

**DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE****1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

**doktor nauk biologicznych**  
*dyscyplina: biologia*

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie:  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)  
Uniwersytetu Łódzkiego,  
Łódź, kwiecień 2000

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** *„Wytwarzanie białek MCP-1/JE i MCP-5 przez komórki makrofagowe myszy pod wpływem działania czynników bakteryjnych”*

**magister biologii**  
*dyscyplina: biologia*  
*specjalność: mikrobiologia*

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie:  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)  
Uniwersytetu Łódzkiego,  
Łódź, czerwiec 1990

**Tytuł pracy magisterskiej:** *„Przeżywalność pałeczek *Listeria innocua* u myszy po przeniesieniu limfocytów syngenicznych dawców uczulanych zabitymi bakteriami”*

**INFORMACJE O ZATRUDNIENIU****1. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

<b>adiunkt 2002 - obecnie</b>	Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii i Immunologii (po reorganizacji Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź
<b>asystent 1990 - 2002</b>	Zakład Immunologii (po reorganizacji Katedra Immunologii), Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki, Łódź

## **TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

- 1. Wskazanie osiągnięcia naukowego\*** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

\*W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie (**załącznik Z7**)

### **„Właściwości immunogenne i immunoprotekcyjne białek ROP2, ROP4, GRA4 i SAG1 *Toxoplasma gondii*”**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl sześciu oryginalnych publikacji naukowych oraz jedna praca przeglądowa. Powyższe prace zostały przedstawione w Tabeli 1.

## PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

**Tabela 1.** Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	punkty MNIŚW
<b>Publikacje oryginalne</b>			
1.	<b>Dziadek, B.</b> , Dzitko, K., Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> binds human lactoferrin but not transferrin. <i>Exp Parasitol</i> <b>2005</b> ; 110:165-67.	<b>1,306</b>	<b>25</b>
2.	<b>Dziadek, B.</b> , Dziadek, J., Długońska, H. Identification of <i>Toxoplasma gondii</i> proteins binding human lactoferrin: A new aspect of rhoptry proteins function. <i>Exp Parasitol</i> <b>2007</b> ; 115(3):277-82.	<b>1,6</b>	<b>25</b>
3.	<b>Dziadek, B.</b> , Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., Długonska, H. <i>Toxoplasma gondii</i> : The immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. <i>Exp Parasitol</i> <b>2009</b> ; 123(1):81-89.	<b>1,773</b>	<b>25</b>
4.	Gatkowska, J., <b>Dziadek, B.</b> , Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., Długońska, H. Determination of diagnostic value of <i>Toxoplasma gondii</i> recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model. <i>Pol J Microbiol</i> <b>2010</b> ; 59(2):137-41.	<b>0,66*</b>	<b>15</b>
5.	<b>Dziadek, B.</b> , Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., Grzybowski, M., Długonska, H. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of <i>Toxoplasma gondii</i> in murine models of experimental toxoplasmosis. <i>Vaccine</i> <b>2011</b> ; 29:821–30.	<b>3,766</b>	<b>30</b>
6.	<b>Dziadek, B.</b> , Gatkowska, J., Grzybowski, M., Dziadek, J., Dzitko, K., Długonska, H. <i>Toxoplasma gondii</i> : The vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. <i>Exp Parasitol</i> <b>2012</b> ; 131(1):133-38.	<b>2,154</b>	<b>25</b>
<b>Publikacja przeglądowa</b>			
7.	<b>Dziadek, B.</b> , Brzostek, A. Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis: What's next? <i>Bioengineered</i> <b>2012</b> ; 3(6):1-7.	n/d	n/d
<b>sumaryczny IF (*zgodnie z rokiem publikacji z wyjątkiem pozycji nr 4-IF 2011) oraz punkty MNIŚW<sub>2014</sub>:</b>		<b>11,259</b>	<b>145</b>

## **OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH PRZEDŁOŻONYCH DO OCENY**

### **WPROWADZENIE**

Kosmopolityczny pierwotniak *Toxoplasma gondii*, czynnik etiologiczny toksoplazmozy, jest obligatoryjnym wewnątrzkomórkowym pasożytem człowieka i wielu gatunków zwierząt endotermicznych. Badania epidemiologiczne wskazują, iż jedna trzecia populacji ludzi na świecie, około 25-30%, jest zarażonych tym pasożytem. Prewalencja toksoplazmozy charakteryzuje się bardzo dużym zróżnicowaniem regionalnym, determinowanym głównie przez: a) czynniki klimatyczne, b) występowanie tej inwazji pasożytniczej u zwierząt hodowlanych przeznaczonych do konsumpcji oraz c) zwyczaje żywieniowe panujące na danym terenie, i może wahać się od 10 do 80% nie tylko w obrębie jednego kraju, ale również pomiędzy różnymi społecznościami zamieszkującymi na danym obszarze. Wysoki poziom prewalencji zarażeń wywoływanych przez *T. gondii* stał się podstawą do klasyfikowania toksoplazmozy jako trzeciej, równorzędnej w stosunku do salmonellozy i kamylobakteriozy, infekcji rozprzestrzeniającej się drogą pokarmową [1, 2].

Kluczowym czynnikiem warunkującym wysoki poziom transmisji *T. gondii* pomiędzy żywicielami jest występowanie w cyklu rozwojowym tego pierwotniaka trzech postaci życiowych, sporozoitów (w oocystach), bradyzoitów (w cystach tkankowych) i tachyzoitów, będących jednocześnie formami inwazyjnymi tego pasożyta. Sporozoity są formami zamkniętymi w sporocystach, które z kolei, w liczbie dwóch, zlokalizowane są w obrębie jednej oocysty. Produkcja oocyst jest wynikiem rozmnażania płciowego zachodzącego w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego zwierząt z rodziny kotowatych (*Felidae*), jedynych znanych ostatecznych żywicieli *Toxoplasma*. Po wydaleniu wraz z kałem, odporne na niesprzyjające warunki środowiska zewnętrznego, oocysty podlegają procesowi dojrzewania (sporulacji) prowadzącemu do powstania sporozoitów i stają się w pełni inwazyjne zarówno dla żywicieli pośrednich, jak i ostatecznych. Do

powstawania dwóch pozostałych postaci inwazyjnych *T. gondii*, tachyzoitów i bradyzoitów, dochodzi w trakcie cyklu rozmnażania bezpłciowego przebiegającego u żywicieli pośrednich, a ich obecność charakteryzuje, odpowiednio, ostrą lub przewlekłą postać toksoplazmozy. Po wnikięciu, z zakażoną żywnością lub wodą, do przewodu pokarmowego żywiciela pośredniego, zarówno cysty tkankowe, jak i oocysty pękają w świetle jelita cienkiego, co prowadzi do uwolnienia bradyzoitów lub sporozoitów, które penetrują komórki nabłonkowe i różnicują się w szybko dzielące się tachyzoity. Inwazyjne tachyzoity namnażają się wewnątrzkomórkowo w obrębie tworzonej przez *Toxoplasma* unikalnej wakuoli pasożytniczej, niepodlegającej fuzji z endosomami i lizosomami komórek żywiciela, i wraz z fagocytami, drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych, przedostają się do innych tkanek. Pod wpływem prawidłowo funkcjonujących mechanizmów odpowiedzi immunologicznej organizmu żywiciela, które ograniczają niekontrolowane wewnątrzkomórkowe namnażanie pasożyta oraz jego rozprzestrzenianie się na nowe tkanki i narządy, tachyzoity przekształcają się w spoczynkowe bradyzoity, które zostają zamknięte w cystach tkankowych wykazujących, podobnie do tachyzoitów, tropizm do tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej, mięśnia sercowego, gałki ocznej i ośrodkowego układu nerwowego. Cysty tkankowe są formami latentnymi w cyklu rozwojowym *T. gondii* i mogą zasiedlać ww. tkanki i organy przez cały okres życia żywiciela, stanowiąc w przypadku obniżenia odporności źródło reaktywacji toksoplazmozy [3, 4].

Ogólnoswiatowy (z wyjątkiem regionów biegunowych i podbiegunowych) charakter inwazji wywoływanych przez *T. gondii*, szerokie spektrum zarażonych żywicieli oraz transmisja pasożyta nie tylko pomiędzy żywicielem ostatecznym i pośrednim, ale także pomiędzy żywicielami pośrednimi czyni toksoplazmozę ważnym problemem klinicznym i weterynaryjnym. U osób ze sprawnym układem odpornościowym zarażenie tym patogenem przebiega w 80% przypadków bezobjawowo lub skąpo objawowo, z ograniczonymi nieswoistymi zmianami patologicznymi manifestującymi się w postaci limfadenopatii, której może towarzyszyć

gorączka, bóle mięśniowe oraz ból gardła. Pierwotna inwazja *T. gondii* u tych osób indukuje silną odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i humoralnego, która warunkuje rozwój nie tylko trwałej immunoprotekcji, ale również utrzymującej się przez cały okres życia żywiciela przewlekłej inwazji pasożytniczej. Gwałtowny rozwój zarażenia, nierzadko zakończony śmiercią, obserwuje się natomiast u chorych cierpiących na niedobory immunologiczne (np. chorzy na AIDS), pacjentów z chorobą nowotworową i pacjentów traktowanych immunosupresorami (np. biorcy przeszczepów), u których przyczyną rozwoju ostrej toksoplazmozy jest najczęściej reaktywacja wcześniejszego zarażenia pierwotnego. Rozwój ostrej toksoplazmozy u chorych z obniżoną odpornością może być przyczyną zapalenia mózgu (objawiającego się bólem głowy, otępieniem, bezładem, niedowładem połowicznym, utratą pamięci, drgawkami, a nawet śpiączką), zapalenia mięśnia sercowego, zapalenia płuc, zapalenia wątroby, powiększenia śledziony, zapalenia wielomięśniowego, zapalenia skórno-mięśniowego, zapalenia naczyń i siatkówki oka oraz wielonarządowych zmian patologicznych. Istotny problem kliniczny stanowi także toksoplazmoza wrodzona będąca następstwem pierwotnego zarażenia kobiety ciężarnej i wertykalnej transmisji tachyzoitów pasożyta przez barierę łożyskową do rozwijającego się płodu o obniżonej fizjologicznej odporności. Toksoplazmoza wrodzona może prowadzić do spontanicznych poronień, obumierania płodu w macicy, a także jego poważnych wad wrodzonych takich, jak wodogłowie, małogłowie, zwapnienia śródczaszkowe, zapalenie naczyń i siatkówki oka, martwica siatkówki, zapalenie nerwu ocznego oraz niedorozwój psychiczny [2, 5].

