

UNIwersytet Jagielloński  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Paulina Chorobik

**Opracowanie metody zwiększenia efektywności bakterii  
*Salmonella typhimurium* w terapii przeciwnowotworowej  
poprzez nadekspresję endogennego białka SipB**

Praca wykonana w Katedrze Immunologii UJ CM  
pod naukową opieką dr Michała Berety

**Promotor:** dr hab. Joanna Bereta

**Recenzenci:** prof. dr hab. Jan Potempa  
prof. dr hab. Marian Sętkas

**Kraków 2010**

Jestem bardzo wdzięczna **dr Michałowi Berecie**,  
wspaniałemu i niezastąpionemu człowiekowi.

Równie serdecznie dziękuję **Pani dr. hab. Joannie Berecie**.  
Za życzliwość, wsparcie i ogromną pomoc  
podczas pisania pracy.

Dziękuję recenzentom: **Panu prof. dr. hab. Janowi Potempie**  
oraz **Panu prof. dr. hab. Marianowi Sęktasowi**.

Dziękuję **Panu prof. dr. hab. Januszowi Marcinkiewiczowi**,  
kierownikowi Katedry Immunologii UJ CM, w której wykonałam pracę.

Badania prezentowane w rozprawie były finansowane przez  
MNiSW w ramach projektu promotorskiego N N302 060334  
oraz projektu badawczego 2 P04B 002 30.

# Spis treści

<b>Wykaz skrótów</b>	8
<b>Wstęp</b>	<b>10</b>
1. Organizacja genomu <i>Salmonella typhimurium</i> .	10
2. Rola genów wysp patogenności w zakażeniu i wewnątrzkomórkowym wzroście <i>Salmonella typhimurium</i> .	11
3. Modyfikacje genetyczne szczepów <i>Salmonella</i> obniżające patogenność.	18
4. Potencjalne zastosowanie atenuowanych szczepów <i>Salmonella sp.</i> w terapii nowotworów.	22
<b>Cel pracy</b>	<b>25</b>
<b>Materiały i metody</b>	<b>27</b>
1. Szczepy bakteryjne.	27
2. Linie komórek eukariotycznych.	27
3. Podstawowe odczynniki.	28
3.1. Odczynniki do hodowli bakterii.	28
3.2. Odczynniki do hodowli komórkowych.	28
3.3. Przeciwciała.	28
3.4. Odczynniki do biologii molekularnej.	29
3.5. Pozostałe odczynniki organiczne i nieorganiczne.	29
4. Klonowanie fragmentów DNA do wektorów plazmidowych.	29
4.1. Uzyskiwanie sekwencji DNA do klonowania.	30
4.2. Przygotowanie plazmidowego DNA do klonowania.	33
4.3. Przygotowanie kompetentnych bakterii <i>Escherichia coli</i> .	34
4.4. Ligacja i transformacja bakterii.	34
5. Transformacja bakterii <i>Salmonella typhimurium</i> VNP20009.	35
6. Wstawianie i usuwanie fragmentów w DNA genomowym <i>Salmonella typhimurium</i> VNP20009.	36
6.1. Selekcja klonów bakterii, w których zaszła rekombinacja homologiczna z udziałem fragmentów DNA plazmidowego i genomowego.	37
6.2. Analiza kolonii bakteryjnych metodą PCR.	39
6.3. Amplifikacja długich fragmentów DNA.	40

7. Sekwencjonowanie DNA.	40
8. Izolacja RNA i analiza ekspresji genów metodą RT-PCR.	40
9. Hodowle komórkowe.	42
10. Transfekcja komórek.	43
11. Test protekcji gentamycynowej.	43
12. Analiza cytofluorymetryczna linii komórkowych i hodowli bakteryjnych.	45
12.1. Analiza linii komórkowych barwionych aneksyną V.	45
12.2. Analiza ekspresji białka GFP i RFP w bakteriach <i>E. coli</i> i <i>S. typhimurium</i> .	45
12.3. Analiza cytofluorymetryczna bakterii z ekspresją białka GFP pod kontrolą promotora <i>PsifB</i> .	45
13. Rozdział elektroforetyczny białek i analiza Western blotting.	46
13.1. Przygotowanie lizatów bakteryjnych i izolacja białka fuzyjnego 6xHis-SipB.	46
13.2. Elektroforeza i Western blotting.	46
14. Analiza ekspresji białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 techniką ELISA.	47
15. Doświadczenia na zwierzętach.	47
15.1. Mysie modele nowotworów transplantacyjnych.	48
15.2. Ustalanie dawki tolerowanej bakterii <i>S. typhimurium</i> VNP20009 i bakterii zmodyfikowanych u myszy.	48
16. Analiza izotypu przeciwciał anty- <i>Salmonella</i> w surowicy immunizowanych myszy.	49
<b>Wyniki</b>	<b>50</b>
1. Uzyskanie genu <i>sipB</i> i ekspresja białka 6xHis-SipB pod kontrolą promotora laktozowego.	50
1.1. Uzyskanie sekwencji kodującej genu <i>sipB</i> z DNA genomowego <i>S. typhimurium</i> i umieszczenie genu <i>sipB</i> pod kontrolą promotora laktozowego.	50
1.2. Ekspresja białka 6xHis-SipB w bakteriach <i>Escherichia coli</i> M15 i <i>Salmonella typhimurium</i> VNP20009 pod kontrolą promotora PT5/ <i>lacO</i> .	54
1.3. Wpływ nadekspresji białka SipB w postaci 6xHis-SipB na tempo wzrostu, żywotność i inwazyjność bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis- <i>sipB</i> .	58

2. Wykazanie proapoptotycznego działania białka SipB na komórki eukariotyczne.	63
2.1. Ekspresja SipB pod kontrolą promotora eukariotycznego w komórkach linii MC38CEA.	64
2.2. Apoptoza komórek fagocytujących i nefagocytujących zakażanych VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis- <i>sipB</i> .	69
3. Hamowanie wzrostu guzów nowotworowych przez VNP20009 w mysich modelach nowotworów transplantacyjnych.	71
4. Klonowanie sekwencji promotorowej <i>PsifB</i> .	74
4.1. Izolacja sekwencji promotora <i>PsifB</i> .	75
4.2. Uzyskanie sekwencji kodującej GFP i umieszczenie jej pod kontrolą promotora <i>PsifB</i> .	76
4.3. Badanie funkcjonalności sekwencji promotorowej <i>PsifB</i> .	77
4.4. Przeklonowanie kasety <i>PsifB-gfp</i> z plazmidu pGEM-T <sub>Easy</sub> - <i>PsifB-gfp</i> do plazmidu pBR322.	79
4.5. Uzyskanie konstruktów genetycznych <i>PsifB-6xHis-sipB-gfp</i> .	81
4.6. Badanie funkcjonalności konstruktów pBR322- <i>PsifB-gfp</i> i pBR322- <i>PsifB-6xHis-sipB-gfp</i> .	86
5. Integracja kasety ekspresyjnej <i>PsifB-6xHis-sipB</i> do chromosomu VNP20009.	89
5.1. Uzyskanie genu 6xHis- <i>sipB</i> z plazmidu pQE30-6xHis- <i>sipB</i> . Umieszczenie 6xHis- <i>sipB</i> pod kontrolą <i>PsifB</i> .	91
5.2. Klonowanie kasety <i>ushA-5'-PsifB-6xHis-sipB-ushA-3'</i> do plazmidu pSG76C.	92
5.3. Integracja plazmidu pSG76C-USS do chromosomu VNP20009.	99
5.4. Usunięcie genu oporności na antybiotyki z genomu VNP20009-pSG76C-USS. Uzyskanie bakterii VNP/ <i>sipB</i> .	105
5.5. Badanie aktywności transkrypcyjnej kasety <i>PsifB-6xHis-sipB</i> włączonej do genomu <i>S. typhimurium</i> VNP20009.	109
6. Badanie funkcjonalności zmodyfikowanego szczepu (VNP/ <i>sipB</i> ).	110
6.1. Porównanie wzrostu <i>in vitro</i> oraz zdolności inwazyjnych VNP20009 i VNP/ <i>sipB</i> .	111
6.2. Stabilność genetyczna integracji kasety <i>PsifB-6xHis-sipB</i> do chromosomu VNP20009 w warunkach <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .	114
6.3. Analiza ekspresji <i>sipB</i> metodą PCR w czasie rzeczywistym, w bakteriach oraz w komórkach eukariotycznych zakażonych VNP20009 i VNP/ <i>sipB</i> .	119

6.4. Indukcja apoptozy komórek MC38CEA zakażonych VNP20009 i VNP/sipB.	121
6.5. Porównanie efektów terapeutycznych VNP20009 i VNP/sipB w mysich modelach nowotworowych.	123
6.6. Badanie izotypu przeciwciał w surowicy myszy immunizowanych bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB.	127
7. Konstrukcja syntetycznego promotora Psp2.	128
7.1. Uzyskanie syntetycznej sekwencji promotorowej Psp2.	130
7.2. Wstawienie sekwencji kodującej RFP pod kontrolę Psp2. Uzyskanie plazmidu pGEM-T <sub>Easy</sub> -Psp2- <i>rfp</i> .	132
7.3. Porównanie aktywności promotorów <i>PsifB</i> i Psp2.	133
8. Delecja genu <i>avrA</i> z chromosomu <i>S. typhimurium</i> VNP20009 i VNP/sipB.	134
8.1. Klonowanie kasety <i>avrA::cat</i> do plazmidu pST76A. Uzyskanie plazmidu pST76A- <i>avrA::cat</i> .	135
8.2. Integracja plazmidu pST76A- <i>avrA::cat</i> do chromosomu <i>S. typhimurium</i> VNP20009. Uzyskanie bakterii VNP20009 pST76A- <i>avrA::cat</i> .	139
8.3. Usunięcie sekwencji plazmidowej z genomu <i>S. typhimurium</i> VNP20009-pST76A- <i>avrA::cat</i> . Uzyskanie bakterii VNP/ <i>avrA::cat</i> .	141
8.4. Porównanie efektywności VNP20009 i VNP/ <i>avrA::cat</i> w hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych.	143
8.5. Porównanie atenuacji szczepu VNP20009, VNP/sipB i VNP/ <i>avrA::cat</i> u myszy C57Bl/6.	144
8.6. Integracja kasety ekspresyjnej <i>PsifB</i> -6xHis- <i>sipB</i> do chromosomu <i>S. typhimurium</i> VNP/ <i>avrA::cat</i> .	145
<b>Dyskusja</b>	<b>150</b>
<b>Podsumowanie wyników</b>	<b>169</b>
<b>Streszczenie</b>	<b>171</b>
<b>Abstract</b>	<b>173</b>
<b>Załączniki</b>	<b>175</b>
<b>Literatura</b>	<b>178</b>

## Wykaz skrótów

7-AAD	7-aminoaktynomycyna
AnnV	aneksyna V
APC	allofikocyjanina
<i>bla</i>	$\beta$ -laktamaza
BCA	ang. <i>bicinchoninic acid protein assay</i> ; test do oznaczania białka, wykorzystujący kwas bicynchoninowy
BMM	ang. <i>bone marrow-derived macrophages</i> ; makrofagi wywodzące się ze szpiku kostnego
BSA	ang. <i>bovine serum albumin</i> ; albumina surowicy wołowej
<i>cat</i>	ang. <i>chloramphenicol acetyltransferase</i> ; acetylotransferaza chloramfenikolu
CFU	ang. <i>colony forming unit</i> ; jednostka tworząca kolonię
cTc	chlorowodorek tetracykliny
DMEM	ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ; pożywka hodowlana DMEM
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; test immunoadsorpcyjny
FBS	ang. <i>fetal bovine serum</i> ; płodowa surowica wołowa
FSC	ang. <i>forward scatter channel</i> ; przedni detektor światła rozproszonego
GFP	ang. <i>green fluorescent protein</i> ; zielone białko fluorescencyjne
IL-1 $\beta$	interleukina -1 $\beta$
IMAC	ang. <i>immobilized metal affinity chromatography</i> ; chromatografia powinowactwa na złożu ze schelatowanymi jonami metalu
IPTG	izopropylotiogalaktozyd
LB	pożywka hodowlana Luria-Bertani
MgM	ang. <i>magnesium minimal media</i> ; pożywka hodowlana MgM
MOI	ang. <i>multiplicity of infection</i> ; liczba bakterii przypadających na jedną komórkę eukariotyczną
MSB	ang. <i>minimal salt broth</i> ; pożywka hodowlana MSB
NF- $\kappa$ B	ang. <i>nuclear factor -<math>\kappa</math>B</i> ; czynnik jądrowy $\kappa$ B
OD	ang. <i>optical density</i> ; gęstość optyczna
<i>ori</i>	ang. <i>origin of replication</i> ; miejsce <i>ori</i> plazmidu
PBS	ang. <i>phosphate buffer saline</i> ; sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCR	ang. <i>polymerase chain reaction</i> ; reakcja łańcuchowa polimerazy
PS	fosfatydyloseryna
RFP	ang. <i>red fluorescent protein</i> ; czerwone białko fluorescencyjne



rpm	ang. <i>revolutions per minute</i> ; liczba obrotów na minutę
RT	ang. <i>reverse transcription</i> ; reakcja odwrotnej transkrypcji
SCV	ang. <i>Salmonella-containing vacuole</i> ; wakuola zawierająca bakterie <i>Salmonella</i>
SPI1	ang. <i>Salmonella pathogenicity island 1</i> ; pierwsza wyspa patogenności <i>Salmonella</i>
SPI2	ang. <i>Salmonella pathogenicity island 2</i> ; druga wyspa patogenności <i>Salmonella</i>
SSC	ang. <i>side scatter channel</i> ; boczny detektor światła rozproszonego
TB	ang. <i>terrific broth</i> ; pożywka hodowlana TB
TTSS	ang. <i>type three secretion system</i> ; system sekrecji typu trzeciego

# Wstęp

## 1. Organizacja genomu *Salmonella typhimurium*.

Bakterie z rodzaju *Salmonella* to obok *Escherichia coli*, najlepiej scharakteryzowana pod względem fizjologii, genetyki i genomiki grupa bakterii. *Salmonella* jest gram-ujemną, patogenną pałeczką należącą do rodziny *Enterobacteriaceae*, o szerokim spektrum gospodarzy, której naturalną drogą zakażenia u ludzi i zwierząt są komórki nabłonka wyściełającego jelito cienkie.

Od roku 2005, kiedy to podjęto próbę uporządkowania nazewnictwa, obowiązuje nomenklatura, według której wyróżnia się tylko dwa gatunki należące do rodzaju *Salmonella*: *S. enterica* i *S. bongori*. W obrębie gatunku *S. enterica* sklasyfikowano ponad 2000 serotypów o różnym spektrum gospodarzy. W Tabeli 1 przedstawiono fragment podziału taksonomicznego bakterii z rodzaju *Salmonella*. Zaprezentowano jeden z sześciu podgatunków, do którego zaliczane są szczepy stanowiące 99% izolatów klinicznych, czyli *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. enteritidis* i *S. paratyphi* A i B, infekujące ptaki i ssaki. Natomiast szczepy z gatunku *S. bongori* infekują wyłącznie kręgowce zimnokrwiste [1, 2].

**Tabela 1. Nomenklatura bakterii z rodzaju *Salmonella*.**

Królestwo	<i>Bacteria</i>
Podkrólestwo	<i>Proteobacteria</i>
Klasa	<i>Gammaproteobacteria</i>
Rząd	<i>Enterobacteriales</i>
Rodzina	<i>Enterobacteriaceae</i>
Rodzaj	<i>Salmonella</i>
<b>Gatunek</b>	<i>Salmonella enterica</i>
Podgatunek	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i>
Serotyp	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Typhimurium
Szczep	<b><i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Typhimurium LT2</b>
Serotyp	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Typhi
Serotyp	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Enteritidis
Serotyp	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Paratyphi A
Serotyp	<i>Salmonella enterica subspecies enterica</i> serovar Paratyphi B
<b>Gatunek</b>	<i>Salmonella bongori</i>

*Salmonella enterica* serotyp Typhimurium LT2 (określany dalej jako *Salmonella typhimurium* LT2), wyizolowany w latach czterdziestych XX wieku, jest modelowym szczepem w badaniach biologii bakterii z rodzaju *Salmonella*. Oznaczenie LT2 zostało wprowadzone przez Kaare Lilleengena (Lilleengen Type), autora pierwszych badań nad transdukcją materiału genetycznego z udziałem bakteriofagów, który sklasyfikował szczepy *Salmonella typhimurium* w oparciu o wrażliwość na 24 różne izolaty

bakteriofagów [3].

Kompletną sekwencję genomu *S. typhimurium* LT2 (4 857 432 pz) opublikowano w 2001 roku [4]. Spośród 4 489 sekwencji kodujących i pseudogenów, około połowę stanowią sekwencje homologiczne do sekwencji DNA chromosomowego innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (*S. typhi* CT18, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. arizonae*, *E. coli* K12, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae*) [4]. Natomiast cechy fenotypowe specyficzne dla poszczególnych gatunków są w dużej mierze efektem ekspresji genów zgrupowanych w segmentach genomu kodujących czynniki wirulencji, które są kodowane w obrębie wysp patogenności (ang. *Salmonella Pathogenicity Islands*, SPIs).

Ponadto geny kodujące czynniki uczestniczące w adhezji i inwazji do komórek eukariotycznych są kodowane na niskokopijnym plazmidzie pSLT, o rozmiarze 93 939 pz, zawierającym 108 sekwencji kodujących.

Geny czynników wirulencji *Salmonella typhimurium* są zgrupowane głównie w postaci operonów, w chromosomie lub na plazmidzie, w wyspach patogenności. Zidentyfikowano pięć wysp patogenności *S. typhimurium* o rozmiarach od 7 kpz (SPI5) do 40 kpz (SPI1 i SPI2). Produkty genów pierwszej wyspy patogenności (SPI1) odpowiadają za inwazyjność *S. typhimurium*, czyli zdolność do zakażenia niefagocytykujących komórek nabłonka jelita. Geny zgrupowane w wyspach: drugiej, trzeciej i czwartej (SPI2, SPI3, SPI4) kodują białka potrzebne do przeżycia i namnażania bakterii w organizmie gospodarza i warunkujące rozwój infekcji systemowej [5-7]. Wiele z tych białek jest transportowanych do komórki eukariotycznej przez dwa odrębne systemy sekrecji typu trzeciego (ang. *Type Three Secretion System*, TTSS), z których jeden jest kodowany w obszarze SPI1, a drugi - w obszarze SPI2. Wyspa piąta (SPI5) koduje białko SopB oraz pięć innych białek, istotnych dla lokalnej fazy infekcji i procesu zapalnego w jelicie, których aktywność jest związana z napływem neutrofilów do nabłonka jelit [8].

A zatem, upraszczając w pewnym stopniu rzeczywisty obraz i zdając sobie sprawę z szeregu wyjątków, można stwierdzić, że poszczególne wyspy patogenności kodują czynniki ulegające ekspresji na określonych etapach infekcji [9-12].

## **2. Rola genów wysp patogenności w zakażeniu i wewnątrzkomórkowym wzroście *Salmonella typhimurium*.**

Środowiskiem życia bakterii z rodzaju *Salmonella* jest nabłonek jelita, a przy zaawansowanych infekcjach także organy wewnętrzne kręgowców. *Salmonella* kolonizuje nabłonek jelita cienkiego gospodarza i wywołuje symptomy lokalnej infekcji ograniczonej do przewodu pokarmowego (ang. *gastroenteritis*) lub rozprzestrzenia się

poza jelitem, głównie w wątrobie i śledzionie, powodując infekcję systemową (ang. *typhoid fever*). *Salmonella* jest bakterią fakultatywnie wewnątrzkomórkową ponieważ może przeżywać i namnażać się w zakażonych komórkach gospodarza. Podczas infekcji systemowej żyje w neutrofilach, monocytach, komórkach dendrytycznych, limfocytach T i B, a obecność zewnątrzkomórkowych bakterii stwierdzono dopiero na późnym etapie letalnej infekcji u myszy [13].

Molekularne podstawy specyficzności poszczególnych serotypów względem zakażanego organizmu nie są jednoznacznie scharakteryzowane. Prawdopodobnie niezależna ewolucja części genów kodujących czynniki wirulencji, czyli białka, które bezpośrednio oddziałują z komórkami eukariotycznymi, odzwierciedla adaptację bakterii do określonego gospodarza [14]. Tak więc niektóre serotypy zakażają wyłącznie drób, inne bydło, ale niektóre nie wykazują takiej specyficzności. Przykładem są *S. typhimurium* i *S. enteritidis*, zakażające bydło, drób, owce, gryzonia i człowieka. W przypadku *S. typhimurium* zakażenie u człowieka jest ograniczone do przewodu pokarmowego. Natomiast u niektórych szczepów myszy zakażenie *S. typhimurium* przebiega systemowo i jest stosowane jako model badawczy duru brzuszego. Z kolei naturalną przyczyną duru jest *S. typhi*, serotyp powodujący infekcję systemową wyłącznie u ludzi i szympanсів [15].

Infekcja systemowa u podatnych szczepów myszy polega na tym, że *S. typhimurium* opuszcza światło jelita i przenika do wyścielającego je nabłonka, a następnie za pośrednictwem leukocytów uzyskuje dostęp do wątroby i śledziony. Aby przeniknąć ze światła jelita do wyścielającego go nabłonka *Salmonella* wykorzystuje co najmniej trzy drogi.

Najlepiej zbadana prowadzi przez komórki M (ang. *microfold cells*), wyspecjalizowane w endocytozie antygenów ze światła jelita i występujące pomiędzy komórkami nabłonkowymi wyścielającymi kępki Peyera jelita cienkiego (ang. *follicle-associated epithelium*). Bakterie z komórek M dostają się do makrofagów, limfocytów i komórek dendrytycznych.

