

## Streszczenie

*Clostridium difficile* jest Gram-dodatnią bakterią, której infekcje stają się coraz większym problemem mającym wpływ na gospodarkę oraz zdrowie publiczne. W związku ze zdolnością *C. difficile* do sporulacji, znaczna część społeczeństwa jest zainfekowana przetrwalnikami tej bakterii. U nosicieli nie obserwuje się jednak żadnych objawów chorobowych. Zakażenia wywołane przez *C. difficile* (ang. *C. difficile* infection, CDI) są spowodowane głównie długotrwałą antybiotykoterapią, która naruszając fizjologiczny mikrobiom jelit powoduje, że wysięlająca je błona śluzowa jest podatna na kolonizację przez komórki wegetatywne *C. difficile*. Po zajęciu przewodu pokarmowego gospodarza rozpoczyna się proces produkcji toksyn, toksyny A i toksyny B. Są one czynnikami odpowiedzialnymi za pojawienie się objawów chorobowych, obejmujących zarówno samoistnie ustępującą biegunkę, jak i rzekomobłoniaste zapalenie jelit, które może prowadzić do dużo poważniejszych komplikacji, takich jak perforacja i ostre rozdęcie okrężnicy, mogących stanowić zagrożenie życia chorej osoby. Obecnie tradycyjne leczenie infekcji wywołanych przez *C. difficile* polega na przerwaniu przyjmowania stosowanych antybiotyków i zastąpieniu ich bardziej specyficznymi, takimi jak metronidazol lub wankomycyna. Coraz częściej opisywane są jednak przypadki niższej wrażliwości *C. difficile* na antybiotyki stosowane w tego typu terapii. Brak alternatywnej, skutecznej metody leczenia CDI wymaga zatem opracowania nowych strategii zwalczających infekcje wywołane przez *C. difficile*. Jedną z nich mogą być szczepienia śluzówkowe, które zgodnie z danymi literaturowymi są skuteczną metodą indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciw patogenom wywołującym infekcje błon śluzowych. Niestety ze względu na trudności związane z dostarczaniem antygeny do docelowych miejsc immunizacji, dotychczas opracowanych zostało niewiele funkcjonalnych szczepionek tego typu. Związane jest to głównie z tym, że oczyszczone antygeny nie są w stanie przetrwać, w niezmięnionej formie, ekstremalnych warunków panujących w żołądku. Ostatecznie prowadzi to do wywołania słabej, a zatem nieskutecznej indukcji odpowiedzi immunologicznej.

Przez ostatnie 15 lat udokumentowanych zostało wiele badań potwierdzających fakt, że przetrwalniki *B. subtilis* mogą stanowić idealne narzędzie do powierzchniowej ekspozycji antygenów. Dzięki wysokiej odporności przetrwalników, eksponowany antygen jest chroniony przed niekorzystnymi warunkami panującymi w żołądku. Opierając się o powyższe dane, niniejsza praca miała na celu skonstruowanie jadalnej szczepionki przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelit wykorzystując rekombinowane przetrwalniki *B. subtilis* eksponujące na swojej powierzchni białko FliD *C. difficile*. Białko FliD zostało wybrane jako antygen ze względu na swoją wysoką immunogenność oraz udział w procesie kolonizacji błony śluzowej jelit przez *C. difficile*. Z tego powodu uważa się, że indukcja efektywnej odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na FliD może prowadzić do zapobiegania procesowi kolonizacji. Eliminacja tego procesu wiązałaby się natomiast z redukcją nosicielstwa, a w efekcie skutecznie obniżałaby bezpośrednie i pośrednie zakażenia między ludźmi oraz nawroty CDI. Aby osiągnąć założony cel, na pierwszym etapie projektu, białko FliD *C. difficile* zostało eksponowane na powierzchni przetrwalników *B. subtilis* jako fuzja białkowa z różnymi białkami płaszczka endospor. Dodatkowo przygotowano rekombinowane szczepy *B. subtilis* niosące podwójną fuzję białkową, złożoną z białka płaszczka przetrwalników, białka FliD oraz fragmentu IL-1 $\beta$ . Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że przetrwalniki *B. subtilis* mogą kiełkować w przewodzie pokarmowym człowieka, skonstruowane zostały szczepy *B. subtilis* zdolne do produkcji białka FliD w czasie wzrostu wegetatywnego. Druga część projektu polegała na ocenie odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez przetrwalniki prezentujące na swojej powierzchni białko FliD, podane zwierzętom laboratoryjnym. W tym celu przeprowadzonych zostało w sumie pięć serii śluzówkowych immunizacji myszy BALB/c rekombinowanymi endosporami. Część przeprowadzonych immunizacji została zaprojektowana tak, aby porównać odpowiedź immunologiczną indukowaną przez rekombinowane przetrwalniki prezentujące białko FliD z lub bez dodatku przetrwalników

