

AUTOREFERAT

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Krystyna Wszyńska

Nazwisko panięskie: **Matracka**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

20.12.2004 Nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rekombinowana *Salmonella* jako szczepionka anty-*Salmonella* /*Campylobacter* - funkcjonalna charakterystyka genu *cjaA* (*cj0982c*) *Campylobacter*”.

Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: prof. dr hab. Ewa Bartnik (Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski) oraz prof. dr hab. Waleria Hryniewicz (Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków).

06.1999 Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tytuł pracy magisterskiej: „Bivalentna szczepionka dla kurcząt przeciwko *Salmonella enterica* sv. Typhimurium i *Campylobacter jejuni* – przygotowanie konstruktów do immunizacji”.

Opiekunem pracy była prof. dr hab. Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2017 do chwili obecnej asystent w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego;

01.02.2005 - 30.09.2016 adiunkt w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego;

w tym:

10.09.2010-10.02.2011 (154 dni) urlop macierzyński;
26.06.2011-30.09.2011 (95 dni) urlop wychowawczy;
18.03.2006-07.07.2006 (112 dni) urlop macierzyński;

10.1999 - 12.2004 studia doktoranckie na Wydziale Biologii UW (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii);

10.1994 - 06.1999 studia magisterskie na Wydziale Biologii UW (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii).

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz.1311.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego.

Immunoprofilaktyka anty-*Campylobacter* dla kurcząt – opracowanie sposobów dostarczania wybranych antygenów.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.

- I **Wszyńska A.K.**¹, Kobierecka P.^{#1}, Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. **2015**. Lactic acid bacteria - 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(7): 2967-77. doi: 10.1007/s00253-015-6498-0;

IF₂₀₁₅ – **3,376**; IF_{5-letni} – 3,882; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **47**;

Wkład habilitanta: 40%. Przegląd literatury, przygotowanie części manuskryptu (rozdziały: *Characteristics of lactic acid bacteria; LAB as carriers of heterologous bacterial, parasitic, and viral antigens; Modulation of the activity of the immune system*).

- II Kobierecka P.A.[#], Olech B.*[#], Książek M.*[#], Derlatka K.*[#], Adamska I., Majewski P.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., **Wszyńska A.K.** **2016**. Cell wall anchoring of the *Campylobacter* antigens to *Lactococcus lactis*. *Front. Microbiol.* 7: 165. doi: 10.3389/fmicb.2016.00165;

IF₂₀₁₆ – **4,076**; IF_{5-letni} – 4,526; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **8**;

Wkład habilitanta: 45%. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; udział w konstrukcji białka hybrydowego; zaplanowanie i wykonanie doświadczeń dotyczących konstrukcji szczepów *L. lactis* wyrażających antygeny *Campylobacter*; udział w wykonaniu doświadczeń potwierdzających lokalizację antygenów w komórkach *L. lactis*; udział w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt; opieka nad studentkami podczas wykonywania badań, których wyniki weszły w skład publikacji (M. Książek, K. Derlatka, B. Olech); współudział w przygotowaniu manuskryptu, analizie i interpretacji wyników badań; przygotowanie tabel i rycin do publikacji; dyskusja z recenzentami.

- III Kobierecka P.A.^{#1}, **Wszyńska A.K.**¹, Gubernator J., Kuczkowski M., Wiśniewski O.*[#], Maruszewska M.*[#], Wojtania A.*[#], Derlatka K.*[#], Adamska I., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. **2016**. Chicken anti-*Campylobacter* vaccine – comparison of various carriers and routes of immunization. *Front. Microbiol.* 7: 740. doi: 10.3389/fmicb.2016.00740;

IF₂₀₁₆ – **4,076**; IF_{5-letni} – 4,526; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **6**;

Wkład habilitanta: 40%. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie i wykonanie części doświadczeń (przygotowanie rekombinowanego antygeny do zamknięcia w liposomach, analizy immunologiczne); udział w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt (przeprowadzenie eksperymentów określających poziom kolonizacji w zależności od drogi podania antygeny); opieka nad studentką podczas wykonywania badań, których wyniki weszły w skład publikacji (K. Derlatka); współudział w przygotowaniu manuskryptu, analizie i interpretacji wyników badań; przygotowanie tabel i rycin do publikacji; dyskusja z recenzentami.

- IV Kobierecka P.^{#1}, **Wyszyńska A.K.**¹, Aleksandrak-Piekarczyk T., Kuczkowski M., Tuzimek A.*, Piotrowska W.*, Górecki A.*, Adamska I., Wieliczko A., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. **2017**. *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen* 6: 5, e00512. doi: 10.1002/mbo3.512.

IF₂₀₁₇ – **2,682**; IF_{5-letni} – 2,722; punktacja MNiSW – **20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **4**.

Wkład habilitanta: 40%. Współautorstwo koncepcji badań; udział w zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń (izolacja szczepów *Lactobacillus* z kału kur chowu wolnego i przyporządkowanie ich do gatunku, analiza szczepów *Lactobacillus* pod kątem aktywności anty-*Campylobacter in vitro*, określenie stężenia mleczanów do eksperymentu protekcyjnego kurcząt); udział w przeprowadzeniu eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt (analiza aktywności anty-*Campylobacter* szczepów *Lactobacillus in vivo*); opieka nad studentkami podczas wykonywania badań, których wyniki weszły w skład publikacji (A. Tuzimek, W. Piotrowska); współudział w przygotowaniu manuskryptu, analizie i interpretacji wyników badań oraz dyskusji z recenzentami; przygotowanie tabeli rycin do publikacji.

* studenci wykonujący prace dyplomowe w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski);

doktoranci Zakładu Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski);

¹ *equal contribution* – z wyłączeniem odpowiedzi na uwagi recenzentów;

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania	14,21
Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	125
Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science)	65

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE

Charakterystyka obiektu badań

Epidemiologia: Bakterie rodzaju *Campylobacter* – mikroaerofilne, spiralne, gramujemne mikroorganizmy zaliczane do klasy *Epsilonproteobacteria* – to czynnik etiologiczny kamylobakteriozy, w ostatnim dziesięcioleciu najczęściej diagnozowanej zoonozy u mieszkańców państw członkowskich Unii Europejskiej. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, *European Food Safety Authority*) w krajach UE w 2014 roku liczba potwierdzonych przypadków kamylobakteriozy u ludzi wyniosła 236 851, co stanowi wzrost o 9,6% w stosunku do roku 2013. W 2017 roku potwierdzono natomiast 246 158 przypadków infekcji pałeczkami *Campylobacter*, przy wskaźniku zachorowalności 64,8 na 100 000 osób (EFSA, 2018). W Stanach Zjednoczonych w 2017 r. patogen ten był najczęstszą przyczyną chorób przenoszonych przez żywność (Marder Mph *et al.*, 2018). W ciągu ostatnich 10 lat częstość występowania i rozpowszechnienie kamylobakteriozy wzrosły również w krajach rozwijających się. Dane z części Afryki, Azji i Bliskiego Wschodu wskazują na endemiczny charakter kamylobakteriozy na tych obszarach, szczególnie u dzieci. Wskaźnik DALY (*disability adjusted life-years* – lata życia skorygowane niesprawnościami) dla zakażeń *Campylobacter* na całym świecie wynosi 7,5 mln, i wśród czynników etiologicznych biegunek ustępuje tylko wskaźnikowi DALY oznaczonemu dla rotawirusów (Murray *et al.*, 2012).

Choroba wywoływana przez pałeczki *Campylobacter* zwykle ogranicza się do stanu zapalnego jelit i wykazuje tendencję do samoograniczenia. To sprawia, że rzeczywista liczba infekcji może być znacznie wyższa (Havelaar *et al.*, 2013). Raport Centers for Disease Control and Prevention z 2011 r. szacuje, że na ok. 30 przypadków kamylobakteriozy w statystykach epidemiologicznych odnotowywany jest tylko jeden (Scallan *et al.*, 2011). W krajach o niskim i średnim dochodzie infekcje *Campylobacter* są powszechne u dzieci do 5-go roku życia (Lengerh *et al.*, 2013), natomiast objawy choroby u dorosłych są rzadkie, co sugeruje, że kontakt z tym enteropatogenem we wczesnym dzieciństwie prowadzi do rozwoju odporności ochronnej (Blaser, 1997; Kirkpatrick and Tribble, 2011). W krajach rozwiniętych na zachorowanie podatni są głównie młodzi dorośli (15-24 lata) (Blaser, 1997; Kirkpatrick and Tribble, 2011).

Spośród opisanych dotychczas 39 gatunków tego rodzaju, za wystąpienie objawów chorobowych odpowiadają głównie dwa z nich: *C. jejuni* oraz *C. coli* (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>, stan na listopad 2018).

Objawy chorobowe: Śmiertelność związana z zakażeniem *Campylobacter* jest niska a większość pacjentów nie wymaga specjalnej terapii. Antybiotyki (makrolidy, chinolony) stosowane są jedynie w ciężkich, ogólnoustrojowych zakażeniach lub u pacjentów z upośledzoną odpornością. Dane epidemiologiczne odnotowują jednak coraz więcej przypadków poważnych autoimmunologicznych i neurologicznych powikłań rozwijających się w następstwie infekcji pałeczkami rodzaju *Campylobacter*. Przykładem takiego schorzenia jest neuropatia obwodowego układu nerwowego tj. zespół Guillaina-Barré (GBS - *Guillain-Barré Syndrome*) (Nyati and Nyati, 2013; Goodfellow and Willison, 2016). Ryzyko jego wystąpienia, zwykle niewielkie (trzy przypadki na 10 000 zdiagnozowanych przypadków kamylobakteriozy), wzrasta po infekcji określonymi serotypami (m. in. HS19, HS41) (Skarp *et al.*, 2016). U podstaw rozwoju GBS leży zjawisko mimikry molekularnej. Powstające podczas infekcji *Campylobacter* przeciwciała rozpoznające bakteryjny lipooligosacharyd wiążą się z gangliozydami występującymi na

powierzchni komórek Schwanna i neuronu, co aktywuje układ dopełniacza, prowadzi do powstania kompleksu atakującego błonę (MAC- *membrane attack complex*) i w konsekwencji do uszkodzenia komórek nerwowych. Przyłączenie się przeciwciał w okolicy węzła Ranviera jest natomiast przyczyną zablokowania kanałów sodowych, a tym samym zaburzeń polaryzacji komórki, czego efektem jest spowolnienie przewodnictwa nerwowego. Ponadto sprowokowana infekcją aktywacja limfocytów T może wywołać migrację makrofagów w kierunku zajętego nerwu, a towarzyszące jej uwolnienie mediatorów stanu zapalnego prowadzi do uszkodzenia mieliny (Dasti *et al.*, 2010).

Aktualne badania wskazują również na związek pomiędzy zakażeniem *Campylobacter* a występowaniem reaktywnego zapalenia stawów (Ajene *et al.*, 2013; Stavropoulos *et al.*, 2015), zespołu nadwrażliwości jelita (IBS - *Irritable Bowel Syndrome*) oraz nowotworów jelita grubego (Kaakoush *et al.*, 2015).

W przebiegu infekcji znaczenie ma zarówno patogenność zakażającego szczepu, jak i funkcjonowanie układu immunologicznego gospodarza (Kaakoush *et al.*, 2015). U ludzi z niesprawnie działającym układem immunologicznym (ludzie starsi, ludzie po przebytych chorobach nowotworowych czy zainfekowani wirusem HIV) *Campylobacter* jest często przyczyną infekcji uogólnionych oraz posocznicy (Kaakoush *et al.*, 2015).

Źródła zakażenia: Badania epidemiologiczne wykazują, że większość przypadków kamylobakteriozy jest wynikiem konsumpcji zanieczyszczonego pałeczkami nieodpowiednio przygotowanego mięsa drobiowego, co jest zgodne z obserwacją, że głównym rezerwuarem tych mikroorganizmów jest drób hodowlany oraz dzikie ptactwo (Dasti *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Drobnoustroje te kolonizują układ pokarmowy ptaków na bardzo wysokim poziomie (do 10^9 CFU/g treści jelita) (Sahin *et al.*, 2015), a do zanieczyszczenia mięsa dochodzi w trakcie procesu produkcyjnego. W 2016 r., według raportu EFSA, 36,7% przebadanych tuszek brojlerów dostępnych na rynku europejskim było skażonych *Campylobacter* w ilości przekraczającej 4 log₁₀ CFU/g mięsa. Niska dawka infekcyjna dla ludzi sprawia, że do zakażeń dochodzi łatwo i często. W ostatnich latach odsetek ten pozostaje na względnie stałym poziomie, choć w roku 2015 dla EU wynosił 47%. Występują też znaczne różnice między poszczególnymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej (EFSA, 2016; EFSA, 2017), co jest m.in. wynikiem stosowania różnych strategii pobierania próbek i metod testowania. Na polskim rynku bakteriami rodzaju *Campylobacter* zanieczyszczonych jest ponad 50% tusz drobiowych (Korsak *et al.*, 2015).

Patogeneza: Mechanizm patogenezy pałeczek *Campylobacter* nie został całkowicie wyjaśniony, co jest m. in. wynikiem braku odpowiednich modeli badawczych zarówno komórkowych, jak i zwierzęcych. W organizmie człowieka patogen ten kolonizuje głównie warstwę śluzową jelita cienkiego. Obecność licznych substancji odżywczych w zajmowanej niszy wspomaga metabolizm pałeczek *Campylobacter*, które pozbawione 6-fosfofruktokinazy, enzymu zaangażowanego w katabolizm glukozy, wykorzystują aminokwasy nie tylko jako źródło azotu, ale także węgla i energii (Velayudhan and Kelly, 2002).