*S. typhimurium* może zakażać również niezwiązane z kępkami Peyera komórki nabłonkowe od strony światła jelita i w ten sposób przekraczać barierę nabłonka.

Trzecią możliwością przekroczenia bariery nabłonka jelit jest pobranie bakterii ze światła jelita przez komórki dendrytyczne. Bakterie pozbawione genów warunkujących inwazyjny fenotyp, podane drogą pokarmową nadal w pewnym stopniu lokalizowały się w śledzionie myszy. Dlatego zasugerowano, że bakterie te pokonują barierę nabłonka jelit za pośrednictwem komórek dendrytycznych, które wysuwają wypustki pomiędzy komórkami nabłonka nie naruszając jego integralności i pobierają bakterie ze światła jelita [16].

Przeżywając w makrofagach, komórkach dendrytycznych i limfocytach kępek Peyera, *S. typhimurium* uzyskuje dostęp do węzłów chłonnych krezki jelita, a z nich do wątroby i śledziony. W tkankach limfoidalnych *S. typhimurium* żyje i namnaża się wewnątrz komórek [17, 18], co ma krytyczne znaczenie dla rozwoju systemowej infekcji. Mutanty wyizolowane jako niezdolne do wewnątrzkomórkowego namnażania w makrofagach były mniej zjadliwe lub niezjadliwe po dootrzewnowym podaniu myszom szczepu Balb/c [19].

Podstawą inwazyjności *Salmonella*, rozumianej jako zdolność do zakażenia komórek niefagocytujących, jest ekspresja szeregu białek powodujących reorganizację białek cytoszkieletu aktynowego komórki eukariotycznej [20]. Penetracja komórek M i komórek nabłonkowych zachodzi z udziałem białek dostarczonych do zakażanej komórki przez bakteryjny systemem sekrecji typu trzeciego, kodowany przez geny pierwszej wyspy patogenności (SPI1) [21]. System sekrecji typu trzeciego jest specyficznym dla wielu patogennych bakterii gram-ujemnych dużym kompleksem białek, rozpiętym pomiędzy błoną zewnętrzną i wewnętrzną oraz wystającym poza powierzchnię bakterii, w przypadku *S. typhimurium*, na odległość około 50 nm [22]. Oprócz tworzących kanał białek strukturalnych integralnymi elementami tego systemu są białka efektorowe, transportowane do komórki eukariotycznej, oraz białka opiekuńcze, regulujące proces fałdowania i translokacji białek efektorowych.

Białka efektorowe TTSS, kodowane głównie na SPI1 oraz nielicznie poza tą wyspą, są dostarczane do zakażanej komórki przez kanał uformowany w poprzek ściany komórkowej bakterii z białek strukturalnych TTSS. Dostarczone białka oddziałują z cytoszkieletem aktynowym i z białkami regulującymi dynamikę cytoszkieletu komórki eukariotycznej. W wyniku rearanżacji cytoszkieletu zostaje uformowany pęcherzyk makropinocytarny, który zamyka się wokół bakterii [23]. Białka efektorowe TTSS w cytoplazmie bakterii są związane z białkami opiekuńczymi, które są również produktami genów pierwszej wyspy patogenności i są ważną częścią systemu sekrecji, ponieważ regulują i uczestniczą w wydzielaniu białek efektorowych. Aktywacja transportu przez TTSS wynika z nie do końca poznanej interakcji kompleksu sekrecyjnego z błoną zakażanej komórki nabłonkowej [24]. Do błony infekowanej komórki są dostarczane białka translokony SipB/C, które formują por w błonie komórki eukariotycznej [24]. Wstępna interakcja bakterii z komórką zachodzi w miejscu występowania domen błonowych w błonie komórki eukariotycznej, bogatych w cholesterol i sfingolipidy (ang. *lipid rafts*). Wśród przyczyn oddziaływania bakterii z tym rejonem błony komórkowej wymienia się: (a) zagęszczenie hipotetycznego receptora w tych domenach błony, (b) skład lipidowy optymalny dla wbudowania translokony i uformowania poru [25], (c) większą zawartość białek transdukcji sygnału, np. kinaz

tyrozynowych z rodziny *src* lub kinazy FAK (ang. *focal adhesion kinase*), oddziałujących z białkami cytoszkieletu komórki eukariotycznej, który bakteria wykorzystuje do procesu inwazji [23, 26].

Ważnym etapem inwazji komórki nefagocytującej jest formowanie pęcherzyka makropinocytarnego, inicjowane lokalnymi zmianami w organizacji cytoszkieletu i powierzchni komórki eukariotycznej, na której w wyniku fałdowania błony komórkowej (ang. *membrane ruffling*) kształtują się filopodia i lamellipodia. Następnie *Salmonella* aktywnie uczestniczy w depolimeryzacji aktyny i zamykaniu pęcherzyka makropinocytarnego. W Tabeli 2 krótko opisano białka bakteryjne uczestniczące w inwazji komórek nabłonkowych przez *S. typhimurium*.

**Tabela 2. Funkcje białek systemu sekrecyjnego kodowanego w obrębie pierwszej wyspy patogenności (SPI1) w inwazji *S. typhimurium* do komórki eukariotycznej.**

Białko efektorowe SPI1	Rodzaj oddziaływania z komórką eukariotyczną
<b>Formowanie pęcherzyka makropinocytarnego</b>	
<b>SipC</b>	C-koniec inicjuje polimeryzację aktyny, natomiast N-koniec spleta mikrofilamenty aktynowe [27].
<b>SipA</b>	Polimeryzuje aktynę i stabilizuje filamenty aktynowe [28].
<b>SopE1 i SopE2</b>	Katalizują wymianę GDP na GTP w GTPazach z rodziny Rho, Cdc42 i Rac-1 i w ten sposób prowadzą do propagacji zainicjowanej nukleacji aktyny [29].
<b>SopB/SigD</b>	Kompleks o aktywności fosfatazy fosfatydyloinozytolu, stymuluje reorganizację aktyny bezpośrednio lub pośrednio poprzez aktywację czynnika SGEF (ang. <i>SH3-containing guanine nucleotide exchange factor</i> ) [30].
<b>Zamykanie pęcherzyka makropinocytarnego</b>	
<b>SptP</b>	Stymuluje aktywność GTPazową białek Cdc42 i Rac-1 (GAP, ang. <i>GTPase-activating protein</i> ) [31], a w następstwie blokuje dalszą polimeryzację aktyny. Działa antagonistycznie względem SopB [32].

Osiągnąwszy wewnątrz komórki, *S. typhimurium* zamknięta w pęcherzyku pinocytarnym zmienia profil ekspresji genów z ukierunkowanego na inwazję komórki na program sprzyjający przetrwaniu i/lub namnażaniu wewnątrz komórki. Strategia przetrwania *Salmonella* to połączenie adaptacji metabolicznej do warunków wewnątrz wakuoli oraz modulacji dojrzewania wakuoli.

Bakteria zamknięta w wakuoli eksportuje białka, które poprzez oddziaływanie ze składnikami cytoplazmy komórki eukariotycznej, prowokują zmianę środowiska wewnątrz wakuoli i wpływają na los wakuoli. Białka te są transportowane poza

pęcherzyk poprzez system sekrecyjny typu trzeciego, kodowany przez geny drugiej wyspy patogenności (SPI2). TTSS transportuje produkty genów SPI2 i inne białka efektorowe, kodowane poza tą wyspą. Zmodyfikowana obecnością *S. typhimurium* wakuola, nazywana w skrócie SCV (ang. *Salmonella containing vacuole*) ma w błonie niektóre markery specyficzne dla wczesnych, a następnie późnych endosomów, ale nie zawiera innych białek charakterystycznych dla tych organelli, np. katepsyn G i L [33]. Niektóre spośród białek efektorowych transportowanych przez TTSS na zewnątrz SCV (SseF, SseG, SseJ, SifA, SifB, PipB, PipB2, SopD2) wiążą się z błonami endosomalnymi [34]. Efektem oddziaływania białek bakteryjnych z tym kompartmentem komórkowym jest zmiana szlaku endocytozy tak, że SCV nie ulega fuzji z lizosomem [35]. Zahamowanie fuzji kompartmentów komórkowych przez białka kodowane przez geny SPI2 ma jeszcze jedną konsekwencję sprzyjającą przeżyciu bakterii - ogranicza ich ekspozycję na produkty oksydazy NADPH - reaktywne formy tlenu [36]. Wewnątrzkomórkowe losy *Salmonella* zależą również od oddziaływania białek SPI2 ze szkieletem aktynowym zakażonej komórki. Badania z zastosowaniem inhibitora polimeryzacji aktyny i mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów SPI2 pokazały, że brak produktów tych genów prowadził do uwalniania bakterii z SCV do cytoplazmy zakażonej komórki i ograniczenia wewnątrzkomórkowej replikacji w makrofagach [37].

Funkcje części białek efektorowych systemu sekrecji są podobne i zdarza się, że niektórym mutantom delecyjnym trudno przypisać konkretną zmianę fenotypową. Na przykład szczepy z pojedynczą mutacją w genie *sopE*, *sopE2* i *sopB* zakażają komórki nabłonkowe *in vitro*, ale szczep z delecjami we wszystkich trzech genach ma silnie osłabioną zdolność do zakażenia. Taka obserwacja niekoniecznie świadczy o zbędności tych białek, ale może wynikać z adaptacji *Salmonella* do różnych gatunków gospodarza [34]. Analiza filogenetyczna pokazuje, że np. gen *sspH2* występuje w około 67% izolatach *Salmonella*, łącznie z *S. typhi* i *S. typhimurium*, a *sseI* - tylko w około 25% izolatach. Produkty genów *sseJ* i *spvB* są czynnikami wirulencji *S. typhimurium* w zakażeniu myszy, natomiast nie występują u *S. typhi*, która jest zjadliwa u ludzi. A więc w zależności od zakażonego organizmu, bakteria wykorzystuje odmienny zestaw genów [38].

W Tabeli 3 przedstawiono niektóre białka SPI2 transportowane do cytoplazmy zakażonej komórki, dla których jednoznacznie poznano funkcję.

**Tabela 3. Rola wybranych białek drugiej wyspy patogenności (SPI2) w przeżyciu *S. typhimurium* wewnątrz komórki eukariotycznej.**

Białko efektorowe SPI2	Rodzaj oddziaływania z komórką eukariotyczną
<b>Formowanie i utrzymanie SCV*</b>	
<b>SpiC</b>	Blokuje fuzję fagosomu z lizosomem w zakażonych makrofagach [39].
<b>SspH2 i Ssel</b>	Oddziałują z filaminą, siecującą filamenty aktynowe, i w ten sposób mogą uczestniczyć w zależnej od SPI2 reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, która jest ważna dla trwałości SCV w zakażonej komórce [38].
<b>SseF i SseG</b>	Uczestniczą w reorganizacji mikrotubul [40].
<b>SseG, SifA i SseF</b>	Wymagane do retencji SCV w sąsiedztwie jądra komórkowego i aparatu Golgiego w komórkach nabłonkowych, dostarczającego błon otaczających powiększający się SCV z replikującymi bakteriami [34, 41-43].

\* ang. *Salmonella containing vacuole*; wakuola, w której żyje i namnaża się *Salmonella* w zakażonej komórce.

Podsumowując, *S. typhimurium* unika zabijania wewnątrzkomórkowego poprzez wytworzenie niszy sprzyjającej przeżyciu i wzrostowi, którą jest SCV.

Zakażenie zwińczone skuteczną kolonizacją organów wewnętrznych, takich jak wątroba i śledziona myszy, sugeruje przystosowanie bakterii sięgające poza zdolność do infekowania i przeżycia wewnątrz komórki. *S. typhimurium* moduluje niektóre elementy wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu.

Zakażone makrofagi ulegają apoptozie, a głównym białkiem za to odpowiedzialnym jest SipB, kodowane w obrębie SPI1 i dostarczane przez system sekrecji typu trzeciego kodowany na tej wyspie. SipB wiąże i aktywuje kaspazę-1 oraz kaspazę-2 [44-46]. Kaspaza-1 (ang. *interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*, ICE) indukuje apoptozę komórek ssaczych z konsekwencjami różniącymi się od klasycznie rozumianej apoptozy. Substratami dla tej kaspazy są pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18, których proteolityczne dojrzewanie prowadzi do uwolnienia aktywnych, prozapalnych cytokin IL-1 $\beta$  i IL-18. Stwierdzono, że *S. typhimurium* SL1344 podana drogą pokarmową myszom *casp-1<sup>-/-</sup>*, które nie posiadały funkcjonalnej kaspazy-1, zachowała zdolność do przekroczenia bariery nabłonka jelit, ale w znacznie mniejszej liczebności lub w ogóle nie kolonizowała kępek Peyera, krezkowych węzłów chłonnych i śledziony tych myszy [47].

Kaspaza-1 jest przede wszystkim główną proteazą zaangażowaną w dojrzewanie pro-IL-1 $\beta$  i uwalnianie aktywnej IL-1 $\beta$  [48, 49]. Nadekspresja tej kaspazy w fibroblastach Rat-1 prowadziła do ich apoptozy [50]. Jednakże główną cechą fenotypową myszy pozbawionych kaspazy-1 była upośledzona synteza dojrzałej IL-1 $\beta$



w wyniku stymulacji LPS i oporność na indukcję szoku septycznego, a monocyty pochodzące od tych myszy cechowała niezdolność do uwalniania IL-1 $\beta$ , a także obniżenie ilości uwalnianych TNF $\alpha$  i IL-6 [51, 52]. Tymocyty tych myszy były odporne na indukcję apoptozy pod wpływem przeciwciała wiążącego i aktywującego Fas, co świadczy o znaczeniu kaspazy-1 również w programowanej śmierci komórki [51]. Kolejne substraty kaspazy-1 zidentyfikowano pośród enzymów szlaku glikolizy, których degradacja może przyczynić się do apoptozy makrofagów [53]. Elementy szlaku sygnałowego prowadzącego do apoptozy poprzez aktywację kaspazy-1 nie są dobrze poznane. Niemniej jednak dla tego, aby *Salmonella* doprowadziła do apoptozy zakażonych makrofagów, ważna jest aktywacja kaspazy-1 [45].

Kaspaza-1 i -2 są syntetyzowane w postaci nieaktywnych prokaspaz i ze względu na swoją budowę są zaliczane do grupy kaspaz inicjatorowych. Myszy transgeniczne pozbawione kaspazy-2, podobnie jak w przypadku kaspazy-1, rozwijały się prawidłowo, stwierdzono jedynie zaburzenia apoptozy oocytów [54]. Aktywacji kaspazy-2 w zakażonych *S. typhimurium* makrofagach pochodzenia szpikowego towarzyszyła aktywacja kaspazy-3, -6 i -8, a preinkubacja z inhibitorem kaspazy-2 lub inaktywacja genu w makrofagach transgenicznych myszy zmniejszyła liczbę komórek apoptotycznych [46].

Aktywacja kaspazy-1 przez SipB prowadzi do uwolnienia prozapalnej IL-1 $\beta$ . Przeciwną funkcję w modyfikowaniu odpowiedzi gospodarza wydaje się mieć białko AvrA, które może hamować odpowiedź prozapalną [55]. AvrA jest kodowane w obrębie SPI1, transportowane do komórki eukariotycznej przez system sekrecji typu trzeciego i ma działanie antyapoptotyczne. AvrA jest deubikwitynazą, a jej poznanymi substratami są I $\kappa$ B $\alpha$  oraz  $\beta$ -katenina. Deubikwitynacja I $\kappa$ B $\alpha$  hamuje degradację tego inhibitora; I $\kappa$ B $\alpha$  pozostaje związany z NF- $\kappa$ B i maskując jego sygnał lokalizacji jądrowej, zatrzymuje NF- $\kappa$ B w cytoplazmie, uniemożliwiając tym samym aktywację transkrypcji genów regulowanych przez ten czynnik transkrypcyjny. AvrA poprzez hamowanie szlaku NF- $\kappa$ B prowadzi do supresji wrodzonych mechanizmów odpornościowych. Natomiast stabilizacja i akumulacja  $\beta$ -kateniny stymuluje proliferację oraz hamuje apoptozę i eliminację zakażonych komórek nabłonkowych [56-58].

Regulacja ekspresji i sekrecji poszczególnych czynników wirulencji ma krytyczne znaczenie dla postępu zakażenia. Specjalne systemy (ang. *two-component regulatory systems*) odbierają sygnały ze zmieniającego się środowiska i regulują ekspresję genów wysp patogenności. Na przykład ekspresja genów SPI1 wzrasta w warunkach obniżonego dostępu tlenu i wysokiej osmolarności i można ją wyindukować hodując *S. typhimurium* do osiągnięcia późnej fazy wzrostu logarytmicznego w pożywce Luria-Bertani [59, 60] lub w pożywce Luria-Bertani z podwyższoną zawartością chlorku

sodu (3 M NaCl) [61]. Natomiast ekspresja genów SPI2 jest indukowana w bakteriach żyjących w SCV wewnątrz makrofagów i komórek nabłonkowych [6, 62, 63]. W warunkach *in vitro* ekspresję genów SPI2 indukuje ograniczony dostęp składników odżywczych [64], a sekrecję białek SPI2 można indukować hodując *S. typhimurium* w pożywce minimalnej o kwaśnym odczynie (pH około 5), a więc w warunkach mogących odzwierciedlać warunki wewnątrz SCV, gdzie pH wynosi 4,0 - 5,0 [65, 66].

### **3. Modyfikacje genetyczne szczepów *Salmonella* obniżające patogenność.**

Bakterie z rodzaju *Salmonella* posiadają szereg cech, wynikających z ich inwazyjności i patogenności, które powodują, że zakażenie *S. typhi* i *S. typhimurium* stanowi istotny problem medyczny. Bakterie z rodzaju *Salmonella* wywołują u ludzi dur brzuszny (*S. typhi*), dur rzekomy (*S. paratyphi*) i salmonellozę (głównie *S. typhimurium* i *S. enteritidis*), przy czym dur brzuszny jest najcięższą chorobą. Nadal brakuje wysoce skutecznej szczepionki chroniącej przed zakażeniem, jak również szczepionki weterynaryjnej, która umożliwiłaby kontrolę zakażenia wśród zwierząt hodowlanych [67, 68]. Kontynuowane są badania podstawowe nad fizjologią tych bakterii i ich oddziaływaniem z zakażonym organizmem, a w szczególności z elementami układu odporności. Wyniki tych badań powinny umożliwić bardziej racjonalne projektowanie skutecznych atenuowanych szczepionek prewencyjnych.

Otrzymane szczepy miałyby charakterystyczne dla szczepionek atenuowanych zalety, których często brakuje szczepionkom inaktywowanym lub rekombinowanym szczepionkom nowej generacji, np. szczepionkom DNA. Żywy materiał szczepionkowy aktywuje większy repertuar naturalnych elementów odpowiedzi odpornościowej, zarówno systemowej jak i lokalnej. Podanie szczepionki drogą pokarmową stwarza możliwość stymulowania odpowiedzi protekcyjnej w obrębie tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi, które są typową drogą inwazji patogenów. W porównaniu ze szczepionkami podjednostkowymi, generowana jest odpowiedź przeciwko bardziej kompletnemu zestawowi antygenów protekcyjnych oraz pamięć immunologiczna, której często brakuje po podaniu szczepionek polisacharydowych [60]. Istotny jest też niski koszt przygotowania szczepionek atenuowanych, związany między innymi z łatwością hodowli bakterii. Z drugiej strony zdolność do replikacji stwarza zagrożenie możliwością transmisji do osób nieszczepionych, co może być niekiedy zaletą, jeśli szczepieniu z różnych względów nie jest poddane 100% zagrożonej populacji, ale jest znaczącym problemem jeśli uwzględnimy osoby z niedoborami immunologicznymi. Stosując żywe bakterie w materiale szczepionkowym należy być świadomym możliwości wystąpienia mutacji i rewersji do dzikiego fenotypu.

Pierwsze atenuowane szczepy *Salmonella* otrzymano stosując mutagenne

substancje chemiczne lub pasażując bakterie przez wiele pokoleń *in vitro*. Ze względu na brak dokładnej charakterystyki modyfikacji wprowadzonych w ten sposób do genomu oraz brak kontroli nad liczbą wprowadzonych zmian ciężko jest ocenić ryzyko wystąpienia mutacji supresorowych lub powrotnych.

Skuteczna i bezpieczna żywa szczepionka bakteryjna musi być atenuowana, ale równocześnie powinna zachować immunogenność. Ponadto wymagane jest, by wprowadzone modyfikacje lub mutacje były dobrze scharakteryzowane. Duża liczba dostępnych obecnie narzędzi inżynierii genetycznej, które zastępują metody mutagenazy chemicznej lub naturalnej selekcji *in vivo*, umożliwia ukierunkowaną mutagenezę.

Modyfikacje osłabiające zjadliwość bakterii *Salmonella* obejmują dwie grupy genów. Atenuację można uzyskać wprowadzając mutacje do genów szlaków metabolicznych, prowadzące do auksotrofizacji szczepu, czyli uzależniające wzrost bakterii od dostarczenia np. aminokwasów aromatycznych, jak w przypadku mutantów delecyjnych genów *aroA*, *aroC*, *aroD*, lub puryn (np. mutanty *purA*).