Z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej, zarażenia *T. gondii* u zwierząt hodowlanych stanowią istotny problem ekonomiczny, gdyż są przyczyną poronień płodów zwierzęcych oraz spadku liczby urodzeń zwierząt hodowlanych na farmach. Ponadto, podobnie do oocyst zanieczyszczających glebę, wodę, owoce i warzywa, cysty tkankowe obecne w przeznaczonym do konsumpcji mięsie zwierząt hodowlanych są uważane za główne źródło horyzontalnej transmisji *T. gondii* do ludzi [1, 5].

Ogromne znaczenie kliniczne i socjoekonomiczne toksoplazmozy, a także fakt, iż dostępne farmaceutyki przeciw pasożytnicze (np. pirymetamina, sulfadiazyna) są nieskuteczne w leczeniu przewlekłego zarażenia *T. gondii* oraz nierzadko wykazują silne działania uboczne, przyczyniły się do podjęcia wielu badań eksperymentalnych zmierzających do skonstruowania profilaktycznej szczepionki przeciwko toksoplazmozie. Obecnie jedynym stosowanym, w Europie i Nowej Zelandii, preparatem szczepionkowym jest „Toxovax” zawierający atenuowane tachyzoity szczepu mutanta S48 *T. gondii*. Szczepionka ta przyczynia się do obniżenia częstości poronień u owiec, ale nie zapobiega wertykalnej transmisji pasożyta. Ponadto, ze względu na indukowanie krótkotrwałego zarażenia u zaszczepionego osobnika oraz prawdopodobieństwo rewersji atenuowanego szczepu mutanta w formę zjadliwą, nie może być ona stosowana w profilaktyce toksoplazmozy u ludzi [6-8].

### **OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO (z podaniem, dla każdego etapu przedstawianej pracy celu, osiągnięć i możliwych zastosowań)**

Celem przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego była konstrukcja doświadczalnej profilaktycznej szczepionki przeciwko toksoplazmozie oraz ocena jej działania immunogennego, a także ochronnego przy użyciu modelu toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych. Przesłanką do podjęcia takiego zadania badawczego było nie tylko wzrastające kliniczne i socjoekonomiczne znaczenie toksoplazmozy, ale przede wszystkim udokumentowany fakt rozwoju trwałej, indukowanej pierwotnym zarażeniem *T. gondii*, swoistej odporności protekcyjnej wskazującej na realną możliwość konstrukcji efektywnych narzędzi immunoprofilaktycznych. Ze względu na wysokie standardy bezpieczeństwa stawiane preparatom szczepionkowym stosowanym w immunoprofilaktyce ludzi zdecydowano się na opracowanie szczepionki podjednostkowej, która zawierałaby oczyszczone, natywne lub rekombinantowe białka *T. gondii*.

Realizację głównego celu podjętych badań rozpoczęto od wytypowania białek pasożyta, które stanowiłyby kluczowy element preparatu



szczepionkowego, determinujący jego skuteczne działanie immunogenne i immunoprotekcyjne. Ponieważ antygeny szczepionkowe powinny stymulować mechanizmy odpornościowe interferujące z kluczowymi funkcjami biologicznymi danego pasożyta, prowadząc do zniesienia jego patogenności i całkowitej eliminacji z organizmu żywiciela, w poszukiwaniu spełniających powyższe kryteria antygenów *T. gondii* postanowiono zwrócić szczególną uwagę na białka pasożyta zaangażowane w pobieranie jonów żelaza związanego z ludzką transferyną i/lub laktoferyną. Poprzez udział w wielu funkcjach fizjologicznych komórek takich jak transport tlenu i elektronów, synteza DNA i RNA, przemiany energetyczne zachodzące w mitochondriach oraz procesy detoksyfikacyjne, żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania prawie wszystkich żywych organizmów. W przypadku drobnoustrojów patogennych dostęp do jonów żelaza jest czynnikiem warunkującym ich wzrost i tym samym decydującym o ich patogenności. U człowieka obecna w surowicy transferyna oraz występująca w wydzielinach błon śluzowo-surowiczych laktoferyna, charakteryzujące się wysokim powinowactwem wiązania jonów żelazowych, stanowią główny zewnątrzkomórkowy rezerwuár żelaza i odpowiedzialne są za jego wychwytywanie, transport i dostarczanie do aktywnych metabolicznie komórek. Ponadto transferyna i laktoferyna, wraz z ferrytyną, hemosyderyną, haptoglobina, hemopeksyną, ferroportyną, hepcydyną oraz transporterem metali dwuwartościowych, odgrywają kluczową rolę w mechanizmach ograniczających wnikającym patogenom dostęp do wolnych jonów żelaza [9, 10]. W toku ewolucji pasożytnicze pierwotniaki, podobnie jak inne drobnoustroje patogene, wykształciły jednak szereg mechanizmów umożliwiających im pobieranie jonów żelaza związanego z białkami nośnikowymi ssaków. Jednym z tych mechanizmów jest obecność receptorów dla występujących u żywicieli białek wiążących jony żelaza [9, 11-15]. Obecność takich białek receptorowych u *T. gondii* sugerowały badania wskazujące, iż tachyzoity pasożyta charakteryzują się zdolnością wiązania bydłęcej laktoferyny, transferyny, a także owotransferyny poprzez wspólny receptor, który został zidentyfikowany jako białko błonowe o masie

cząsteczkowej 42 kDa [16]. Dodatkowo, istotne znaczenie jonów żelaza dla replikacji *Toxoplasma* w komórkach żywiciela potwierdziły badania wskazujące, iż mechanizmem odpowiedzialnym za ograniczenie wewnątrzkomórkowego wzrostu pasożyta w szczurzych enterocytach stymulowanych homologicznym rekombinantowym interferonem- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) jest ograniczanie przez te komórki dostępu do wewnątrzkomórkowego żelaza [17].

### **Etap I**

#### **Cel:**

**Określenie zdolności wiązania ludzkiej laktoferyny i/lub transferyny przez *T. gondii***

Zmierzając do identyfikacji białek *T. gondii* zaangażowanych w pobieranie żelaza, w pierwszym etapie pracy postanowiono określić zdolność wiązania ludzkiej laktoferyny i transferyny przez żywe tachyzoity tego pierwotniaka (**praca nr 1**). W badaniach wykorzystano, otrzymany z Instytutu Mikrobiologii Lekarskiej i Wirusologii Uniwersytetu w Düsseldorfie, niewytwarzający cyst tkankowych, wysoce zjadliwy szczep BK *T. gondii* zaliczany do genotypu I. Tachyzoity pierwotniaka propagowano *in vitro*, w hodowli fibroblastów myszy linii L929 i każdorazowo, przed przystąpieniem do wiązania transferyn, oczyszczano stosując filtry nitrocelulozowe. W celu oceny zdolności wiązania ludzkiej laktoferyny i transferyny, komórki *T. gondii* inkubowano z ludzką hololaktoferyną, holotransferyną i apotransferyną, a obecność białek związanych z toksoplazmami oceniano przy użyciu zmodyfikowanej klasycznej metody immunoenzymatycznej, jaką jest test cELISA (cellular ELISA). Związane z tachyzoitami *Toxoplasma* badane białka ludzkie wykrywano stosując królicze przeciwciała swoiście skierowane przeciwko ludzkiej laktoferynie lub transferynie oraz kozie przeciwciała skierowane przeciwko immunoglobulinom klasy IgG królika znakowane peroksydazą chrzanową. Komórkami kontrolnymi stosowanymi w doświadczeniach były tachyzoity inkubowane w buforze bez dodatku ludzkich transferyn. Przeprowadzone badania wykazały, iż żywe tachyzoity

szczepu BK *T. gondii* wiąże ludzką hololaktoferynę, natomiast nie wykazują zdolności wiązania zarówno ludzkiej holotransferyny, jak i apotransferyny. Ponadto zaobserwowano wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ilością związanej przez toksoplazmy hololaktoferyny a stężeniem końcowym tego białka, użytym w przeprowadzonych badaniach. Wiązanie ludzkiej hololaktoferyny przez żywe tachyzoity *T. gondii* potwierdzono stosując technikę fluorescencji bezpośredniej, z wykorzystaniem znakowanego izotiocyjanianem fluoresceiny białka ludzkiego. Dodatkowo, otrzymane w badaniach z wykorzystaniem żywych tachyzoitów wyniki zweryfikowano stosując jako źródło białek *T. gondii* surowy preparat antygenowy TLA (Toxoplasma Lysate Antigen), otrzymany z tachyzoitów tego pierwotniaka. Do oceny wiązania ludzkich transferyn przez białka obecne w preparacie TLA zastosowano technikę dot-ELISA polegającą na wiązaniu ludzkiej hololaktoferyny, holotransferyny i albuminy (kontrola negatywna) do naniesionych na membrany nitrocelulozowe białek otrzymanych z tachyzoitów *Toxoplasma*, a następnie wykrywaniu związanych z TLA ludzkich transferyn przy użyciu przeciwciał stosowanych w teście cELISA. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż surowy preparat antygenowy TLA, podobnie jak żywe tachyzoity pasożyta, wiąże wyłącznie ludzką hololaktoferynę. W toku prowadzonych doświadczeń oceniono także swoistość wiązania ludzkiej hololaktoferyny przez białka *T. gondii* wykorzystując w tym celu preparat antygenowy TLA oraz znakowaną biotyną hololaktoferynę ludzką. Badania swoistości wiązania ludzkiej hololaktoferyny przeprowadzono stosując test kompetycji, który polega na konkurencyjnym wiązaniu homologicznego znakowanego i użytego w nadmiarze nieznakowanego białka do swobodnego receptora, co w konsekwencji prowadzi do hamowania wiązania białka znakowanego. Przeprowadzony test kompetycji wykazał, iż wiązanie ludzkiej hololaktoferyny przez białka *Toxoplasma* ma charakter swoisty, ponieważ jest ono hamowane wyłącznie przez nadmiar homologicznego białka nieznakowanego, a nie w obecności nadmiaru nieznakowanej holotransferyny lub apotransferyny. Udokumentowane w przeprowadzonych badaniach swoiste wiązanie ludzkiej

hololaktoferyny przez tachyzoity *T. gondii* może sugerować, iż pasożyt ten posiada swoiste receptory błonowe zaangażowane w pozyskiwanie jonów żelaza związanych z tym ludzkim białkiem. Wykorzystywanie hololaktoferyny, a nie holotrasferyny, jako źródła jonów żelaza, może być związane z naturalną, pokarmową drogą wnikania toksoplazmy do organizmów żywicieli i obecnością hololaktoferyny na nabłonkach. Zdolność wiązania hololaktoferyny przez swoiste błonowe białka receptorowe, a także wykorzystywanie jej jako źródła jonów żelaza opisano bowiem u innych pasożytniczych pierwotniaków powodujących inwazje układu pokarmowego (*Entamoeba histolytica*) lub dróg moczopłciowych (*Trichomonas vaginalis*) [9, 15]. Ponadto wskazuje się, iż interakcje białek receptorowych patogenów z hololaktoferyną ich żywicieli mogą nie tylko zapewniać tym pierwszym dostęp do jonów żelaza, ale również ułatwiać ich adhezję do komórek docelowych, której koniecznym elementem jest z kolei wiązanie hololaktoferyny przez swoiste dla niej receptory występujące na powierzchni wielu komórek organizmów wyższych [18].