Campylobacter wnika do komórek nabłonkowych w procesie zależnym od mikrotubuli, kaweoli lub aktyny, czego konsekwencją jest modulacja procesów transdukcji sygnału. Zaindukowany infekcją stan zapalny, jak i aktywność patogenu, doprowadzają do rozluźnienia ścisłych powiązań między komórkami nabłonka i umożliwiają pałeczkom *Campylobacter* dotarcie do warstwy podnabłonkowej. Nie wykluczono też możliwości transmigracji poprzez nabłonkowe komórki M. Jak dotąd opisano wiele genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy ruchliwości, chemotaksji, adhezji oraz internalizacji. Do najdokładniej scharakteryzowanych należą *jlpA*, *peb1*, *cadF*, *capA*, *ciaB* jak również geny warunkujące biogenezę rzęsek (Bolton, 2015) i procesy chemotaksji (Korolik, 2018). Istotnym czynnikiem wirulencji *Campylobacter* jest również cytotoksyna CDT (*cytolethal distending toxin*) (Asakura *et al.*, 2008). W ostatnich latach, u 10%

przedstawicieli gatunku *C. jejuni*, stwierdzono również obecność genów kodujących białka budujące system sekrecji typu VI (T6SS). Jest on wykorzystywany przez bakterie do transportowania toksycznych cząsteczek efektorowych do wnętrza komórek eukariotycznych bądź prokariotycznych (Bleumink-Pluym *et al.*, 2013).

Istotną rolę w procesie patogenezy *Campylobacter* odgrywa olbrzymia zmienność genetyczna tych mikroorganizmów. Dotyczy ona głównie genów kodujących białka biorące udział w syntezie LOS (*lipooligosaccharide*), CPS (*capsular polysaccharide*), biogenezie rzęsek czy aparatu ruchu. Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko jest zmienność fazowa. Obecność w rejonach promotorowych lub rejonach 5' genów homopolimerowych sekwencji lub kilkunukleotydowych powtórzeń doprowadza do poślizgu polimerazy w trakcie replikacji (SSM, *slipped strand misspairing*). Konsekwencją są zaburzenia procesu transkrypcji i translacji, które mogą prowadzić do braku funkcjonalnego białka lub zmiany poziomu transkrypcji. Efektem jest niejednorodny skład populacji. Występowanie licznych wariantów strukturalnych CPS oraz LOS pozwala na aktywne unikanie działania układu immunologicznego gospodarza (Dasti *et al.*, 2010; Poly *et al.*, 2011; Guerry *et al.*, 2012; Esson *et al.*, 2016).

Campylobacter ma również zdolność przeprowadzania glikozylacji białek, zarówno typu O jak i N (Karlyshev *et al.*, 2005). W glikozylacji typu N do docelowych białek przyłączana jest jednostka heptasacharydowa, która może być dodatkowo modyfikowana przez produkt genu *eptC* (fosfoetanoloamina, PEtN). Nie udało się jak dotąd ustalić, czy ten rodzaj modyfikacji jest niezbędny do uzyskania pełnej aktywności czynników wirulencji, takich jak np. Peb1 i JlpA, czy też to struktura glikanu ma znaczenie w interakcjach glikoprotein z komórkami gospodarza.

Infekcja *Campylobacter* u kurcząt: Większość przeprowadzonych dotychczas badań wskazuje, że wysoki poziom kolonizacji jelit kurcząt nie powoduje objawów chorobowych u ptaków, co tym samym uniemożliwia eliminację zarażonych osobników (Lee and Newell, 2006). Hermans i wsp. sugerowali, że stan taki jest wynikiem nieskuteczności układu odpornościowego kurcząt połączonej z mechanizmami, które przekierowują odpowiedź zwierząt na tolerowanie patogena (Hermans *et al.*, 2012). Doniesienia z ostatnich lat opisują jednak szkodliwe skutki zdrowotne kolonizacji jelit kurcząt przez *Campylobacter* (Williams *et al.*, 2013; Humphrey *et al.*, 2014; Awad *et al.*, 2015). W 2014 r. zaobserwowano uszkodzenia błony śluzowej jelit brojlerów wywołane przez szczep *C. jejuni* M1, co umożliwiło translokację bakterii ze światła jelita, takich jak np. *E. coli*, do głębiej położonych tkanek. W efekcie u ptaków wystąpił ostry stan zapalny i biegunka (Humphrey *et al.*, 2014; Awad *et al.*, 2015; Awad *et al.*, 2016). Uzyskane wyniki nakazują zatem zweryfikowanie przekonania, że *Campylobacter* jest wyłącznie komensalem ptaków.

Campylobacter jest wykrywany w przewodzie pokarmowym ptaków hodowlanych dopiero po 2 tygodniu ich życia (Conlan *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2011). Sugeruje to istnienie mechanizmu przeciwdziałającego kolonizacji młodych ptaków przez pałeczki patogena. Spekulowano, że za ten stan odpowiada wysoki poziom swoistych przeciwciał matczynych (Cawthraw and Newell, 2010). Obserwacje, że kurczęta przebywające w stadach razem z dorosłymi są wolne od *Campylobacter* przez pierwsze kilka tygodni po wylęgnięciu, wydają się to potwierdzać (Sahin *et al.*, 2003). Istnieją również doniesienia sugerujące, że główną przyczyną zależnego od wieku zakażenia kurcząt przez *Campylobacter* jest zmiana składu mikrobiomu ptaków (Han *et al.*, 2016). Przeprowadzone przez Ijaz i wsp. kompleksowe, codzienne badania mikrobiomu kurcząt od 3 do 35 dnia życia ptaków wykazały, że *Campylobacter* pojawia się w 16 dniu życia, tuż po zaobserwowaniu najbardziej znaczących zmian w profilach metabolicznych. Nie

można wykluczyć, że jest to wynik pojawienia się środowiskowych czynników stymulujących rozwój tych drobnoustrojów (Ijaz *et al.*, 2018).

Wyjaśnienie roli mikroflory jelitowej w zakażeniu kurcząt przez *Campylobacter* wymaga dokładniejszego zrozumienia ich ekologii. Dotychczas kwestii tych dotyczyły nieliczne badania. Tak na przykład Kaakoush i wsp. powiązali obecność *C. jejuni* w przewodzie pokarmowym kurcząt z występowaniem mniejszej ilości przedstawicieli rodzajów *Lactobacillus* i *Corynebacterium* oraz większej ilości zarówno *Streptococcus*, jak i *Ruminococcaceae* (Kaakoush *et al.*, 2014). Uwagę zwróciła również obecność głównych producentów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) (*Bacteroides*, *Alistipes*, *Blautia* i *Clostridium*). Pałeczki *Campylobacter* mogą wykorzystywać kwasy organiczne wytwarzane przez te rodzaje jako źródło energii i węgla, co może tłumaczyć ich współwystępowanie u ptaków (Thibodeau *et al.*, 2015). Zmiany w liczebności przedstawicieli *Clostridiales* w odpowiedzi na kolonizację *Campylobacter* obserwowali również Connerton i wsp. (Connerton *et al.*, 2018). Zauważyli jednak, że np. *Clostridium* XIVa wykazuje większą obfitość przy nieobecności *Campylobacter*. Przedstawiciele tej grupy w jelitach człowieka należą do głównych producentów maślanu i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu funkcji metabolicznych i immunologicznych (Lopetuso *et al.*, 2013). Oprócz składu mikroflory, Connerton i wsp. porównali reakcje zapalne i parametry zootechniczne brojlerów niezakażonych *Campylobacter* oraz zainfekowanych tym patogenem w 6 dniu lub w 20 dniu życia, kiedy komercyjne stada kurcząt najczęściej ulegają kolonizacji przez *Campylobacter*. Zarówno wczesna, jak i późna kolonizacja wywołuje reakcje prozapalne, ale ich kinetyka jest zupełnie inna. W przypadku ptaków zakażonych w 6 dniu życia obserwowano wzrost IFN- γ i IL-4, a następnie zwiększoną ekspresję IL-6, IL-17A i IL-17F, która spada po osiągnięciu wyższego poziomu przez IL-10. Ostatecznie, poziom prozapalnych cytokin ptaków skolonizowanych w pierwszym tygodniu życia był identyczny z poziomem cytokin obserwowanym u niezainfekowanych ptaków (Connerton *et al.*, 2018). Ekspresja cytokin w odpowiedzi na zakażenie *Campylobacter* u kurcząt zainfekowanych w dniu 20 wykazała zwiększoną ekspresję IL-6, IL-17A i IL-17F; podwyższoną odpowiedź IL-17A obserwowano aż do 35 dnia życia. Różnice te nie skutkują niższymi poziomami kolonizacji *Campylobacter* pod koniec badania, ale mogą prowadzić do zmian w lokalnych społecznościach drobnoustrojów.

Immunoprofilaktyka: Duża liczba przypadków kampylobakteriozy, występowanie poinfekcyjnych powikłań, głównie neurologicznych, jak również rosnąca liczba szczepów *Campylobacter* opornych na antybiotyki stosowane w terapii powodują, że zakażenia tym enterpatogenem stanowią poważny problem służb medycznych. Mikroorganizm ten znalazł się na opublikowanej w 2017 roku przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organisation*) liście gatunków bakterii będących, głównie ze względu na swą antybiotykooporność, największym zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego (<https://www.who.int>). W związku z tym w ostatnich latach wysiłki badaczy skupiają się na opracowaniu strategii zapobiegania infekcjom *Campylobacter*.

Szczepionki przeznaczone dla ludzi: Jedną z możliwości zakłada się szczepienie ludzi z grup podwyższonego ryzyka, np. personelu i dzieci do piątego roku życia. Obecność przeciwciał u osób, które przeszły infekcję oraz brak zachorowań dorosłych w regionach, gdzie *Campylobacter* występuje endemicznie wskazują, że choć opracowanie szczepionki przeznaczonej dla ludzi nie jest łatwym zadaniem, to jest realne. Trudności wynikają z nie do końca wyjaśnionych procesów patogenezы, ogromnej różnorodności szczepów *Campylobacter* i niemożności ustalenia, które z antygenów mają największy potencjał ochronny.

Zdolność *Campylobacter* do wywołania GBS powoduje, że poważne obawy dotyczą również bezpieczeństwa preparatów, zwłaszcza tych opartych na wykorzystaniu pełnych zabitych

mikroorganizmów bądź szczepów atenuowanych. Ten ostatni problem może zostać rozwiązany przez zastosowanie w charakterze antygenów polisacharydów otoczkowych (CPS) (Rose *et al.*, 2012; Maue *et al.*, 2013; Pequegnat *et al.*, 2017). Nie wykazują one podobieństwa do gangliozydów budujących otoczkę mielinową nerwów obwodowych. Ponieważ jednak charakteryzuje je duża zmienność strukturalna (aktualnie znanych jest 47 wariantów strukturalnych CPS), szczepionka oparta na tym antygenie powinna być poliwalentna, tzn. składać się z polisacharydów dominujących serotypów. Użycie polisacharydów otoczkowych wymaga również ich przyłączenia do białka nośnikowego. Zapewnia to zdolność do indukowania odpowiedzi związanej z limfocytami T (Lesinski and Westerink, 2001). Metodę tę z powodzeniem wykorzystano do opracowania szczepionek przeciwko m. in. *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) (Makela *et al.*, 2003) i *Neisseria meningitidis* (Broker *et al.*, 2009). Pilotażowe badania nad wykorzystaniem szczepionki polisacharydowej przeciwko *Campylobacter* rozpoczął Naval Medical Research Center. Jako białko nośnikowe zastosowano zmodyfikowaną toksynę błonicy CRM197, której bezpieczeństwo potwierdzono w licznych badaniach. Monteiro i wsp. wykazali, że preparat zawierający CPS-CRM₁₉₇ znacząco zmniejsza objawy chorobowe u immunizowanych (podskórnie) myszy oraz u małą z gatunku *Aotus nancymae*. Immunizacja wywołała silną odpowiedź immunologiczną u zwierząt wykorzystanych w badaniach, choć nie zapobiegła skolonizowaniu ich jelit przez *Campylobacter* (Monteiro *et al.*, 2009). Zachęcające wyniki wstępnych badań doprowadziły do fazy klinicznej, która miała miejsce w 2014 r. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02067676). Szczepionka (CJCV1) podana domięśniowo 48 ochotnikom nie spowodowała znaczącej odpowiedzi immunologicznej przeciwko CPS. Uznano, że za ten rozczarowujący wynik odpowiada brak immunodominujących epitopów MeOPN (metylofosforoamidany) w strukturze użytych CPS. Transferazy odpowiedzialne za przyłączenie MeOPN do polisacharydów otoczkowych podlegają zmienności fazowej (Pequegnat *et al.*, 2017). Dlatego też do kolejnych badań wybrano naturalny wariant *C. jejuni* 81-176 posiadający obie transferazy MeOPN w fazie "on" (Poly *et al.*, 2018).

Szczepionki przeznaczone dla kurcząt: Ograniczenie poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez patogenne dla ludzi szczepy *Campylobacter* spp. doprowadziłoby do znacznego obniżenia poziomu zachorowań wśród ludzi, a co za tym idzie, znacznej redukcji kosztów opieki zdrowotnej. Spadek liczby CFU w jelitach kurcząt zaledwie o 2 log₁₀ powinien przełożyć się na około trzydziestokrotne obniżenie poziomu ludzkich infekcji (Rosenquist *et al.*, 2003). 1 stycznia 2018 roku weszło w życie Rozporządzenie Komisji UE (nr 2017/1495) wprowadzające kryterium higieny dotyczące bakterii *Campylobacter* w tuszach brojlerów, co umożliwi kontrolę zanieczyszczenia tusz podczas procesu uboju ptaków. Ustalono, że dopuszczalna liczba CFU / gram mięsa drobiowego nie może przekraczać 1000.

Podejmowano rozmaite próby kontrolowania rozprzestrzeniania się zakażeń w warunkach masowego chowu kurcząt. Jednak działania zmierzające w kierunku poprawy higieny na fermach i bezpieczeństwa biologicznego (stosowanie wykluczenia konkurencyjnego czy dodatków do pasz lub wody pitnej np. kwasów organicznych i kwasów tłuszczowych, produktów pochodzenia roślinnego, bakteriocyn, bakteriofagów) nie są wystarczające, aby kontrolować lub wyeliminować *Campylobacter* z łańcucha pokarmowego drobiu (Nauta *et al.*, 2007; El-Shibiny *et al.*, 2009; Meunier *et al.*, 2016). Wydaje się, że najskuteczniejszą metodą profilaktyki anty-*Campylobacter* jest immunizacja kurcząt. Pomimo, że wiele grup badawczych pracuje nad stworzeniem prototypu takiej szczepionki, nadal nie jest ona komercyjnie dostępna.