Drugą możliwością wynikającą z fizjologii tego rodzaju bakterii jest inaktywacja genów kodujących czynniki wirulencji albo białka regulujące ich ekspresję. Przykładem takiego sposobu atenuacji są mutacje genach w *phoP* i/lub *phoQ*, kodujących czynniki regulujące ekspresję genów SPI2, lub mutacje genów *cya/crp* kodujących czynniki globalnego systemu regulatorowego, kontrolującego transkrypcję wielu genów katabolizmu komórkowego, lub mutacja genu *htrA*, umożliwiającego przeżycie w warunkach stresu [69-71].

Wprowadzając określone nieodwracalne mutacje do specyficznych genów w chromosomie uzyskano osłabione szczepy *Salmonella*, a poszczególne szczepy z różną kombinacją delecji np. w genach *aro* i *pur*, różniły się immunogennością u myszy [72-79].

Część szczepów auksotroficznych jak i tych z delecjami w drugiej z wymienionych grupie genów charakteryzuje zbyt niska immunogenność lub niekorzystne efekty uboczne podania u ludzi, co czyni te szczepy nieprzydatnymi do uzyskania szczepionki protekcyjnej [80, 81]. Zatem wyzwaniem jest racjonalne zaprojektowanie modyfikacji bakterii w celu uzyskania szczepu, który wykazywałby odpowiednio zbalansowane immunogenność i atenuację.

Przykładem bezpiecznej, stabilnej i stosunkowo skutecznej szczepionki protekcyjnej jest *S. typhi* Ty21a (Vivotif, Crucell/Berna Biotech), jedyna dotychczas licencjonowana atenuowana szczepionka przeciwko durowi brzuszemu, podawana drogą pokarmową. *S. typhi* Ty21a otrzymano poprzez liczne mutacje indukowane mutagenami chemicznymi w bakteriach *S. typhi* Ty2, uzyskując w efekcie szczep, który jest wrażliwy

na galaktozę, auksotroficzny w stosunku do izoleucyny i waliny oraz ma zmniejszoną oporność na stres, a cechy te wynikają z mutacji w genach odpowiednio: *galE*, *ilvD* i *rpoS*. Stwierdzono również niezdolność do produkcji polisacharydu Vi, a także około 30 innych mutacji. Wielość mutacji zmniejsza szansę powrotu do dzikiego fenotypu i zwiększa bezpieczeństwo, gdyż mutacje powrotne w obrębie genów wirulencji nie zostały zaobserwowane ani *in vitro* ani *in vivo* [82-84]. Natomiast prawdopodobnie z powodu zbyt silnej atenuacji szczep ten jest słabo immunogenny i nie gwarantuje długotrwałej protekcji.

Bakterie z rodzaju *Salmonella* nabyły w toku ewolucji zestaw właściwości decydujących o ich przystosowaniu do przetrwania i namnażania w organizmie. Umiejętne wykorzystanie zdolności do oddziaływania z komórkami gospodarza, a przede wszystkim z elementami układu immunologicznego, może być podstawą opracowania szczepów, które będą skutecznymi wektorami protekcyjnymi oraz terapeutycznymi do leczenia chorób innych niż te, których przyczyną jest *Salmonella*.

Zastosowanie atenuowanych szczepów *Salmonella* nie ogranicza się do wykorzystania ich jako bezpośredniego materiału szczepionkowego indukującego odporność na zakażenie *Salmonella*. Bakterie te służą również do konstrukcji wektorów dostarczających do organizmu antygeny pochodzące z innych patogenów, w celu wygenerowania odpowiedzi protekcyjnej przeciwko tym patogenom. Możliwością takiego wykorzystania szczepów *Salmonella* zainteresowano się ze względu na szczególne cechy tej bakterii. Atenuowane bakterie *Salmonella* podane drogą pokarmową indukują odpowiedź systemową oraz odpowiedź w obrębie tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi, które są drogą zakażenia wieloma patogenami. *Salmonella* stymuluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Ponadto spośród bakterii o podobnej specyfice oddziaływania z organizmem gospodarza, które są potencjalnie dogodnymi wektorami, takich jak *Shigella* lub *Listeria*, jedynie *Salmonella* (*S. typhi* Ty21a) jest zaaprobowaną i stosowaną u ludzi szczepionką. Zebrane doświadczenie oraz duża, aczkolwiek niewyczerpująca, wiedza na temat patogenezы, regulacji ekspresji genów i mechanizmów wirulencji, a także względna łatwość manipulacji materiałem genetycznym powodują, że *Salmonella* jest obiecującym wektorem szczepionkowym.

Około dziesięciu atenuowanych szczepów *S. typhi* i *S. typhimurium* z ekspresją antygenów heterologicznych było przedmiotem badań klinicznych, a kolejne są w fazie badań przedklinicznych (Tabela 4).

**Tabela 4. Atenuowane wektory szczepionkowe *S. typhi* i *S. typhimurium*, dostarczające antygen do organizmu w celu indukcji odpowiedzi protekcyjnej.**

	Zastosowanie	Opis szczepu
<b><i>S. typhimurium</i> SL7207</b>	Szczepionka chroniąca przed zakażeniem bakteriami <i>Listeria monocytogenes</i> .	Mutant delecyjny <i>aroA</i> z ekspresją antygenów protekcyjnych pochodzących z <i>L. monocytogenes</i> : białka p60 lub listeriolizyny Hly. Podanie szczepu z ekspresją wydzielniczej formy tych antygenów chroniło myszy C57Bl/6 przed zakażeniem [85].
<b><i>S. typhimurium</i> BRD509</b>	Ochrona przed zakażeniami wiciowcem <i>Leishmania major</i> i <i>L. donovani</i> .	<i>S. typhimurium</i> SL1344 z delecją genów <i>aroA</i> i <i>aroD</i> , wykazujący ekspresję powierzchniowej glikoproteiny gp63 <i>L. major</i> pod kontrolą promotora indukowanego <i>in vivo</i> . Obserwowano częściową protekcję przed zakażeniem <i>L. major</i> u myszy Balb/c [86].
<b><i>S. typhi</i> CVD 915</b>	Wektor dostarczający heterologiczny antygen do organizmu.	Szczep z delecją genów <i>guaBA</i> , wykazujący ekspresję fragmentu C toksyny tężca pod kontrolą endogennego promotora indukowanego w warunkach anaerobowych. Po podaniu bakterii obserwowano wysoki poziom IgG przeciwko fragmentowi C w surowicy myszy Balb/c, wyższy niż po podaniu analogicznej szczepionki DNA [87].
<b><i>S. typhimurium</i> CKS257</b>	Wektor szczepionkowy stymulujący lokalną odpowiedź protekcyjną przeciwko antygenowi Gag HIV.	<i>S. typhimurium</i> SL1344 z delecjami <i>phoP/phoQ</i> , <i>aroA</i> , <i>asd</i> , <i>strA/strB</i> i ekspresją antygeny HIV Gag, eksportowanego przez TTSS SPI1. Badano bezpieczeństwo i efekt podania szczepionki drogą pokarmową u zdrowych ochotników. Nie wykryto IgG przeciwko HIV Gag u żadnego z 10 badanych. W dwóch przypadkach stwierdzono antygenowo-swoistą odpowiedź komórek T [88].
<b><i>S. typhimurium</i></b>	Szczepionka prewencyjna służąca kontroli zakażenia wirusem grypy A H5N1 u drobiu.	<i>S. typhimurium</i> dostarczająca fragmentu DNA kodującego hemaglutyninę H5N1. Zaobserwowano protekcję u drobiu po podaniu pierwszej dawki ( <i>prime</i> ) w postaci żywych bakterii oraz drugiej dawki bakterii zabitych ( <i>boost</i> ) [89].

Efektywność wektora szczepionkowego jest pochodną poszczególnych cech, które wpływają na jego immunogenność i reaktywność. Oprócz odpowiedniej relacji między immunogennością a atenuacją, ważne są takie wzajemnie powiązane czynniki, jak: (a) źródło ekspresji antygeny, którym może być plazmid lub chromosom bakteryjny, (b) stabilność dziedziczenia materiału genetycznego kodującego antygen, (c) wpływ ekspresji antygeny na żywotność wektora, czyli wymagany jest dobór odpowiedniego systemu ekspresji pod kątem liczby kopii genu, siły promotora kontrolującego ekspresję i odpowiedniej regulacji ekspresji (np. konstytutywnej vs. indukowanej *in vivo*), (d) docelowa lokalizacja antygeny, preferencyjnie na powierzchni bakterii lub w postaci antygeny eksportowanego poza bakterie, (e) droga podania do organizmu [82].

Kolejnym kierunkiem badań aplikacyjnych obok tych, których celem jest opracowanie szczepionki protekcyjnej przeciwko antygenom heterologicznym, jest wykorzystanie szczepów *Salmonella* do dostarczenia rekombinowanego czynnika terapeutycznego. Terapeutyczny wektor szczepionkowy, czyli bioterapeutyk, w którym bakteria jest nośnikiem substancji efektorowej w postaci materiału genetycznego (fragmentu kodującego gen lub shRNA), białka enzymatycznego lub innego czynnika

terapeutycznego, musi spełniać odmienne kryteria dotyczące immunogenności, w porównaniu ze szczepionkami protekcyjnymi. Taki szczep powinien być stosunkowo silnie atenuowany i słabo immunogenny, co zapewniałoby skuteczność przy wielokrotnym podaniu do organizmu.

Skuteczność szczepionki prewencyjnej może opierać się na jej zdolności do indukcji protekcyjnej odpowiedzi humoralnej i pamięci immunologicznej. Do stymulacji odpowiedzi humoralnej nie jest konieczne zachowanie zdolności inwazyjnych bakterii, a podanie martwych bakterii lub szczepionki w postaci antygeny Vi *S. typhi* (Typhim Vi, Pasteur Merieux) stymuluje produkcję przeciwciał [90]. Inwazyjność jest istotnym elementem zjadliwości *Salmonella*, czyli dogodnym celem mutageny osłabiającej bakterie, które mają służyć jako szczepionka prewencyjna.

Natomiast terapeutyczne wektory *Salmonella* powinny mieć zachowaną inwazyjność, która wiąże się z jakością mechanizmów odpornościowych stymulowanych przez te bakterie, wynikającą z indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej przez bakterie zdolne do zakażenia komórek gospodarza.

#### **4. Potencjalne zastosowanie atenuowanych szczepów *Salmonella sp.* w terapii nowotworów.**

*Salmonella sp.* jest wewnątrzkomórkowym pasożytem aktywnie zakażającym niefagocytyjące komórki nabłonkowe oraz makrofagi. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja bakterii stwarza możliwości dostarczenia czynnika terapeutycznego do tych komórek, a ponadto wygenerowania odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Modulacja naturalnych właściwości *Salmonella* prowadząca do ukierunkowania jej inwazyjności względem określonej populacji komórek może prowadzić do ich eliminacji poprzez wygenerowanie odpowiedzi immunologicznej, której celem jest zakażona komórka. Ta koncepcja została wykorzystana do opracowania szczepionek bakteryjnych, których zadaniem jest zahamowanie wzrostu lub eliminacja litych guzów nowotworowych.

Chemio- i radioterapia nowotworów są związane z dewastującymi skutkami ubocznymi, a w połączeniu z niską skutecznością generują potrzebę opracowania alternatywnych terapii. Jedną z nich jest immunoterapia z wykorzystaniem szczepionek przeciwnowotworowych, które stymulują własne siły obronne organizmu do zwalczania choroby.

Słaba dostępność nowotworu dla czynnika terapeutycznego jest jedną z przyczyn ograniczonej skuteczności chemio- i radioterapii, ale również biernej i czynnej immunoterapii nowotworów. Specyfika tkanki nowotworowej powoduje, że stosowane chemioterapeutyki oraz bioterapeutyki, np. przeciwciała monoklonalne, a także elementy efektorowe układu immunologicznego, nie spełniają pokładanych w nich

nadziei ze względu na ograniczoną penetrację do wnętrza guzów nowotworowych. W przypadku immunoterapii, ich skuteczność może być również osłabiona przez immunosupresyjne środowisko nowotworu oraz niską immunogenność zdefiniowanych antygenów nowotworowych, które z reguły są składnikami proponowanych szczepionek przeciwnowotworowych.

Stosunkowo słaba immunogenność *Salmonella typhimurium* sprawia, że bakteria ta jest dogodnym wektorem szczepionkowym umożliwiającym generowanie odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom heterologicznym, którymi mogą być popularne antygeny nowotworowe. W konstrukcji szczepionki przeciwnowotworowej opartej na wektorze *Salmonella* sp. były wykorzystane antygeny czerniaka złośliwego (gp100, TR-2) [91], jak również antygen raka piersi, NY-ESO [92]. Celem tak skonstruowanych szczepionek jest mobilizacja antygenowo-specyficznych limfocytów T CD8 (CTL), które mają za zadanie eliminację komórek z ekspresją wymienionych antygenów. Trudności z wywołaniem silnej specyficznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom nowotworowym, czyli uzyskaniem efektywnego poziomu CTL w obrębie guza nowotworowego, są głównym powodem niepowodzeń w klinicznym zastosowaniu tej i podobnych metod immunoterapii [93, 94].

Atenuowane szczepy *Salmonella* sp. są zdolne do preferencyjnej kolonizacji guzów nowotworowych, czemu towarzyszy zahamowanie wzrostu nowotworu w modelach zwierzęcych [95, 96]. Mechanizm zahamowania wzrostu guzów litych przez *Salmonella* wciąż pozostaje niewyjaśniony. Biorąc pod uwagę immunostymulacyjne właściwości bakterii oraz wyniki badań nad *Salmonella* w modelach nowotworowych, można przypuszczać, że wynika ono z połączonego bezpośredniego działania bakterii zakażających komórki nowotworowe oraz z wpływu zakażenia na zmianę środowiska wewnątrz guza z immunosupresyjnego i sprzyjającego wzrostowi nowotworu na środowisko niepodtrzymujące dalszego wzrostu i umożliwiające generowanie skutecznej odpowiedzi ukierunkowanej na tkankę nowotworową. Uwzględniając niską efektywność terapii skoncentrowanych na odpowiedzi przeciwko konkretnemu antygenowi nowotworowemu należy podkreślić, że *Salmonella* może być nie tylko nośnikiem dostarczającym czynnika terapeutycznego. Przede wszystkim, do osiągnięcia maksymalnych efektów terapeutycznych w modelach nowotworowych można wykorzystać jej naturalne właściwości immunomodulacyjne.

*Salmonella typhimurium* może powodować apoptozę zakażonych komórek makrofagowych i nabłonkowych [43, 97], między innymi poprzez aktywację kaspazy-1 i kaspazy-2 przez białko SipB [44, 45]. Indukcja apoptozy w obrębie tkanki nowotworowej na skutek wybiórczej akumulacji bakterii w guzie i zakażenia komórek może przyczyniać się do hamowania wzrostu guzów nowotworowych w wyniku: (a)

bezpośredniego efektu cytotoksycznego bakterii względem zakażonych komórek nowotworowych, (b) aktywacji cytotoksycznych limfocytów T w wyniku krzyżowej prezentacji antygenów nowotworowych przez komórki prezentujące antygen [98], które sfagocytowały apoptotyczne komórki nowotworowe [98, 99], (c) zmiany w mikrośrodowisku nowotworu, spowodowane apoptozą zakażonych makrofagów TAM (ang. *Tumor Associated Macrophages*).

Jednym ze szczepów, które były badane pod kątem zdolności do hamowania wzrostu litych guzów nowotworowych, jest *Salmonella typhimurium* VNP20009, atenuowany, auksotroficzny szczep o właściwościach przeciwnowotworowych, otrzymany między innymi poprzez delecję *purl*, jednego z genów szlaku metabolizmu puryn. VNP20009 jest zdolna do preferencyjnego osiedlania się i namnażania w obrębie tkanki nowotworowej u myszy i psów, prowadząc do zahamowania wzrostu guzów litych [100, 101]. Ponadto VNP20009 jest dobrze tolerowana przez ssaki dzięki częściowej delecji *msbB*, obniżającej zdolność lipopolisacharydu VNP20009 do stymulacji produkcji TNF $\alpha$  [102]. Badania kliniczne I fazy przeprowadzone na grupie 28 pacjentów z zaawansowanym stadium czerniaka złośliwego nie potwierdziły zjawiska preferencyjnego osiedlania się bakterii w obrębie zmian nowotworowych, obserwowanego u innych ssaków [103]. Badania te pozwoliły jednak na stwierdzenie, że podanie dużej ilości VNP20009 ( $10^9$  CFU) we wlewach dożylnych jest dobrze tolerowane przez ludzi, co potwierdza, że VNP20009 jest bezpiecznym wektorem szczepionkowym, który może być zastosowany u człowieka.



## Cel pracy

Praktyczne wykorzystanie wektorów szczepionkowych jest z reguły ograniczone do roli nośników dla immunogenów. Tymczasem wektory szczepionkowe, a szczególnie złożone wektory bakteryjne, zawierają w sobie ogromny potencjał immunoregulacyjny, którego znaczenie jest często pomijane w pracach nad konstrukcją takich szczepionek. W naszych badaniach zajmujemy się wykorzystaniem naturalnych właściwości bakterii dla osiągnięcia maksymalnych efektów terapeutycznych w mysich modelach nowotworów.

Celem poprzednich prac naszego zespołu kierowanego przez Dr Michała Beretę było spotęgowanie naturalnej zdolności szczepu *S. typhimurium* VNP20009 do preferencyjnej kolonizacji tkanki nowotworowej. Aby to osiągnąć, wykorzystaliśmy metodę powierzchniowej ekspresji (ang. *surface display*) fragmentu części zmiennej przeciwciała (ang. *single-chain variable fragment*, scFv) specyficznego dla antygeny karcynoembrionalnego (CEA), którego ekspresja jest powszechna na ludzkich nowotworach jelita grubego, płuc oraz komórkach raka prostaty i piersi. W wyniku indukcji ekspresji białka fuzyjnego Lpp-OmpA-scFv na powierzchni bakterii dochodzi do zwiększonego zasiedlania tkanki nowotworowej w mysim modelu nowotworowym (myszy Apc/CEA) oraz w mysim modelu nowotworu transplantacyjnego (MC38CEA) [104].

W wyniku procedur przeprowadzonych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej, szczep VNP20009, obok cząsteczki ukierunkowującej bakterię na tkankę nowotworową w postaci części zmiennej przeciwciała wiążącego antygen nowotworowy, został wyposażony również w molekułę terapeutyczną. *Salmonella typhimurium* prowadzi do apoptotycznej śmierci zakażonych komórek, a jednym z głównych czynników proapoptotycznych jest białko SipB (ang. *Salmonella invasion protein B*), kodowane w obszarze pierwszej wyspy patogenności, SPI1. **Celem tej pracy była modyfikacja szczepu VNP20009 zwiększająca efekt proapoptotyczny bakterii poprzez wewnątrzkomórkową nadekspresję białka SipB w zakażonych komórkach eukariotycznych, z wykorzystaniem naturalnego promotora genu *sifB*, który uaktywnia się w bakteriach żyjących wewnątrz zakażonej komórki.**

Poszczególne cele pracy obejmowały:

1) zbadanie wpływu ekspresji SipB pod kontrolą promotora eukariotycznego na żywotność transfekowanych komórek nowotworowych oraz wpływu nadekspresji SipB w bakteriach VNP20009 na żywotność zakażonych makrofagów i komórek nowotworowych,

2) weryfikacja hipotezy, że nadekspresja białka SipB może wzmocnić

przeciwnowotworowe własności szczepu VNP20009 w transplantacyjnych modelach nowotworów u myszy,

3) w przypadku potwierdzenia tej hipotezy - dokonanie genetycznej modyfikacji chromosomu bakteryjnego *S. typhimurium* VNP20009 w celu uzyskania stabilnej nadekspresji białka SipB w warunkach wewnątrzkomórkowych,

4) określenie biologicznych efektów tej modyfikacji.

# Materiały i metody

## 1. Szczepy bakteryjne.

Szczepy bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) używane w tej pracy wraz z ich charakterystyką genetyczną przedstawiono w Tabeli 5.

**Tabela 5. Charakterystyka genetyczna szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*.**

Szczep	Opis	Źródło/Referencja
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	F <sup>-</sup> φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
M15	Nal <sup>S</sup> Str <sup>S</sup> Rif <sup>S</sup> <i>thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>+</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i>	Qiagen, [105]
DH5α <i>pir</i>	F' λ:: <i>pir endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>glnV44 thi-1 recA1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR</i> (φ80-Δ <i>lacZ</i> M15) <i>gyrA</i> (Nal <sup>R</sup> )	dar od G. Posfai
<b><i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium</b>		
SL5319	M7471 (ColE1) <i>malB leu hisC527 CRR401 [aroA554::Tn10] hisD8557::Tn10 rpsL120</i>	[106]
VNP20009 (YS1646)	14028 <i>pur xyl purI msbB</i>	[107]

## 2. Linie komórek eukariotycznych.

RAW264.7 - mysia linia monocytarno-makrofagowa, uzyskana z komórek myszy szczepu Balb/c, transformowanych wirusem AML; ATCC TIB-71.

MC38CEA - linia gruczolakoraka jelita grubego, charakteryzująca się powierzchniową ekspresją ludzkiego antygenu karcynoembrionalnego (CEA), uzyskaną przez dr Michała Beretę w wyniku stabilnej transfekcji komórek linii MC38 cDNA kodującym CEA [104]; linię MC38 wyprowadzono z komórek myszy szczepu C57Bl/6 [108].

CT26CEA - linia mysia z powierzchniową ekspresją ludzkiego CEA, otrzymana przez dr Michała Beretę, poprzez stabilną transfekcję komórek linii CT26 cDNA kodującym

CEA. CT26 to linia gruczolakoraka jelita grubego uzyskana z komórek myszy szczepu Balb/c; ATCC CRL-2638.