**Osiągnięcia:**

- 1. Wykazanie po raz pierwszy zdolności wiązania ludzkiej hololaktoferyny przez *T. gondii*.**
- 2. Wykazanie swoistości wiązania ludzkiej hololaktoferyny przez *T. gondii*, sugerującej obecność u tego pasożyta swoistego białka/białek receptorowych wiążących ww. białko ludzkie.**
- 3. Opracowanie oraz optymalizacja warunków wszystkich technik i metod stosowanych na tym etapie pracy, z wyjątkiem techniki znakowania hololaktoferyny ludzkiej biotyną wykonanej zgodnie z procedurą podaną przez Tanaka i wsp. [16].**

**Możliwe zastosowanie:**

- 1. Dalsza identyfikacja białka/białek receptorowych *T. gondii* zaangażowanych w wiązanie ludzkiej hololaktoferyny.**
- 2. Badanie mechanizmów pobierania żelaza przez *T. gondii*.**

**3. Opracowanie nowych metod terapeutycznych interferujących z wiązaniem przez *T. gondii* ludzkiej hololaktoferyny, będącej potencjalnym źródłem jonów żelaza niezbędnych dla tego pasożytniczego pierwotniaka.**

**Etap II**

**Cel:**

**Identyfikacja białka/białek *T. gondii* wiążących ludzką hololaktoferynę**

Kolejnym zadaniem badawczym realizowanym w ramach przedstawianego cyklu publikacji, była identyfikacja błonowych białek receptorowych *T. gondii* zaangażowanych w wiązanie ludzkiej hololaktoferyny (**praca nr 2**). Faza wstępna tego etapu pracy polegała na opracowaniu i optymalizacji warunków metody izolacji białek błonowych pasożyta oraz techniki chromatografii powinowactwa stosowanej do swobodnego wyodrębnienia poszukiwanego białka/białek przy użyciu złoża opłaszczanego ligandem, którym była ludzka hololaktoferyna. Przygotowane procedury pozwoliły na wyizolowanie trzech białek, o masach cząsteczkowych 74, 63 i 58 kDa, których zdolność do swobodnego wiązania ludzkiej hololaktoferyny została potwierdzona w teście kompetycji z zastosowaniem znakowanego białkiem ludzkiego białka. Przeprowadzona analiza wykazała, iż tylko dwa białka, o masach cząsteczkowych 63 i 58 kDa, swobodnie wiążą ludzką hololaktoferynę, natomiast białkiem o masie cząsteczkowej 74 kDa jest najprawdopodobniej uwolniona ze złoża chromatograficznego hololaktoferyna ludzka użyta w charakterze liganda w technice chromatografii powinowactwa. Wykonane w dalszej części prowadzonych badań określenie sekwencji aminokwasowej przy użyciu techniki spektrometrii masowej ESI/MS/MS jako metody analitycznej oraz analiza porównawcza otrzymanych sekwencji z dostępnymi bazami danych umożliwiły identyfikację poszukiwanych białek o masach cząsteczkowych 63 i 58 kDa, jako antygenów roptrii, odpowiednio, ROP4 i ROP2, *T. gondii*. Oba

zidentyfikowane białka należą do spokrewnionej antygenowo rodziny ROP2 białek roptrii toksoplazmy, które są organellami wydzielniczymi zlokalizowanymi w apikalnej części komórki pierwotniaka. Białka ROP2 i ROP4 zaliczane są do pseudokinaz, które nie wykazują aktywności katalitycznej, natomiast posiadają funkcjonalne miejsce wiązania liganda, co warunkuje pełnienie przez nie funkcji biologicznych [19-21]. W cząsteczkach białek ROP2 i ROP4 wyróżnia się segment przezbłonowy oraz część N-końcową o charakterze kwaśnym i część C-końcową o charakterze zasadowym, a stosunkowo duża liczba kwaśnych aminokwasów budujących te białka może mieć istotne znaczenie dla ich interakcji z ligandami [22, 23]. Ponadto oba białka roptrii zaangażowane są w tworzenie wakuoli pasożytniczej i modulowanie właściwości funkcjonalnych otaczającej ją błony (np. tworzenie porów w błonie), która stanowi barierę między wewnątrzkomórkowo namnażającymi się tachyzoitami a cytoplazmą komórki docelowej, chroniąc pasożyta przed niekorzystnym wpływem białek żywiciela. Uważa się, że błona wakuoli pasożytniczej bierze udział w pozyskiwaniu przez *Toxoplasma* składników odżywczych, gdyż pełni ona funkcję sita molekularnego, umożliwiając dwukierunkowy przepływ substancji – składników odżywczych do wnętrza wakuoli oraz szkodliwych produktów metabolizmu pierwotniaka do cytoplazmy komórki żywiciela [24-27]. Mimo iż bierny przepływ hololaktoferyny przez błonę wakuoli pasożytniczej wydaje się być mało prawdopodobny, to nie można wykluczyć, iż jest ona aktywnie transportowana do wnętrza wakuoli przy udziale białek takich jak antygeny roptrii ROP2 i ROP4. Wydzielane w trakcie inwazji komórki żywiciela oba te białka szybko lokalizują się w błonie wakuoli pasożytniczej przyjmując charakterystyczną orientację, z częścią N-końcową skierowaną do cytoplazmy zarazanej komórki, co może odgrywać istotną rolę w tworzeniu połączeń z organellami cytoplazmatycznymi komórki żywiciela takimi jak mitochondria oraz retikulum endoplazmatyczne i, tym samym, mieć istotne znaczenie w procesie pobierania składników pokarmowych niezbędnych dla pasożyta [22, 28-30]. Z drugiej strony, zdolność zewnątrzkomórkowych tachyzoitów *T. gondii* do wiązania ludzkiej hololaktoferyny może sugerować

istnienie dodatkowych mechanizmów zaangażowanych w wiązanie tego ludzkiego białka. Taką funkcję mogłyby pełnić np. białka pasożyta wydzielane do otaczającego go środowiska i przypominające pod względem aktywności funkcjonalnej produkowane przez bakterie siderofory.

**Osiągnięcia:**

1. Identyfikacja antygenów roptrii ROP2 i ROP4 *T. gondii* jako białek zaangażowanych w wiązanie ludzkiej hololaktoferyny.
2. Opracowanie oraz optymalizacja warunków wszystkich technik i metod stosowanych na tym etapie pracy.

**Możliwe zastosowanie:**

1. Badanie mechanizmów wiązania ludzkiej hololaktoferyny i jonów żelaza przez białka roptrii ROP2 i ROP4 *T. gondii*.
2. Identyfikacja epitopów antygenów ROP2 i ROP4 *T. gondii* wiążących ludzką hololaktoferynę.
3. Identyfikacja i badanie mechanizmów zaangażowanych w wiązanie ludzkiej hololaktoferyny przez zewnątrzkomórkowo położone tachyzoity *T. gondii*.
4. Opracowanie, zarówno nowych narzędzi terapeutycznych, jak i profilaktycznych interferujących z aktywnością funkcjonalną białek ROP2 i ROP4 *T. gondii*.

**Etap III****Cel:**

Ocena właściwości immunogennych i immunoprotekcyjnych doświadczalnej podjednostkowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie, zawierającej, jako antygeny, rekombinantowe formy białek rROP2 i rROP4 *T. gondii*

Następnym etapem prowadzonych badań była konstrukcja podjednostkowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie (**praca nr 3**),

zawierającej jako antygeny szczepionkowe białka roptrii ROP2 i ROP4 *T. gondii* oraz ocena zarówno jej właściwości immunogennych, jak i immunoprotekcyjnych przy użyciu modelu doświadczalnej, przewlekłej toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych. Przesłanką do wykorzystania białek ROP2 i ROP4 jako antygenów szczepionkowych była nie tylko, wykazana w etapie II prezentowanej pracy, ich zdolność do wiązania ludzkiej laktoferyny, sugerująca ich związek z mechanizmami pobierania żelaza przez pasożyta, ale również fakt obecności tych antygenów u wszystkich trzech postaci inwazyjnych *Toxoplasma*, tachyzoitów, bradyzoitów i sporozoitów [31, 32], co ma istotne znaczenie dla indukowania pełnego efektu ochronnego przez preparat immunoprofilaktyczny. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, oba białka uczestniczą w tworzeniu wakuoli pasożytniczej, modulują funkcje biologiczne błony tej wakuoli oraz odpowiedzialne są za tworzenie połączeń z mitochondriami komórek docelowych, co ma fundamentalne znaczenie dla procesu inwazji komórek żywiciela przez tego pasożytniczego pierwotniaka. Dodatkowo, białko ROP2 wchodzi również w interakcje z retikulum endoplazmatycznym zarazonej komórki, a jego obecność jest niezbędna nie tylko dla procesu penetracji komórki żywiciela przez *T. gondii*, ale również dla wewnątrzkomórkowego wzrostu tego pasożyta [30, 33]. Obecność przeciwciał swoistych dla antygeny ROP2 stwierdza się w znacznej większości surowic pochodzących od osób seropozytywnych w kierunku *Toxoplasma*, a w cząsteczce tego antygeny występują trzy epitopy rozpoznawane przez limfocyty T, z których jeden jest swoście rozpoznawany przez 64% surowic osobników seropozytywnych [34-36]. Ponadto, immunizacja myszy zarówno antygenem ROP2, jak i ROP4, prowadzi do produkcji wysokiego miana swoistych przeciwciał, które obecne są w surowicy oraz wydzielinach błon śluzowo-surowicznych [37].