Do chwili obecnej nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaki typ odpowiedzi immunologicznej chroni kurczęta przed kolonizacją *Campylobacter*. Badania przeprowadzone przez Sahin

i wsp. wskazują, że w ochronie młodych kurcząt przed kolonizacją przez ten gatunek bakterii odgrywają rolę przeciwciała matczyne swoiste dla *Campylobacter*, jednak ochrona ta nie obejmuje całego okresu produkcji brojlerów (Sahin *et al.*, 2001; Sahin *et al.*, 2003; Cawthraw and Newell, 2010). Badanie to jednocześnie wskazuje, że zwiększenie odporności może być racjonalnym i wykonalnym sposobem kontrolowania *Campylobacter* na poziomie hodowli.

Znaczenie humoralnej odpowiedzi immunologicznej w zapobieganiu kolonizacji kurcząt przez *Campylobacter* zostało potwierdzone przez Hermansa i wsp. Wykazali oni, że bierna immunizacja, polegająca na podaniu kurom przeciwciał IgY uzyskanych od niosek zainfekowanych *Campylobacter*, redukuje znacząco liczbę komórek tego mikroorganizmu w jelitach i uniemożliwia transmisję patogenu pomiędzy ptakami (Hermans *et al.*, 2014). Rolę przeciwciał klasy IgA, jak również znaczenie limfocytów B, w odpowiedzi adaptacyjnej kurcząt przeciwko *Campylobacter* badali w 2017 roku Lacharme-Lora i wsp. Przeprowadzili oni burssektomię kurcząt (usunięcie Torebki Fabrycjusza), w wyniku czego ptaki zostały pozbawione limfocytów B oraz nie produkowały wydzielniczych przeciwciał sIgA. Naukowcy wykazali, że limfocyty B nie odgrywają istotnej roli w redukcji kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki *Campylobacter* do 7 tygodnia ich życia. Natomiast badanie treści jelitowej ptaków po 9 tygodniach od zakażenia wykazało, że poziom kolonizacji jelita ślepego u ptaków posiadających Torebkę Fabrycjusza była o ponad 2 log₁₀ niższa w porównaniu do grupy kurcząt, u których przeprowadzono burssektomię. Wyniki powyższych badań pokazują, że wytwarzanie przeciwciał odgrywa rolę w ograniczaniu infekcji *Campylobacter*, jednak proces ten wymaga dłuższego czasu aniżeli czas życia komercyjnego kurczęcia (6 tygodni) (Lacharme-Lora *et al.*, 2017).

Jednocześnie badania przeprowadzone przez Humphrey'a i wsp. wykazały, że znaczący wpływ na wynik zakażenia *C. jejuni* i odpowiedź immunologiczną ma rasa kurcząt. Cztery komercyjne rasy brojlerów wykorzystane w eksperymencie różniły się czasem trwania i rozmiarem reakcji zapalnych, czego efektem była komensalna kolonizacja bądź choroba z uszkodzeniem błony śluzowej jelita (Humphrey *et al.*, 2014). Oprócz nikłej wiedzy dotyczącej funkcjonowania układu immunologicznego kurcząt przyczyną dotychczasowych niepowodzeń w opracowaniu szczepionki dla kurcząt jest również wspomniana wcześniej różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter*.

Celem prowadzonych przeze mnie badań jest opracowanie prototypu szczepionki anty-*Campylobacter* przeznaczonej dla kurcząt, a w szczególności ocena przydatności różnych nośników dla antygenów *Campylobacter* w procesie immunizacji kurcząt. Wyniki badań, które stanowią podstawę przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego, podzieliłam na następujące, spójne tematycznie, części:

- 1. Konstrukcja szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB) prezentujących na powierzchni hybrydowe białko zawierające epitopy dwóch antygenów *Campylobacter* sp.;**
- 2. Charakterystyka szczepów rodzaju *Lactobacillus* pod kątem ich wykorzystania jako nośników antygenów/epitopów białek *Campylobacter* sp.;**
- 3. Analiza skuteczności działania skonstruowanych prototypów szczepionek anty-*Campylobacter* na modelu kurzym; porównanie drogi podania.**

NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

1. Wyszyńska A.K., Kobierecka P., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2015. Lactic acid bacteria - 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(7): 2967-77;
2. Kobierecka P.A., Olech B., Książek M., Derlatka K., Adamska I., Majewski P.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Wyszyńska A.K. 2016. Cell wall anchoring of the *Campylobacter* antigens to *Lactococcus lactis*. *Front. Microbiol.* 7: 165;
3. Kobierecka P.A., Wyszyńska A.K., Gubernator J., Kuczkowski M., Wiśniewski O., Maruszewska M., Wojtania A., Derlatka K., Adamska I., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2016. Chicken anti-*Campylobacter* vaccine - comparison of various carriers and routes of immunization. *Front. Microbiol.* 7: 740;
4. Kobierecka P., Wyszyńska A.K., Aleksandrak-Piekarczyk T., Kuczkowski M., Tuzimek A., Piotrowska W., Górecki A., Adamska I., Wieliczko A., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2017. *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen* 6: 5, e00512.

W procesie konstrukcji szczepionek podjednostkowych niezwykle ważny jest wybór antygeny. Potencjalny antygen powinien być rozpoznawany przez układ odpornościowy immunizowanego organizmu. Cechą niezbędną jest jego produkcja *in vivo*, gdy patogen oddziałuje z komórkami gospodarza. Poza tym antygen szczepionkowy powinien być silnie konserwowany w obrębie różnych serotypów/genotypów, co ma szczególnie duże znaczenie w sytuacji, gdy patogenny organizm cechuje wysoki poziom zmienności genetycznej. Istotny jest sposób dostarczenia antygeny, jak również droga podania preparatu szczepionkowego. Wszystkie te elementy mają wpływ na rodzaj i poziom indukowanej odpowiedzi immunologicznej.

Wybór antygeny: Wiele technologii (m.in. STM - *Signature-tagged transposon mutagenesis*, GSH - *Genomic subtractive hybridization*, SCOTS - *Selective capture of transcribed sequences*, genomika, transkryptomika, proteomika) w połączeniu z metodami bioinformatycznymi zrewolucjonizowało proces poszukiwania atrakcyjnych kandydatów do konstrukcji szczepionek. Technika IVIAT (*in vivo-induced antigen technology*) pozwala na przykład na identyfikację genów ulegających ekspresji *in vivo*, a więc podczas oddziaływania między gospodarzem i drobnoustrojem. Kodowane przez nie białka mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie w określonym układzie gospodarz-patogen, a ich potencjalny udział w wirulencji sprawia, że brane są również pod uwagę jako antygeny do opracowania szczepionek podjednostkowych czy jako markery diagnostyczne. Przeszukanie ekspresyjnej biblioteki genomowej (do stworzenia której wykorzystano DNA zsekwencjonowanego szczepu *C. jejuni* NCTC11168) za pomocą ludzkiej surowicy od rekonwalescentów, wysyczonej dodatkowo białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego w warunkach laboratoryjnych, doprowadziło do zidentyfikowania 24 genów. Ich produkty pełnią różne funkcje metaboliczne (m. in. *leuC*, *ptmB*, *eno* i *fcl*), są zaangażowane w procesy biosyntezy (m.in. *tufB*) czy procesowanie informacji genetycznej. Dwa geny wykryte w tym eksperymencie (*cj1471c* oraz *cj1587c*) biorą udział w transporcie aminokwasów (Hu *et al.*, 2014b). Podobna analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem surowicy od kurcząt wysyczonej białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego *in vitro* (Hu *et al.*, 2014a). Ten schemat postępowania doprowadził do identyfikacji 28 genów, z których jedynie pięć ulega ekspresji *in vivo* w obu gospodarzach, co jest prawdopodobnie wynikiem zupełnie innego przebiegu infekcji u ludzi i kurcząt. Zwraca uwagę fakt, że wśród wyróżnionej puli genów nie ma tych kodujących białka wykorzystane do konstrukcji prototypów szczepionek podjednostkowych (*cjaA*, *peb1*, *dps*). Analiza ta nie wykryła również genów takich jak *cadF*, *ciaB*, *pldA*, których unieczynnienie bezsprzecznie, jak wykazano w innych laboratoriach, obniża zdolność mikroorganizmu do kolonizacji.

Jak dotąd na modelach zwierzęcych testowano tylko kilka potencjalnych kandydatów do konstrukcji szczepionki anty-*Campylobacter* - głównie w postaci oczyszczonych rekombinowanych białek lub produkowanych w żywych atenuowanych szczepach bakteryjnych (Jagusztyn-Krynicka *et al.*, 2009). Najdokładniej pod tym kątem została przebadana flagellina (FlaA). Choć stanowi immunodominujący

antygen wyrażany podczas infekcji, jej użycie w szczepionkach jest problematyczne. Flagellina podlega bowiem O-glikozylacji, która to modyfikacja ma znaczenie dla jej struktury i właściwości immunogennych. Inne analizowane antygeny obejmują: główne białko błony zewnętrznej (MOMP), adhezynę Peb1, składnik wielolekowej pompy efflux CmeC, receptor enterobakteryjny CfrA oraz lipoproteiny CjaA i CjaC zaangażowane w transport aminokwasów. Indukowana odpowiedź immunologiczna (specyficzne wydzielnicze przeciwciała klasy sIgA w śluzie jelitowym oraz IgG w surowicy) zapewniała ograniczoną ochronę (FlaA-LTB; rCmeC, Dps), była skierowana przeciwko konformacyjnie zmiennemu epitopom (MOMP), nie chroniła przed zakażeniem heterologicznymi szczepami (FlaA) lub wyniki były wysoce zmienne (CjaA) zależne od dawki preparatu, drogi podawania oraz schematu jego aplikacji (Wyszynska *et al.*, 2004; Buckley *et al.*, 2010; Layton *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2012; Theoret *et al.*, 2012).

Wyniki tych badań, podobnie jak wyniki badań naszej grupy badawczej, wskazują, że preparaty szczepionkowe powstałe w oparciu o pojedynczy antygen cechuje niezadowalający potencjał protekcyjny. Do ograniczenia poziomu kolonizacji jelit kurcząt przez pałeczki *Campylobacter* doprowadzić może jedynie opracowanie wieloskładnikowej szczepionki. Podobna strategia zastosowana została przy opracowywaniu szczepionki przeciwko meningokokom grupy B (MenB, Novartis). Dwa z czterech jej składników to hybrydowe rekombinowane białka zawierające epitopy kilku antygenów (Serruto *et al.*, 2010).

W Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii UW przeszukiwanie genomowych bibliotek *Campylobacter* przy użyciu króliczych surowic anti-*Campylobacter* doprowadziło do identyfikacji trzech immunodominujących białek *Campylobacter*: CjaA (Cj0982c w *C. jejuni* NCTC11168), CjaC (Cj0734c w *C. jejuni* NCTC11168) oraz CjaD (Cj0113c w *C. jejuni* NCTC11168) (Pawelec *et al.*, 1997). Badania, które prowadziłam w trakcie wykonywania doktoratu (*Biwalentna szczepionka dla kurcząt przeciwko Salmonella enterica sv. Typhimurium i Campylobacter jejuni – przygotowanie konstruktów do immunizacji*), jak również w pierwszych latach po doktoracie, miały na celu ich charakterystykę. Wspomniane wyżej białka posiadają wiele cech predysponujących je do zastosowania w immunoprofilaktyce. Białka CjaA i CjaC to pozacytoplazmatyczne glikozylowane lipoproteiny konserwowane wśród różnych serotypów *Campylobacter* (Wyszynska *et al.*, 2007; Wyszynska *et al.*, 2008). Należą one do grupy białek wiążących substrat systemu transportu typu ABC. Analizy krystalograficzne rCjaA udokumentowały, że białko to jest ligandem dla cysteiny (Muller *et al.*, 2005), ale eksperymenty wzrostowe sugerują, że nie jest zaangażowane w wiązanie jedynie tego aminokwasu (Vorwerk *et al.*, 2014). Natomiast dla CjaC najbardziej prawdopodobnym ligandem jest histydyna (Garvis *et al.*, 1996). Ponieważ aminokwasy dla tego mikroorganizmu są nie tylko źródłem azotu, ale także węgla i energii, białka biorące udział w transporcie aminokwasów pełnią istotną rolę w procesach fizjologicznych bakterii rodzaju *Campylobacter*. Dodatkowo poziom ekspresji genu *cjaA* ulega podwyższeniu na podłożach ubogich w żelazo, co sugeruje udział CjaA w procesie kolonizacji *in vivo* (Holmes *et al.*, 2005). Wykazano, iż białka te w komórkach świeżych klinicznych izolatów występują w większej ilości niż w komórkach wielokrotnie pasażowanych szczepów laboratoryjnych (Cordwell *et al.*, 2008). Są one także rozpoznawane przez przeciwciała matczyne, chroniące kurczęta przez pierwsze tygodnie życia przed *Campylobacter* (Cordwell *et al.*, 2008; Shoaf-Sweeney *et al.*, 2008).

CjaD to białko PAL (*Peptidoglycan Associated Protein*) zakotwiczone w błonie zewnętrznej komórki, co wykazano metodą Western blot z wykorzystaniem specyficznych króliczych przeciwciał anti-rCjaD. Podobnie jak białko PAL *E. coli* tworzy ono kompleks z wieloma białkami błonowymi, między innymi z białkiem błony wewnętrznej - TolB, który jest odpowiedzialny za utrzymanie odpowiedniej struktury osłon komórki. Gen *cjaD* jest prawdopodobnie genem niezbędnym do przeżycia mikroorganizmu. Wiele

prób wykonanych w naszym laboratorium, mających na celu skonstruowanie mutantów w genie *cjaD*, zakończyło się niepowodzeniem. Ponieważ silnie immunogenne białka PAL są istotnymi czynnikami wirulencji wielu gramujemnych bakterii, były one testowane jako składniki podjednostkowych szczepionek. Przykładem są próby jego zastosowania w zapobieganiu ludzkim infekcjom powodowanym przez nietypowalne szczepy *Haemophilus influenzae* (NTHi). Wstępne eksperymenty wykonane na modelu mysim wykazały skuteczność badanych prototypów (Godlewska *et al.*, 2009).