B16 - linia czerniaka, wyprowadzona z komórek myszy szczepu C57Bl/6 [109].

B16F10 - linia czerniaka, wyprowadzona z komórek myszy szczepu C57Bl/6J; ATCC CRL-6475.

### **3. Podstawowe odczynniki.**

#### **3.1. Odczynniki do hodowli bakterii.**

Pożywka LB (Luria-Bertani Broth: trypton - 10 g/l, ekstrakt drożdżowy - 5 g/l, NaCl - 5 g/l), trypton, ekstrakt drożdżowy, ampicylina, chloramfenikol, kanamycyna, glicerol, chlorowodorek chlorotetracykliny - Sigma.

Pożywka TB (Terrific Broth: pepton 140 - 1,8 g/l, ekstrakt drożdżowy - 23,6 g/l,  $K_2HPO_4$  - 9,4 g/l,  $KH_2PO_4$  - 2,2 g/l, glicerol - 0,4%), izopropylotiogalaktozyd (IPTG) - Invitrogen.

Agar-B, roztwór chlorku rubidu i wapnia do przygotowywania bakterii kompetentnych (10x RbCl/CaCl Transformation Salts) - Qbiogene.

Glukoza - Polskie Odczynniki Chemiczne.

Kwaśny hydrolizat kazeiny - DIFCO.

#### **3.2. Odczynniki do hodowli komórkowych.**

Pożywka DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), płodowa surowica bydlęca (Fetal Bovine Serum), aminokwasy endogenne (Non-essential Amino Acids), roztwór trypsyny i EDTA w PBS (0,5 mg/ml trypsyny; 0,22 mg/ml EDTA) - PAA Laboratories.

Pożywka zdefiniowana Opti-MEM, stabilizowana glutamina (GlutaMAX; 200 mM roztwór dipeptydu L-alanylo-L-glutamina) - GIBCO/Invitrogen.

Gentamycyna (40 mg/ml) - Polfa Tarchomin.

Dimetylosulfotlenek (DMSO, Hybri-Max) - Sigma.

#### **3.3. Przeciwciała.**

Mysie monoklonalne przeciwciało anti-RGS-His - Qiagen.

Kozie anti-mysie IgG sprzęgnięte z alkaliczną fosfatazą - Promega.

Kozie anti-mysie Ig sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową - BD Pharmingen.

Biotynylowane szczurze anti-mysie IgG1 - MP Biomedicals.

Biotynylowane kozie anti-mysie IgG2a, biotynylowane kozie anti-mysie IgM - SouthernBiotech.

### **3.4. Odczynniki do biologii molekularnej.**

Zestaw do izolacji DNA plazmidowego na małą (QIAprep Spin Miniprep Kit) i dużą skalę (HiSpeed Plasmid Midi Kit), zestaw do izolacji DNA genomowego (DNeasy Blood and Tissue Kit), zestaw do izolacji całkowitego RNA (RNeasy Mini Kit), DNaza I (RNase-Free DNase Set) - Qiagen.

Enzymy restrykcyjne, fragment Klenowa polimerazy DNA, albumina do reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi - New England Biolabs.

Krewetkowa alkaliczna fosfataza, zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji - Promega.

Ligaza DNA faga T4 - Epicentre Biotechnologies.

Standardy długości fragmentów DNA - Promega, Fermentas.

Standardy mas cząsteczkowych białek - Bio-Rad.

Polimerazy DNA - Eppendorf (TripleMaster PCR System), Invitrogen (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity), Finnzymes (DyNazyme II DNA Polymerase), Promega (GoTaq Hot Start Polymerase).

Zestaw do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (SYBR Green Quantitative RT-PCR Kit) - Sigma.

### **3.5. Pozostałe odczynniki organiczne i nieorganiczne.**

Etanol, metanol, glicyna, nadsiarczan amonu, NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  - Polskie Odczynniki Chemiczne.

Woda o czystości HPLC - otrzymano od dr hab. Pawła Maka z Zakładu Biochemii Analitycznej WBBiB.

Tween 20, bis-akrylamid, Tris Base, paraformaldehyd, zestaw do oznaczania białka metodą BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay) - Sigma.

Akryloamid, TEMED - Fluka.

Agaroza, SDS - SERVA.

Albumina bydlęca (Bovine Serum Albumin Fraction V) - Roche.

Odtłuszczone mleko w proszku - Marvel Dried Skimmed Milk.

Streptawidyna znakowana fikoerytryną (PE), aneksyna V znakowana allofikocyjaniną (APC) - BD Pharmingen.

7-aminoaktynomycyna (7-AAD) - Beckman Coulter.

## **4. Klonowanie fragmentów DNA do wektorów plazmidowych.**

Wszystkie konstrukty uzyskano wykorzystując do ich amplifikacji bakterie *Escherichia coli*. DNA plazmidowe namnażano i oczyszczano początkowo na małą skalę, a następnie przy pomocy analizy restrykcyjnej oraz sekwencjonowania

sprawdzano zgodność uzyskanych sekwencji z sekwencją oczekiwaną. Wybrane konstrukty namnażano w bakteriach *E. coli*, a uzyskanym DNA plazmidowym transformowano bakterie *Salmonella typhimurium* VNP20009 lub transfekowano komórki eukariotyczne. W Tabeli 23 umieszczonej w rozdziale Załączniki przedstawiono plazmidy wykorzystane do przygotowania poszczególnych konstruktyw.

#### **4.1. Uzyskiwanie sekwencji DNA do klonowania.**

Całkowite DNA genomowe bakterii izolowano poprzez lizę bakterii w buforze zawierającym SDS, EDTA oraz proteinazę K i oczyszczano na złożu krzemionkowym wykorzystując zestaw odczynników do izolacji DNA (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen). Fragmenty DNA kodujące poszczególne geny (*sipB*, *ushA*, *avrA*) i sekwencję promotorową (*PsifB*) otrzymano z DNA genomowego szczepów *Salmonella typhimurium* SL5319 lub VNP20009, w reakcjach PCR ze starterami hybrydującymi ze specyficznymi sekwencjami oraz zawierającymi sekwencje flankujące z miejscem restrykcyjnym, ułatwiające klonowanie fragmentów DNA. Startery projektowano z użyciem programu Primer 1.01, a syntezę wykonała Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN lub firma BioTe21.

W Tabeli 6 przedstawiono sekwencje starterów oraz ich pozycje w sekwencji genomu szczepu *S. typhimurium* LT2. Szczep VNP20009 uzyskano na drodze mutagenезy i selekcji w warunkach laboratoryjnych ze szczepu *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 [107], natomiast *S. typhimurium* SL5319 uzyskano na drodze transdukcji i selekcji ze szczepu *S. typhimurium* M7471 [106]. Genomy żadnego z wymienionych szczepów dotychczas nie zostały zsekwencjonowane. Z tego względu w tej pracy szczepem referencyjnym w odniesieniu do sekwencji kodujących poszczególne geny i sekwencje regulatorowe w genomie jest *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium szczep LT2, określany dalej jako *Salmonella typhimurium* LT2 lub *S. typhimurium* LT2. Szczep LT2 jest obecnie jedynym szczepem należącym do serotypu *S. typhimurium*, którego genom został w pełni zsekwencjonowany [4]. Sekwencja DNA genomowego jest dostępna w bazie GenBank pod numerem dostępu AE006468.

**Tabela 6. Oligonukleotydy zastosowane do uzyskania sekwencji kodujących geny i sekwencje regulatorowe w reakcji PCR z DNA genomowego bakterii *Salmonella typhimurium*.**

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Powielana sekwencja	Pozycja w genomie <i>S. typhimurium</i> LT2
SipFPst	AACTGCAGAACCAATGCATTGGTTTCTCCCTTTATTTGGCA*	<i>sipB</i>	3 029 089**
SipRBam	CGGGATCCCGAAGTAGCATTAGCCGTAGCG		3 030 880 C
sifF	CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG	<i>PsifB</i>	1 691 572
sifR	GAAGATCITCACTTCATTACTGGAATAGGTGGT		1 692 152 C
Fusha	GGGGTACCCCGCGATGTTGGAGATAGTAGG	<i>ushA</i>	553 482
Rusha	GGGGTACCCCTACAGCCAGCTCACCTCA		555 285 C
F1avr	CGGCATTGTTATCGAATC	5' <i>avrA</i>	3 009 977
R1avrHind	CCCAAGCTTGGGGCAGCTCTTGAACGTGAAC		3 010 328 C
F2avrHind	CCCAAGCTTGGGGCTCTCAACGCCAGTAA	3' <i>avrA</i>	3 010 332
R2avrPst	AACTGCAGAACCAATGCATTATCGCCTCAGCCTGAC		3 010 727 C

\* podkreślono sekwencję miejsca restrykcyjnego, pogrubiono sekwencję komplementarną do DNA genomowego. \*\* pozycja oligonukleotydów w sekwencji genomu szczepu referencyjnego *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, zdeponowanej w bazie GenBank, o numerze dostępu AE006468; C - nieć matrycowa.

Niektóre klonowane sekwencje uzyskano nie poprzez bezpośrednią amplifikację fragmentów DNA genomowego lecz poprzez amplifikację sekwencji zawartych w plazmidach. W ten sposób uzyskano fragmenty DNA kodujące białko SipB znakowane etykietką histydynową (6xHis-SipB), białka GFP i RFP, odpowiednio z plazmidów pQE30-6xHis-*sipB*, pGFPuv (Clontech) i pDsRed2 (Clontech), w reakcjach PCR ze starterami hybrydującymi ze specyficznymi sekwencjami oraz zawierającymi sekwencje flankujące z miejscem restrykcyjnym, ułatwiające klonowanie fragmentów DNA (Tabela 7).

**Tabela 7. Oligonukleotydy zastosowane do uzyskania sekwencji kodujących geny 6xHis-*sipB*, *gfp* i *rfp* w reakcji PCR z plazmidów pQE30-6xHis-*sipB*, pGFPuv i pDsRed2.**

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Powielana sekwencja	Matryca
FsipBgl	GGAAGATCITCCAGAGGAGAAATTAAGTATGAGA*	6xHis- <i>sipB</i>	pQE30-6xHis- <i>sipB</i>
RsipBgl	GAAGATCITCGGAGTCCAAGCTCAGCTA		
FsipBgl	GGAAGATCITCCAGAGGAGAAATTAAGTATGAGA	6xHis- <i>sipB</i> ΔSTOP	pQE30-6xHis- <i>sipB</i>
dSTOPsip	CGGATATCCATGACTCTGGCGCAGAATAA		
ForGFP	GAAGATCITCTCACACAGGAAACAGCTATGAC	<i>gfp</i>	pGFPuv
RevGFP	GAAGATCITCGCGCTCAGTTGGAATTCA		
FgfpEcoV	CGGATATCTAAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG	<i>gfp</i> ΔATG	pGFPuv
RgfpEB	CGGATATCGAAGATCITCGCGCTCAGTTGGAATTCA		
FgfpNde	GGAATTCCATATGACCATGATTACGCC	<i>rfp</i>	pDsRed
RgfpEB	CGGATATCGAAGATCITCGCGCTCAGTTGGAATTCA		

\* podkreślono sekwencję miejsca restrykcyjnego, pogrubiono sekwencję komplementarną do DNA plazmidowego.

Produkty PCR przeznaczone do klonowania uzyskano w reakcji prowadzonej przez polimerazę posiadającą także aktywność egzonukleolityczną w kierunku 3'→5' (naprawczą) oraz aktywnością terminalnej transferazy niezależnej od matrycy (TripleMaster PCR System lub Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity). W wyniku reakcji otrzymano produkty, które posiadały pojedynczy nukleotyd adeninowy na końcu 3' dwuniciowej cząsteczki DNA. Obecność wolnego nukleotydu adeninowego umożliwiała wklonowanie produktu PCR bezpośrednio do linearnego plazmidu posiadającego pojedyncze nukleotydy tymidynowe na końcach 5' (tzw. klonowanie T/A). Wykorzystano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub> (Promega). Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub> umożliwia wybór klonów bakteryjnych zawierających wektor z wstawką na podstawie barwy kolonii, wynikającej z utraty ekspresji genu *lacZ* w wyniku wklonowania wstawkę we wnętrzu sekwencji *lacZ*. Efektem jest niezdolność tych klonów do metabolizowania 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-β-D-galaktozydu (X-Gal) i brak zabarwienia kolonii na niebiesko (ang. *blue/white screening*).

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze z podgrzewaną pokrywą (TPersonal Thermocycler, Biometra). W Tabeli 8 przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR, a w Tabeli 9 - warunki reakcji PCR.

**Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR, w których amplifikowano fragmenty DNA do klonowania.**

	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
Bufor (HighFidelity, 25 mM Mg <sup>2+</sup> )	5	1x (2,5 mM Mg <sup>2+</sup> )
10 mM dNTP	1	0,2 mM
Starter lewy 100 pmol/μl	1	2 μM
Starter prawy 100 pmol/μl	1	2 μM
Matryca 100 - 200 ng	X	2 - 4 ng/μl
TripleMaster Polymerase Mix (5 U/μl)	0,3	0,03 U/μl
H <sub>2</sub> O do końcowej objętości 50 μl	X	-



**Tabela 9. Warunki reakcji PCR, w których amplifikowano fragmenty DNA do klonowania.**

DNA matrycowe	Amplifikowany fragment	Startery	Denaturacja	Przyłączanie starterów	Synteza DNA	Liczba cykli
<i>S. typhimurium</i> SL5319	<i>sipB</i> (1823 pz)	FsipPst, RsipBam	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 1 min 30 s	30
<i>S. typhimurium</i> SL5319	<i>PsifB</i> (605 pz)	sifF, sifR	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 1 min	30
pQE30-6xHis- <i>sipB</i>	RGS-6xHis- <i>sipB</i> (1919 pz)	FsipBgl, RsipBgl	94°C, 30 s	59°C, 30 s	72°C, 1 min 30 s	30
pQE30-6xHis- <i>sipB</i>	6xHis- <i>sipB</i> ΔSTOP (1837 pz)	FsipBgl, dSTOPsip	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 1 min 30 s	30
pGFPuv	<i>lac-Zgfp</i> (846 pz)	ForGFP, RevGFP	94°C, 30 s	59°C, 30 s	72°C, 1 min 30 s	30
pGFPuv	<i>gfp</i> ΔATG (760 pz)	FgfpEco, RgfpEB	94°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 1 min	30
pDsRed	<i>Ndel-rfp</i> (835 pz)	FgfpNde, RgfpEB	94°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 45 s	30
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	<i>ushA</i> (1825 pz)	FushA, RushA	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 1 min 30 s	30
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	5' <i>avrA</i> (364 pz)	F1avr, R1avrHind	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 45 s	30
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	3' <i>avrA</i> (424 pz)	F2avrHin, R2avrPst	94°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 45 s	30

Wstępną denaturację matrycy przeprowadzano w temperaturze 94°C przez 45 s (DNA genomowe) lub 1 min 30 s (DNA plazmidowe), a po zakończeniu ostatniego cyklu prowadzono syntezę DNA w temperaturze 72°C przez 5 min lub, w przypadku, kiedy produkty PCR klonowano bezpośrednio do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>, przez 10 min. Wszystkie fragmenty DNA uzyskano w reakcji z polimerazą TripleMaster Polymerase Mix.

Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 0,8% żelu agarozowym, w buforze TBE (89 mM Tris, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, pH 8,2 - 8,4), w obecności bromku etydyny, pod napięciem 5 V/cm. DNA oczyszczano z żelu agarozowego na złożu krzemionkowym wykorzystując zestaw odczynników do ekstrakcji DNA z żelu agarozowego (QIAquick Gel Extraction Kit) i klonowano bezpośrednio do linearnego plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>.

Niektóre produkty PCR wklonowano do plazmidów wykorzystując lepkie końce. W tym przypadku produkt reakcji oczyszczony na złożu krzemionkowym trawiono enzymami restrykcyjnymi, rozdzielano elektroforetycznie i ponownie oczyszczano z żelu agarozowego.

#### 4.2. Przygotowanie plazmidowego DNA do klonowania.

DNA plazmidowe namnażano w bakteriach *Escherichia coli* DH5α lub M15,

hodowanych w pożywce płynnej TB (Terrific Broth), w temperaturze 30 lub 37°C, z wytrząsaniem (180 rpm). DNA plazmidowe izolowano z całonocnej hodowli metodą lizy alkalicznej i oczyszczano na złożu krzemionkowym wykorzystując zestaw odczynników QIAprep Spin Miniprep Kit. DNA plazmidowe (1 - 2 µg) trawiono enzymami restrykcyjnymi w objętości 20 µl, w odpowiednim buforze zawierającym 1 µg albuminy, a następnie zlinearyzowane DNA plazmidowe defosforylowano termolabilną krewetkową alkaliczną fosfatazą. Fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 0,8% żelu agarozowym, w buforze TBE, w obecności bromku etydydy, pod napięciem 5 V/cm. DNA oczyszczano z żelu agarozowego na złożu krzemionkowym wykorzystując zestaw odczynników do ekstrakcji DNA z żelu agarozowego. Czystość preparatu i stężenie DNA oznaczano elektroforetycznie względem standardu DNA (Lambda DNA/HindIII Markers) i spektrofotometrycznie (NanoDrop 1000, Thermo SCIENTIFIC).

W przypadku braku możliwości klonowania z wykorzystaniem wzajemnie kompatybilnych lepkich końców, fragmenty DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi generującymi tępe końce lub końce lepkie, które następnie wypełniano przy pomocy fragmentu Klenowa polimerazy DNA I.

#### **4.3. Przygotowanie kompetentnych bakterii *Escherichia coli*.**

Bakterie *E. coli* DH5α lub M15 hodowano przez 16 - 18 godz. w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem (180 rpm), w 2 ml pożywki LB. Całonocną hodowlę rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:50 w pożywce LB i prowadzono hodowlę w 37°C z wytrząsaniem do czasu uzyskania gęstości optycznej OD<sub>600</sub> około 0,5 (co odpowiada 2,5·10<sup>8</sup> CFU/ml). Bakterie wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C przy przyspieszeniu 2300g, zawieszano w roztworze chlorku wapnia i rubidu (RbCl/CaCl Transformation Salts) o temperaturze 4°C, w objętości równej 1/3 objętości hodowli i inkubowano na lodzie przez 1 - 16 godz., po czym bakterie wirowano i zawieszano w takiej objętości roztworu chlorku wapnia i rubidu (4°C), aby uzyskać gęstość zawiesiny bakterii w zakresie 5 - 7·10<sup>8</sup> CFU/100 µl.

Kompetentne bakterie transformowano bezpośrednio po przygotowaniu lub zamrażano w roztworze chlorku wapnia i rubidu zawierającym 15% glicerolu, w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

#### **4.4. Ligacja i transformacja bakterii.**

DNA plazmidowe i klonowane fragmenty DNA ligowano ligazą DNA faga T4 przez 1 godzinę w temperaturze 16°C lub 16 godzin w temperaturze 4°C. W Tabeli 10 zamieszczono skład mieszaniny reakcyjnej reakcji ligacji.

**Tabela 10. Skład mieszaniny reakcji ligacji fragmentów DNA.**

10x bufor *	1 µl
10 mM ATP	1 µl (lepkie końce) / 0,5 µl (tępe końce)
wektor	X µl / 50 - 100 ng
wstawka	X µl **
T4 DNA ligaza	1 µl (2U)
H <sub>2</sub> O do końcowej objętości 10 µl	X µl

\* (330 mM Tris-octan pH 7,8, 660 mM octan potasu, 100 mM octan magnezu, 5 mM DTT), \*\* obliczano według formuły: (ng wektor x pz wstawka / pz wektor) x stosunek molowy wstawka : wektor, np. (50 ng x 1000 pz / 3000) x 3/1 = 50 ng)

Następnie pięcioma mikrolitrami mieszaniny ligacyjnej transformowano 100 µl kompetentnych bakterii *E. coli* ( $5 - 7 \cdot 10^8$  CFU) metodą szoku termicznego. Bakterie inkubowano kolejno przez 30 min na lodzie, 45 s w łaźni wodnej o temperaturze 42°C, 2 min na lodzie, i hodowano w 0,8 ml pożywki LB przez 45 min w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem (180 rpm). Bakterie wysiewano na podłoże stałe LB z 1,5% agarem (określane dalej jako LB/agar) z odpowiednim antybiotykiem: ampicyliną w stężeniu 50 µg/ml, chloramfenikolem - 30 µg/ml lub kanamycyną - 20 µg/ml, w celu selekcji stransformowanych klonów, i hodowano w temperaturze 30°C przez 16 - 20 godz. Z 5 - 10 wybranych kolonii inicjowano hodowle w 2 ml pożywki LB zawierającej odpowiedni antybiotyk. Bakterie hodowano w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem (180 rpm). Z całonocnych hodowli izolowano DNA plazmidowe metodą lizy alkalicznej [110], a prawidłową orientację wklonowanych sekwencji weryfikowano przeprowadzając analizę restrykcyjną DNA plazmidowego. Wybrane klony bakterii zamrażano w pożywce TB zawierającej 15% glicerolu, w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

### 5. Transformacja bakterii *Salmonella typhimurium* VNP20009.

Bakterie *S. typhimurium* VNP20009 transformowano metodą elektroporacji. Aby uzyskać elektrokompentne bakterie stosowano następującą procedurę:

Bakterie hodowano w pożywce MSB (Minimal Salt Broth: 1% trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>), w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem (180 rpm). Całonocną hodowlę rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:100, w 100 - 200 ml pożywki MSB i hodowano dopóki gęstość optyczna OD<sub>600</sub> nie wynosiła około 0,5 - 0,7 (co odpowiada gęstości żywych bakterii  $2,5 - 3,5 \cdot 10^8$  CFU/ml). Bakterie wirowano (10 min, 4°C, 2300g), płukano czterokrotnie w 10% roztworze glicerolu w wodzie o czystości HPLC i zawieszano w takiej objętości wody, aby uzyskać zawiesinę bakterii o gęstości około  $5 \cdot 10^9$  CFU/50 µl.