Mając na uwadze aktywność funkcjonalną oraz właściwości antygenowe i immunogenne białek roptrii ROP2 i ROP4 postanowiono zastosować je jako antygeny szczepionkowe. W tym celu na wstępie tego etapu pracy opracowano optymalne warunki klonowania genów *rop2* i *rop4* oraz ekspresji i oczyszczania rekombinantowych białek rROP2 i rROP4. Oba



geny sklonowano w wektorze ekspresyjnym pHis, a rekombinantowe białka poddawano ekspresji w komórkach szczepu *Escherichia coli* BL21 (DE3). Do sekwencji części N-końcowej każdego z białek wprowadzono dodatkowo domeny zbudowane z sześciu histydyn (domeny 6-His-tag), umożliwiające ich dalsze oczyszczenie z zastosowaniem techniki chromatografii powinowactwa przy użyciu komercyjnego złoża wysyczonego jonami niklu ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Przed wykorzystaniem białek rROP2 i rROP4 w formie szczepionki oceniono, w warunkach *in vitro*, wpływ różnych stężeń swoistych dla nich przeciwciał (anty-rROP2 i anty-rROP4) na inwazję fibroblastów myszy linii L929 przez tachyzoity szczepu BK *T. gondii* oraz na wewnątrzkomórkowy wzrost komórek toksoplazm. W doświadczeniach wykorzystano oczyszczone królicze immunoglobuliny klasy IgG otrzymane po immunizacji królików rekombinantowym białkiem rROP2 lub rROP4. Zarówno przeciwciała anty-rROP2, jak i anty-rROP4 przyczyniły się do statystycznie znamiennego zahamowania wewnątrzkomórkowego wzrostu *Toxoplasma* w komórkach żywiciela, ale najmniejszą liczbę żywych tachyzoitów pierwotniaka (54% zahamowania wewnątrzkomórkowego wzrostu) obserwowano w hodowlach z dodatkiem obu tych przeciwciał o stężeniu końcowym każdego z nich 50  $\mu\text{g/ml}$ . Biorąc pod uwagę zaobserwowany wpływ przeciwciał anty-rROP2 i anty-rROP4 na wewnątrzkomórkowy wzrost *T. gondii* oraz dodatkowo wyniki przeprowadzonych badań wstępnych, które wykazały, iż immunizacja myszy jednoskładnikową szczepionką zawierającą rekombinantowe białko rROP2 lub rROP4 nie indukuje działania ochronnego przed zarażeniem wytwarzającym cysty szczepem DX *T. gondii*, w dalszej części przystąpiono do określenia właściwości immunogennych i immunoprotekcyjnych dwuskładnikowej, podjednostkowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie zawierającej oba rekombinantowe białka pasożyta. Antygeny rROP2 i rROP4 podawano podskórnym myszom szczepu C3H/HeJ (haplotyp H-2<sup>k</sup>), o genetycznie warunkowanej średniej wrażliwości na toksoplazmozę, łącznie z adiuwantem Freund, który jest powszechnie stosowanym adiuwantem doświadczalnym preferencyjnie pobudzającym powstawanie komórek plazmatycznych, a tym samym typ Th2 odpowiedzi immunologicznej. Wybór

myszy laboratoryjnych jako modelu doświadczalnego wynikał nie tylko z faktu, że są one naturalnymi żywicielami *T. gondii*, ale również stąd, że dostępna jest bogata kolekcja szczepów wsobnych o zdefiniowanej i zróżnicowanej wrodzonej odporności na toksoplazmozę.

Ocena właściwości immunogennych i immunoprotekcyjnych użytej do immunizacji dwuskładnikowej szczepionki wykazała, iż indukuje ona silną odpowiedź typu humoralnego i komórkowego oraz umiarkowany efekt ochronny. Stymulacja mechanizmów humoralnych manifestowała się w postaci mieszanej odpowiedzi immunologicznej typu Th1/Th2 i wytwarzania surowicznych antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG, zarówno izotypu IgG1, jak i IgG2a. Dominującym wśród immunoglobulin klasy IgG anty-rROP2 i anty-rROP4 był jednak izotyp IgG1 charakteryzujący odpowiedź immunologiczną typu Th2. Mimo iż rola mechanizmów humoralnych w odporności protekcyjnej przeciwko zarażeniu *T. gondii* nie jest do końca wyjaśniona, to produkcja antygenowo swoistych przeciwciał, będąca wynikiem immunizacji, ma istotne znaczenie ze względu na ich działanie wspomagające związane z ograniczaniem adhezji pasożyta do komórek docelowych oraz ułatwianiem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego zabijania opłaszczonych przez przeciwciała komórek toksoplazm przy udziale, odpowiednio, dopełniacza lub makrofagów [38-40].

Kluczową rolę w odporności protekcyjnej przeciwko zarażeniu *T. gondii* odgrywają wrodzone i nabyte mechanizmy komórkowe odpowiedzi immunologicznej. Istotnym elementem tych mechanizmów jest produkcja IL-12 przez monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne i neutrofile oraz cytokin typu Th1 przez limfocyty T. Interleukina-12 stymuluje syntezę IFN- $\gamma$  przez komórki NK, a także limfocyty Th1 CD4<sup>+</sup> i cytotoksyczne limfocyty T CD8<sup>+</sup>, będące głównymi komórkami efektorowymi odporności protekcyjnej. Ponadto, aktywowane limfocyty T CD4<sup>+</sup> produkują IL-2 będącą ważnym mitogenem limfocytów T [41]. Na podstawie oceny produkcji cytokin, a także proliferacji komórek śledziony stwierdzono, iż w przeciwieństwie do białka rROP2, stymulacja splenocytów immunizowanych myszy rekombinantowym białkiem rROP4, a także surowym preparatem antygenowym TLA (źródło natywnych

form białek *Toxoplasma*) prowadzi do statystycznie znamiennego podwyższenia *in vitro* produkcji cytokin prozapalnych typu Th1, IFN- $\gamma$  i IL-2, oraz znamienne nasilonej, antygenowo swoistej proliferacji tych komórek. Natomiast, wszystkie z badanych białek, rROP2, rROP4 i TLA, przyczyniały się do statystycznie znamiennego podwyższenia poziomu syntezy IL-2. Przeprowadzone badania pokazały, iż immunizacja myszy C3H/HeJ antygenami rROP2 i rROP4 prowadzi do rozwoju mechanizmów odpornościowych typu komórkowego, które indukowane są nie tylko przez rekombinantowe formy antygenów szczepionkowych, ale również przez będący źródłem natywnych form białek pasożyta antygen TLA, co ma istotne znaczenie dla działania immunoprotekcyjnego preparatu szczepionkowego. Dodatkowo, po raz pierwszy wykazano, iż oprócz stosowanego wielokrotnie w badaniach antygenu ROP2, również białko ROP4 *T. gondii* jest obiecującym antygenem w kontekście badań dotyczących opracowania skutecznej szczepionki przeciwko toksoplazmozie.

Ponieważ głównym celem profilaktycznej immunizacji jest indukcja protekcji przeciwko danemu patogenowi, działanie ochronne badanej doświadczalnej szczepionki oceniano u myszy immunizowanych, którym podano drogą dootrzewnową cysty szczepu DX *T. gondii*. Przeprowadzona ocena liczby cyst tkankowych w mózгах zwierząt immunizowanych i kontrolnych wykazała, że immunizacja myszy szczepu C3H/HeJ dwuskładnikową szczepionką rROP2+rROP4 indukuje umiarkowany efekt ochronny przed zarażeniem cystotwórczym szczepem DX pasożyta, przejawiający się jako 46% obniżenie liczby cyst w mózгах zwierząt immunizowanych.

Wyniki tego etapu pracy pokazały, że strategia wykorzystania rekombinantowych białek rROP2 i rROP4 jako składników szczepionkowych jest bardzo obiecująca ze względu na silną stymulację antygenowo swoistych mechanizmów humoralnych i komórkowych odpowiedzi immunologicznej. Jednocześnie wykazano, iż immunizacja myszy laboratoryjnych jednoskładnikowym lub dwuskładnikowym preparatem szczepionkowym jest

niewystarczająca dla uzyskania pełnego działania ochronnego przed zarażeniem *T. gondii*.

Dysponując oczyszczonymi rekombinantowymi białkami rROP2 i rROP4 wykorzystano je również do oceny ich ewentualnej przydatności diagnostycznej (**praca nr 4**). Ze względu na bezobjawowy przebieg zarażenia *T. gondii* u znacznej większości osobników z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, diagnostyka toksoplazmozy ma z reguły charakter retrospektywny i ma na celu określenie statusu serologicznego badanego osobnika. Technikami powszechnie stosowanymi w diagnostyce zarażeń *Toxoplasma* są łatwe do wykonania testy immunoenzymatyczne ELISA, w których źródłem antygenów są otrzymywane z tachyzoitów ekstrakty zawierające białka pasożyta. Powoduje to, iż antygen diagnostyczny jest słabo zdefiniowany, gdyż mogą występować różnice pomiędzy zawartością poszczególnych białek *Toxoplasma*, obecnych w preparatach różnych firm produkujących testy diagnostyczne. Co więcej, tachyzoity wykorzystywane do otrzymywania tych ekstraktów propagowane są poprzez wykonywanie pasażu przez myszy lub też ich hodowlę na liniach komórkowych, co stwarza możliwość zanieczyszczenia antygenów diagnostycznych białkami komórek żywicielskich i może być przyczyną otrzymywania wyników fałszywie pozytywnych. Atrakcyjną alternatywą wobec stosowanych obecnie antygenów diagnostycznych są dobrze zdefiniowane białka rekombinantowe, które umożliwiłyby nie tylko określenie statusu serologicznego badanego osobnika (seropozytywny/seronegatywny), ale również różnicowanie między ostrą i przewlekłą toksoplazmozą, co ma szczególne znaczenie w przypadku kobiet ciężarnych i osobników z niedoborami immunologicznymi.