Za wykorzystaniem lipoprotein w konstrukcji szczepionek podjednostkowych przemawiają także badania, w których wykazano u kurcząt silną indukcję wrodzonej odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem receptora TLR2 (de Zoete *et al.*, 2010). Ostatnio publikowane dane wskazują, że wrodzona odpowiedź immunologiczna może odgrywać istotną rolę w ochronie kurcząt przed kolonizacją *Campylobacter* (Reid *et al.*, 2016).

Przedstawione wyżej białka CjaA i CjaD wykorzystane zostały do opracowania hybrydowego antygeny. Za pomocą analiz *in silico*, określone zostały ich powierzchniowe epitopy rozpoznawane przez przeciwciała. W sekwencji aminokwasowej CjaA wytypowano sześć miejsc, do których można wprowadzić krótkie peptydy, nie powodując przy tym istotnych zmian jego struktury. Trzy z nich zostały wykorzystane do wstawienia epitopów białka CjaD. Królicza surowica poliklonalna anti-rCjaAD rozpoznaje natywne białka CjaA i CjaD [**publikacja 2 (Kobierecka *et al.*, 2016a)**]. Powstałe hybrydowe białko rCjaAD było w prowadzonych przeze mnie badaniach modelowym antygenem.

Droga dostarczenia antygeny: Antygeny bakterii chorobotwórczych muszą być dostarczone do układu immunologicznego osobników uodpornianych. W charakterze nośników stosowane są m.in. atenuowane szczepy różnych mikroorganizmów patogennych, VLPs (Virus Like Particles), wirusów, bakterie komensalne z grupy LAB (*Lactic Acid Bacteria*) lub też liposomy.

Szczepy atenuowane: Szczepionki podjednostkowe skonstruowane w oparciu o atenuowane szczepy patogenów mają wiele zalet: (1) silnie stymulują odpowiedź humoralną i/lub komórkową nie tylko przeciwko homologicznym antygenom, ale również przenoszonym antygenom heterologicznym, (2) możliwe są różne drogi podania (droga wziewna, donosowa, doustna, dooczną, dopochwowa, doodbytnicza), (3) podane na jeden z wymienionych sposobów indukują mechanizmy odpornościowe związane z błonami śluzowymi jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, (4) są łatwe i tanie w produkcji, (5) istnieje możliwość ich liofilizacji i przechowywania w temperaturze pokojowej. Przede wszystkim jednak atenuowane patogeny jelitowe przeżywają w środowisku układu pokarmowego zawierającym m.in. różne proteazy, defensyny, lizozym, a zatem są zdolne do ochrony przenoszonego heterologicznego antygeny.

Pierwszym, zastosowanym przeze mnie nośnikiem genów *Campylobacter* były szczepy awirulentnej *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (Wyszynska *et al.*, 2004). Po doustnym podaniu mikroorganizmy te pobudzają układ immunologiczny do produkcji dużej ilości specyficznych przeciwciał klasy sIgA odnajdywanych w błonach śluzowych przewodu pokarmowego i gruczołach wydzielniczych. Infekcja szczepami *Salmonella* stymuluje również odpowiedź ogólnoustrojową (IgG) oraz wysoki poziom odpowiedzi typu komórkowego. W przeprowadzonym eksperymencie protekcyjnym uzyskano znaczące ograniczenie kolonizacji jelita w porównaniu do wyników uzyskiwanych w grupie kontrolnej, osiągające 6 log₁₀. Niemniej wyniki innych grup badawczych wskazywały, że po przeniesieniu antygeny CjaA z wykorzystaniem atenuowanych szczepów *Salmonella* obniżenie poziomu kolonizacji *Campylobacter* w jelitach kurcząt nie było tak znaczące. Z pewnością ma tu znaczenie zarówno tło genetyczne czynnika

infekcyjnego, jak i gospodarza (Rubin *et al.*, 2010; Indikova *et al.*, 2015). Nie bez znaczenia były również inne warunki doświadczenia: dawka preparatu oraz schemat jego aplikacji (Buckley *et al.*, 2010; Theoret *et al.*, 2012). W roku 2005 nasze badania (grupa badawcza Zakładu Genetyki Bakterii kierowana przez prof. dr hab. E. K. Jagusztyn-Krynicką) zostały wyróżnione nagrodą specjalną Didiera Reyndersa, Vice Premiera i Ministra Finansów Belgii oraz złotym medalem na 54 Światowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Techniek Brussels EUREKA 2005 za projekt „Bivalentna szczepionka dla drobiu anty-*Salmonella* /*Campylobacter*”.

Badania, w których do przenoszenia immunogennych białek *Campylobacter* zastosowano szczepy *Salmonella*, są obecnie kontynuowane, a ich wyniki zostaną wkrótce zebrane w formie manuskryptu publikacji. Do przeniesienia modelowego antygeny rCjaAD został wykorzystany, skonstruowany specjalnie do użycia w immunoprofilaktyce ludzi i zwierząt, przedstawiciel serii RASV (*Recombinant Attenuated Salmonella Vaccine*) charakteryzujący się opóźnioną atenuacją oraz opóźnioną produkcją heterologicznych antygenów (system RDAS – *Regulated Delayed Antigen Synthesis*) (Curtiss *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Szczep ten ma delecje w dwóch chromosomowych genach metabolizmu podstawowego: *asd* (dehydrogenaza aldehydu kwasu semiasparaginowego) i *dadB* (racemaza alaniny). Mutacje te komplementowane są przez geny *asd/dad* zawarte na plazmidach będących wektorami do klonowania heterologicznych genów. Zastosowanie tych układów (*double balanced-lethal host-vector system*) pozwala na stabilne utrzymywanie plazmidów bez stosowania presji antybiotykowej. Szczepy te niosą w genomie także mutacje genów *crp* i *fur*, które powodują opóźnienie atenuacji bez uszkodzenia oddziaływania mikroorganizmu z komórkami GALT. Ich ekspresja nie zachodzi w środowisku pozbawionym arabinozy tj. w organizmie immunizowanego gospodarza. Opóźniona produkcja heterologicznego antygeny warunkowana jest natomiast regulacją ekspresji genów *lacI* i *c2*. Geny te, sklonowane pod kontrolą kasety arabinozowej (TT *araC* P_{BAD}), kodują represor laktozowy (LacI) oraz represor C2 faga P22, które hamują ekspresję heterologicznych genów sklonowanych pod promotorami *trc* i *P22L* odpowiednio na plazmidach serii Asd⁺ lub DadB⁺ (Wang *et al.*, 2013; Clark-Curtiss and Curtiss, 2018).

W celu ukierunkowania odpowiedzi immunologicznej zastosowane zostały kurze cytokiny: ChIL-6 i ChIL-18. Obie cytokiny są wielofunkcyjnymi białkami modulującymi odpowiedź immunologiczną. ChIL-6 moduluje odpowiedź Th1/Th2, głównie hamując drogę Th1. ChIL-18 głównie ułatwia odpowiedź Th1, choć w odpowiednich warunkach stymuluje także odpowiedź Th2. Niektóre z wyników tych badań weszły w skład rozprawy doktorskiej dr. Pawła Łaniewskiego.

Bakterie kwasu mlekowego: Do przenoszenia obcych antygenów w procesie immunizacji wykorzystywane są również bakterie kwasu mlekowego (LAB). LAB to sztucznie wyodrębniona grupa o olbrzymiej różnorodności genetycznej oraz filogenetycznej, której cechą charakterystyczną jest zdolność do produkcji kwasu mlekowego. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że podanie takich szczepów prowadzi do indukcji odpowiedzi immunologicznej zarówno w błonach śluzowych (slgA), jak i ogólnoustrojowej reakcji układu odpornościowego przeciwko ekspresywowanym heterologicznym antygenom, przy jednoczesnej niskiej odpowiedzi skierowanej przeciwko antygenom szczepu nośnikowego. Jako wektory szczepionkowe posiadają także inne zalety. Umożliwiając immunizację drogą śluzówkową zapewniają większą skuteczność walki z patogenami, dla których to właśnie śluzówka stanowi wrota infekcji. O atrakcyjności bakterii kwasu mlekowego w immunoprofilaktyce lub terapii decyduje również ich oporność na działanie niskiego pH soku żołądkowego oraz zdolność adhezji do komórek nabłonka jelitowego. Kluczową kwestią jest też bezpieczeństwo tych preparatów. Bakterie te

(m.in. gatunki *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) posiadają status GRAS, a część z nich zaliczamy do probiotyków, czyli organizmów, których krótkotrwała obecność lub kolonizacja wywiera pozytywny wpływ na wiele elementów fizjologii organizmu gospodarza. Niewątpliwą zaletą są również niskie koszty produkcji tego typu szczepionek oraz możliwość liofilizacji i przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej.

Od czasu pierwszego doniesienia dotyczącego wykorzystania bakterii kwasu mlekowego jako nośnika antygenów szczepionkowych opublikowano wiele badań [publikacja nr 1, (Wyszynska et al., 2015)]. Podejmowane są próby wykorzystania rekombinowanych szczepów LAB w immunoprofilaktyce skierowanej przeciwko patogenom przewodu pokarmowego (*Salmonella*, *Helicobacter*, *Yersinia*). Testowano je także przeciwko patogenom powodującym infekcje układu oddechowego (*Streptococcus pneumoniae*) (LeCureux and Dean, 2018). Opracowano różne strategie umożliwiające wydajną ekspresję genów kodujących heterologiczne antygeny w szczepach LAB, głównie rodzajów *Lactococcus* i *Lactobacillus*. Skuteczność preparatów była różna i zależna od wielu parametrów, takich jak np. rodzaj antygeny (bakteryjny, pasożytniczy czy wirusowy), gatunek szczepu nośnikowego, a nawet konkretny szczep, jak również ilość antygeny, jego lokalizacja, droga podania oraz zastosowany schemat immunizacji (Marelli et al., 2011; Villena et al., 2011; Kajikawa, 2012; Fontana et al., 2013).

Lactococcus lactis: Do przeniesienia modelowego antygeny rCjaAD wykorzystałam szczep *Lactococcus lactis* [publikacja nr 2, (Kobierecka et al., 2016a)]. Jest to przedstawiciel grupy LAB, którego sekwencja genomu została poznana już w 1999 roku i dla którego opracowano techniki rekombinacji genetycznej (Bolotin et al., 1999; Nouaille et al., 2003; Pontes et al., 2011).

W komórkach bakteryjnych większość białek wydzielana jest z wykorzystaniem białek Sec. Białka takie na swoim N-końcu posiadają peptyd sygnałowy (SP) o charakterystycznej budowie. SP bakterii gramodatnich jest dłuższy niż u bakterii gramujemnych. Istnieją też różnice w budowie aparatu Sec – tak np. w komórkach *L. lactis* nieobecne są białka SecDF, zaangażowane w późniejszych etapach translokacji w komórkach gramujemnych. Pozostawienie sekwencji sygnałnej pochodzącej z komórek bakterii gramujemnych niosło ryzyko, że sekrecja białek *Campylobacter* w komórkach *Lactococcus* będzie niewydajna lub nie będzie zachodzić wcale. Stąd też w pierwszej kolejności stworzyłam fuzję translacyjną rCjaAD z sekwencją sygnałną genu *usp45* kodującego główne sekrecyjne białko *Lactococcus* (*Usp45*, *unidentified secreted protein*). Kowalencyjne związanie rekombinowanego białka rCjaAD do peptydoglikanu *Lactococcus lactis* umożliwiła natomiast fuzja translacyjna z C-końcem białka *L. lactis* YndF zawierającym motyw LPXTG (leucyna – prolina – dowolny aminokwas – treonina – glicyna). W procesowaniu białek zawierających ten motyw uczestniczy sortaza A (SrtA), enzym o aktywności transpeptydazy. Produkt genu *yndF* (accession no. NP_267457) jest substratem dla sortazy A w szczepie *L. lactis* IL1403 (Dieye et al., 2010). W sekwencji aminokwasowej ok. 78 kDa białka YndF stwierdzono obecność dwóch domen wiążących mucyny, jego funkcja jednak nie została jak dotąd określona.

Lokalizacja białka rCjaAD na powierzchni *L. lactis* została potwierdzona za pomocą immunofluorescencji. Dodatkowo, by ocenić wpływ lokalizacji antygeny na skuteczność szczepionki, skonstruowano szczep *L. lactis*, w którym hybrydowe białko rCjaAD pozostawało w cytoplazmie.

Tak stworzone prototypy szczepionek (rCjaA; rCjaAD_{LPXTG} i rCjaAD_{CYTOPL}) podano trzykrotnie (1, 8 i 17 dnia życia) ptakom *per os*. Grupa kontrolna otrzymała PBS. Kurczęta 22 dnia życia zakażono szczepem *C. jejuni* 12/2 o wysokiej zdolności do kolonizacji jelit ptaków, a efekt ochronny badano pięć i dziewięć dni później. Szczep *L. lactis* prezentujący na powierzchni rCjaAD wykazywał wyższy efekt ochronny niż szczep *L. lactis* wytwarzający białko zlokalizowane w cytoplazmie oraz od szczepu *L. lactis* prezentującego na

powierzchni CjaA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie; poziom kolonizacji obniżył się jedynie o 1 rząd wielkości.

Podczas pierwszych dwóch tygodni życia kurczęcia obserwowano wysoki poziom specyficznych przeciwciał klasy IgY, co jest wynikiem istnienia odporności biernej naturalnej opisaną w literaturze. Uzyskane wyniki wskazują, że szczepienie może wspomóc działanie ochronne przeciwciał matczyńskich, jako że grupy, którym podano prototypy szczepionek miały wyższy poziom specyficznych IgY w dniach 7 i 14 niż grupa, która otrzymała jedynie niezmodyfikowany szczep nośnikowy. Najwyższe miano przeciwciał anty-rCjaAD wykryto po immunizacji kurcząt szczepem *L. lactis*, który prezentował białko hybrydowe na swojej powierzchni. Przeciwciała klasy IgA występujące w śluzie jelitowym stanowią pierwszą linię obrony immunologicznej przed wieloma patogenami. Miano specyficznych przeciwciał IgA rozpoznających rCjaAD rosło u wszystkich immunizowanych grup. Nie odnotowano jednak korelacji między poziomem indukowanej odpowiedzi immunologicznej a lokalizacją antygenów.