Elektrokompentne bakterie transformowano bezpośrednio po przygotowaniu lub zamrażano w 10% glicerolu, w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C. Przed elektroporacją kuwetę do elektroporacji komórek prokariotycznych (Bio-Rad)

oraz zawiesinę bakterii inkubowano na lodzie. Porcję bakterii (około  $5 \cdot 10^9/50 \mu\text{l}$ ) transformowano przez elektroporację plazmidowym DNA (1-2  $\mu\text{l}$  preparatu DNA o stężeniu 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) stosując standardowe warunki (2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ ). Bakterie po transformacji zawieszano w 0,8 ml pożywki TB i hodowano przez 1 godz. w temperaturze 30°C z wytrząsaniem (180 rpm). Bakterie wysiewano na podłoże stałe LB/agar z odpowiednim antybiotykiem i hodowano w temperaturze 30°C przez 16 - 18 godz.

## **6. Wstawianie i usuwanie fragmentów w DNA genomowym *Salmonella typhimurium* VNP20009.**

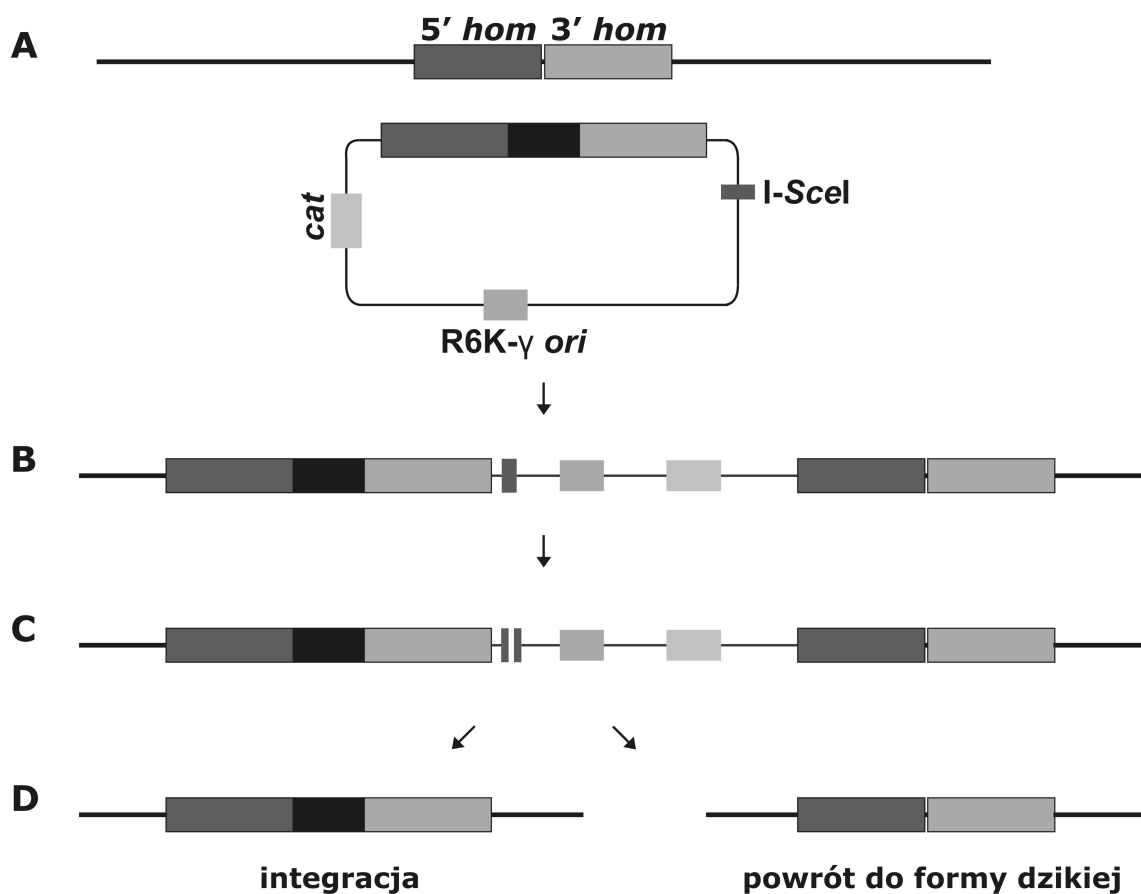
Integrację kasety ekspresyjnej *PsifB*-6xHis-*sipB* do genomu VNP20009 oraz inaktywację genu *avrA* uzyskano metodą bazującą na procesie rekombinacji homologicznej i wykorzystującą naturalny system naprawczo-rekombinacyjny bakterii (aktywność białka RecA). Metoda ta została opracowana przez György'ego Pósfai'a na potrzeby manipulacji genomowych w *Escherichia coli* [111].

W wybranej metodzie zmutowany allel jest dostarczany do DNA genomowego bakterii w warunkowo replikującym plazmidzie (ang. *suicide plasmid*), który zawiera również sekwencję kodującą gen oporności na antybiotyk oraz unikalne miejsce restrykcyjne nieobecne w genomie bakteryjnym. W temperaturze uniemożliwiającej namnażanie plazmidu, w obecności antybiotyku, zachodzi selekcja klonów, które wbudowały plazmid, uzyskując chromosomową oporność na antybiotyk. Wbudowanie plazmidu do DNA genomowego jest wynikiem rekombinacji pomiędzy dzikim - genomowym i zmutowanym - plazmidowym fragmentem DNA. Na tym etapie regiony homologiczne modyfikowanego fragmentu są zduplikowane w genomie. W następnym etapie zachodzi rekombinacja pomiędzy zduplikowanymi sekwencjami, stymulowana przecięciem nici DNA w obrębie unikalnego miejsca restrykcyjnego wprowadzonego do genomu. W efekcie następuje powrót do formy dzikiej allelu lub jego wymiana na formę zmutowaną, z równoczesnym wycięciem genu oporności na antybiotyk.

W skrócie, metoda ta przebiega dwuetapowo: w pierwszym etapie warunkowo replikujący plazmid jest wbudowany do genomu, natomiast w drugim jest z genomu usuwany. Oba procesy wymagają zajścia rekombinacji homologicznej, a ich rezultatem jest powrót do formy dzikiej lub wprowadzenie do genomu zmienionego fragmentu DNA.

Wybrana metoda umożliwia delecję fragmentu DNA z genomu, jak również wstawienie nowego fragmentu DNA do genomu bakteryjnego. Warunkiem obu zdarzeń jest przygotowanie odpowiedniej kasety, wklonowanej następnie do warunkowo replikującego plazmidu integracyjnego, np. plazmidu pSG76-C. Kasetą taką musi

składać się z dwóch ramion homologii, czyli dwóch różnych fragmentów DNA o sekwencjach identycznych z dwoma fragmentami sekwencji genomowej. Jeśli fragmenty te zostaną w kasecie umieszczone bezpośrednio jeden po drugim, to w wyniku rekombinacji homologicznej uzyskamy delecję fragmentu, który w DNA genomowym znajduje się pomiędzy tymi fragmentami. Natomiast jeśli w kasecie pomiędzy dwoma ramionami homologii umieścimy fragment DNA o sekwencji niewystępującej pomiędzy tymi fragmentami w DNA genomowym, to w to miejsce w genomie zostanie wprowadzona nowa sekwencja (tę sytuację przedstawiono na Rys. 1). Warunkowo replikujące plazmidy pSG76-C, pST76-A, pPIR-A i pSTKST otrzymano od dr György'ego Pósfai'a (Instytut Biochemii Węgierskiej Akademii Nauk).



**Rys. 1. Schemat integracji plazmidu do genomu i wymiany fragmentu DNA, stymulowanej przecięciem obu nici DNA.** Szczegółowy opis poszczególnych etapów procesu integracji przedstawiono w rozdziale 6.1; 5' *hom*, 3' *hom* - fragmenty homologiczne z fragmentami DNA genomowego, umożliwiające wbudowanie plazmidu do genomu w wyniku rekombinacji homologicznej; I-SceI - osiemnastonukleotydowe miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez endonukleazę I-SceI; R6K- $\gamma$  *ori* - miejsce *ori* plazmidu, uzależniające replikację od obecności białka  $\Pi$ ; *cat* - gen oporności na chloramfenikol.

### 6.1. Selekcja klonów bakterii, w których zaszła rekombinacja homologiczna z udziałem fragmentów DNA plazmidowego i genomowego.

W celu uzyskania zrekombinowanych klonów bakterii VNP20009 stosowano

następującą procedurę:

Bakterie *S. typhimurium* VNP20009 transformowano warunkowo replikującym plazmidem pSG76 lub pST76, zawierającym: (a) kasetę przeznaczoną do integracji, (b) gen oporności na antybiotyk, umożliwiający selekcję klonów, w których zaszła rekombinacja, (c) miejsce *ori* umożliwiające replikację plazmidu tylko w określonych warunkach, np. tylko w temperaturze 30°C (pSC101 *ori* plazmidu pST76) lub w obecności białka  $\Pi$  (R6K- $\gamma$  *ori* plazmidu pSG76), które jest dostarczane z plazmidu pomocniczego pPIR-A (z miejscem *ori* pSC101) (d) wyjątkowo rzadkie miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez endonukleazę I-SceI, niewystępujące w genomie *S. typhimurium*. Na Rys. 1A przedstawiono schemat plazmidu integracyjnego oraz fragmentu DNA genomowego z regionami homologii.

Transformowane bakterie hodowano na podłożu stałym LB/agar, zawierającym odpowiedni antybiotyk selekcyjny, w warunkach umożliwiających replikację plazmidu, czyli w temperaturze 30°C. Następnie bakterie z pojedynczych kolonii przesiewano na podłoże stałe LB/agar i zmieniano warunki hodowli na uniemożliwiające dalsze namnażanie plazmidu (temperatura 42°C), w dalszym ciągu utrzymując antybiotykową presję selekcyjną. Zastosowanie takich warunków umożliwia wyselekcjonowanie klonów bakterii, w których gen oporności na antybiotyk został wbudowany do DNA genomowego. Klony te tworzą duże kolonie bakteryjne na podłożu stałym. Na Rys. 1B przedstawiono schematycznie wynik integracji plazmidu z DNA genomowym w wyniku rekombinacji homologicznej z udziałem jednego z dwóch regionów homologii, oznaczonego jako 5' *hom*. Na tym etapie oba regiony homologii są zduplikowane w genomie.

Do detekcji klonów, w których zaszła rekombinacja homologiczna, wykorzystano metodę PCR w sposób opisany w rozdziale 6.2. Wyboru kolonii bakterii do reakcji PCR dokonywano na podstawie specyficznego wyglądu kolonii, które rosły na podłożu stałym w postaci sektorów kolonii, przypominających niesymetryczną rozetkę. Na podstawie długości produktów reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do specyficznych sekwencji w obrębie DNA genomowego, flankującymi miejsce insercji, i plazmidowego (Tabela 11 w rozdziale 6.2) wybrano klony bakterii. Wybrane klony namnożono i transformowano plazmidem pSTKST. Plazmid pSTKST zawiera gen kodujący meganukleazę I-SceI pod kontrolą promotora tetracyklinowego, gen oporności na kanamycynę oraz temperaturo-wrażliwe miejsce *ori* (pSC101). Transformowane bakterie wysiano na podłoże stałe LB/agar z kanamycyną (20  $\mu\text{g/ml}$ ) i hodowano w temperaturze 30°C. Następnie pojedyncze kolonie hodowano w temperaturze 30°C, w pożywce płynnej LB, zawierającej kanamycynę oraz termicznie inaktywowaną chlorotetracyklinę (cTc, 30  $\mu\text{g/ml}$ ), która utraciła aktywność

bakteriobójczą, ale wiąże represor tetracyklinowy. Całonocną hodowlę rozcieńczano około 1:10<sup>6</sup>, aby po wysianiu na podłoże stałe LB/agar z kanamycyną i cTc uzyskać wzrost w postaci pojedynczych kolonii. Obecność termicznie inaktywowanej chlorotetracykliny, która inaktywuje represor tetracyklinowy, indukowała aktywność promotora tetracyklinowego kontrolującego ekspresję meganukleazy I-SceI. Enzym I-SceI przecina DNA genomowe w miejscu wprowadzonym do genomu wraz z sekwencją plazmidową. Miejsce to sąsiaduje z regionami homologii zduplikowanymi w genomie (Rys. 1C). Przecięcie obu nici łańcucha DNA w obrębie zintegrowanej sekwencji plazmidowej stymuluje zależną od białka RecA wewnątrzcząsteczkową rekombinację (ang. *double strand break-stimulated gene replacement*) i jest równocześnie czynnikiem presji selekcyjnej. Przeżyją i namnożą się tylko te bakterie, w których dojdzie do naprawy powstałego pęknięcia DNA w wyniku rekombinacji pomiędzy homologicznymi fragmentami DNA. Rekombinacja może zajść pomiędzy fragmentami oznaczonymi na Rys. 1 jako 5' *hom*, powodując powrót do formy dzikiej genu, lub pomiędzy fragmentami oznaczonymi jako 3' *hom*, prowadząc do efektywnej rearanżacji (Rys. 1D). Równocześnie z DNA genomowego jest usuwana sekwencja plazmidowa wraz z genem oporności na antybiotyk. W efekcie uzyskuje się zmodyfikowany szczep bakteryjny pozbawiony markera selekcyjnego w postaci genu oporności na antybiotyk oraz innych egzogennych sekwencji, co stanowi o przewadze wybranej metody nad innymi metodami używanymi do usuwania lub wstawiania fragmentów DNA w genomach bakteryjnych.

Klony bakterii, w których skutkiem naprawy i rekombinacji była zaplanowana integracja fragmentu DNA, wykryto metodą PCR, z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji flankujących miejsce insercji oraz do specyficznych sekwencji w obrębie wstawionego fragmentu DNA (Tabela 11 w rozdziale 6.2).

## **6.2. Analiza kolonii bakteryjnych metodą PCR.**

Kolonie bakteryjne *S. typhimurium* VNP20009 zawierające zrekombinowane sekwencje DNA genomowego identyfikowano metodą PCR, w reakcji typu „colony PCR”. Bakterie pobrane z 5 - 15 pojedynczych kolonii rosnących na podłożu stałym LB/agar zawieszano w 50 µl buforu TE (10 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA), inkubowano przez 2 min w temperaturze 100°C i wirowano (1 min, 12280g). Do reakcji PCR o objętości mieszaniny reakcyjnej równej 25 µl używano 1 µl uzyskanego nadsącza. DNA amplifikowano polimerazą DyNazyne II lub GoTaq Hot Start. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym, w obecności bromku etydyny.

W Tabeli 11 przedstawiono startery, które zastosowano do analizy klonów bakteryjnych metodą PCR, za pomocą której wykrywano czy doszło do integracji

kasety ekspresyjnej *PsifB-6xHis-sipB* do genomu VNP20009. Podano długości produktów reakcji PCR specyficzne dla VNP20009 (produkt typu dzikiego) lub świadczących o zajściu rekombinacji homologicznej pomiędzy sekwencjami plazmidową i genomową, w wyniku której w pierwszym etapie plazmid został zintegrowany z genomem. W drugim etapie procedury w wyniku rekombinacji homologicznej sekwencja plazmidowa jest usuwana z genomu, co potwierdzały długości produktów reakcji PCR określone w ostatniej kolumnie tabeli jako „produkt po wycięciu genu oporności”. Podane długości produktów PCR odpowiadają sytuacji przedstawionej na Rys. 1, czyli rekombinacji pomiędzy fragmentami 5' *hom*.

**Tabela 11. Startery i produkty reakcji PCR zastosowane do analizy integracji fragmentu *PsifB-6xHis-sipB* do genomu VNP20009.**

Nazwa	Sekwencja 5'→3'	Produkt typu dzikiego	Produkt po integracji
Fusha	GGGGTACCCCGCGATGTTGGAGATAGTAGG	1825 pz	8102 pz
Rusha	GGGGTACCCCTACAGCCAGCTCACCTCA		4366 pz (po wycięciu genu oporności)
FushaFL	GCGACTGGATCATATCGT	—	2350 pz
sipseq2	CGCCTCACTATGCTCATG		
Fcat	CTGAACGGTCTGGTTATAGG	—	2411 pz
RushaFL	CTGGATATTGAACTGGCG		— (po wycięciu genu oporności)
FushaFL	GCGACTGGATCATATCGT	2146 pz	8423 pz
RushaFL	CTGGATATTGAACTGGCG		4679 pz (po wycięciu genu oporności)
sifR	CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG	—	5140 pz
RushaFL	CTGGATATTGAACTGGCG		1526 pz (po wycięciu genu oporności)
FushaFL	GCGACTGGATCATATCGT	—	4560 pz
Fcat	GCAGGTCGACTCTAGAGGAT		— (po wycięciu genu oporności)
FushaFL	GCGACTGGATCATATCGT	—	
sifF	CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG		3755 pz

### 6.3. Amplifikacja długich fragmentów DNA.

Niektóre fragmenty DNA o długości powyżej 4 kbpz amplifikowano w reakcji PCR, w której zastosowano czas syntezy produktu równy 4 min 30 s przez pierwsze 10 cykli, a następnie czas elongacji w każdym kolejnym z 20 cykli wydłużano o 10 s. W tych warunkach na matrycy DNA genomowego zmodyfikowanych bakterii namnożono produkt obejmujący kompletną sekwencję kasety *PsifB-6xHis-sipB* wbudowanej do genomu.

### 7. Sekwencjonowanie DNA.

Sekwencjonowanie fragmentów DNA przeprowadzono w Instytucie Ekspertyz Sądowych (Kraków) oraz w firmie BioTe21 (Kraków). Plazmidy zawierające DNA do



sekwencjonowania wyizolowano zgodnie z opisem w punkcie 4.5. Produkty PCR przeznaczone do sekwencjonowania uzyskano w reakcji z polimerazą DNA posiadającą także aktywność korekcyjną (ang. *proofreading*; TripleMaster PCR System lub Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity). Do sekwencjonowania wykorzystano startery zebrane w Tabeli 12.

**Tabela 12. Oligonukleotydy zastosowane do analizy sekwencji klonowanych fragmentów DNA.**

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Zastosowanie
PQEFOR	CCACCTGACGTCTAAGAA	sekwencjonowanie genu <i>sipB</i> wklonowanego do plazmidu pQE30
PQEREV	GCTAGCTTGGATTCTCAC	
sipseq1	GAGGCGACGGATCTCTAT	sekwencjonowanie genu <i>sipB</i>
sipseq2	CGCCTCACTATGCTCATG	
sipseq3	GTAATCGCCTTGCCAATC	
sipseq4	AGACGAGACTCCAGTTGAGA	
Rsce	GCAGGTCGACTCTAGAGGAT	sekwencjonowanie DNA zintegrowanego do genomu <i>S. typhimurium</i>
Fcat	CTGAACGGTCTGGTTATAGG	
pGEM-F	GGCCAGTGAATTGTAATACG	sekwencjonowanie fragmentów DNA wklonowanych do plazmidu pGEM-T <sub>Easy</sub>
PGEM-R	GAATACTCAAGCTATGCATCATCC	

## 8. Izolacja RNA i analiza ekspresji genów metodą RT-PCR.

W celu stabilizacji RNA bakteryjnego, przed przystąpieniem do izolacji RNA, do hodowli bakteryjnej w pożywce płynnej dodawano odczynnik RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen), w ilości równej dwóm objętościom hodowli bakteryjnej.

Całkowite RNA izolowano z bakterii oraz linii komórkowych zakażanych bakteriami *S. typhimurium* metodą lizy z dodatkiem izotiocyanianu guanidyny i oczyszczano na złożu krzemionkowym wykorzystując zestaw odczynników RNeasy Mini Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie i czystość preparatu RNA oznaczano spektrofotometrycznie. Dla wszystkich preparatów użytych do reakcji odwrotnej transkrypcji stosunek absorbancji  $A_{260}/A_{280}$  wynosił 1,9 - 2,0, co świadczyło o wysokiej czystości preparatów.

Preparaty RNA trawiono DNazą I (RNase-Free DNase Set), przez 1 - 2 godz. w temperaturze 37°C, w takiej objętości mieszaniny reakcyjnej, aby stężenie kwasów nukleinowych było nie większe niż 200 ng/μl; DNazę inaktywowano termicznie (10 min, 70°C). cDNA syntetyzowano z użyciem odwrotnej transkryptazy AMV i heksadeoksynukleotydów pełniących funkcję przypadkowych starterów (ang. *random primers*; Reverse Transcription System, Promega). Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji zamieszczono w Tabeli 13.

**Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkrypcji.**

10x bufor *	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 mM dNTP	2 µl
Inhibitor rybonukleaz (RNasin)	0,5 µl
Heksadeoksynukleotydy	1 µl; 0,5 µg
Odwrotna transkryptaza AMV	1 µl (15 u)
RNA	X µl; 1 - 2 µg
H <sub>2</sub> O do końcowej objętości 20 µl	X µl

\* 10mM Tris-HCl 9pH 9,0), 50mM KCl, 0,1% Triton X-100

RNA inkubowano przez 10 min w temperaturze 70°C, następnie przenoszono na lód, po czym dodawano pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze (10 min - 25°C, 45 min - 42°C, 5 min - 95°C, 5 min - 4°C).