Ocenę przydatności diagnostycznej rekombinantowych białek rROP2 i rROP4 *T. gondii* przeprowadzono przy użyciu surowic myszy zarażonych cystotwórczym szczepem DX pasożyta. Zastosowanie takiego modelu badawczego umożliwiło precyzyjne zdefiniowanie fazy toksoplazmozy i przygotowanie kolekcji surowic pochodzących od osobników z ostrą i przewlekłą postacią tej parazytozy. Badania przeprowadzone z

zastosowaniem wersji pośredniej testu ELISA wykazały, iż oba wydzielnicze białka *Toxoplasma*, ROP2 i ROP4, indukują u zarażonych tym pierwotniakiem myszy silną humoralną odpowiedź immunologiczną, a profil swoistych dla nich przeciwciał zależy od fazy inwazji, ostrej lub przewlekłej. Ponadto stwierdzono, iż otrzymane preparaty rekombinantowych białek rROP2 i rROP4 umożliwiają określenie obecności w badanych surowicach przeciwciał swoistych dla natywnych form tych antygenów. Wskazuje to na możliwość wykorzystania badanych, rekombinantowych białek roptrii w diagnostyce toksoplazmozy u ludzi, gdzie w połączeniu z innymi antygenami pasożyta mogą być użyteczne nie tylko do określenia przynależności badanego osobnika do grupy seropoztywnej lub seronegatywnej, ale także do różnicowania klinicznie istotnej fazy zarażenia.

**Osiągnięcia:**

- 1. Wykazanie po raz pierwszy, iż białko roptrii ROP4 *T. gondii* jest interesującym potencjalnym kandydatem szczepionkowym, indukującym antygenowo swoiste humoralne i komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej.**
- 2. Wykazanie po raz pierwszy immunogennego i częściowego ochronnego działania rekombinantowej, podjednostkowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie zawierającej białka rROP2 i rROP4 *T. gondii*.**
- 3. Wykazanie po raz pierwszy przydatności diagnostycznej rekombinantowego białka rROP4 *T. gondii*.**
- 4. Opracowanie i optymalizacja warunków wszystkich technik i metod zastosowanych na tym etapie pracy.**

**Możliwe zastosowanie:**

- 1. Wykorzystanie rekombinantowych form białek roptrii rROP2 i rROP4 *T. gondii* do konstrukcji wieloskładnikowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie.**
- 2. Wykorzystanie rekombinantowych form białek roptrii rROP2 i rROP4 *T. gondii* do konstrukcji nowych testów diagnostycznych pozwalających**

**nie tylko na różnicowanie między osobnikami seronegatywnymi i seropozytywnymi, ale również na rozróżnienie pomiędzy ostrą a przewlekłą postacią toksoplazmozy.**

#### **Etap IV**

**Cel:**

**Ocena właściwości immunogennych i immunoprotekcyjnych trzech rekombinantowych, podjednostkowych szczepionek przeciwko toksoplazmozie zawierających powierzchniowe i wydzielnicze białka *T. gondii***

Jedną ze strategii prowadzących do zwiększenia działania ochronnego preparatów szczepionkowych jest optymalizacja ich składu antygenowego. Biorąc pod uwagę bardzo szerokie spektrum białek powierzchniowych i wydzielniczych *T. gondii* zaangażowanych w procesy adhezji, inwazji i wewnątrzkomórkowego wzrostu pasożyta postanowiono uzupełnić, zastosowaną w etapie III pracy, dwuskładnikową szczepionkę o antygen powierzchniowy SAG1 (Surface Antigen 1) i/lub wydzielniczy antygen granul o dużej gęstości GRA4 (Dense Granule Antigen 4) *Toxoplasma*.

Antygen SAG1 jest głównym białkiem powierzchniowym tachyzoitów *T. gondii*, stanowiącym prawie 5% wszystkich białek tej postaci inwazyjnej pierwotniaka. Białko to jest istotnym elementem immunogenności i patogenności tachyzoitów, gdyż jego aktywność funkcjonalna wiąże się z udziałem w adhezji komórek toksoplazm do zarażanych komórek docelowych poprzez wchodzenie w interakcje z białkami powierzchniowymi komórek żywicieli. Silne właściwości immunogenne antygenu SAG1, przejawiające się w indukowaniu powstawania antygenowo swoistych przeciwciał u zarażonych *T. gondii* osobników zostały wykorzystane do celów diagnostycznych, a także w badaniach nad doświadczalnymi szczepionkami przeciwko toksoplazmozie [42-44].

Białko granul o dużej gęstości GRA4 *T. gondii* jest obecne u tachyzoitów i bradyzoitów pierwotniaka. Należy ono do rodziny białek wydzielniczych odgrywających istotną rolę w penetracji pasożyta do komórki żywiciela oraz modulowaniu środowiska panującego wewnątrz wakuoli pasożytniczej, przyczyniając się do wewnątrzkomórkowego wzrostu i przeżywania *Toxoplasma* [45]. Ze względu na udokumentowane właściwości immunogenne i częściowe działanie immunoprotekcyjne antygen GRA4 jest interesującym, potencjalnym komponentem szczepionki przeciwko toksoplazmozie [46-48].

W prezentowanych badaniach postanowiono ocenić właściwości ochronne i immunogenne trzech trójskładnikowych, rekombinantowych szczepionek przeciwko toksoplazmozie zawierających antygeny rROP2+rGRA4+rSAG1, rROP2+rROP4+rGRA4 i rROP2+rROP4+rSAG1 *Toxoplasma* (**praca nr 5 i praca nr 6**). Podobnie jak geny *rop2* i *rop4*, geny *sag1* i *gra4* sklonowano w wektorze ekspresyjnym pHis w komórkach *E. coli* BL21(DE3), a oczyszczone przy użyciu techniki chromatografii powinowactwa rekombinantowe białka rSAG1 i rGRA4 zastosowano w prowadzonych badaniach. Każdą z trzech doświadczalnych szczepionek podawano podskórnie myszom laboratoryjnym łącznie z niekompletnym adiuwantem Freund'a. W doświadczeniach przeprowadzonych na tym etapie zastosowano ponownie doświadczalny model przewlekłej toksoplazmozy u myszy oraz dodatkowo trzy szczepy myszy: C57BL/6 (haplotyp H-2<sup>b</sup>), C3H/HeJ (haplotyp H-2<sup>k</sup>) oraz BALB/c (haplotyp H-2<sup>d</sup>) o genetycznie determinowanej, odpowiednio, wysokiej, średniej i niskiej wrażliwości na zarażenie *T. gondii*. Zastosowanie szczepów myszy różniących się naturalną wrażliwością na toksoplazmozę konieczne jest do pełnej oceny właściwości szczepionek doświadczalnych, gdyż pozwala ocenić potencjał immunogenny i ochronny badanych preparatów u osobników zróżnicowanych genetycznie. Ponadto, badania takie stanowią model odzwierciedlający efektywność działania szczepionki w zróżnicowanych genetycznie populacjach żywicieli, w tym w populacji ludzkiej.

Spośród badanych podjednostkowych szczepionek rekombinantowych najsilniejsze działanie immunoprotekcyjne wykazała szczepionka zawierająca antygeny rROP2+rROP4+rSAG1. W mózgach zwierząt laboratoryjnych immunizowanych tym doświadczalnym preparatem obserwowano statystycznie znamienne, silną redukcję liczby cyst tkankowych szczepu *Dx T. gondii*, która wynosiła, odpowiednio, 90% u myszy szczepu C57BL/6, 71% u myszy C3H/HeJ oraz 77% u myszy szczepu BALB/c. Dodatkowo, silne działanie ochronne wynoszące 84% stwierdzono również u myszy szczepu BALB/c immunizowanych szczepionką zawierającą białka rROP2+rROP4+rGRA4.

Obserwowany efekt immunoprotekcyjny badanych rekombinantowych szczepionek związany był z pobudzeniem przez białka szczepionkowe antygenowo swoistej komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Indukcja mechanizmów komórkowych przez badane doświadczalne preparaty przejawiała się w postaci znamienne podwyższonej syntezy *in vitro* cytokin prozapalnych typu Th1, IFN- $\gamma$  i IL-2, przez stymulowane rekombinantowymi antygenami i TLA splenocyty myszy immunizowanych, a obserwowany efekt zależny był od kompozycji antygenowej użytej do szczepienia zwierząt, antygenu stosowanego do stymulacji splenocytów *in vitro* oraz szczepu myszy laboratoryjnych. Najwyższe stężenie IFN- $\gamma$  i IL-2 zanotowano w supernatantach pochodzących splenocytów myszy C3H/HeJ, stymulowanych antygenami rekombinantowymi lub TLA. Natomiast, prawdopodobnie ze względu na duże zróżnicowanie osobnicze, nie stwierdzono statystycznie znamiennej produkcji *in vitro* obu badanych cytokin przez stymulowane antygenami splenocyty immunizowanych myszy BALB/c. Dodatkowo, w przeciwieństwie do komórek śledziony pochodzących od immunizowanych myszy szczepu C57BL/6, splenocyty myszy C3H/HeJ i BALB/c wykazywały umiarkowaną antygenowo swoistą proliferację *in vitro*. Najwyższy, statystycznie znamiennej poziom limfoproliferacji obserwowano w przypadku splenocytów stymulowanych białkami rROP4, rSAG1 i TLA lub rROP4 i TLA, pochodzących, odpowiednio, od immunizowanych szczepionką rROP2+rROP4+rSAG1 myszy C3H/HeJ lub immunizowanych szczepionkami rROP2+rROP4+rGRA4 i rROP2+rROP4+rSAG1 myszy BALB/c.



Rozwojowi mechanizmów komórkowych u zwierząt immunizowanych badanymi kompozycjami rekombinantowych białek *T. gondii* towarzyszyła synteza antygenowo swoistych surowicznych przeciwciał klasy IgG. Podobnie jak dwuskładnikowa szczepionka rROP2+rROP4, badane preparaty trójskładnikowe wzbudzały mieszaną odpowiedź immunologiczną typu Th1/Th2. U myszy C3H/HeJ immunizowanych rROP2+rGRA4+rSAG1 i rROP2+rROP4+rGRA4 odpowiedź ta była spolaryzowana w kierunku typu Th2 z dominującą syntezą surowicznych, antygenowo swoistych immunoglobulin izotypu IgG1, natomiast w surowicach trzech z pięciu (60%) zwierząt szczepionych rROP2+rROP4+rSAG1 przeważały immunoglobuliny izotopu IgG2a o swoistości anty-rROP2 i anty-rSAG1. Identyczne miana przeciwciał izotypów IgG1 i IgG2c zaobserwowano w przypadku swoistych dla białka rGRA4 immunoglobulin IgG obecnych w surowicach myszy C57BL/6 immunizowanych rROP2+rGRA4+rSAG1 lub rROP2+rROP4+rGRA4. Ocena mian antygenowo swoistych przeciwciał w surowicach myszy BALB/c wykazała, iż wytwarzanymi w najwyższym mianie izotypami surowicznych, antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG są immunoglobuliny IgG1 anty-rGRA4, IgG1 anty-rSAG1 i IgG2a anty-rROP2, IgG2a anty-rSAG1 (immunizacja rROP2+rGRA4+rSAG1), IgG1/IgG2a anty-rROP4 (immunizacja rROP2+rROP4+rGRA4) oraz IgG1/IgG2a anty-rROP4 i IgG1/IgG2a anty-rSAG1 (immunizacja rROP2+rROP4+rSAG1).