Prezentowane badania stanowią pierwszą próbę stymulacji układu odpornościowego drobiu przy pomocy LAB.

***Lactobacillus* sp.:** Redukcja kolonizacji jelit kurcząt przez pałeczki *Campylobacter* po podaniu szczepu *L. lactis* niosącego antygeny tego patogena nie była znacząca, jednak powyższe eksperymenty udokumentowały, że szczepy LAB mogą dostarczać heterologiczne antygeny do układu odpornościowego ptaków. Główną wadą *L. lactis* jako nośnika obcych antygenów jest jego niezdolność do długotrwałej kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt. W związku z tym kolejny etap badań obejmował poszukiwanie szczepu *Lactobacillus*, który mógłby zostać wykorzystany jako nośnik antygenów *Campylobacter*. Szczepy przedstawicieli tego rodzaju mają zdolność kolonizowania lub przynajmniej utrzymywania się przez dłuższy czas w jelicie ptaka. Zasadność wyboru tego gatunku jako nośnika potwierdzają liczne badania dotyczące składu mikrobiomu kurcząt.

W większości ferm drobiarskich drobnoustroje tworzące mikrobiom układu pokarmowego piskląt pochodzą ze środowiska hodowlanego (ściółka). Ponieważ kurczęta nie mają kontaktu z dorosłymi ptakami ponowne użycie ściółki jest powszechną praktyką w produkcji brojlerów. Szybki pasaż pokarmu, co wynika bezpośrednio z długości układu żołądkowo-jelitowego ptaków, promuje bakterie, które adherują do warstwy błony śluzowej i/lub charakteryzuje je szybki wzrost. Najbardziej zróżnicowany jest mikrobiom jelita ślepego. Sprzyja temu najdłuższy czas retencji paszy (12-20 godzin). W kątnicy dominują przedstawiciele rodzin *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillaceae* oraz *Lachnospiraceae*. Mikrobiom wraz z wiekiem kurcząt staje się coraz bardziej zróżnicowany. W 42 dniu życia kurcząt w ich jelitach zidentyfikowano ponad 200 rodzajów, podczas gdy po wykluciu jedynie 50. Początkowo mikrobiom jelitowy jest zdominowany przez bakterie gram-ujemne, w szczególności *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Proteus* i *Escherichia coli*). U tygodniowych kurcząt pojawiają się przedstawiciele *Firmicutes* i stopniowo zaczynają przeważać. W 28 dniu życia ptaków bakterie gram-ujemne stanowią mniej niż 6% mikrobiomu (van der Wielen *et al.*, 2002; Apajalahti *et al.*, 2004; Ijaz *et al.*, 2018). Porównanie mikroorganizmów występujących w świetle jelita i związanych z błoną śluzową wykazało znacznie większe bogactwo tych drugich, szczególnie w jelicie krętym i jelicie ślepych brojlerów (Borda-Molina *et al.*, 2016). Skład i aktywność mikroflory żołądkowo-jelitowej ulega ciągłym dynamicznym zmianom i zależy od wielu czynników. Zmiany w składzie mikroflory jelitowej mogą być uwarunkowane genetyczne (Meng *et al.*, 2014). Udział różnych grup drobnoustrojów zależy także od wieku (Williams *et al.*, 2013), stanu zdrowia (Abt and Artis, 2009) oraz diety kurczęcia. Istnieje również wiele badań

wykazujących wpływ środków przeciwdrobnoustrojowych na mikrobiom (Costa *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018).

Przedstawiciele rodzaju *Lactobacillus* cechuje olbrzymia różnorodność fizjologiczna i genetyczna. Fakt ten warunkuje różnice w stymulowanej przez nie odpowiedzi immunologicznej. Wybór szczepu *Lactobacillus* nie jest więc łatwym zadaniem i musi być dokonany z należytą starannością. Użycie szczepu o właściwościach probiotycznych może nieść dodatkowe korzyści, takie jak: wspomaganie utrzymania homeostazy przewodu pokarmowego ptaków, zwiększanie tolerancji organizmu na niekorzystne bodźce zewnętrzne, ułatwianie procesu trawienia i przyswajalności pasz, a w przypadku konieczności stosowania antybiotyków w celach leczniczych przyspieszanie okresu rekonwalescencji.

Poszukiwanie szczepu *Lactobacillus*, który mógłby zostać wykorzystany jako wektor w procesie immunizacji kurcząt *anti-Campylobacter*, rozpoczęliśmy od stworzenia kolekcji szczepów tego gatunku izolowanych od kur [publikacja nr 4, (Kobierecka *et al.*, 2017)]. 64 szczepy wyizolowano z próbek kału kurcząt z wolnego wybiegu, a 43 z kloaki ptaków hodowanych w komercyjnej fermie drobiowej. Zostały one zaklasyfikowane do gatunków dzięki amplifikacji genu kodującego 16S rRNA, sekwencjonowaniu i analizie porównawczej BLAST. Jednocześnie ta część badań pokazała, że skład gatunkowy szczepów wyizolowanych od kur chowu wolnego był bardziej różnorodny, choć w obu grupach ptaków najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem był *Lactobacillus salivarius*.

Następnie szczepy *Lactobacillus* zbadano pod kątem hamującego wpływu na wzrost pałeczek *Campylobacter*. Najsilniejszą aktywność *anti-Campylobacter in vitro* wykazywały gatunki *L. salivarius* i *L. plantarum*, podczas gdy aktywność antagonistyczna *L. agilis*, *L. johnsonii* i *L. crispatus* wobec *Campylobacter* zależała od szczepu użytego w eksperymencie. W hodowli prawie wszystkich szczepów gatunku *L. plantarum* i *L. salivarius* stężenie kwasu mlekowego było bardzo wysokie i wynosiło ok. 20 g/l, przy czym obserwowano przewagę jednego z enancjomerów: odpowiednio D-mleczanu lub L-mleczanu. Jedynym gatunkiem, którego przedstawiciele nie wykazywali aktywności *anti-Campylobacter* był *L. reuteri*. Szczepy te cechowała o połowę niższa produkcja mleczanów (ok. 10 g/l). Produkowany przez szczepy *Lactobacillus* kwas mlekowy prowadzi do destabilizacji ściany komórkowej *Campylobacter* i jest odpowiedzialny, przynajmniej częściowo, za zahamowanie wzrostu patogena.

Zdolność bakterii LAB do adhezji do śluzu jelitowego warunkuje powodzenie kolonizacji, bądź przedłużoną obecność w przewodzie pokarmowym. Stąd kolejnym eksperymentem było badanie ich właściwości adhezyjnych *in vitro*. Przeprowadzona analiza zdolności szczepów *Lactobacillus* do przylegania do polistyrenu (PS) stanowi duże uproszczenie sytuacji występującej *in vivo*, ale pozwala na wytypowanie bakterii o potencjalnie najwyższych zdolnościach adhezyjnych.

Przeprowadzona charakterystyka (badanie aktywności antagonistycznej *in vitro* i zdolności adhezyjnych) pozwoliła na wybór 11 szczepów *Lactobacillus*, które analizowano pod kątem ich przeżywalności w obecności soli żółciowych oraz w kwaśnym środowisku. Zdolność przeżycia w warunkach fizjologicznych organizmu jest jednym z podstawowych kryteriów selekcji szczepów probiotycznych. Probiotyki, aby mogły dotrzeć do dolnych odcinków układu pokarmowego gospodarza, powinny charakteryzować się zdolnością przeżycia podczas procesów trawiennych w żołądku i jelicie cienkim. Pierwszą barierą jest niskie pH żołądka i dwunastnicy, zaś drugą kwasy żółciowe produkowane w wątrobie i wydzielane do dwunastnicy. Badano również ich oporność na stres osmotyczny oraz określono profil fermentowanych przez nie węglowodanów. Ta część eksperymentów została wykonana we współpracy z grupą prof. J. Bardowskiego z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Ostatecznie, na podstawie uzyskanych wyników, wytypowano pięć szczepów *Lactobacillus* do eksperymentu badającego

ich wpływ na poziom kolonizacji jelit ślepych kurcząt przez pałeczki *Campylobacter*. Po podaniu szczepów *L. salivarius* i *L. crispatus* nie zaobserwowano ograniczenia kolonizacji jelit ptaków przez komórki patogena. Wysoka aktywność antagonistyczna wobec patogena w warunkach *in vitro* nie ma prostego przełożenia na warunki *in vivo* i wskazuje raczej na złożone mechanizmy interakcji pomiędzy składnikami mikrobiota. Obiecującymi nośnikami antygenów *Campylobacter* wydają się przedstawiciele gatunku *L. plantarum* (18A i 20A), które były w stanie obniżyć poziom kolonizacji jelit kurcząt przez szczep *C. jejuni*. Aktualnie prowadzone są eksperymenty, których celem jest określenie czasu utrzymywania się tych bakterii w przewodzie pokarmowym kurcząt, co umożliwi optymalizację schematu immunizacji.

Podczas wykonywania wyżej opisanych eksperymentów ściśle współpracowałam z doktorantką Patrycją Kobierecką, będąc jednocześnie promotorem pomocniczym jej rozprawy doktorskiej.

Liposomy: Atrakcyjnymi nośnikami antygenów szczepionkowych są liposomy. Ich przydatność do celów immunizacyjnych po raz pierwszy opisali Allison i Gregoriadis w 1974 roku (Watson *et al.*, 2012). Zaletą liposomów – dwuwarstwowych pęcherzyków złożonych z amfipatycznych fosfolipidów, jest wydłużenie czasu uwalniania antygeny z ich wnętrza, ochrona antygeny przed nadmierną proteolizą i ułatwienie wchłaniania przez komórki prezentujące antygen (APC – *Antigen-Presenting Cells*) (Watson *et al.*, 2012; Watarai *et al.*, 2013), co prowadzi do stymulacji odpowiedzi immunologicznej nie tylko typu humoralnego, lecz także typu komórkowego (Schwendener, 2014). Poza tym mogą być one produkowane na dużą skalę, przechowywane przez stosunkowo długi czas i, co najważniejsze, są uznane za bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm (Romero and Morilla, 2011; Watson *et al.*, 2012). Jak dotąd przeprowadzone nieliczne badania wskazują, że liposomy mogą być z powodzeniem stosowane do stymulacji układu odpornościowego kurcząt (Li *et al.*, 2004; Chiou *et al.*, 2009; Yaguchi *et al.*, 2009).

Wyniki wielu badań wskazują na silniejszą odpowiedź immunologiczną w przypadku liposomów, w których antygeny zostały wyeksponowane na ich powierzchni. Białka posiadające wyraźnie wyodrębnione domeny hydrofobowe mogą być z powodzeniem inkorporowane do błon liposomów przez wymieszanie liposomów jednowarstwowych otrzymanych metodą ekstruzji z roztworem białka. Ta metoda została zastosowana w przypadku białka rCjaAD [publikacja 3, (Kobierecka *et al.*, 2016b)]. Liposomy przygotowane zostały we współpracy z dr. hab. Jerzym Gubernatorem z Uniwersytetu Wrocławskiego.

Droga podania antygeny: Droga podania preparatu szczepionkowego to jeden z czynników determinujących poziom odpowiedzi immunologicznej i skuteczność immunizacji. Opracowana w latach 90. XX wieku technologia *in ovo* polega na podaniu antygenów do płynu owodniowego lub bezpośrednio do rozwijającego się zarodka. Immunizacja kurcząt *in ovo* od dawna jest szeroko stosowana przez przemysł drobiarski w zapobieganiu chorobom wirusowym (Negash *et al.*, 2004). Ten sposób aplikacji wykorzystano m. in. w przypadku szczepionki przeciwko chorobie Mareka, nowotworowej chorobie ptaków wywoływanej przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*. Okazało się, że po podaniu szczepionki *in ovo* znacznie szybciej dochodzi do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej chroniącej ptaki przed zakażeniem (Peebles, 2018).

Proces rearanżacji genów immunoglobulin u ptaków występuje tylko raz podczas rozwoju embrionalnego i jest znany jako somatyczna konwersja genów. U kurcząt prekursorzy limfocytów B wytwarzających przeciwciała (*Prebursal Stem Cells*) są syntetyzowane między 8 a 14 dniem embriogenezy, a następnie zasiedlają torebkę Fabrycjusza, gdzie są poddawane różnicowaniu i klonowaniu. Dlatego podawanie szczepionki *in ovo* w czasie, gdy następuje rozwój komórek prekursorowych limfocytów ma swoje

uzasadnienie. Dodatkowe zalety tej drogi immunizacji to zmniejszenie stresu w porównaniu z tradycyjnym szczepieniem oraz możliwość automatyzacji procesu szczepienia (Toro *et al.*, 2007).

Prototypy szczepionek zostały wstrzyknięte do płynu owodniowego jaj zawierających osiemnastodniowe kurcze embriony [publikacja nr 3, (Kobierecka *et al.*, 2016b)]. Immunizacja kurcząt *in ovo* przy zastosowaniu liposomów niosących rekombinowane białko rCjaAD doprowadziła do redukcji kolonizacji jelit przez pałeczki *Campylobacter*. Odnotowano średnie obniżenie o 2 rzędy wielkości w stosunku do grupy kontrolnej. Zwraca jednak uwagę fakt, że w jelitach połowy kurcząt kolonizacja była na poziomie niewykrywalnym zastosowaną metodą, czyli poniżej 1000 cfu/ gram zawartości jelita.

W roli nośników antygenów testowano także cząstki GEM (*Gram-positive Enhancer Matrix*) uzyskane z komórek *L. lactis*. Struktury te zawierają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), przez co zdolne są do indukowania procesów prozapalnych, a więc mogą wzmocnić działanie immunoterapeutyczne (Bosma *et al.*, 2006; Audouy *et al.*, 2007). Cząstki GEM zawierające na swojej powierzchni antygeny rCjaA i rCjaD podane *in ovo* nie wykazywały jednak działania ochronnego. Podanie podskórne i doustne cząstek GEM również nie prowadziło do obniżenia kolonizacji jelit kurcząt.