Reakcję PCR przeprowadzano w obecności starterów hybrydujących ze specyficznymi sekwencjami cDNA. Kontrolę stanowił 16S rRNA, transkrypt genu zaliczanego do genów podstawowego metabolizmu komórkowego bakterii, którego cDNA po reakcji odwrotnej transkrypcji amplifikowano w reakcji PCR ze starterami: lewy (F16RNA) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, prawy (R16RNA) ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG, które namnażały fragment o długości 350 pz [112]. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym, w obecności bromku etydyny.

W celu względnego oszacowania ilości transkryptu wykonano analizę cDNA metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem zestawu odczynników firmy Sigma, a reakcję prowadzono w termocyklerze Rotor-Gene (Corbet). Transkrypt *sipB* namnażano w reakcji ze starterami: lewy (*sipseq5*) TTAGCCGTAGCGGATATAACC i prawy (*sipseq6*) CCACCGTATTAATAGCGCTC, które namnażały fragment o długości 176 pz. Przyrost ilości produktu oznaczano przy pomocy barwnika SYBR Green, wiążącego dwuniciowe DNA. Reakcję prowadzono w warunkach: 10 min - 95°C; 30 s - 95°C, 30 s - 58°C; 30 s - 72°C, 45 cykli. Analizę przeprowadzono metodą delta-delta Ct (Applied Biosystems), pozwalającą na porównanie różnic w poziomie ekspresji genu w stosunku do genu referencyjnego, którym w tym przypadku również był 16S rRNA.

## 9. Hodowle komórkowe.

Komórki linii RAW264.7, MC38CEA, CT26CEA, B16 i B16F10 hodowano w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy (4,5 g/l), wzbogaconej w 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS), aminokwasy endogenne (NEAA) i stabilizowaną glutaminę (GlutaMAX), określanej dalej jako kompletna pożywka DMEM, w standardowych warunkach

(temperatura 37°C, 5% nasycenia CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności). Komórki pasażowano przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS, z taką częstotliwością, aby powierzchnia monowarstwy komórek nie przekroczyła 90% powierzchni naczynia hodowlanego. Komórki zamrażano w 10% roztworze DMSO (Hybri-Max, Sigma) w FBS, w temperaturze -80°C, w pojemniku wypełnionym izopropanolem dla zapewnienia optymalnej szybkości zamrażania (spadek temperatury o 1°C/min), a następnie przechowywano w temperaturze -80°C.

#### **10. Transfekcja komórek.**

DNA plazmidowe namnożono w bakterjach *E. coli* DH5α, izolowano i oczyszczono na złożu jonowymiennym (HiSpeed Plasmid Midi Kit).

Komórki linii MC38CEA wysiewano na 24-dołkowe płytki hodowlane w ilości 7,5·10<sup>4</sup>, w 1 ml kompletnej pożywki DMEM i hodowano w standardowych warunkach przez 24 godz. przed transfekcją. W chwili rozpoczęcia transfekcji monowarstwa komórek pokrywała 50 - 60% powierzchni płytki hodowlanej. Kompletną pożywkę DMEM zmieniano na 250 µl pożywki Opti-MEM bez surowicy i transfekowano komórki z wykorzystaniem odczynnika do transfekcji GeneJuice (Novagen), w proporcji 3 µl na 1 µg DNA plazmidowego. Mieszaniny transfekujące o objętości 25 µl na studnię, zawierały 0,5 µg plazmidu, 1,5 µl GeneJuice, 20 µl Opti-MEM i wodę. Komórki inkubowano z mieszaniną transfekującą przez 6 godzin, a następnie dodawano 500 µl pożywki Opti-MEM z 3% surowicą (stężenie surowicy w pożywce w dołku hodowlanym wynosiło 2%). Komórki inkubowano przez 24, 48 lub 72 godz. w standardowych warunkach.

#### **11. Test protekcji gentamycynowej.**

Inwazyjność bakterii określano *in vitro* w teście protekcji gentamycynowej, w którym komórki są zakażane bakteriami, a następnie zewnątrzkomórkowe bakterie, które nie zainfekowały komórek, są zabijane gentamycyną, antybiotykiem niewnikającym do komórek eukariotycznych. Wyznaczając liczbę bakterii użytych do infekcji oraz liczbę bakterii, które były chronione przed działaniem gentamycyny (czyli wniknęły do komórek eukariotycznych), można oznaczyć jaki procent wszystkich bakterii stanowią bakterie inwazyjne.

Bakterie *S. typhimurium* hodowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem (180 rpm), w 2 ml pożywki TB lub MSB. Całonocną hodowlę rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:20 w 2 ml pożywki i hodowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem (180 rpm) do osiągnięcia gęstości optycznej hodowli OD<sub>600</sub> ≈ 0,4. Następnie bakterie wirowano (10 min, 4°C, 2300g), płukano dwukrotnie buforem PBS (1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

2,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15 mM NaCl, pH 7,2), zawieszano w niewielkiej objętości tego buforu, mierzono gęstość optyczną zawiesiny bakterii (OD<sub>600</sub>) przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000 i przygotowywano zawiesinę zawierającą 1,25·10<sup>5</sup> bakterii w 100 µl pożywki Opti-MEM. Obliczając liczbę bakterii korzystano z założenia, że zawiesina o gęstości optycznej OD<sub>600</sub> = 1 zawiera 5·10<sup>8</sup> bakterii.

Komórki RAW264.7 lub MC38CEA hodowano na 48-dołkowych płytkach w ilości 2,5·10<sup>4</sup>, w 1 ml kompletnej pożywki DMEM przez 24 godz. Następnie usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki zakażano bakteriami zawieszonymi w 100 µl pożywki Opti-MEM bez surowicy, w stosunku ilościowym pięciu bakterii przypadających na jedną komórkę (MOI = 5). Po 1 godz. koinkubacji komórek z bakteriami (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) dodawano 100 µl pożywki Opti-MEM z surowicą i gentamycyną (końcowe stężenie wynosiło 2% surowicy, 100 µg/ml gentamycyny) i inkubowano przez 1 ½ godz. (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) w celu eliminacji bakterii pozakomórkowych. Pożywki zbierano, wirowano przy wysokich obrotach, osad zawieszano w małej objętości buforu PBS i wysiewano na podłoże stałe LB/agar; brak wzrostu bakterii był kontrolą całkowitej eliminacji bakterii pozakomórkowych. Następnie komórki zbierano przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS, wirowano, zawieszano w PBS i wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Liczbę żywych (wewnątrzkomórkowych) bakterii oceniano na podstawie liczby kolonii bakteryjnych po 24 godzinach wzrostu na podłożu stałym i odnoszono do liczby komórek eukariotycznych w studzience. Równolegle wyznaczono liczbę CFU przypadającą na dołek na początku infekcji, na podstawie liczby kolonii bakteryjnych po 24 godzinach wzrostu na podłożu stałym LB/agar, uzyskanych z odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny bakterii użytej do infekcji. Inwazyjność bakterii wyznaczono jako frakcję żywych bakterii odzyskanych z komórek po 2 ½ godz. od początku infekcji, z liczby żywych bakterii użytych do infekcji.

Test protekcji gentamycynowej wykonywano także w celu zbadania cytotoksyczności zmodyfikowanych bakterii VNP20009. Komórki linii makrofagowej RAW264.7 lub nowotworowej MC38CEA hodowano na 12- lub 24-dołkowych płytkach, w ilości odpowiednio 1·10<sup>5</sup> lub 7,5·10<sup>4</sup>, w kompletnej pożywce DMEM przez 24 godz. Komórki zakażano bakteriami w 300 lub 200 µl pożywki Opti-MEM bez surowicy, w stosunku ilościowym dwudziestu bakterii przypadających na jedną komórkę (MOI = 20). Po 1 godz. koinkubacji komórek z bakteriami dodawano 200 µl pożywki Opti-MEM z surowicą i gentamycyną (końcowe stężenie FBS wynosiło 2%, a gentamycyny - 100 µg/ml) i inkubowano przez 1 godz. w celu eliminacji bakterii pozakomórkowych. Następnie pożywkę wymieniało na 0,5 ml pożywki Opti-MEM z 2% surowicą i gentamycyną (20 µg/ml). Po 12 lub 20 godz. inkubacji z dołków zbierano pożywkę, a komórki zbierano przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS i łączono z zebraną

pożywką. Komórki wirowano (5 min, 400g, temperatura pokojowa), barwiono aneksyną V znakowaną allofikocyjaniną (APC) i 7-aminoaktynomycyną (7-AAD) i analizowano cytofluorymetrycznie.

## **12. Analiza cytofluorymetryczna linii komórkowych i hodowli bakteryjnych.**

### **12.1. Analiza linii komórkowych barwionych aneksyną V.**

Transfekowane różnymi plazmidami komórki linii MC38CEA lub komórki linii RAW264.7 i MC38CEA zakażane bakteriami *S. typhimurium*, inkubowano przez 12, 24, 48 lub 72 godz. (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) od początku transfekcji lub infekcji. Następnie z poszczególnych dołków zbierano pożywkę hodowlaną, a komórki zbierano z płytek hodowlanych używając roztworu trypsyny i EDTA w PBS, łączono z pożywką zebraną z dołków, wirowano (5 min, 400g, temperatura pokojowa) i zawieszano w 25 µl buforu do barwienia (z jonami magnezu i wapnia; Annexin V Binding Buffer, BD Pharmingen) zawierającym 1 µl roztworu aneksyny V znakowanej APC. Komórki barwiono przez 15 min w temperaturze pokojowej w ciemności, następnie dodawano 0,3 ml buforu do barwienia, zawierającego 7-AAD w ilości 5 µl na próbkę, i analizowano przy pomocy cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson) oraz oprogramowania Cell Quest Pro.

### **12.2. Analiza ekspresji białka GFP i RFP w bakteriach *E. coli* i *S. typhimurium*.**

Dziesięć do dwudziestu mikrolitrów (około  $1 \cdot 10^7$  CFU) płynnej hodowli bakteryjnej przenoszono bezpośrednio do 0,3 ml buforu utrwalającego (1% roztwór formaldehydu w PBS) i analizowano cytofluorymetrycznie (FACSCalibur, Becton Dickinson).

### **12.3. Analiza cytofluorymetryczna bakterii z ekspresją białka GFP pod kontrolą promotora *PsifB*.**

Hodowlę bakterii zapoczątkowano z bakterii przechowywanych w temperaturze -80°C, którymi inokulowano pożywkę płynną TB i hodowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem. Całoczną hodowlę rozcieńczono w stosunku objętościowym 1:20 i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 30°C przez 3 godz. Następnie bakterie płukano dwukrotnie w buforze PBS, zawieszano w niewielkiej ilości tego buforu i mierzono gęstość optyczną zawiesiny. Na podstawie pomiaru gęstości optycznej zapoczątkowywano hodowlę o gęstości około  $6 \cdot 10^6$  bakterii/ml w 1,5 ml pożywki TB, MgM lub Opti-MEM i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 30°C przez 16 godz. Ekspresję GFP analizowano przy pomocy cytometru przepływowego.

### **13. Rozdział elektroforetyczny białek i analiza Western blotting.**

#### **13.1. Przygotowanie lizatów bakteryjnych i izolacja białka fuzyjnego 6xHis-SipB.**

Bakterie *E. coli* M15 lub *S. typhimurium* VNP20009 zawieszano w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0 zawierającym 300 mM chlorek sodu oraz inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail for purification of Histidine-Tagged Proteins, Sigma), określanym dalej jako bufor do lizy. Zawiesinę bakterii poddawano sonikacji (2 x 30 s, 7 W; Bandelin Sonopuls HD2070). Lizat bakteryjny wirowano (1 min, 12280g) i oznaczano stężenie białka metodą BCA.

Białko fuzyjne 6xHis-SipB oczyszczano z lizatu bakteryjnego metodą chromatografii powinowactwa IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) na złożu kobaltowym Talon (Talon Metal Affinity Resin, Clontech). 100  $\mu$ l zrównoważonego buforem fosforanowym złoża inkubowano z 1 ml lizatu o stężeniu białka 5 mg/ml, przez 30 min, w temperaturze pokojowej, z łagodnym mieszaniem. Złoże wirowano (2 min, 700g), dwukrotnie płukano 1 ml buforu do lizy przez 10 min, w temperaturze pokojowej, z łagodnym mieszaniem. Związaną frakcję eluowano poprzez inkubację złoża w 200  $\mu$ l 150 mM roztworu imidazolu w buforze do lizy, przez 5 min, w temperaturze pokojowej, z łagodnym mieszaniem, po czym złoże wirowano (2 min, 700g) i zbierano nadsąc.

#### **13.2. Elektroforeza i Western blotting.**

Lizaty białkowe, w ilości 20 - 30  $\mu$ g całkowitego białka w próbce, rozdzielano elektroforetycznie w 10% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w systemie Laemmli' ego [113], w warunkach stałego natężenia prądu: 10 mA (żel zagęszczający) i 25 mA (żel rozdzielający; Minigel Twin, Biometra). Rozdzielone białka wizualizowano barwnikiem Coomassie lub przenoszono na membranę nitrocelulozową (Trans-Blot Nitrocellulose Membrane, 0.45 micron, Biorad) metodą transferu półsuchego z wykorzystaniem aparatu do transferu (Semi Dry Mini System SD10, Cleaver Scientific). Białka związane na membranie barwiono odwracalnie 0,25% roztworem Ponceau S w 1% kwasie octowym przez 1 - 2 min w celu weryfikacji prawidłowego przebiegu transferu, po czym membranę płukano w wodzie destylowanej. Membranę blokowano przez 12 - 18 godz. w temperaturze 4°C w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku (dalej określanego jako mleko) w buforze TST (10 mM Tris-Cl, pH 7,4; 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Następnie membranę inkubowano przez 1 godz. w buforze TST, zawierającym przeciwciało monoklonalne anti-RGS-His o stężeniu 0,2 - 0,4  $\mu$ g/ml oraz 1% mleko, w temperaturze pokojowej, z łagodnym mieszaniem. Po inkubacji w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego membranę płukano czterokrotnie w 15 ml buforu TST przez 10

min. Następnie inkubowano przez 30 min w buforze TST z 1% mlekiem, zawierającym przeciwciało drugorzędowe, kozie anti-mysie IgG sprzęgnięte z alkaliczną fosfatazą (0,5 µg/ml). Membranę ponownie płukano i inkubowano z substratem dla alkalicznej fosfatazy (NBT/BCIP; Western Blue Substrate, Promega) aż do chwili pojawienia się wyraźnych prążków. Po usunięciu roztworu substratu membranę płukano w wodzie destylowanej.

#### **14. Analiza ekspresji białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 techniką ELISA.**

Test ELISA wykonywano postępując zgodnie z ogólnymi procedurami [114]. Wiązanie białka do powierzchni płytki przeprowadzano inkubując studzienki 96-dółkowej płytki (EIA/RIA 96-well plate, Costar) z 50 µl roztworu lizatu bakteryjnego w buforze węglanowym (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6), w temperaturze 4°C. Całkowita zawartość białka w 50 µl roztworu wynosiła 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; lub 7,81 ng. Po około 18 godzinach inkubacji roztwór białka usuwano, a dołki płukano trzykrotnie 100 µl buforu fosforanowego PBST (154 mM NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% Tween 20, pH7,4) i blokowano 50 µl roztworu 5% albuminy w buforze PBST przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z łagodnym mieszaniem. Następnie roztwór usuwano, a do dołków dodawano po 50 µl buforu PBST z 2,5% albuminą, zawierającego mysie monoklonalne przeciwciało anti-RGS-His w stężeniu 0,4 µg/ml, i płytkę inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej z łagodnym mieszaniem. Dołki płukano trzykrotnie 100 µl buforu fosforanowego PBST i inkubowano w 50 µl buforu PBST z 2,5% albuminą, zawierającego przeciwciało drugorzędowe, kozie anti-mysie Ig sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową, w rozcieńczeniu 1:2000, przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z łagodnym mieszaniem. Dołki płukano trzykrotnie 100 µl buforu fosforanowego PBST i inkubowano w 100 µl substratu dla peroksydazy chrzanowej (TMB Substrate Reagent Set, BD Pharmingen) przez 30 min w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 25 µl 1 M roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i mierzono absorbancję przy długości fali równej 450 nm.

#### **15. Doświadczenia na zwierzętach.**

Myszy szczepów wsobnych C57Bl/6 i Balb/c oraz myszy szczepu niekrewniaczego (ang. *outbred*) SWISS hodowano w zwierzętarni Katedry Immunologii Collegium Medicum UJ. Doświadczenia wykonano na myszach w przedziale wiekowym 8 - 12 tygodni. Na każdą grupę doświadczalną przypadało pięć myszy. Na wszystkie procedury uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

### **15.1. Mysie modele nowotworów transplantacyjnych.**

Efektywność zmodyfikowanych bakterii *S. typhimurium* VNP20009 w hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych badano w mysich modelach nowotworów podskórnych lub płucnych. W modelu podskórnym komórki gruczolakoraka linii MC38CEA i czerniaka B16 lub gruczolakoraka CT26CEA implantowano podskórnym samicom myszy szczepu odpowiednio C57Bl/6 lub Balb/c w przedziale wiekowym 8 - 12 tygodni. Komórki podawano w ilości  $5 \cdot 10^5$ , w 100  $\mu$ l buforu PBS. Wzrost guzów nowotworowych monitorowano poprzez pomiar dwóch prostopadłych wymiarów guza przy pomocy suwmiarki, z iloczynu których obliczano powierzchnię guza. Bakterie podawano podskórnym, w miejsce wzrostu guza, lub dożylnym, do żyły ogonowej, w objętości 100  $\mu$ l buforu PBS.

W modelu płucnym komórki czerniaka linii B16F10 lub gruczolakoraka CT26CEA podawano dożylnym odpowiednio samicom myszy szczepu C57Bl/6 lub Balb/c, do żyły ogonowej w ilości  $5 \cdot 10^5$ , w 100  $\mu$ l buforu PBS. Komórki podane dożylnym tworzyły guzy nowotworowe w płucach. Bakterie podawano donosowo, w objętości 10  $\mu$ l buforu PBS. Płuca pobierano od myszy w piętnastym dniu po podaniu komórek nowotworowych.

Płuca myszy C57Bl/6, którym podano komórki B16F10, barwiono i utrwalano roztworem Bouin'a, przygotowanym z piętnastu objętości nasyconego wodnego roztworu kwasu pikrynowego, pięciu objętości formaliny i jednej objętości stężonego kwasu octowego. W tak barwionych płucach guzy nowotworowe są widoczne w postaci ciemnych punktów, których liczba i wielkość obrazują efektywność lokalizacji i wzrostu nowotworu w płucach.

Płuca myszy szczepu Balb/c, którym podano komórki linii CT26CEA, barwiono 15% roztworem czerni indyjskiej i utrwalano w roztworze Feketesa, przygotowanym z jednej objętości stężonego kwasu octowego, dwóch objętości formaliny, czternastu objętości 96% etanolu i sześciu objętości wody. Guzki nowotworowe były widoczne w postaci białych punktów na ciemnym tle.

### **15.2. Ustalanie dawki tolerowanej bakterii *S. typhimurium* VNP20009 i bakterii zmodyfikowanych u myszy.**

*S. typhimurium* VNP20009 oraz jej zmodyfikowane formy podawano dożylnym, do żyły ogonowej, myszom szczepu C57Bl/6, Balb/c i Swiss w różnych dawkach, w 100  $\mu$ l buforu PBS. Myszy obserwowano pod kątem wystąpienia objawów toksyczności (utrata apetytu, drgawki) oraz monitorowano śmiertelność. W określonych punktach czasowych oznaczano stopień kolonizacji organów wewnętrznych przez bakterię. W tym celu od myszy pobierano wątroby i śledziona. Fragmenty organów ważono, homogenizowano za pomocą szkiełek mikroskopowych ze szlifem i zawieszano w 1 ml



buforu PBS; 50  $\mu$ l zawiesiny zawierającej około 100 - 200 mg tkanki wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Liczbę żywych bakterii przypadającą na 100 mg tkanki obliczano z liczby kolonii uzyskanych po 24 godz. wzrostu na płytkach w temperaturze 30°C.

#### **16. Analiza izotypu przeciwciał anti-*Salmonella* w surowicy immunizowanych myszy.**

Do oznaczenia izotypu przeciwciał anti-*Salmonella* w surowicy myszy opracowano test oparty o analizę cytofluorymetryczną bakterii VNP20009, do których związano *ex vivo* przeciwciała obecne w surowicy.

Krew obwodową myszy nainwanych lub immunizowanych pobierano z zatoki oczodołowej tylnej i inkubowano przez około 1 godz. w temperaturze 4°C aż do jej skrzepnięcia. Następnie osocze oddzielano poprzez wirowanie przy przyspieszeniu 750g przez 5 min w temperaturze 4°C i zbierano nadsącz. Przygotowywano rozcieńczenia surowicy w stosunku objętościowym 1:5000 i 1:10000 w buforze PBS zawierającym 0,5% BSA, określanym dalej jako bufor do barwienia.