eksponujących na powierzchni immunomodulatory, takie jak IL-1 $\beta$  i IL-2. Dodatkowo przeanalizowana została odpowiedź układu odpornościowego wywoływana przez białko FliD produkowane w czasie wegetatywnego wzrostu *B. subtilis*. Ostatnia seria immunizacji miała na celu ocenę różnic między donosową a dożołądkową drogą podania preparatu. Dodatkowo przeanalizowane zostały różnice indukcji układu odpornościowego myszy w odpowiedzi na białko FliD eksponowane na powierzchni rekombinowanych i nierekombinowanych przetrwalników. Do analizy profilu odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez FliD eksponowanego na powierzchni endospor wykorzystany został materiał pobrany od immunizowanych myszy.

Dożołądkowe podanie rekombinowanych przetrwalników nie skutkowało indukcją humoralnej odpowiedzi układu immunologicznego skierowanej specyficznie przeciw białku FliD. W przypadku podania zwierzętom przetrwalników BAN05 (CotB-linker-FliD) zaobserwowana została natomiast silniejsza indukcja odpowiedzi immunologicznej typu Th1, podczas gdy BAN03 (CotG-FliD) indukowały odpowiedź przeciwzapalną typu Th17. Dodatek immunomodulatorów ani produkcja FliD podczas wegetatywnego wzrostu *B. subtilis* nie prowadziły do statystycznie istotnego zwiększenia potencjału immunogennego podawanego preparatu. Druga metoda podania przetrwalników zwierzętom laboratoryjnym (immunizacja donosowa), w przeciwieństwie do immunizacji dożołądkowej, prowadziła do wzmożonej indukcji humoralnej odpowiedzi układu immunologicznego. Taka indukcja została jednak zaobserwowana jedynie w przypadku podania zwierzętom nierekombinowanych przetrwalników, z zaadsorbowanym na powierzchni białkiem FliD. Podsumowując, immunizacja myszy rekombinowanymi przetrwalnikami *B. subtilis* prowadziła do aktywacji układu immunologicznego typu komórkowego oraz przeciwzapalnego, jednak nie indukowała układu odpornościowego typu humoralnego.

Przeprowadzone analizy wskazują na większą skuteczność immunizacji donosowej w stosunku do dożołądkowej, szczególnie w przypadku podania zwierzętom przetrwalników nierekombinowanych. Podejście bazujące na adsorpcji antygeny na powierzchni przetrwalników może również z większym prawdopodobieństwem prowadzić do ochrony immunizowanego organizmu przed CDI, w porównaniu z podejściem bazującym na przetrwalnikach rekombinowanych. Aby dokładnie ocenić czy profil obserwowanej odpowiedzi immunologicznej miałby właściwości ochronne, niezbędne jest jednak przeprowadzenie doświadczeń typu „challenge”.

Wyniki opisane w niniejszej pracy potwierdziły, że przetrwalniki eksponujące na swojej powierzchni białko FliD mogą być potencjalnie wykorzystane w przyszłości jako szczepionka przeciwko rzekomobłoniastemu zapaleniu jelit. Niezbędna jest jednak optymalizacja potencjału immunogennego takiego preparatu.