Wyższy poziom protekcji warunkowany przez liposomy może sugerować lepszą ochronę antygeny przed degradacją, jak również większą wydajność pobierania przez komórki prezentujące antygen. Jednocześnie zwraca uwagę na pozytywny efekt wczesnej modulacji systemu immunologicznego, co ma szczególne znaczenie w przypadku brojlerów, których długość życia nie przekracza 8 tygodni.

Część eksperymentów na modelu zwierzęcym przeprowadzona została we współpracy z dr. Maciejem Kuczkowskim z Wrocławskiego Uniwersytetu Przyrodniczego.

Przedstawione badania finansowane były z grantu MNiSW 2011/03/B/NZ/0059.

Główne osiągnięcia poznawcze

1. konstrukcja hybrydowego białka *Campylobacter* rCjaAD (białko CjaA wyrażające na powierzchni epitopy białka CjaD);
2. opracowanie sposobu klonowania genów *Campylobacter* w komórkach bakterii LAB, tak aby ich produkty były białkami zakotwiczonymi w osłonach komórkowych;
3. charakterystyka funkcjonalna ponad 60 szczepów rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z przewodu pokarmowego kurcząt, co pozwoliło na wytypowanie szczepu nośnikowego do konstrukcji szczepionki;
4. ocena skuteczności działania opracowanej szczepionki w zależności od drogi podania.

PODSUMOWANIE

Różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter* nie tylko znajduje odzwierciedlenie w patobiologii zakażenia u kurcząt, ale też hamuje rozwój skutecznej szczepionki. Wymagania skutecznej immunizacji mogą spełnić jedynie schematy szczepień uwzględniające tę różnorodność i złożoność antygenową. Można to osiągnąć albo poprzez wieloantygenowy skład szczepionki, albo przez zastosowanie różnych antygenów w kolejnych immunizacjach. Tak więc niezbędna jest identyfikacja nowych antygenów – białek konserwowanych w obrębie wielu serotypów, występujących w komórce w dużej ilości i indukujących silną odpowiedź immunologiczną. Jednocześnie konieczne są strategie mające na celu wzmocnienie/modulację odpowiedzi immunologicznej kurcząt.

Proponowany przeze mnie schemat immunizacji powstały w oparciu o przeprowadzone, opisane powyżej, eksperymenty obejmowałby dwa główne etapy: podanie *in ovo* liposomów niosących rekombinowane hybrydowe białka zawierające epitopy kilku antygenów *Campylobacter* jako dawki podstawowej, a następnie podanie kurczętom, już po wykluciu, dawki przypominającej w postaci żywej szczepionki (żywe szczepy *L. plantarum* produkujące rekombinowane, hybrydowe białka). Dodatkowo można rozważyć zastosowanie odpowiedniego adiuwantu, co będzie kolejnym etapem planowanych przeze mnie badań.

Badania te niewątpliwie posiadają aspekt zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Ich wynikami jest zainteresowana francuska weterynaryjna firma farmaceutyczna CEVA – jedna z 10 największych tego typu firm na świecie. Po spotkaniu, które odbyło się w marcu 2019 roku w Bordeaux (Francja) firma ta wyraziła chęć nawiązania współpracy i finansowania dalszych badań nad szczepionkami dla kurcząt.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- **Analiza immunogennych białek *Campylobacter* i oznaczenie ich epitopów:** Badania te pozwolą na uzyskanie nowych białek hybrydowych łączących w sobie epitopy kilku antygenów, które są zdolne do indukcji przeciwciał rozpoznających natywne antygeny. Ich jednoczesna aplikacja pozwoli na indukcję silniejszej, w porównaniu z podaniem pojedynczego antygeny, odpowiedzi immunologicznej w organizmach kurcząt. Źródłem epitopów będą białka, które zidentyfikowałam jako silnie reagujące z kurzymi matczynymi przeciwciałami.

- **Analiza genów i białek biorących udział w adhezji bakterii *Lactobacillus* spp.:** Jak dotąd procesy adhezji szczepów rodzaju *Lactobacillus* nie zostały w pełni wyjaśnione, podobnie jak skomplikowane mechanizmy oddziaływań tych mikroorganizmów z gospodarzem. Planowane badania nie tylko pozwolą na wybór szczepu najskuteczniejszego z punktu widzenia konstrukcji szczepionki, ale umożliwią poznanie genetycznych aspektów różnorodności procesów adhezji. Znajomość genów, których produkty uwikłane są w proces adhezji, może umożliwić manipulowanie potencjałem probiotycznym szczepów.

Wiedza zdobyta dzięki realizacji tych projektów może ułatwić opracowanie szczepionek przeciwko innym patogenom drobiu.

LITERATURA

- Abt M.C., and Artis D. 2009. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 25(6), 496-502.
- Ajene A.N., Fischer Walker C.L., and Black R.E. 2013. Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *J Health Popul Nutr* 31(3), 299-307.
- Apajalahti J., Kettunen A., and Graham H. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult Sci J* 60, 223-32.
- Asakura M., Samosornsuk W., Hinenoya A., Misawa N., Nishimura K., Matsuhisa A., et al. 2008. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(2), 260-6.
- Audouy S.A., van Selm S., van Roosmalen M.L., Post E., Kanninga R., Neef J., et al. 2007. Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine* 25(13), 2497-506.
- Awad W.A., Dublecz F., Hess C., Dublecz K., Khayal B., Aschenbach J.R., et al. 2016. *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. *Poult Sci* 95(10), 2259-65.
- Awad W.A., Molnar A., Aschenbach J.R., Ghareeb K., Khayal B., Hess C., et al. 2015. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immun* 21(2), 151-60.
- Blaser M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *C. jejuni* infections. *J Infect Dis* 176 Suppl 2, S103-5.
- Bleumink-Pluym N.M., van Alphen L.B., Bouwman L.I., Wosten M.M., and van Putten J.P. 2013. Identification of a functional type VI secretion system in *C. jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS Pathog* 9(5), e1003393.
- Bolotin A., Mauger S., Malarne K., Ehrlich S.D., and Sorokin A. 1999. Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1-4), 27-76.
- Bolton D.J. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol* 48, 99-108.
- Borda-Molina D., Vital M., Sommerfeld V., Rodehutsord M., and Camarinha-Silva A. 2016. Insights into Broilers' Gut Microbiota Fed with Phosphorus, Calcium, and Phytase Supplemented Diets. *Front Microbiol* 7, 2033.
- Bosma T., Kanninga R., Neef J., Audouy S.A., van Roosmalen M.L., Steen A., et al. 2006. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72(1), 880-9.
- Broker M., Dull P.M., Rappuoli R., and Costantino P. 2009. Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages. *Vaccine* 27(41), 5574-80.
- Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A. et al. 2010. Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine* 28(4), 1094-105.
- Cawthraw S.A., and Newell D.G. 2010. Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis* 54(1), 86-93.
- Chiou C.J., Tseng L.P., Deng M.C., Jiang P.R., Tasi S.L., Chung T.W., et al. 2009. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials* 30(29), 5862-8.
- Clark-Curtiss J.E., and Curtiss R., 3rd. 2018. *Salmonella* Vaccines: Conduits for Protective Antigens. *J Immunol* 200(1), 39-48.
- Clark J.D., Oakes R.D., Redhead K., Crouch C.F., Francis M.J., Tomley F.M., et al. 2012. *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine* 30(16), 2683-8.
- Conlan A.J., Coward C., Grant A.J., Maskell D.J., and Gog J.R. 2007. *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. *J R Soc Interface* 4(16), 819-29.
- Connerton P.L., Richards P.J., Lafontaine G.M., O'Kane P.M., Ghaffar N., Cummings N.J., et al. 2018. The effect of the timing of exposure to *Campylobacter jejuni* on the gut microbiome and inflammatory responses of broiler chickens. *Microbiome* 6(1), 88.
- Cordwell S.J., Len A.C., Touma R.G., Scott N.E., Falconer L., et al. 2008. Identification of membrane-associated proteins from *C. jejuni* strains using complementary proteomics technologies. *Proteomics* 8(1), 122-39.
- Costa M.C., Bessegatto J.A., Alfieri A.A., Weese J.S., Filho J.A. et al. 2017. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLoS One* 12(2), e0171642.
- Curtiss R., 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., et al. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. *Infect Immun* 77(3), 1071-82.
- Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., and Gross U. 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 300(4), 205-11.
- de Zoete M.R., Keestra A.M., Roszczenko P., and van Putten J.P. 2010. Activation of human and chicken toll-like receptors by *Campylobacter* spp. *Infect Immun* 78(3), 1229-38.

- Dieye Y., Oxaran V., Ledue-Clier F., Alkhalaf W., Buist G., Juillard V., et al. 2010. Functionality of sortase A in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 76(21), 7332-7.
- EFSA. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J* 14, 4634.
- EFSA. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017 15(12)(5077), 228.
- EFSA 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018 16 (12)(5500), 262 pp.
- El-Shibiny A., Scott A., Timms A., Metawea Y., Connerton P., et al. 2009. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *C. jejuni* and *C. coli* colonizing broiler chickens. *J Food Prot* 72(4), 733-40.
- Esson D., Mather A.E., Scanlan E., Gupta S., de Vries S.P., Bailey D., et al. 2016. Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci Rep* 6, 38303.
- Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Munoz-Quezada S., and Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* 109 Suppl 2, S35-50.
- Garvis S.G., Puzon G.J., and Konkel M.E. 1996. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* 29-kilodalton periplasmic binding protein. *Infect Immun* 64(9), 3537-43.
- Godlewska R., Wisniewska K., Pietras Z., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 2009. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiol Lett* 298(1), 1-11.
- Goodfellow J., and Willison H. 2016. Guillain-Barre syndrome: a century of progress. *Nat Rev Neurol* 12(12), 723-31.
- Guerry P., Poly F., Riddle M., Maue A.C., Chen Y.H., and Monteiro M.A. 2012. *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 7.
- Han Z., Pielsticker C., Gerzova L., Rychlik I., and Rautenschlein S. 2016. The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev Comp Immunol* 62, 58-71.
- Havelaar A.H., Ivarsson S., Lofdahl M., and Nauta M.J. 2013. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol Infect* 141(2), 293-302.
- Hermans D., Pasmans F., Heyndrickx M., Immerseel F., Martel A., Van Deun K., et al. 2012. A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *C. jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit Rev Microbiol* 38(1), 17-29.
- Hermans D., Van Steendam K., Verbrugge E., Verlinden M., Martel A., Seliwiorstow T., et al. 2014. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Vet Res* 45, 27.
- Holmes K., Mulholland F., Pearson B.M., Pin C., McNicholl-Kennedy J., Ketley J.M., et al. 2005. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* 151(Pt 1), 243-57.
- Hu Y., Huang J., and Jiao X.A. 2014a. Screening of genes expressed in vivo during interaction between chicken and *Campylobacter jejuni*. *J Microbiol Biotechnol* 24(2), 217-24.
- Hu Y., Huang J., Li Q., Shang Y., Ren F., Jiao Y., et al. 2014b. Use of in vivo-induced antigen technology to identify in vivo-expressed genes of *Campylobacter jejuni* during human infection. *J Microbiol Biotechnol* 24(3), 363-70.
- Humphrey S., Chaloner G., Kemmett K., Davidson N., Williams N., Kipar A., et al. 2014. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio* 5(4), e01364-14.
- Ijaz U.Z., Sivaloganathan L., Mckenna A., Richmond A., Kelly C., Linton M., et al. 2018. Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. doi: 10.3389/fmicb.2018.02452
- Indikova I., Humphrey T.J., and Hilbert F. 2015. Survival with a Helping Hand: *Campylobacter* and Microbiota. *Front Microbiol* 6, 1266.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Laniewski P., and Wyszynska A. 2009. Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert Rev Vaccines* 8(5), 625-45.
- Kaakoush N.O., Castano-Rodriguez N., Mitchell H.M., and Man S.M. 2015. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev* 28(3), 687-720.
- Kaakoush N.O., Sodhi N., Chenu J.W., Cox J.M., and Mitchell H.M. 2014. The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut Pathog* 6, 18.
- Kajikawa A. 2012. Protection against *Salmonella* via immunization with recombinant lactic acid bacteria. *Nihon Rinsho* 70(8), 1293-7.
- Karlyshev A.V., Ketley J.M., Wren B.W. 2005. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiol Rev* 29(2), 377-90.
- Kirkpatrick B., and Tribble D. 2011. Update on human *C. jejuni* infections. *Curr Opin Gastroenterol* 27(1), 1-7.
- Kobierecka P.A., Olech B., Ksiazek M., Derlatka K., Adamska I., Majewski P.M., et al. 2016a. Cell Wall Anchoring of the *Campylobacter* Antigens to *Lactococcus lactis*. *Front Microbiol* 7, 165.