Całonocną hodowlę bakterii VNP20009 płukano dwukrotnie w buforze PBS, wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C przy przyspieszeniu 2300g, zawieszano w niewielkiej ilości tego buforu, mierzono gęstość optyczną ( $OD_{600}$ ) i przygotowywano zawiesinę zawierającą  $2,5 \cdot 10^8$  bakterii w 1 ml buforu do barwienia. 10  $\mu$ l tej zawiesiny ( $2,5 \cdot 10^6$  bakterii) inkubowano z 10  $\mu$ l roztworu surowicy przez 30 min na lodzie, po czym płukano dwukrotnie w 100  $\mu$ l buforu do barwienia. Następnie bakterie inkubowano przez 30 min na lodzie w 20  $\mu$ l buforu, zawierającego biotynylowane przeciwciało drugorzędowe, czyli anti-mysie IgG1 (rozcieńczone 1:2000), IgG2a (0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l) lub IgM (0,25  $\mu$ g/ $\mu$ l), po czym płukano dwukrotnie. Biotynylowane przeciwciała anti-Ig wykrywano poprzez wiązanie streptawidyny znakowanej fikoerytryną (PE), rozcieńczonej 1:500 w 20  $\mu$ l buforu do barwienia. Inkubację prowadzono przez 20 min na lodzie, następnie bakterie płukano jednokrotnie w buforze do barwienia, zawieszano w 300  $\mu$ l buforu utralającego (1% roztwór paraformaldehydu w PBS) i analizowano cytofluorymetrycznie.

## Wyniki

Uzyskanie nadekspresji SipB pod postacią białka 6xHis-SipB w bakteriiach *S. typhimurium* VNP20009 obejmowało szereg etapów. W pierwszym etapie z DNA genomowego *S. typhimurium* otrzymano sekwencję kodującą genu *sipB*, którą wklonowano do wektora ekspresyjnego. Ze względu na brak komercyjnie dostępnych przeciwciał zdecydowano się na wyznakowanie białka SipB etykietką histydynową (6xHis). Zastosowano system ekspresji indukowanej izopropylotiogalaktozydem (IPTG) pod kontrolą promotora T5//*lacO*. System ten działa w oparciu o modyfikację klasycznego mechanizmu regulacji ekspresji genów kodowanych w obrębie operonu laktozowego [115] i umożliwia znaczącą akumulację klonowanego białka.

Sprawdzono, jak ekspresja 6xHis-SipB kodowanego na plazmidzie i pozostającego pod kontrolą silnego promotora wpływa na żywotność bakterii, ich zdolność do zakażenia komórek eukariotycznych i na przeżywanie zakażonych komórek eukariotycznych.

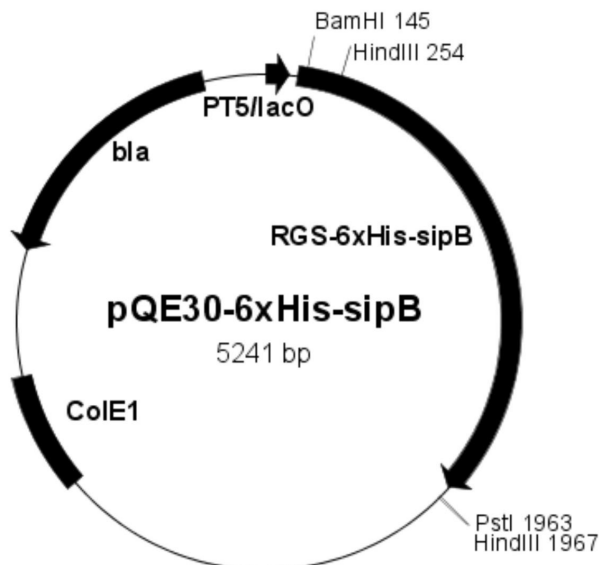
### **1. Uzyskanie genu *sipB* i ekspresja białka 6xHis-SipB pod kontrolą promotora laktozowego.**

#### **1.1. Uzyskanie sekwencji kodującej genu *sipB* z DNA genomowego *S. typhimurium* i umieszczenie genu *sipB* pod kontrolą promotora laktozowego.**

Używany w tej pracy szczep VNP20009 jest jednym z tysięcy szczepów *S. typhimurium*, który uzyskano w wyniku procesu mutagenyzy i selekcji w warunkach laboratoryjnych ze szczepu *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 [107]. Dotychczas nie zsekwencjonowano ani szczepu VNP20009 ani szczepu 14028. Dlatego w tej pracy szczepem referencyjnym w odniesieniu do sekwencji kodujących poszczególne geny i sekwencje regulatorowe w genomie jest *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium szczep LT2, określane dalej jako *Salmonella typhimurium* LT2 lub *S. typhimurium* LT2. Genom tego szczepu został zsekwencjonowany [4], a całkowita sekwencja DNA genomowego jest dostępna w bazie GenBank pod numerem AE006468.

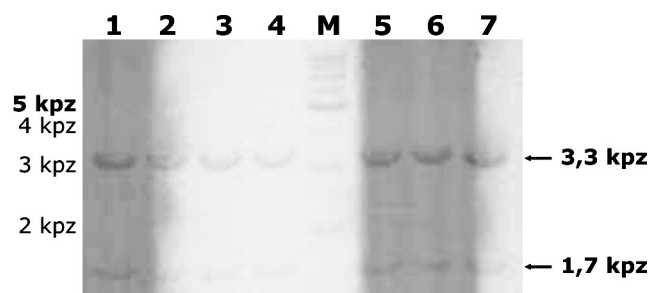
Sekwencję kodującą genu *sipB* uzyskano z DNA genomowego bakterii *Salmonella typhimurium* SL5319, w reakcji PCR ze starterami wprowadzającymi miejsca restrykcyjne flankujące *sipB*: *Bam*HI oraz *Pst*II. Produkt reakcji PCR (1823 pz) wklonowano do plazmidu pQE30, w miejsca restrykcyjne *Bam*HI i *Pst*II, pod kontrolę promotora PT5//*lacO* (Rys. 2). W wektorze pQE30 aktywność silnego promotora faga T5 jest regulowana poprzez wiązanie represora do dwóch sekwencji operatorowych *lacO*. Promotor PT5//*lacO* ulega aktywacji w obecności laktozy lub syntetycznego

induktora, izopropylotiogalaktozydu (IPTG).



**Rys. 2. Schemat plazmidu pQE30-6xHis-sipB z sekwencją genu sipB umieszczoną pod kontrolą promotora PT5/lacO.** Fragment sipB wstawiono do pQE30 w miejsca restrykcyjne BamHI i PstI i uzyskano sekwencję 6xHis-sipB, kodującą SipB z etykietką histydynową. PT5/lacO - promotor faga T5 o aktywności regulowanej obecnością dwóch sekwencji operatora laktozowego; RGS-6xHis-sipB - sekwencja kodująca białko SipB z dodaną na N-końcu etykietką histydynową (Arg-Gly-Ser-6xHis), które dalej jest określane jako 6xHis-SipB; ColE1 - miejsce ori; bla - gen kodujący β-laktamazę, warunkującą oporność na ampicylinę.

Przeprowadzono analizę restrykcyjną plazmidów wyizolowanych z siedmiu klonów bakteryjnych (Rys. 3). Produkty trawienia wszystkich siedmiu klonów enzymem restrykcyjnym HindIII miały oczekiwane wielkości (ok. 3,5 oraz 1,7 kpz), co potwierdzało prawidłową orientację sekwencji genu sipB względem promotora T5/lacO. Do dalszej pracy wybrano jeden z przeanalizowanych klonów bakteryjnych.



**Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pQE30-6xHis-sipB poddanego działaniu enzymu restrykcyjnego HindIII.** Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). DNA plazmidowe było wyizolowane z siedmiu klonów bakterii E. coli M15 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB (ścieżki 1 - 7). M - wzorzec długości fragmentów DNA.

W otrzymanym wektorze ekspresyjnym pQE30-6xHis-sipB, sekwencja genu sipB, a dokładnie nukleotydy od 15 do 1781 (kodon STOP) otwartej ramki odczytu natywnej sekwencji genu sipB, jest znakowana na końcu 5' sekwencją kodującą etykietkę

histydynową. Sekwencja ta jest dalej nazywana 6xHis-*sipB*. Natywny kodon START oraz kolejnych 11 nukleotydów (ATG GTA AAT GAC GC), kodujących sekwencję aminokwasową N-końca białka SipB (Met-Val-Asn-Asp-Ala), zostały zastąpione następującą sekwencją plazmidową: ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC CG (podkreślono miejsce restrykcyjne *Bam*HI), kodującą sekwencję aminokwasową: Met-Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-Gly-Ser-Arg (Rys. 4).

**A**

ATG GTA AAT GAC GCA AGT AGC ATT AGC CGT AGC GGA ...  
Met Val Asn Asp Ala Ser Ser Ile Ser Arg Ser Gly ...

**B**

ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC CGA AGT AGC ATT AGC CGT AGC GGA ...  
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Arg Ser Ser Ile Ser Arg Ser Gly ...

**Rys. 4. Sekwencja nukleotydowa kodująca koniec 5' genu *sipB* *Salmonella typhimurium* LT2 (locus STM2885) oraz odpowiadająca jej sekwencja aminokwasowa. (A) Sekwencja natywna. (B) Sekwencja N-końcowa białka 6xHis-SipB, kodowana przez pQE30-6xHis-*sipB*. Pogrubioną czcionką wyróżniono sekwencję wspólną dla natywnej i rekombinowanej sekwencji genu *sipB*. Podkreślono sekwencję miejsca restrykcyjnego *Bam*HI.**

Domeny funkcjonalne SipB nie są w pełni opisane. SipB może wiązać kaspazę-1, ale nie określono, która część białka jest za to odpowiedzialna [45]. Natomiast wykazano, że aminokwasy 100 - 140 są wymagane do lokalizacji białka na powierzchni zewnętrznej błony bakteryjnej [116], a prawdopodobnie pomiędzy aminokwasem trzecim a ósmym jest zlokalizowana sekwencja wymagana do eksportu przez system sekrecyjny typu trzeciego (TTSS) [117]. Sekwencje te, występujące w białkach efektorowych TTSS, nie są konserwatywne, natomiast charakteryzują się występowaniem fragmentów amfipatycznych [118].

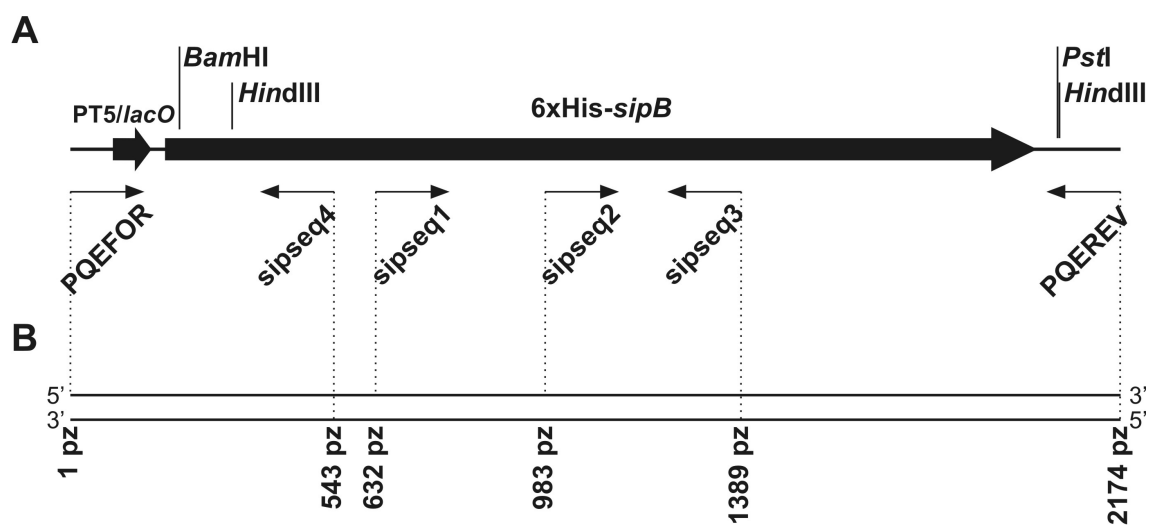
Porównano sekwencję białka natywnego SipB oraz rekombinowanego 6xHis-SipB pod kątem występowania sygnału sekrecyjnego specyficznego dla TTSS. Analizę wykonano przy pomocy algorytmu dostępnego na serwerze „modlab” ([http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/T3SS\\_prediction/T3SS\\_prediction.html](http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/T3SS_prediction/T3SS_prediction.html)) [119]. Oba zastosowane modele wykazały, że w sekwencjach aminokwasowych SipB i 6xHis-SipB występują sekwencje warunkujące sekrecję.

Wstępne doświadczenia, w których do klonowania *sipB* używano bakterii *Escherichia coli* DH5α, sugerowały, że produkcja SipB może być toksyczna dla bakterii. O ile zjawisko to sprzyja naszym celom w momencie, gdy nadekspresja tego białka odbywa się w bakteriach *Salmonella* po zakażeniu komórek eukariotycznych, o tyle jest niepożądane podczas namnażania plazmidu niosącego gen 6xHis-*sipB* w bakteriach *E. coli* oraz *S. typhimurium* przed zakażeniem komórek eukariotycznych.

Ekspresja genu 6xHis-*sipB* pod nieobecność induktora byłaby potencjalnym źródłem presji selekcyjnej w kierunku selekcji klonów zawierających plazmid z niepoprawną,

zmutowaną lub niefunkcjonalną sekwencją kodującą gen *sipB*. Dlatego do namnażania uzyskanego plazmidu wykorzystano bakterie *Escherichia coli* M15, które zawierają plazmid pREP-4. Plazmid ten zawiera gen *lacI* kodujący białko represorowe LacI, które ogranicza tzw. „cieknięcie” promotora, czyli aktywność promotora PT5/*lacO* pod nieobecność induktora. Ponadto bakterie hodowano w temperaturze 30°C w pożywce zawierającej 1% glukozę. Wzbogacenie podłoża hodowlanego w glukozę oraz niższą, od standardowo stosowanej dla *E. coli*, temperaturę hodowli stosowano w celu ograniczenia aktywności promotora PT5/*lacO*.

Aby potwierdzić identyczność rzeczywistej sekwencji 6xHis-*sipB* w wektorze pQE30 z oczekiwaną, przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu wektora pQE30-6xHis-*sipB*. Ponieważ fragment 6xHis-*sipB* obejmuje 1806 nukleotydów, a rzetelne wyniki sekwencjonowania (przy komercyjnym sekwencjonowaniu) można uzyskać dla sekwencji nie dłuższych niż około 600 nukleotydów, zlecono sekwencjonowanie z wykorzystaniem sześciu starterów, których sekwencje zamieszczono w Tabeli 12 w rozdziale Materiały i metody, a położenie w sekwencjonowanym fragmencie DNA zaznaczono na Rys. 5.



**Rys. 5. Schemat fragmentu plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* obejmujący sekwencję 6xHis-*sipB* pod kontrolą promotora T5/*lacO*. (A) Zaznaczono pozycję starterów zastosowanych do sekwencjonowania. (B) Względne położenie sekwencji komplementarnych do wymienionych starterów.**

Złożenie wyników uzyskanych w tych sześciu analizach sekwencji wykazało, że wektor pQE30-6xHis-*sipB* zawiera oczekiwaną sekwencję DNA kodującą SipB z metką histydynową. Analiza wyników sekwencjonowania wykonana przy pomocy programów Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inz.) i BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) wykazała 100% zgodności z sekwencją *sipB* zdeponowaną w bazie GenBank (*Salmonella typhimurium* LT2, STM2885).

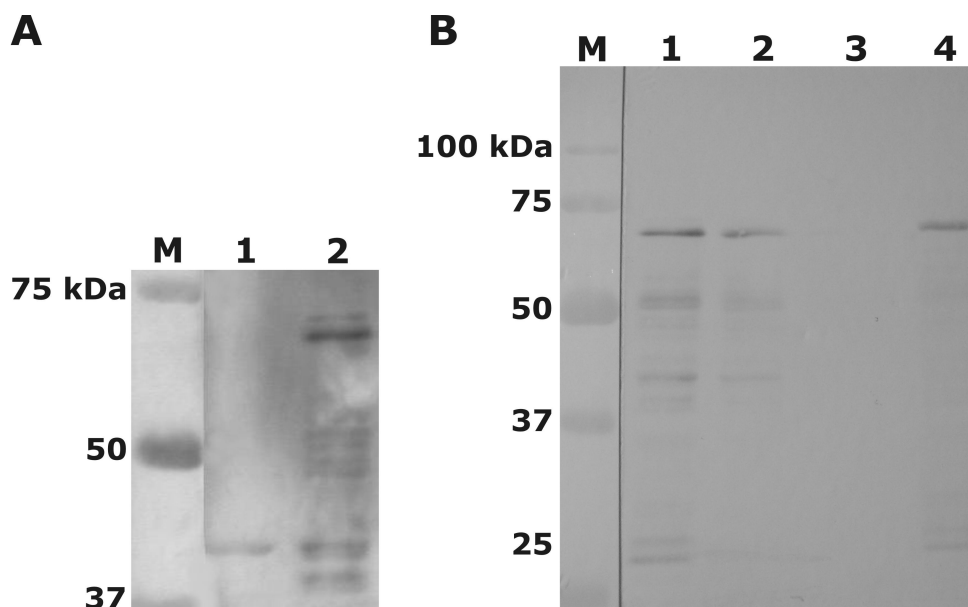
## 1.2. Ekspresja białka 6xHis-SipB w bakteriach *Escherichia coli* M15 i *Salmonella typhimurium* VNP20009 pod kontrolą promotora PT5/*lacO*.

### Nadekspresja białka SipB w postaci białka fuzyjnego 6xHis-SipB w bakteriach *E. coli* M15.

Aby sprawdzić, czy wklonowany do plazmidu fragment *sipB* jest funkcjonalny, tzn. czy pozwala na ekspresję białka 6xHis-SipB, analizowano produkcję 6xHis-SipB w hodowli bakterii *E. coli* M15.

Bakterie *E. coli* M15 stransformowane wektorem pQE30-6xHis-*sipB* hodowano w warunkach ograniczających ekspresję białka 6xHis-SipB (obecność glukozy, temperatura 30°C), a następnie rozcieńczano i hodowano w pożywce niezawierającej glukozy, aż do osiągnięcia znacznej gęstości hodowli ( $OD_{600} \approx 1$ ). Następnie indukowano ekspresję białka 6xHis-SipB przez dodanie induktora, 0,5 mM IPTG, i kontynuowano hodowlę przez 3 godz. w temperaturze 25°C. Obniżenie temperatury hodowli miało ograniczyć negatywny wpływ ekspresji 6xHis-SipB na wzrost bakterii poprzez spowolnienie procesu syntezy transgenicznego białka.

Ekspresję białka 6xHis-SipB analizowano techniką Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających metkę histydynową. Analizowano pełny lizat bakteryjny uzyskany przez sonikację bakterii w buforze zawierającym inhibitory proteaz (Rys. 6A) albo próbki uzyskane w wyniku frakcjonowania lizatów metodą chromatografii powinowactwa wykorzystującej oddziaływanie metki histydynowej białka z kobaltem schelatowanym ze złożem chromatograficznym (Rys. 6B). Porównano obraz lizatu komórek *E. coli* M15 stransformowanych pustym wektorem (pEQ30) oraz lizatu *E. coli* M15 stransformowanych wektorem zawierającym gen kodujący 6xHis-SipB (pEQ30-6xHis-*sipB*) (Rys. 6A).



**Rys. 6. Analiza Western blotting ekspresji białka 6xHis-SipB w bakterii *E. coli* M15. (A)** Na ścieżki żelu nałożono po 20 µg białek lizatów bakterii transformowanych plazmidem pQE30 (ścieżka 1) lub pQE30-6xHis-*sipB* (ścieżka 2). **(B)** Na ścieżki żelu nałożono po 20 µg (ścieżki 1, 2, 3) lub 5 µg (ścieżka 4) frakcji rozdziálu chromatograficznego lizatu bakterii *E. coli* M15 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, hodowanych w obecności 0,5 mM IPTG; ścieżka 1 - całkowity lizat bakteryjny, 2 - frakcja niezwiązana do złoża, 3 - frakcja wyeluowana buforem fosforanowym, 4 - frakcja wyeluowana roztworem imidazolu. M - na obu panelach A i B w ścieżce pierwszej znajdował się wzorzec mas cząsteczkowych. Do wywołania blotu użyto przeciwciał anti-RGS-His oraz przeciwciał drugorzędowych sprzęgniętych z alkaliczną fosfatazą. Wynik jest reprezentatywny dla trzech niezależnych analiz.

W lizacie bakterii transformowanych wektorem pQE30-6xHis-*sipB*, ale nie w lizacie kontrolnym, wykryto białko o masie cząsteczkowej około 62 kDa, czyli takiej, jaka powinna charakteryzować białko fuzyjne 6xHis-SipB. Białko to wiąże się ze złożem kobalt-sefaroza. Uzyskany wynik wskazuje na to, że przygotowany konstrukt genetyczny (6xHis-*sipB*) w plazmidzie pQE30 pozwala na uzyskanie ekspresji kodowanego przez ten konstrukt białka SipB z metką histydynową w hodowli bakterii *E. coli* M15.

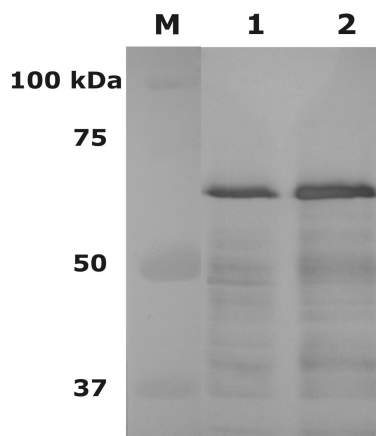
#### **Ekspresja białka fuzyjnego 6xHis-SipB w bakterii *S. typhimurium* VNP20009.**

Kolejnym etapem pracy było sprawdzenie czy również w bakterii *S. typhimurium* VNP20009 dochodzi do wydajnej ekspresji białka 6xHis-SipB po ich transformacji plazmidem kodującym 6xHis-SipB pod kontrolą promotora T5/*lacO*.