Powyższe doświadczenia wykazały, iż wzbogacenie kompozycji białek rROP2 i rROP4 w powierzchniowy antygen rSAG1 lub wydzielniczy antygen rGRA4 przyczynia się do statystycznie znamiennego nasilenia działania ochronnego indukowanego przez użyty do immunizacji doświadczalny preparat szczepionkowy, a indukowany efekt immunoprotekcyjny zależy od kompozycji antygenowej użytej do immunizacji zwierząt laboratoryjnych i ich naturalnej, genetycznie warunkowanej wrażliwości na toksoplazmozę. Mimo iż kompozycja antygenów rROP2+rROP4 z białkiem rSAG1 lub białkiem rGRA4 przyczyniła się do znacznego obniżenia liczby cyst tkankowych w mózгах myszy immunizowanych, w porównaniu z ich liczbą w mózгах zwierząt kontrolnych, to obserwowane działanie immunoprotekcyjne indukowane

przez te badane doświadczalne szczepionki nadal nie gwarantowało pełnej ochrony przed zarażeniem cystotwórczym szczepem DX *T. gondii*. Dalsze możliwości prowadzące do nasilenia potencjału ochronnego podjednostkowej szczepionki zawierającej białka rROP2+rROP4+rSAG1 lub rROP2+rROP4+rGRA4, obejmujące: a) uzupełnianie jej/ich kompozycji antygenowej w krytyczne dla patogenności pasożyta białka wydzielnicze, b) zmianę doświadczalnego adiuwantu Freund'a na stosowany klinicznie lub znajdujący się w fazie badań przedklinicznych adiuwant preferencyjnie pobudzający komórkową odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepionkowe, odgrywającą kluczowe znaczenie w odporności protekcyjnej przeciwko zarażeniu *T. gondii*, c) zmianę drogi podawania antygeny z podskórnej na dośluzówkową, gwarantującą rozwój lokalnej swoistej odpowiedzi immunologicznej w obrębie nabłonków, zostały przedstawione w publikacji przeglądowej (**praca nr 7**) przygotowanej na zaproszenie edytorów czasopisma Bioengineered Bugs (obecnie Bioengineered). Praca ta podsumowuje wyniki otrzymane w badaniach szczepionek trójskładnikowych oraz przedstawia możliwe perspektywy zastosowania nowych modeli pozwalających na skonstruowanie w pełni immunoprotekcyjnej szczepionki przeciwko toksoplazmozie.

**Osiągnięcia:**

- 1. Wykazanie po raz pierwszy silnego działania ochronnego podjednostkowej, rekombinantowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie zawierającej białka rROP2+rROP4+rSAG1 lub rROP2+rROP4+rGRA4 *T. gondii*.**
- 2. Wykazanie wpływu naturalnej, warunkowanej genetycznie, podatności na toksoplazmozę na indukowany przez badane podjednostkowe, trójskładnikowe szczepionki rROP2+rGRA4+rSAG1, rROP2+rROP4+rGRA4 i rROP2+rROP4+rSAG1 efekt ochronny przed zarażeniem *T. gondii*.**
- 3. Opracowanie i optymalizacja warunków klonowania, ekspresji i oczyszczania rekombinantowych białek rGRA4 i rSAG1.**

**Możliwe zastosowanie:**

1. Badanie wpływu innych, ważnych dla patogenności *T. gondii*, wydzielniczych białek tego pasożyta na efekt ochronny indukowany przez podjednostkowe, trójskładnikowe szczepionki rROP2+rROP4+rSAG1 i rROP2+rROP4+rGRA4.
2. Badanie wpływu adiuwantów, polaryzujących odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepionkowe w kierunku typu Th1, na efekt ochronny indukowany przez podjednostkowe, trójskładnikowe szczepionki rROP2+rROP4+rSAG1 i rROP2+rROP4+rGRA4.
3. Badanie wpływu dośluzówkowej drogi podawania białek szczepionkowych na działanie ochronne doświadczalnych preparatów zawierających rekombinantowe formy antygenów *T. gondii*.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Kijlstra, A., Jongert, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol* 2008; 38:1359-70.
2. Robert-Gangneux, F., Darde M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:264-96.
3. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:267-99.
4. Petersen, E., Dubey, J.P. Biology of toxoplasmosis. In: Joynton D.H.M., Wreghitt, T.G., ed. *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. Cambridge UK: Cambridge University Press 2001; 1-42.
5. Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, I.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30:1217-58.
6. Hill, D., Dubey, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:634-40.
7. Buxton, D., Innes, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 1995; 110 (Suppl):S11-16.
8. Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S., Katzer, F., Buxton, D. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro 2009; 104:246-51.
9. Lopez-Soto, F., Leon-Sicairos, N., Reyes-Lopez, M., Serrano-Luna, J., Ordaz-Pichardo, C., Pina-Vazquez, C, et al. Use and endocytosis of iron-containing proteins by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Genet Evol* 2009; 9:1038-50.
10. Johnson, E.E., Wessling-Resnick, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect* 2012; 14:207-16.
11. Wilson, M.E., Britigan, B.E. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1998; 14:348-53.
12. Weinberg, E.D. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46:231-38.
13. Portugal, S., Drakesmith, H., Mota, M.M. Superinfection in malaria: *Plasmodium* shows its iron will. *EMBO reports* 2011; 12:1233-42.
14. Tylor, M.C., Kelly, J.M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 2010; 137:899-917.

15. Sehgal, R., Goyal, K., Sehgal, A. Trichomoniasis and lactoferrin: future prospects. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012; 2012:1-8.
16. Tanaka, T., Abe, Y., Kim, W-S., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., et al. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Toxoplasma gondii*. *J Vet Med Sci* 2003; 65:1377-80.
17. Dimier, I.H., Bout, D.T. Interferon- $\gamma$ -activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology* 1998; 94:488-95.
18. Deriy, L.V., Chor, J., Thomas, L.L. Surface expression of lactoferrin by resting neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275:241-46.
19. Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* 1998; 1007-13.
20. Carruthers, V.B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cell. *Parasitol Int* 1999; 48:1-10.
21. Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., et al. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 2005; 280:34245-58.
22. Beckers, C.J.M., Dubremetz, J.F., Mercereau-Pujalon, O., Joiner, K.A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 1994; 127:947-61.
23. Joiner, K.A., Roos, D.S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 2002; 157:557-63.
24. Lingelbach, K., Joiner, K.A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 1998; 111:1467-75.
25. Mordue, D.G., Hakansson, S., Niesman, I., Sibley, D. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol* 1999; 92:87-99.
26. Coppens, I., Joiner, K.A. Parasite-host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention? *Exp Rev Mol Med* 2001; 1-10.

27. Schwab, J.C., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:509-13.
28. Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., Ward, G.E. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell* 2004; 3:1320-30.
29. Sinai, A.P., Webster, P., Joiner, K.A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 1997; 110:2117-28.
30. Sinai, A.P., Joiner, K.A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 2001; 154:95-108.
31. Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B., Dubremetz, J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 29:203-11.
32. El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, M., et al. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 2006; 6:5773-84.
33. Nakaar, V., Ngo, H.M., Aaronson, E.P., Coppens, I., Stedman, T.T., Joiner, K.A. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 2003; 116:2311-20.
34. Van Gelder, P., Bosman, F., De Meuter, F., Van Heuverswyn, H., Herion, P. Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1993; 31:9-15.
35. Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M.R.R., De Souza Neves, E., Griemberg, G., et al. Detection of human *Toxoplasma*-specific immunoglobulins A, M and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5:627-31.
36. Saavadera, R., Becerril, M.A., Dubeaux, C., Lippens, R., De Vos, M.J., Herion, P., et al. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1996; 64:3858-62.
37. Chardes, T., Bourguin, I., Mevelec, M.N., Dubremetz, J.F., Bout, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from

- orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun* 1990; 58:1240-46.
38. Kang, H., Remington, J.S., Suzuki, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2000; 164:2629-34.
39. Sayles, P.C., Gibson, G.W., Johnson, L.L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*, *Infect Immun* 2000; 68:1026-33.
40. Sibley, L.D., Adams, L.B., Krahenbuhl, J.I. Macrophage interactions in toxoplasmosis. *Res Immunol* 1993; 144:38-40.
41. Tait, E.D., Hunter, C.A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2009; 104:201-10.
42. Lekutis, C., Ferguson, D.J.P., Grigg, M.E., Camps, M., Boothroyd, J.C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* 2001; 31:1285-92.
43. Roux-Buisson, N., Fricker-Hidalgo, H., Foussadier, A., Rolland, D., Suchel-Jambon, A.S., Brenier-Pinchart, M.P., et al. Comparative analysis of the VIDAS Toxo IgG IV assay in the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:79-81.
44. Kur, J., Holec-Gasior, I., Hiszczyńska-Sawicka, E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8:791-808.
45. Nam, H.W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions cross the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol* 2009; 47:29-37.
46. Martin, V., Supanitsky, A., Echeverria, P.C., Litwin, S., Tanos, T., De Roodt, A.R., et al. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:704-10.
47. Mevelec, M.N., Bout, D., Desolme, B., Marchand, H., Magne, R., Bruneel, O., et al. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 2005; 23:4489-99.

48. Desolme, B., Mevelec, M.N., Buzoni-Gatel, D., Bout, D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 2000; 18:2512-21.



## OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO- BADAWCZYCH

### **1. Modulacja mechanizmów odpowiedzi immunologicznej przez pałeczki z rodzaju *Listeria***

Zaliczane do fakultatywnych, wewnątrzkomórkowych patogenów pałeczki z rodzaju *Listeria* są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym (gleba, żywność, rośliny), a zakażenia powodowane przez te bakterie są szczególnie niebezpieczne dla kobiet ciężarnych oraz osób z obniżoną odpornością. U biorców przeszczepów szpiku kostnego, poddanych terapii lekami immunosupresyjnymi, zakażenia pałeczkami *Listeria* oraz ich modulujący wpływ na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej gospodarza wiążą się między innymi z nasilaniem reakcji GvHR (Graft versus Host Reaction; reakcja przeszczep przeciw gospodarzowi), stanowiąc tym samym przyczynę niepowodzenia wykonanego zabiegu transplantacyjnego. Przeprowadzone badania własne wykazały, że indukowane przez pałeczki *L. innocua* nasilenie reakcji GvHR związane jest z rozwojem nadwrażliwości typu późnego na antygeny tych bakterii i stymulującym działaniem IL-2, która produkowana jest przez limfocyty T w trakcie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie. Ponadto udokumentowano również rolę makrofagów jako komórek związanych z intensyfikacją reakcji GvHR.