- Kobierecka P.A., Wyszynska A.K., Aleksandrak-Piekarczyk T., Kuczkowski M., Tuzimek A., Piotrowska W., et al. 2017. *In vitro* characteristics of *Lactobacillus spp.* strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *Microbiologyopen* 6(5).
- Kobierecka P.A., Wyszynska A.K., Gubernator J., Kuczkowski M., Wisniewski O., et al. 2016b. Chicken Anti-*Campylobacter* Vaccine - Comparison of Various Carriers and Routes of Immunization. *Front Microbiol* 7, 740.
- Korolik V. 2018. The role of chemotaxis during *C. jejuni* colonisation and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 47, 32-7.
- Korsak D., Mackiw E., Rozynek E., and Zylowska M. 2015. Prevalence of *Campylobacter spp.* in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef Meat in Poland between 2009 and 2013. *J Food Prot* 78(5), 1024-8.
- Kumar S., Chen C., Indugu N., Werlang G.O., Singh M., Kim W.K., et al. 2018. Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *PLoS One* 13(2), e0192450.
- Lacharme-Lora L., Chaloner G., Gilroy R., Humphrey S., Gibbs K., Jopson S., et al. 2017. B lymphocytes play a limited role in clearance of *Campylobacter jejuni* from the chicken intestinal tract. *Sci Rep* 7, 45090.
- Layton S., Morgan M., Cole K., Kwon Y., Donoghue D., et al. 2011. Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *C. jejuni* in broiler chickens. *Clin Vaccine Immunol* 18(3), 449-54.
- LeCureux J.S., and Dean G.A. 2018. *Lactobacillus* Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens. *mSphere* 3(3).
- Lee M.D., and Newell D.G. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis* 50(1), 1-9.
- Lengerh A., Moges F., Unakal C., and Anagaw B. 2013. Prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern of *Campylobacter* species among under five diarrheic children at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatr* 13, 82.
- Lesinski G.B., and Westerink M.A. 2001. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microbiol Methods* 47(2), 135-49.
- Li W., Watarai S., Iwasaki T., and Kodama H. 2004. Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev Comp Immunol* 28(1), 29-38.
- Lopetuso L.R., Scadaferri F., Petito V., and Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog* 5(1), 23.
- Makela P.H., Kayhty H., Leino T., Auranen K., Peltola H., Ekstrom N., et al. 2003. Long-term persistence of immunity after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine* 22(2), 287-92.
- Marder Mph E., Griffin P., Cieslak P., Dunn J., Hurd S., and Jervis R. 2018. Preliminary incidence and trends of Infections with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67(11), 324-8.
- Marelli B., Perez A.R., Banchio C., de Mendoza D., and Magni C. 2011. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. *J Virol Methods* 175(1), 28-37.
- Maue A.C., Mohawk K.L., Giles D.K., Poly F., Ewing C.P., Jiao Y., et al. 2013. The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. *Infect Immun* 81(3), 665-72.
- Meng H., Zhang Y., Zhao L., Zhao W., He C., Honaker C.F., et al. 2014. Body weight selection affects quantitative genetic correlated responses in gut microbiota. *PLoS One* 9(3), e89862.
- Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Dory D., and Chemaly M. 2016. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J Appl Microbiol* 120(5), 1139-73.
- Monteiro M.A., Baqar S., Hall E.R., Chen Y.H., Porter C.K., Bentzel D.E., et al. 2009. Capsule polysaccharide conjugate vaccine against diarrheal disease caused by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 77(3), 1128-36.
- Muller A., Thomas G.H., Horler R., Brannigan J.A., Blagova E., Levnikov V.M., et al. 2005. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Mol Microbiol* 57(1), 143-55.
- Murray C.J., Vos T., Lozano R., Naghavi M., Flaxman A.D., Michaud C., et al. 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380(9859), 2197-223.
- Nauta M.J., Jacobs-Reitsma W.F., and Havelaar A.H. 2007. A risk assessment model for *Campylobacter* in broiler meat. *Risk Anal* 27(4), 845-61.
- Negash T., al-Garib S.O., and Gruys E. 2004. Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q* 26(2), 76-87.
- Newell D.G., Elvers K.T., Dopfer D., Hansson I., Jones P., James S., et al. 2011. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter spp.* on poultry farms. *Appl Environ Microbiol* 77(24), 8605-14.
- Nouaille S., Ribeiro L.A., Miyoshi A., Pontes D., Le Loir Y., Oliveira S.C., et al. 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2(1), 102-11.

- Nyati K.K., and Nyati R. 2013. Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barre syndrome: an update. *Biomed Res Int* 2013, 852195.
- Pawelec D., Rozynek E., Popowski J., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 1997. Cloning and characterization of a *C. jejuni* 72Dz/92 gene encoding a 30 kDa immunopositive protein, component of the ABC transport system; expression of the gene in avirulent *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19(2), 137-50.
- Peebles E.D. 2018. *In ovo* applications in poultry: A review. *Poult Sci* 97(7), 2322-38.
- Pequegnat B., Laird R.M., Ewing C.P., Hill C.L., Omari E., Poly F., et al. 2017. Phase-Variable Changes in the Position of O-Methyl Phosphoramidate Modifications on the Polysaccharide Capsule of *Campylobacter jejuni* Modulate Serum Resistance. *J Bacteriol* 199(14).
- Poly F., Noll A.J., Riddle M.S., and Porter C.K. 2018. Update on *Campylobacter* vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*, 1-12.
- Poly F., Serichatalergs O., Schulman M., Ju J., Cates C.N., Kanipes M., et al. 2011. Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 49(5), 1750-7.
- Pontes D.S., de Azevedo M.S., Chatel J.M., Langella P., Azevedo V., and Miyoshi A. 2011. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif* 79(2), 165-75.
- Reid W.D., Close A.J., Humphrey S., Chaloner G., Lacharme-Lora L., Rothwell L., et al. 2016. Cytokine responses in birds challenged with the human food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* implies a Th17 response. *R Soc Open Sci* 3(3), 150541.
- Romero E.L., and Morilla M.J. 2011. Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 3(4), 356-75.
- Rose A., Kay E., Wren B.W., and Dallman M.J. 2012. The *Campylobacter jejuni* NCTC11168 capsule prevents excessive cytokine production by dendritic cells. *Med Microbiol Immunol* 201(2), 137-44.
- Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.M., Norrung B., and Christensen B.B. 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int J Food Microbiol* 83(1), 87-103.
- Rubin C.J., Zody M.C., Eriksson J., Meadows J.R., Sherwood E., Webster M.T., et al. 2010. Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature* 464(7288), 587-91.
- Sahin O., Kassem, II, Shen Z., Lin J., Rajashekara G., and Zhang Q. 2015. *Campylobacter* in Poultry: Ecology and Potential Interventions. *Avian Dis* 59(2), 185-200.
- Sahin O., Luo N., Huang S., and Zhang Q. 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl Environ Microbiol* 69(9), 5372-9.
- Sahin O., Zhang Q., Meitzler J.C., Harr B.S., Morishita T.Y., and Mohan R. 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Appl Environ Microbiol* 67(9), 3951-7.
- Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17(1), 7-15.
- Schwendener R.A. 2014. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2(6), 159-82.
- Serruto D., Spadafina T., Ciocchi L., Lewis L.A., Ram S., Tontini M., et al. 2010. *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8), 3770-5.
- Shoaf-Sweeney K.D., Larson C.L., Tang X., and Konkel M.E. 2008. Identification of *Campylobacter jejuni* proteins recognized by maternal antibodies of chickens. *Appl Environ Microbiol* 74(22), 6867-75.
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., and Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2, 200.
- Skarp C.P.A., Hanninen M.L., and Rautelin H.I.K. 2016. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 22(2), 103-9.
- Stavropoulos P.G., Soura E., Kanelleas A., Katsambas A., and Antoniou C. 2015. Reactive arthritis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29(3), 415-24.
- Theoret J.R., Cooper K.K., Zekarias B., Roland K.L., Law B.F., Curtiss R., 3rd, et al. 2012. The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 19(9), 1426-31.
- Thibodeau A., Fravallo P., Yergeau E., Arseneault J., and Letellier A. 2015. Chicken Caecal Microbiome Modifications Induced by *C. jejuni* Colonization and by a Non-Antibiotic Feed Additive. *PLoS One* 10(7), e0131978.
- Toro H., Tang D.C., Suarez D.L., Sylte M.J., Pfeiffer J., and Van Kampen K.R. 2007. Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine* 25(15), 2886-91.
- van der Wielen P.W., Keuzenkamp D.A., Lipman L.J., van Knapen F., and Biesterveld S. 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb Ecol* 44(3), 286-93.

- Velayudhan J., and Kelly D.J. 2002. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148(Pt 3), 685-94.
- Villena J., Oliveira M.L., Ferreira P.C., and Alvarez S. 2011. Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: future opportunities and challenges. *Int Immunopharmacol* 11(11), 1633-45.
- Vorwerk H., Mohr J., Huber C., Wensel O., Schmidt-Hohagen K., et al. 2014. Utilization of host-derived cysteine-containing peptides overcomes the restricted sulphur metabolism of *C. jejuni*. *Mol Microbiol* 93(6), 1224-45.
- Wang S., Kong Q., and Curtiss R., 3rd. 2013. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog* 58, 17-28.
- Wang S., Li Y., Scarpellini G., Kong W., Shi H., Baek C.H., et al. 2010. *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis in vivo to enhance immunogenicity. *Infect Immun* 78(9), 3969-80.
- Watarai S., Iwase T., Tajima T., Yuba E., and Kono K. 2013. Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier. *ScientificWorldJournal* 2013, 903234.
- Watson D.S., Endsley A.N., and Huang L. 2012. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* 30(13), 2256-72.
- Williams L.K., Sait L.C., Trantham E.K., Cogan T.A., and Humphrey T.J. 2013. *Campylobacter* infection has different outcomes in fast- and slow-growing broiler chickens. *Avian Dis* 57(2), 238-41.
- Wyszynska A., Kobińska P., Bardowski J., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 2015. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(7), 2967-77.
- Wyszynska A., Raczko A., Lis M., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 2004. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine* 22(11-12), 1379-89.
- Wyszynska A., Tomczyk K., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 2007. Comparison of the localization and post-translational modification of *C. coli* CjaC and its homolog from *C. jejuni*, Cj0734c/HisJ. *Acta Biochim Pol* 54(1), 143-50.
- Wyszynska A., Zycka J., Godlewska R., and Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008. The *C. jejuni/coli cjaA* (*cj0982c*) gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. *Curr Microbiol* 57(3), 181-8.
- Yaguchi K., Ohgitani T., Noro T., Kaneshige T., and Shimizu Y. 2009. Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. *Avian Dis* 53(2), 245-9.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Publikacje habilitantki w temacie:

- Pawelec D., **Wszyńska A.**, Korsak D., Popowski J., Rożynek E., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2000. Genetic diversity of *Campylobacter* genes coding immunodominant proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 43-9.
- Wszyńska A.**, Pawelec D.P., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2003. Immunological characterization of the *Campylobacter jejuni* 72Dz/92 *cjaD* gene product and its fusion with B subunit of *E. coli* LT toxin. *Acta Microbiol. Pol.* 51: 313-26.
- Wszyńska A.**, Lis M., Raczko A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2004. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain expressing *C. jejuni cjaA* gene elicits specific humoral immune responses associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine* 22: 1379-89.
- Raczko A., **Wszyńska A.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2004. Antigenicity of the *C. coli* CjaA protein produced by *E. coli*. *Pol. J. Microbiol.* 53: 61-4.

Pracę naukową w Zakładzie Genetyki Bakterii UW rozpoczęłam od oceny przydatności immunogennych białek *Campylobacter* w konstrukcji szczepionki.

Przy konstrukcji szczepionki znaczenie mają nie tylko właściwości immunogenne antygenów (Wszyńska *et al.*, 2003; Raczko *et al.*, 2004). Równie istotne jest rozpowszechnienie wybranego antygeny wśród klinicznych izolatów danego gatunku bakterii. W przypadku szczepów *C. jejuni* wyróżniono ponad 100 serotypów (klasyfikacja w oparciu o ciepłochwiejny antygen wg Lior), jednak zdecydowana większość izolowanych na danym obszarze szczepów (75%) należy tylko do kilku z nich.

Analizowałam rozprzestrzenienie genów *cjaA*, *cjaC* oraz *cjaD* w genomach 31 szczepów rodzaju *Campylobacter* należących do najczęściej występujących serotypów. Stosując technikę PCR oraz metodę hybrydyzacji DNA-DNA (dot-blot) potwierdziłam, że geny te występują w genomach wszystkich przebadanych szczepów (Pawelec *et al.*, 2000).

Doustne szczepienie kurcząt atenuowanym szczepem *Salmonella enterica* sv. Typhimurium χ 3987 z mutacjami Δ *crp* Δ *cya* indukuje silną odpowiedź immunologiczną, zarówno typu komórkowego jak i humoralnego, chroniącą ptaki przed kolonizacją ich przewodu pokarmowego przez wirulentne szczepy *S. enterica*. Szczep ten od 1999 roku jest licencjonowaną szczepionką dla kurcząt anty-*Salmonella* w USA (Megan Health Inc., St. Louis, MO, USA). Został on wykorzystany do przeniesienia wytypowanego antygeny *Campylobacter* (CjaA) do organizmu kurcząt (Wszyńska *et al.*, 2004). Za zniesienie jego wirulencji odpowiadają mutacje Δ *crp* Δ *cya*, natomiast mutacja w genie *asd* komplementowana przez dziką kopię tego genu umieszczoną na plazmidzie umożliwiła klonowanie heterologicznych genów bez stosowania antybiotyków jako markerów selekcyjnych. Zakładano, że preparat tego rodzaju uniemożliwi lub przynajmniej ograniczy zasiedlenie jelita ptaków przez oba rodzaje enteropatogenów, co przyczyni się do obniżenia poziomu ludzkich infekcji.

Oceniono poziom specyficznej odpowiedzi immunologicznej indukowanej doustnym podaniem kurczętom szczepu *Salmonella enterica* sv. Typhimurium niosącego gen *cjaA* oraz efekt ochronny badanego prototypu szczepionki. Eksperyment protekcyjny, w którym poddane immunizacji kurczęta infekowano dzikim szczepem *Campylobacter* wykazał skuteczność opracowanego prototypu w warunkach laboratoryjnych. Jedynie u trzech z dwudziestu szczepionych kurcząt stwierdzono obecność *Campylobacter* powyżej poziomu detekcji czyli 1×10^3 CFU/g zawartości jelita. W odróżnieniu od szczepionych kurcząt poziom kolonizacji u wszystkich nieimmunizowanych zwierząt był bardzo wysoki – około 1×10^9 /g zawartości jelita.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Charakterystyka antygenów *Campylobacter* i analiza ich potranslacyjnych modyfikacji:

Publikacje habilitantki w temacie:

- Wyszynska A.**, Pawlowski M., Bujnicki J., Pawelec D., van Putten J.P.M., Brzuszkiewicz E., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2006. Genetic characterization of the *cjaAB* operon of *Campylobacter coli*. *Pol. J. Microbiol.* 55: 85-94.
- Wyszynska A.**, Tomczyk K., Jagusztyn Krynicka E.K. 2007. Comparison of the localization and post-translational modification of the *Campylobacter coli* CjaC and its homolog from *Campylobacter jejuni* (Cj0734c/HisJ). *Acta Bioch. Pol.* 54(1): 143-50.
- Wyszynska A.**, Życka J., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2008. The *Campylobacter jejuni/coli cjaA* (*cj0982c*) gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. *Curr. Microbiol.* 57(3): 181-8.
- Łasica A., **Wyszynska A.**, Szymanek K., Majewski P., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2010. *Campylobacter* protein oxidation influences epithelial cell invasion or intracellular survival as well as intestinal tract colonization in chickens. *J. Appl. Genet.* 51: 383-93.
- Grabowska A., Wandel M., Łasica A., Nesteruk M., Roszczenko P., **Wyszynska A.**, Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2011. *Campylobacter jejuni dsb* gene expression is regulated by iron concentration in a Fur-dependent manner and by a translational coupling mechanism. *BMC Microbiol.* 11: 166.

Kolejnym etapem była charakterystyka antygenów *Campylobacter*, a w szczególności analiza ich potranslacyjnych modyfikacji.

Analiza z wykorzystaniem genu reporterowego wykazała, że gen *cjaA* tworzy razem z występującą poniżej otwartą ramką odczytu operon, choć kodują one różne pod względem funkcjonalnym białka. Metodą RACE określono natomiast położenie miejsca startu transkrypcji operonu *cjaAB* 46 bp powyżej punktu początkowego translacji (Wyszynska *et al.*, 2006).

W sekwencji aminokwasowej białek CjaA i CjaC, jak również Dsbl, odnaleziono potencjalne miejsca glikozylacji, zarówno typu O jak i N. Doświadczenia z wykorzystaniem komórek *E. coli* niosących geny *pgl* *Campylobacter*, oraz przeprowadzenie mutagenезы specyficznej do miejsca potwierdziły, że białka te podlegają N-glikozylacji (Wyszynska *et al.*, 2007, Wyszynska *et al.*, 2008, Grabowska *et al.*, 2011). *Campylobacter* jest jedyną, jak dotąd, opisaną bakterią z dobrze scharakteryzowanym systemem N-glikozylacji. Aktualnie tego rodzaju modyfikację wykazano dla 65 białek *C. jejuni*, choć przewiduje się, że glikozylacji ulega ponad 150 białek proteomu tego patogena. Pojawianie się nowych w pełni zsekwencjonowanych genomów *Campylobacter* wykazało, że geny systemu *pgl* odpowiedzialne za wprowadzanie powyższej modyfikacji obecne są we wszystkich gatunkach *Campylobacter*.

Znaczenie procesu glikozylacji w komórkach mikroorganizmów nie zostało jak dotąd dokładnie wyjaśnione. Jednak, podobnie jak w przypadku organizmów eukariotycznych, oligosacharydowe grupy wywierają istotny wpływ na strukturę i funkcję białka modyfikowanego przez ich dołączenie. Pozwalają one m. in. na utrzymanie właściwej konformacji łańcuchów polipeptydowych, czy też chronią białko przed rozpadem proteolitycznym. Wyniki wielu badań wskazują, że mogą mieć one znaczenie w interakcji z komórkami gospodarza lub otaczającym środowiskiem - pełnią one rolę determinant antygenowych i uczestniczą w zjawiskach biologicznego rozpoznawania i adhezji.

W komórkach organizmów prokariotycznych lipoproteiny pełnią m. in. funkcje strukturalne, enzymatyczne oraz biorą udział w procesach adhezji i transportu. Ponadto, bakteryjne lipoproteiny, jako tzw. molekularne wzorce związane z patogenami (PAMP – *Patogen Associated Molecular Patterns*) poprzez oddziaływanie na komórki odpowiedzi nieswoistej mają zdolność modulowania reakcji układu odpornościowego.

Analiza sekwencji aminokwasowej białek CjaA oraz CjaC wykazała na ich N-końcach obecność sekwencji sygnałnej, która może być procesowana zarówno przez sygnałową peptydazę I jak i peptydazę II. Stosując znakowany kwas palmitynowy udowodniono, że białka te w komórkach *E. coli* są lipoproteinami. Przeprowadzono również doświadczenie polegające na zastąpieniu cysteiny lipoboxu białka CjaA oraz

białka CjaC prostym aminokwasem o ładunku obojętnym, jakim jest alanina. Cysteina, będąca ostatecznie pierwszym aminokwasem dojrzałej cząsteczki lipoprotein, we wstępnym etapie jest modyfikowana przez przyłączenie do jej sulfhydrylowej grupy reszty glicerolu podstawionego dwoma łańcuchami kwasów tłuszczowych. Część lipidowa modyfikująca cysteinę umożliwi zakotwiczenie lipoprotein w osłonach komórkowych. Zakładano, że brak tego aminokwasu wpłynie na umiejscowienie białek w komórkach *Campylobacter*.

Białko CjaA (C20A), zgodnie z przewidywaniami, w odróżnieniu do jego dzikiej kopii odnajdywanej w błonie wewnętrznej, lokuje się w przestrzeni peryplazmatycznej. Tak więc potwierdzono rolę cysteiny tetrapeptydu rozpoznawanego przez peptydazę II w procesowaniu badanej proteiny i jej lokalizacji w komórkach naturalnego gospodarza (Wyszynska *et al.*, 2008). Analogiczne wyniki uzyskano dla białka CjaC. Pomimo, że aminokwasem kierunkowym jest w tym przypadku glutamina, w komórkach *Campylobacter* badana lipoproteina lokuje się w błonie wewnętrznej, zaś w *E. coli* – w błonie wewnętrznej i peryplazmie. Niezgodna z regułami opracowanymi dla *E. coli* lokalizacja CjaA oraz CjaC w komórkach *Campylobacter* może być wynikiem odmiennego mechanizmu odpowiadającego za transport/sortowanie lipoprotein w komórkach tego rodzaju gramujemnych mikroorganizmów (Wyszynska *et al.*, 2007).

Analizowano również wpływ białek systemu Dsb na zdolność szczepów rodzaju *Campylobacter* do kolonizacji jelita kurcząt. Białka Dsb są odpowiedzialne za proces wprowadzania mostków dwusiarczkowych pomiędzy grupami -SH reszt cysteinowych. Mostki dwusiarczkowe wprowadzane są do wielu białek pozacytoplazmatycznych i biorą udział w prawidłowym ich zwijaniu, co warunkuje ich stabilność, aktywność oraz oporność na proteazy. Ponieważ wiele czynników wirulencji to białka pozacytoplazmatyczne, uszkodzenie systemu Dsb ma wpływ na patogenność drobnoustrojów. Wykazano, że jednoczesna inaktywacja genów *dsbB* oraz *dsbI* znacząco zmniejsza zdolność szczepu *Campylobacter* do kolonizacji jelit kurcząt. Ponadto, szczep *C. jejuni* 81-176 ze zmutowanymi genami *dsbB* lub *dsbI* wykazywał również zmniejszoną zdolność do inwazji/ przeżycia wewnątrzkomórkowego.

Ocena różnych sposobów dostarczania antygenów szczepionkowych do immunizowanych organizmów

Publikacje habilitantki w temacie:

- Łaniewski P., Kuczkowski M., Chrzastek K., Woźniak A., Wyszynska A., Wieliczko A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2014. Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA protein delivered by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(1):281-92. doi: 10.1007/s11274-013-1447-5.
- Łaniewski P., Lis M., Wyszynska A., Majewski P., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2012. Assessment of chicken protection against *Campylobacter jejuni* infection by immunization with avirulent *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain producing *Campylobacter* CjaD/Pal protein. *Vaccine: Develop Therapy* 2: 43-50.
- Kobierecka P., Wyszynska A., Maruszewska M., Wojtania A., Żylińska J., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2015. Lactic acid bacteria as a surface display platform for *Campylobacter jejuni* antigens. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25(1), 1-10.
- Godlewska R., Kuczkowski M., Wyszynska A., Klim J., Derlatka K., Woźniak-Biel A., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2016. Evaluation of a protective effect of *in ovo* delivered *Campylobacter jejuni* OMVs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (20), 8855-64.

Istnieją różne sposoby dostarczania antygenów szczepionkowych do immunizowanego organizmu. W prezentowanych wyżej publikacjach analizowano możliwość wykorzystania atenuowanych szczepów *Salmonella*, cząstek GEM (*Gram-positive Enhancer Matrix*) oraz OMV (*Outer Membrane Vesicles*).

W badaniach wykorzystano szczep *Salmonella* konstytutywnie atenuowany oraz szczep o opóźnionej atenuacji (Łaniewski *et al.*, 2012; Łaniewski *et al.*, 2014). Szczep *S. Typhimurium* nowej generacji, charakteryzujący się opóźnioną atenuacją i opóźnioną produkcją antygenów, nie był stosowany w immunoprofilaktyce kurcząt. Dlatego też porównano wpływ szczepu nośnikowego (tj. szczepu

konstytutywnie atenuowanego $\Delta crp\Delta cya$ i szczepu o opóźnionej atenuacji) na poziom odpowiedzi immunologicznej i kolonizacji jelita przez pałeczki *C. jejuni*. Jako antygen protekcyjny zastosowano białko CjaA. Immunizacja kurcząt w obydwu przypadkach powodowała porównywalny efekt ochronny. Zauważono jednak wcześniejszą indukcję humoralnej odpowiedzi immunologicznej w przypadku szczepu nowej generacji (Łaniewski *et al.*, 2014).

Jako platforma do prezentacji antygeny mogą służyć również cząstki GEM, a więc komórki szczepów bakterii mlekowych traktowane 10% kwasem trójchlorooctowym. W metodzie tej z powierzchni bakterii usuwane są głównie kwasy lipoteichojoye, co zapewnia wiązanie większej ilości antygeny połączonego z domenami LysM, które umożliwiają niekowalencyjne wiązanie z peptydoglikanem. Mikroskopia immunofluorescencyjna wykazała wyższą wydajność wiązania białek fuzyjnych do powierzchni cząstek GEM niż do komórek żywych oraz specyficzność tego wiązania (Kobierecka *et al.*, 2015).

OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) transportują wiele biomolekuł wykazujących zdolność do wywołania przeciwko sobie odpowiedzi układu odpornościowego. Dlatego też ich potencjał jako niereplikujących się szczepionek nowej generacji stał się ważnym aspektem badań immunoterapeutycznych. *Campylobacter jejuni*, podobnie jak inne bakterie gramujemne, konstytutywnie uwalnia pęcherzyki błony zewnętrznej. Przetestowano ich przydatność do doustnego (*in ovo*) szczepienia kurcząt (Godlewska *et al.*, 2016).

Prace przeglądowe:

Publikacje habilitantki w temacie:

- Grabowska A., **Wszyńska A.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2004. Powrót chorób infekcyjnych – *Campylobacter*, nowy groźny ludzki enteropatogen. *Mikrobiologia, Medycyna* 2: 8-15.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., **Wszyńska A.**, Raczko A. 2004. New approaches to development of mucosal vaccine against enteric bacterial pathogens. *Pol. J. Microbiol.* 53, 7-15.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Życka J., Tomczyk K., **Wszyńska A.** 2005. Glikozylacja białek mikroorganizmów rodzaju *Campylobacter*. *Post. Mikrobiol.* 44: 299-308.
- Wszyńska A.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2006. Nowe tendencje w konstrukcji szczepionek podjednostkowych. *Post. Mikrobiol.* 45: 119-34.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., **Wszyńska A.**, Łasica A.M. 2006. *Campylobacter jejuni* – oddziaływanie z komórkami eukariotycznymi; komensalizm a chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* 45: 12-7.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Grabowska A., Szymanek K., **Wszyńska A.** 2006. Genetyczne podstawy kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez bakterie rodzaju *Campylobacter*. *Med. Wet.* 63: 29-33.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., **Wszyńska A.** 2008. The decline of antibiotic era - New approaches for antibacterial drug discovery. *Pol. J. Microbiol.* 57(2): 91-8.
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Łaniewski P., **Wszyńska A.** 2009. Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert Rev. Vaccines* 8(5):625-45.
- Żyłowska M., **Wszyńska A.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2011. Antimicrobial peptides - defensins. *Post. Mikrobiol.* 50: 223-34.
- Kobierecka P., **Wszyńska A.**, Jagusztyn-Krynicka E.K. 2013. Characterization of CDT (cytolethal distending toxin) genotoxins. *Post. Mikrobiol.* 52 (3), 315-24.
- Wszyńska A.**, Kobierecka P., Jagusztyn-Krynicka E.K. 2015. LAB (lactic acid bacteria) as live vectors for the development of safe mucosal vaccines. *Post. Mikrobiol.* 54(2), 141-53.

Niektóre enteropatogeny są szeroko rozpowszechnione, występowanie innych ograniczone jest do określonych obszarów geograficznych. W ostatnich latach specyfika ta ulega jednak zatarciu, a wynika to głównie z możliwości szybkiego i łatwego przemieszczania się między oddalonymi od siebie rejonami świata. W dalszym ciągu jednak w następstwie określonych warunków klimatycznych oraz sytuacji społecznej i ekonomicznej (sposób żywienia, tryb życia, higiena) częstość niektórych zakażeń jest na pewnych obszarach zdecydowanie wyższa.

Wobec ciągłego zagrożenia ze strony enteropatogenów i innych czynników zakaźnych istnieje konieczność udoskonalania szczepionek już istniejących oraz opracowania zupełnie nowych, zwłaszcza że

immunizacja jest jedną z najtańszych metod zapobiegania i kontrolowania chorób infekcyjnych. Jej zastosowanie pozwala w wielu przypadkach na uniknięcie obciążonej wieloma działaniami ubocznymi i coraz częściej nieskutecznej antybiotykoterapii.

Powyzsze prace to prace przeglądowe, których bylam współautorką. Przedstawiają one tendencje w konstrukcji szczepionek podjednostkowych jak również stan wiedzy związany z patogenezą *Campylobacter*, antybiotykoopornością oraz immunoprofilaktyką skierowaną przeciwko *Campylobacter* - enteropatogena, który jest obiektem moich badań.

6. Dane bibliometryczne

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w którym ukazały się wszystkie publikacje habilitantki, zgodnie z rokiem opublikowania	37,558
Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitantki	550
Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitantki (wg bazy Web of Science)	218
Indeks Hirscha habilitantki (wg bazy Web of Science)	10

A. Wyszyńska