Cytokiny chemotaktyczne (chemokiny) są grupą cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za stymulowanie napływu leukocytów i, w związku z tym, odgrywających istotną rolę w przebiegu procesów zapalnych, patologicznych, a także w trakcie infekcji. Zaliczane do  $\beta$ -chemokin (rodzina CC-chemokin) białka chemotaktyczne dla monocytów (MCP; Monocyte Chemotactic Protein) charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej wskazującym na ich możliwe zaangażowanie w mechanizmy odpowiedzi immunologicznej indukowane w zakażeniach wewnątrzkomórkowymi patogenami bakteryjnymi takimi jak *L. monocytogenes* czy *Mycobacterium tuberculosis*. We wczesnej fazie doświadczalnej listeriozy u myszy laboratoryjnych, mysia chemokina MCP-

1/JE, homolog ludzkiego białka MCP-1, stanowi ważny element nieswoistych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, a jej aktywność biologiczna wiąże się z indukowaniem napływu i akumulacji makrofagów w miejscu infekcji. Wyniki otrzymane z własnych doświadczeń wykazały, iż nie tylko białko MCP-1/JE, ale również mysia chemokina MCP-5, będąca drugim homologiem ludzkiego białka MCP-1, stanowi element wczesnej odporności nieswoistej w zakażeniach pałeczkami *Listeria*. Badania te po raz pierwszy udokumentowały nie tylko produkcję cytokiny chemotaktycznej MCP-5 przez makrofagi w przebiegu doświadczalnej listeriozy u myszy laboratoryjnych, ale również wskazały różnice dotyczące zarówno kinetyki wytwarzania chemokin MCP-1/JE i MCP-5, jak i czynników regulujących ich syntezę.

### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

#### **Przed doktoratem**

1. Goscicka, T., Walencka, M., Szeliga, J., Bloch, M., **Dziadek, B.** Participation of IL-12 and direct cell cytotoxicity in the modulation of GVH reaction in mice infected with *Listeria innocua*. Arch Immunol Ther Exp **1995**; 43: 239-45.

#### **Po doktoracie**

1. **Dziadek, B.**, Dziadek, J., Popławski, T., Gościcka, T. Two murine homologues of human MCP-1 chemokine are differently expressed during intracellular infection with *Listeria* strains. Centr Eur J Immunol; **2004**; 29(1):23-28.

<b>2. Aktywność biologiczna IL-8, związanej <i>in vivo</i> w kompleksach z <math>\alpha</math>-2-makroglobuliną, u pacjentów z ostrym uszkodzeniem płuc (ALI) i zespołem ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)</b>
---

Ostre uszkodzenie płuc (ALI; Acute Lung Injury) i zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS; Acute Respiratory Distress Syndrome) charakteryzują się występowaniem rozszanych uszkodzeń w płucach prowadzących do zaburzeń funkcjonalnych tego narządu. Zmianom patologicznym w płucach pacjentów z ALI/ARDS towarzyszy uszkodzenie warstwy komórek nabłonka i śródbłonka oraz zwiększenie przepuszczalności włosowatych naczyń płucnych, co powoduje przemieszczanie się białek osocza i upostaciowanych składników krwi, poza światło naczyń, do miąższu

płucnego i światła pęcherzyków płucnych. Badania, w których brałam udział, dotyczące pacjentów z ALI/ARDS, pozwoliły stwierdzić, iż charakteryzują się oni podwyższonym stężeniem  $\alpha$ 2-makroglobuliny oraz kompleksów IL-8 z  $\alpha$ 2-makroglobuliną w płynie płucnym, co najprawdopodobniej warunkuje zmiany patologiczne w obrębie płuc, gdyż może się przyczyniać do stymulacji napływu i akumulacji neutrofilów w przestrzeniach płucnych. Związane jest to z zachowaniem aktywności biologicznej przez IL-8 związaną w kompleksach z  $\alpha$ 2-makroglobuliną, co przejawia się w zdolności wiązania się tej cytokiny do swoistych receptorów występujących na neutrofilach oraz indukowania przez nią syntezy mieloperoksydazy przez te komórki. Ponadto tworzenie przez IL-8 kompleksów z  $\alpha$ 2-makroglobuliną chroni ją przed degradacją proteolityczną, co warunkuje modulujący wpływ tej cytokiny na wystąpienie ostrego odczynu zapalnego u pacjentów z ALI/ARDS. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyjaśnienie obserwowanej u pacjentów z ALI/ARDS korelacji pomiędzy podwyższonym stężeniem kompleksów IL-8 z  $\alpha$ 2-makroglobuliną, a nasilonym gromadzeniem się neutrofilów w płucach. Ponadto, biorąc pod uwagę wcześniejsze badania przeprowadzone w zespole prof. Anny Kurdowskiej, dotyczące usuwania z organizmu kompleksów IL-8 z  $\alpha$ 2-makroglobuliną przy udziale receptorów dla  $\alpha$ 2-makroglobuliny obecnych na makrofagach stwierdzono, iż u pacjentów z ALI/ARDS biologiczna rola IL-8 związanej w kompleksach z  $\alpha$ 2-makroglobuliną może być zależna m.in. od takich czynników, jak rodzaj komórek obecnych w miejscu reakcji zapalnej oraz obecność i dostępność odpowiednich receptorów na tych komórkach.

#### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

1. Kurdowska, A.K., Geiser, T.K., Alden, S.M., **Dziadek, B.R.**, Noble, J.M., Nuckton, T.J., Matthay, M.A. Activity of pulmonary edema fluid interleukin-8 bound to  $\alpha$ 2-macroglobulin in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**; 282:1092-98.

### 3. Regulacja metabolizmu żelaza w zarażeniach *T. gondii*

Nieswoiste mechanizmy komórkowe determinowane przez makrofagi, granulocyty, komórki dendrytyczne i komórki NK odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu zarażeń *T. gondii*. Istotnym czynnikiem modulującym fizjologiczne i immunologiczne funkcje makrofagów jest metabolizm żelaza, a zaburzenia dotyczące tego metabolizmu mogą hamować aktywność bójczą i cytotoksyczną tych komórek. Zewnątrzkomórkowym rezerwuarem jonów żelaza w organizmie żywiciela są białka nośnikowe, do których należy występująca w surowicy transferyna oraz obecna w wydzielinach komórek nabłonkowych laktoferyna. Makrofagi, podobnie jak wiele innych komórek, pobierają jony żelaza związane z białkami nośnikowymi przy udziale powierzchniowych receptorów, których ekspresja regulowana jest przez czynniki pochodzenia endogennego i egzogennego. Przeprowadzone badania własne wykazały, iż zarażenie *T. gondii* prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji receptorów dla transferyny obecnych na makrofagach, stanowiąc prawdopodobnie jeden z mechanizmów ograniczających dostęp do jonów żelaza niezbędnych temu pasożytowi do wewnątrzkomórkowego wzrostu i rozprzestrzeniania się w organizmie żywiciela.

Biorąc pod uwagę wykazaną wcześniej w badaniach własnych zdolność *Toxoplasma* do wiązania ludzkiej hololaktoferyny określono oraz porównano kinetykę wiązania tego białka przez żywe oraz utrwalone tachyzoity pasożyta. Jednocześnie, mając na względzie przeciwdrobnoustrojową aktywność laktoferyny, wykazano, iż wysokie stężenia tego białka ograniczają wewnątrzkomórkowy wzrost pasożyta, co może mieć ważne znaczenie ze względu na obecność laktoferyny w wydzielinach błon śluzowo-surowicznych i naturalną, pokarmową drogę wnikania *T. gondii* do organizmu żywiciela.

#### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

1. **Dziadek, B.**, Dytnerka-Dziłko, K., Długońska, H. The modulation of transferrin receptors level on mouse macrophages and fibroblasts by *Toxoplasma gondii*. Polish J Microbiol **2004**; 53:75-80.

2. Dzitko, K., **Dziadek, B.**, Dziadek, J., Długowska, H. *Toxoplasma gondii*: inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. *Pol J Microbiol* **2007**;56(1):25-32.
3. Długońska, H., **Dziadek, B.**, Dzitko, K. Pobieranie żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki: receptory dla białek wiążących żelazo. *Post Biol Kom* **2005**; 32(2):169-80.

#### **4. Interakcje pomiędzy prolaktyną a *T. gondii***

Prolaktyna jest hormonem wykazującym szeroką aktywność biologiczną, wiążącą się także z pełnieniem przez nią funkcji immunoregulatorowych. W przypadku inwazji *T. gondii* prolaktyna wykazuje działanie ochronne wynikające prawdopodobnie ze stymulowania przez ten hormon wytwarzania cytokin typu Th1, głównie IFN- $\gamma$ , co ma istotne znaczenie dla przebiegu zarażenia tym pasożytniczym pierwotniakiem. Niezbędnym dla pełnego zrozumienia roli prolaktyny w przebiegu inwazji *T. gondii* wydaje się być jednak, nie tylko poznanie jej wpływu na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej żywiciela, ale również wyjaśnienie interakcji zachodzących pomiędzy tym hormonem a samym pierwotniakiem. Interakcje te mogą być istotne dla opracowania nowych, skutecznych w leczeniu toksoplazmozy, strategii terapeutycznych i/lub profilaktycznych. Badania podjęte w ramach tej problematyki pozwoliły stwierdzić, iż zarówno fizjologiczne, jak i podwyższone stężenia prolaktyny ograniczają wewnątrzkomórkowy wzrost tachyzoitów *Toxoplasma*, co związane jest z bezpośrednim oddziaływaniem tego hormonu na toksoplazmy i hamowaniem ich zdolności do penetrowania komórek żywiciela. Ponadto wykazano, iż zarówno endogenna, jak i egzogenna prolaktyna hamuje proliferację tachyzoitów w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej izolowanych od pacjentek z hiperprolaktynemią. Fakt ten sugeruje, iż fizjologiczny wzrost stężenia prolaktyny u kobiet ciężarnych może stanowić naturalny mechanizm ograniczający ryzyko rozwoju zarażenia tym pasożytem. Dodatkowo, na podstawie doświadczeń zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów interakcji pomiędzy prolaktyną

a *T. gondii* stwierdzono, iż tachyzoity zarówno szczepu RH (genotyp I), jak i ME49 (genotyp II) tego pasożyta swoiście wiążą owczą prolaktynę.

#### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

1. Dzitko, K., Gatkowska, J., Płociński, P., **Dziadek, B.**, Długońska, H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. Parasitol Res **2010**; 107(1):199-204.
2. Dzitko, K., Lawnicka, H., Gatkowska, J., **Dziadek, B.**, Komorowski, J., Długonska, H. Inhibitory effect of prolactin on *Toxoplasma* proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. Parasite Immunol **2012**; 34(6):302-11.
3. Dzitko, K., **Dziadek, B.**, Gatkowska, J., Długońska, H. *Toxoplasma gondii* binds sheep prolactin. Exp Parasitol **2013**; 134(2):216-19.

#### **5. Zarażenie *T. gondii* a zmiany behawioralne u żywicieli pośrednich**

Tropizm tachyzoitów i bradyzoitów *T. gondii* do ośrodkowego układu nerwowego oraz lokalizacja cyst tkankowych pasożyta w mózgach żywicieli pośrednich stały się podstawą do rozpoczęcia, w wielu laboratoriach na świecie, badań zmierzających do wyjaśnienia możliwych powiązań pomiędzy toksoplazmozą a zaburzeniami neurologicznymi. Pozwoliły one na wykazanie nie tylko zmian behawioralnych u żywicieli pośrednich z przewlekłą toksoplazmozą, ale również zwróciły uwagę na korelację pomiędzy przewlekłą inwazją *Toxoplasma* a niektórymi chorobami o podłożu neurologicznym takimi jak schizofrenia czy zaburzenia obsesyjno-kompulsywne (nerwica natręctw). Biorąc po uwagę fakt, iż przewlekła toksoplazmoza może prowadzić do zaburzeń naturalnych mechanizmów samozachowawczych, podjęte zostały badania własne mające na celu określenie stopnia zasiedlania, przez cysty tkankowe pasożyta, obszarów ośrodkowego układu nerwowego, hipokampa i ciał migdałowatych, kontrolujących zaburzane mechanizmy. Wykazano, iż u myszy z doświadczalną przewlekłą toksoplazmozą cysty tkankowe *Toxoplasma* lokalizują się w obrębie zarówno hipokampa, jak i ciał migdałowatych, bez preferencyjnego zasiedlania jednego z tych dwóch regionów mózgu.

Ponadto u zwierząt laboratoryjnych obserwowano zmiany behawioralne związane m.in. z obniżeniem ich aktywności eksploracyjnej. Dodatkowo, stwierdzono, iż przede wszystkim ostrej toksoplazmozie towarzyszą, zależne od płci, zmiany aktywności wybranych systemów neurotransmisyjnych, dopaminergicznego, serotonergicznego i noradrenergicznego.

#### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

1. Gałkowska, J., Wieczorek, M., **Dziadek, B.**, Dzitko, K., Długowska, H. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitol Res* **2012**; 111(1):53-58.
2. Gałkowska, J., Wieczorek, M., **Dziadek, B.**, Dzitko, K., Długowska, H. Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of *Toxoplasma gondii* infected mice. *Exp Parasitol* **2013**; 133(1):1-7.

#### **6. Molekularne podstawy patogenezy prątków gruźlicy**

*Mycobacterium tuberculosis*, czynnik etiologiczny gruźlicy, jest jednym z najgroźniejszych, wewnątrzkomórkowych, bakteryjnych patogenów człowieka, odpowiedzialnym każdego roku za śmierć około 2 mln osób i 8 mln nowych zachorowań. Światowa Organizacja Zdrowia ocenia, że około 1/3 populacji ludzi jest zakażona prątkiem gruźlicy, a u około 5-10 % spośród zakażonych osób rozwinię się w ciągu życia aktywna postać gruźlicy. Gruźlica wywołana prątkami lekowrażliwymi jest chorobą całkowicie uleczalną, przy zastosowaniu właściwie prowadzonej, wielolekowej terapii, lecz coraz częściej identyfikuje się na całym świecie szczepy odporne na leki, wielolekooporne (MDR; Multi Drug Resistance) czy też szczepy o rozszerzonej oporności (XDR; Extensively Drug Resistance). Wirulencja *M. tuberculosis* warunkowana jest mechanizmami pozwalającymi mu na przeciwstawianie się układowi odpornościowemu gospodarza, zarówno po sfagocytowaniu przez komórki żerne (neutrofile, makrofagi), jak i w zmianach ziarniniakowatych, nawet wiele lat od pierwotnej infekcji. Zdolność prątków do adaptacji w zmieniających się warunkach środowiska jest jednym z elementów pozwalających *M. tuberculosis* na przeżycie w organizmie gospodarza i reaktywację w warunkach obniżonej odporności organizmu. Zdolność do przeżywania

prątków podczas zakażenia warunkowana jest również możliwością wykorzystywania dostępnych źródeł węgla i energii. W badaniach, w których uczestniczyłam, analizowano zdolność prątków gruźlicy do akumulacji i degradacji cholesterolu oraz analizowano enzymy uczestniczące w tym procesie, jako potencjalne czynniki wirulencji. W ramach pierwszej z realizowanych wspólnie prac uzyskano, a następnie poddano analizie z zastosowaniem modelu doświadczalnej gruźlicy u myszy, mutantu *M. tuberculosis* pozbawionego zdolności do syntezy oksydazy cholesterolowej, jak przypuszczano kluczowego enzymu dla procesu degradacji cholesterolu. Badany mutant, lecz nie szczep dziki czy mutant komplementowany genem funkcjonalnym, słabiej namnażał się zarówno w warunkach *in vitro* w komórkach wysięku otrzewnowego myszy, jak i *in vivo* w organizmach zakażonych zwierząt laboratoryjnych. Przeprowadzone badania jasno wykazały, że zdolność do syntezy oksydazy cholesterolowej jest dla prątków niezbędna w procesie zakażenia. Ponadto, konstrukcja ukierunkowanego mutantu z blokiem metabolicznym na jednym z etapów degradacji struktury pierścieniowej cholesterolu pozwoliła stwierdzić, iż, w zależności od składu podłoża i dostępności innych źródeł węgla, akumuluje on cholesterol w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej bądź przeprowadza proces jego degradacji. Identyfikacja pośredniego produktu degradacji cholesterolu w hodowli mutantu niezdolnego do syntezy ketosteroidowej dehydrogenazy była bezpośrednim dowodem na zdolność prątków do wykorzystywania tego sterolu jako źródła węgla i energii.

Początkowe etapy procesu degradacji cholesterolu były również badane w kolejnej pracy mającej za zadanie określić, czy oksydaza cholesterolowa i/lub hydroksysteroidowa dehydrogenaza są niezbędne do degradacji cholesterolu. Doświadczenia te miały wyjaśnić: a) czy rola oksydazy cholesterolowej w patogenności prątków związana jest z procesem degradacji cholesterolu, czy też np. z cytotoksycznością samego enzymu oraz b) czy obserwowany w badaniach własnych i innego zespołu brak atenuacji mutantu *M. tuberculosis*, niezdolnego do syntezy hydroksysteroidowej dehydrogenazy, wskazuje, że proces degradacji cholesterolu nie jest



niezbędny w warunkach *in vivo*. Konstrukcja wielokrotnych mutantów i szeregu szczepów komplementowanych funkcjonalnymi genami oraz ich analiza jednoznacznie wykazała, że szczep *M. tuberculosis* pozbawiony możliwości syntezy obu badanych enzymów jest wciąż zdolny do degradacji cholesterolu.

Jednym z kluczowych elementów warunkujących wirulencję prątków gruźlicy jest ich specyficznie zbudowana ściana komórkowa, stanowiąca doskonałą barierę przepuszczalności zarówno dla związków hydrofobowych, jak i hydrofilowych, w tym wielu antybiotyków. Szczegółowe wyjaśnienie mechanizmów biosyntezy ściany komórkowej prątków jest niezbędne nie tylko z punktu widzenia pełnego zrozumienia procesów wirulencji, ale także przy poszukiwaniu potencjalnych miejsc docelowych dla nowych tuberkulostatyków. Celem prowadzonych badań była ocena roli jednego z enzymów zaangażowanych w proces biosyntezy kwasów mykolinowych, acetylokarboksylazy CoA (AccD6), który okazał się niezbędny w komórkach prątków gruźlicy, ale nie w komórkach niepatogennych prątków *Mycobacterium smegmatis*.

Poszukiwanie właściwych elementów docelowych dla nowych tuberkulostatyków prowadzone jest nie tylko wśród enzymów związanych z biosyntezą ściany komórkowej prątków gruźlicy, ale także wśród białek zaangażowanych w inne, niezbędne dla funkcjonowania komórki procesy. W przeprowadzonych przez nas badaniach oceniano enzym replikacyjny – primazę DnaG jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych tuberkulostatyków. Wykazano, że enzym ten jest niezbędny dla przeżycia prątków, a usunięcie kodującego go genu jest letalne, nawet w warunkach nadprodukcji identyfikowanych w genomie prątków primaz AEP. Jednocześnie, zaobserwowano, że nawet silne obniżenie poziomu białka DnaG w komórkach prątków nie wpływa znacząco na ich przeżywalność.

#### **Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki**

1. Brzostek, A., **Dziadek, B.**, Rumijowska-Galewicz, A., Pawelczyk, J., Dziadek, J., Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett **2007**; 275:106-12.

2. Brzostek, A., Pawełczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., **Dziadek, B.**, Dziadek, J., *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J Bacteriol* **2009**; 191(21):6584-91.
3. Pawełczyk, J., Brzostek, A., Kremer, L., **Dziadek, B.**, Rumijowska-Galewicz, A., Fiolka, M., Dziadek, J. AccD6, a key carboxyltransferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain. *J Bacteriol* **2011**; 193(24):6960-72.
4. Brzostek, A., Rumijowska-Galewicz, A., **Dziadek, B.**, Wojcik, E.A., Dziadek, J. ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2013**; 134:1-7.
5. Kuron, A., Korycka-Machala, M., Brzostek, A., Nowosielski, M., Doherty, A., **Dziadek, B.**, Dziadek, J. Evaluation of DNA primase DnaG as a potential target for antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; Dec 30