Bakterie VNP20009 transformowane plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* hodowano w warunkach ograniczających aktywność promotora laktozowego (obecność glukozy, temperatura 30°C). Całoczną hodowlę rozcieńczono i hodowano do gęstości optycznej  $OD_{600} \approx 1$  w temperaturze 30°C. Następnie ekspresję białka 6xHis-SipB indukowano 0,5 mM IPTG w temperaturze 25°C przez 3 godz. Uzyskany metodą

sonikacji lizat bakteryjny analizowano metodą Western blotting z użyciem przeciwciał anty-RGS-His.

Przeciwciała anty-RGS-His wykrywają w lizacie bakterii VNP20009 białko o masie cząsteczkowej 62 kDa i jego ilość znacząco wzrasta po indukcji ekspresji przez IPTG. Stąd wniosek, że 6xHis-SipB ulega ekspresji w bakteriach VNP20009 nawet przy braku induktora; IPTG jednakże wyraźnie stymuluje tę ekspresję (Rys. 7).

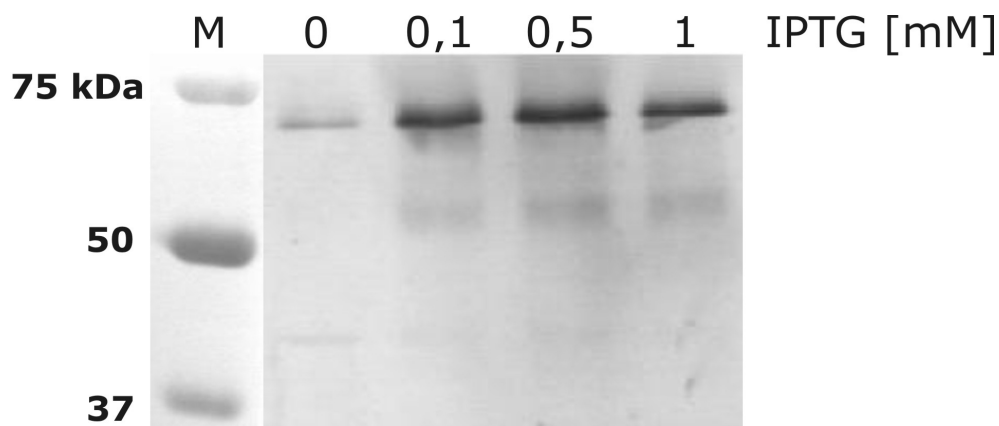


**Rys. 7. Analiza Western blotting ekspresji białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.** M - wzorzec mas cząsteczkowych, 1 - lizat bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, 2 - lizat bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, hodowanych w obecności 0,5 mM IPTG. Do wywołania blotu użyto przeciwciał anty-RGS-His oraz przeciwciał drugorzędowych sprzęgniętych z alkaliczną fosfatazą. Wynik jest reprezentatywny dla dwóch niezależnych doświadczeń.

W zastosowanym wektorze gen 6xHis-sipB znajduje się pod kontrolą promotora laktozowego PT5/lacO. Do dalszych badań konieczna była pełna charakterystyka ekspresji dodatkowych kopii genu sipB w bakteriach VNP20009 oraz wyznaczenie optymalnego stężenia induktora, to znaczy takiego, które w stosowanych warunkach hodowli stymuluje maksymalną z możliwych do osiągnięcia produkcję 6xHis-SipB. Kolejnym etapem było więc zbadanie zależności ekspresji białka 6xHis-SipB od stężenia induktora - IPTG.

W tym celu wykonano analizę Western blotting lizatów przygotowanych z bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, które hodowano w obecności 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG (Rys. 8).

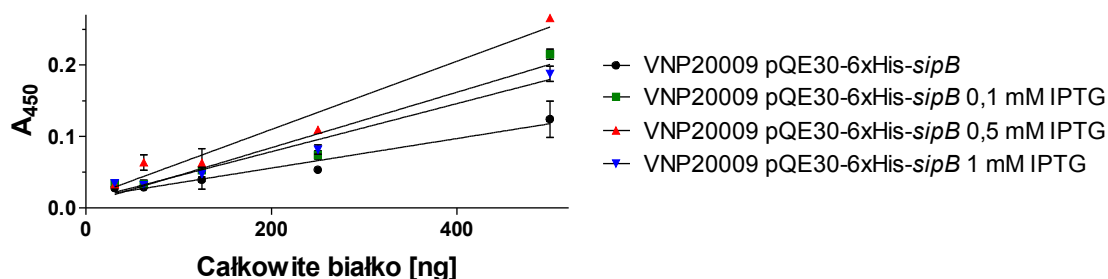




**Rys. 8. Analiza Western blotting lizatu bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.** Bakterie hodowano bez IPTG (ścieżka oznaczona jako 0) lub w obecności 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG. M - wzorzec mas cząsteczkowych. Do wywołania blotu użyto przeciwciał anty-RGS-His oraz przeciwciał drugorzędowych sprzęgniętych z alkaliczną fosfatazą. Powyższy wynik jest reprezentatywny dla analiz Western blotting z dwóch niezależnych eksperymentów.

Wynik analizy Western blotting wskazuje, że przy 0,5 mM IPTG ekspresja 6xHis-SipB jest wyższa niż przy zastosowaniu 1 mM IPTG; natomiast trudno określić czy przy 0,1 mM IPTG poziom ekspresji 6xHis-SipB jest wyższy, niższy czy porównywalny z tym, jaki obserwuje się przy 0,5 mM stężeniu induktora. Dlatego też podjęto próbę określenia zawartości 6xHis-SipB metodą ELISA. Nie dysponując na tym etapie pracy dwoma różnymi przeciwciałami zastosowano technikę ELISA bezpośrednią, w której adsorbowano na płytce lizaty komórek bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB. Ten typ ELISA nie jest uznawany za metodę ilościową, ale w pewnym zakresie stężeń badanego antygenu może być traktowany jako technika porównawcza, półilościowa.

Aby oznaczyć względną zawartość 6xHis-SipB w lizatach bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, powierzchnię płytki opłaszczono lizatami bakteryjnymi w ilości 500, 250, 125, 62, 31, 16 i 8 ng całkowitego białka w pojedynczej studzience. Następnie 6xHis-SipB wykryto przeciwciałem anty-RGS-His oraz drugorzędowym przeciwciałem sprzęgniętym z peroksydazą chrzanową (Rys. 9).



**Rys. 9. Analiza poziomu ekspresji białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.** Ekspresję indukowano 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG. Białko znakowane etykietką histydynową oznaczono testem ELISA w lizatach

bakteryjnych. Przedstawiono średnie z tryplikatów  $\pm$  odchylenia standardowe z jednego doświadczenia reprezentatywnego dla dwóch wykonanych.

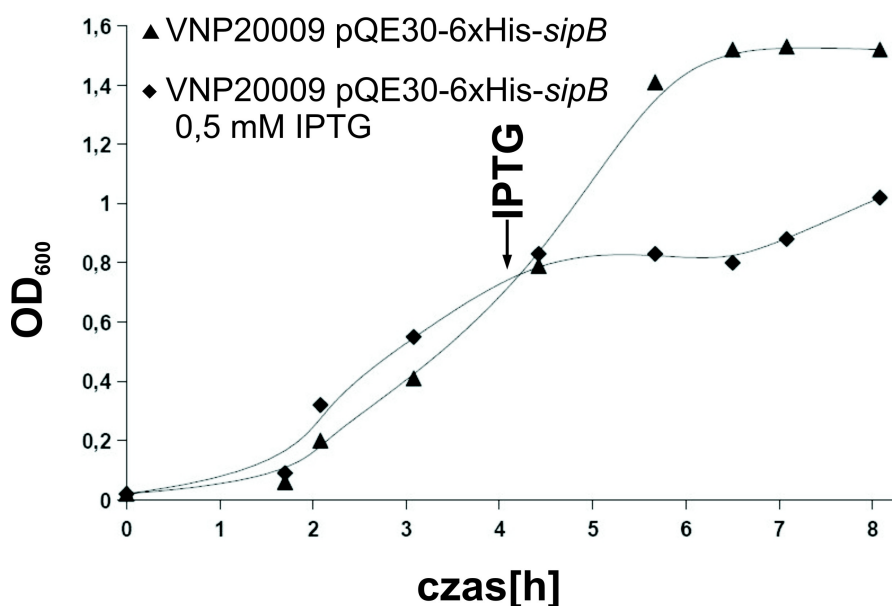
Otrzymano niskie absorbancje próbek przygotowanych z lizatów bakteryjnych, gdyż 6xHis-SipB stanowi niewielki procent białek komórki bakteryjnej. Określono względną zawartość 6xHis-SipB w bakteriach nieindukowanych i indukowanych w następujący sposób. Z wartości absorbancji odczytanej z krzywej regresji, odpowiadającej 500 ng całkowitego białka wynikało, że zawartość białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, była 1,7-, 2,1- i 1,5-krotnie wyższa w bakteriach, w których ekspresję indukowano odpowiednio 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM IPTG, w porównaniu do zawartości w bakteriach nieindukowanych. Ten wynik świadczył o znacznym „cieknięciu” promotora T5//acO. Najbardziej efektywną indukcję otrzymano stosując 0,5 mM IPTG.

### **1.3. Wpływ nadekspresji białka SipB w postaci 6xHis-SipB na tempo wzrostu, żywotność i inwazyjność bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.**

Nadekspresja białka bakteryjnego, a szczególnie białka zmodyfikowanego, może wpływać na szereg cech bakterii, ich przeżywanie, tempo wzrostu czy zdolność do inwazji komórek eukariotycznych. Podczas prowadzonych doświadczeń obserwowano, że dodanie IPTG do hodowli bakterii *S. typhimurium* VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB zawsze powoduje spowolnienie ich wzrostu. Kolejnym etapem pracy było więc zbadanie, jak ekspresja białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB po indukcji aktywności promotora T5//acO przez IPTG wpływa na ich wzrost.

#### **Krzywa wzrostu bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.**

Aby uzyskać maksymalną ekspresję 6xHis-SipB, do hodowli bakteryjnej w logarytmicznej fazie wzrostu ( $OD_{600} = 0,8$ ) dodawano IPTG w ustalonym wcześniej optymalnym stężeniu - 0,5 mM. Hodowlę prowadzono przez cały czas jej trwania w temperaturze 30°C i nie obniżano temperatury do 25°C po dodaniu IPTG. Obniżenie temperatury prawdopodobnie spowodowałoby spadek tempa wzrostu bakterii przekładający się na spadek gęstości optycznej hodowli i zaburzenie profilu krzywej wzrostu niezwiązane z ekspresją białka 6xHis-SipB. Monitorowano tempo wzrostu bakterii przez pomiar absorbancji hodowli przy długości fali 600 nm (Rys. 10).



**Rys. 10. Krzywa wzrostu bakterii *S. typhimurium* VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.** Monitorowano gęstość optyczną hodowli bakterii (OD<sub>600</sub>). Ekspresję białka 6xHis-SipB pod kontrolą promotora T5/lacO indukowano 0,5 mM IPTG po osiągnięciu gęstości optycznej hodowli OD<sub>600</sub> = 0,8. Wartość każdego punktu jest średnią z trzech niezależnych pomiarów gęstości optycznej.

Dodanie IPTG do hodowli bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB spowodowało zahamowanie wzrostu gęstości optycznej hodowli bakterii. Dodanie IPTG do hodowli bakterii VNP20009 lub VNP20009 transformowanych pustym plazmidem pQE30, nawet w stężeniu 10 mM, nie zmieniało tempa wzrostu OD<sub>600</sub> (nie pokazano). Stąd wniosek, że spowolnienie przyrostu absorbancji hodowli bakterii zawierających pQE30-6xHis-sipB jest bezpośrednio związane z produkcją transgenicznego białka 6xHis-SipB.

Niezależnie od przyczyny tej zmiany, jest ona w naszym przypadku niekorzystna, ponieważ dowodzi, że ekspresja białka 6xHis-SipB koliduje ze wzrostem lub kondycją bakterii, a pożądane jest, aby bakterie zachowały wysoką żywotność i możliwie wysoką inwazyjność. Obserwowany po upływie trzech godzin od dodania IPTG wzrost gęstości optycznej prawdopodobnie następuje w wyniku dominacji w hodowli bakterii, które nie odpowiedziały na IPTG i nie produkują białka 6xHis-SipB.

Należy wspomnieć, że po dodaniu IPTG do hodowli znajdującej się w początkowej fazie wzrostu logarytmicznego (OD<sub>600</sub> ≈ 0,3) również każdorazowo obserwowano zatrzymanie wzrostu gęstości optycznej hodowli (nie pokazano).

### **Przeżywalność *in vitro* i inwazyjność bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB.**

Celem nadekspresji białka 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 jest dostarczenie tego białka do wnętrza komórki eukariotycznej, co będzie możliwe pod warunkiem, że

bakterie przeżyją indukcję ekspresji i pozostaną inwazyjne. Dlatego sprawdzono, czy spadkowi gęstości optycznej hodowli towarzyszy spadek żywotności bakterii. Żywotność hodowli określano poprzez wyznaczenie liczby bakterii zdolnych do wzrostu i tworzenia kolonii na podłożu stałym, czyli liczby CFU (ang. *Colony Forming Unit*). W tym celu sprawdzono, czy przygotowane zawiesiny bakterii nieindukowanych i indukowanych o tej samej gęstości optycznej zawierają tę samą liczbę żywych bakterii. Równolegle sprawdzono zdolność tych bakterii do zakażenia komórek eukariotycznych. Przeprowadzono następujące doświadczenie.

Hodowlę bakterii zapoczątkowaną z hodowli całonocnej prowadzono w temperaturze 30°C aż do osiągnięcia gęstości optycznej hodowli  $OD_{600} \approx 0,3$ . Następnie ekspresję białka 6xHis-SipB indukowano 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG w temperaturze 25°C przez 1 ½ godz. Po zakończeniu hodowli, bakterie płukano dwukrotnie w buforze PBS, zawieszano w niewielkiej ilości tego buforu i mierzono gęstość optyczną zawiesiny bakterii. Następnie, korzystając z obserwacji, że zawiesina bakterii o gęstości optycznej  $OD_{600} = 1$  odpowiada  $5 \cdot 10^8$  CFU, przygotowywano zawiesinę zawierającą  $1,25 \cdot 10^6$  bakterii w 1 ml pożywki Opti-MEM. Takie założenie pozwoliło na uzyskanie na tym etapie zawiesin bakterii o równej gęstości optycznej we wszystkich grupach doświadczalnych.

Aby określić żywotność hodowli, zawiesiny bakterii rozcieńczano 1:2·10<sup>4</sup> w buforze PBS; 50 µl zawiesiny wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Z liczby kolonii uzyskanych po 24 godz. wzrostu obliczano liczbę CFU (liczbę żywych bakterii) jaka przypadłaby na 1 ml poszczególnych zawiesin bakterii o gęstości optycznej  $OD_{600} = 1$ . W Tabeli 14 przedstawiono żywotność bakterii VNP20009 lub VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, z nieindukowaną bądź indukowaną (0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG) ekspresją białka 6xHis-SipB. Podane wartości obliczono dla poszczególnych grup doświadczalnych z liczby kolonii uzyskanych z zawiesiny bakterii o tej samej gęstości optycznej, uwzględniając rozcieńczenie zawiesiny.

**Tabela 14. Żywotność VNP20009 i VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, z nieindukowaną bądź indukowaną ekspresją białka 6xHis-SipB.**

Bakteria	CFU *
VNP20009	$2,24 \cdot 10^8 \pm 1,07 \cdot 10^8$
VNP20009 pQE30-6xHis- <i>sipB</i>	$3,39 \cdot 10^8 \pm 1,23 \cdot 10^8$
VNP20009 pQE30-6xHis- <i>sipB</i> 0,1 mM IPTG	$1,61 \cdot 10^8 \pm 0,23 \cdot 10^8$
VNP20009 pQE30-6xHis- <i>sipB</i> 0,5 mM IPTG	$1,19 \cdot 10^8 \pm 0,52 \cdot 10^8$
VNP20009 pQE30-6xHis- <i>sipB</i> 1 mM IPTG	$0,81 \cdot 10^8 \pm 0,04 \cdot 10^8$

\* - w przeliczeniu na 1 ml zawiesiny bakterii o  $OD_{600} = 1$ . Podano średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń, a każdorazowo przygotowano trzy niezależne rozcieńczenia bakterii.

Obecność plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* i synteza białka 6xHis-SipB na niewielkim poziomie nie obniża żywotności bakterii; obserwuje się nawet niewielki wzrost ilości żywych bakterii choć nie jest on statystycznie istotny. Natomiast indukcja ekspresji białka 6xHis-SipB w znaczącym stopniu obniża żywotność bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*. Liczba żywych bakterii w zawiesinie o równej gęstości optycznej w stosunku do bakterii nieindukowanych jest około dwukrotnie, trzykrotnie i czterokrotnie niższa gdy ekspresję indukowano odpowiednio 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG.

Ta sama hodowla bakteryjna była wykorzystywana zarówno do badania żywotności jak i do badania inwazyjności bakterii. W obu typach doświadczeń preparaty bakterii były dwukrotnie płukane buforem PBS przed dodaniem ich do komórek eukariotycznych (test inwazyjności) i przed wyznaczaniem żywotności (wzrost kolonii na agarze). Porównując wyniki dla poszczególnych grup doświadczalnych zaobserwowano, że różna liczba kolonii bakteryjnych (CFU) odpowiadała tej samej wartości OD<sub>600</sub> zawiesiny bakteryjnej. Stąd wniosek, że dwukrotne płukanie i wirowanie hodowli bakteryjnych nie prowadzi do usunięcia martwych bakterii. Ta obserwacja miała istotne implikacje w dalszej pracy.

W celu zbadania inwazyjności bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* przeprowadzono następujące doświadczenie.

W teście protekcji gentamycynowej określono zdolność bakterii do zakażenia komórek na podstawie liczby bakterii, które dostały się do wnętrza komórki i dzięki temu uniknęły działania antybiotyku niepenetrującego przez błonę komórki eukariotycznej (gentamycyny). W tym celu komórki linii makrofagowej RAW264.7 hodowano na 48-dołkowych płytkach w ilości  $2,5 \cdot 10^4$ , w kompletnej pożywce DMEM przez 24 godz. Do zakażenia makrofagów używano 100  $\mu$ l zawiesiny zawierającej  $1,25 \cdot 10^6$  bakterii w 1 ml pożywki Opti-MEM, czyli komórki RAW264.7 zakażano bakteriami w stosunku ilościowym pięciu bakterii przypadających na jedną komórkę makrofagową (MOI = 5).

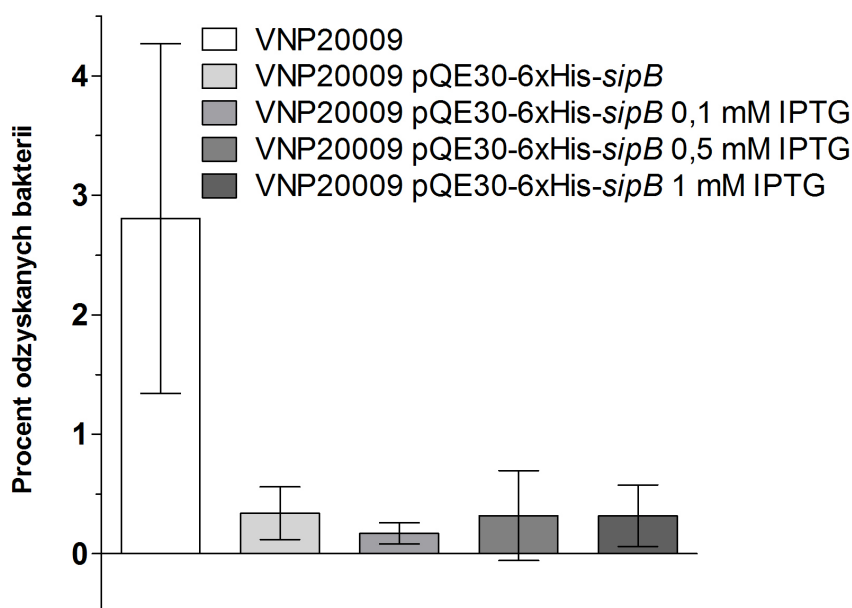
Po 1 godz. koinkubacji komórek z bakteriami do hodowli dodawano 100  $\mu$ l pożywki Opti-MEM z surowicą i gentamycyną (końcowe stężenie wynosiło 2% surowicy, 100  $\mu$ g/ml gentamycyny) i inkubowano przez 1  $\frac{1}{2}$  godz. w celu eliminacji bakterii pozakomórkowych, po czym pożywkę zbierano i wirowano. Osad zawieszano w minimalnej objętości buforu PBS i wysiewano na podłoże stałe LB/agar, które inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godz. w celu sprawdzenia skuteczności działania antybiotyku. Stwierdzono, że stosowane stężenie gentamycyny i czas inkubacji umożliwiały zabicie bakterii zewnątrzkomórkowych.

Zawiesinę bakterii używaną do zakażenia makrofagów rozcieńczano 1:2 $\cdot$ 10<sup>4</sup> razy w

PBS i wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Z liczby kolonii uzyskanych po 24 godz. wzrostu obliczano liczbę żywych bakterii nakładaną na jeden dołek płytki na początku infekcji.

Po zakończeniu inkubacji w pożywce zawierającej gentamycynę, komórki makrofagowe zbierano z dołków przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS, wirowano, osad zawieszano w 200  $\mu$ l buforu PBS i 50  $\mu$ l wysiewano na podłoże stałe LB/agar. We wstępnych doświadczeniach stwierdzono, że liczba kolonii nie zależała od tego, czy komórki eukariotyczne wysiewano bezpośrednio, czy też przed wysianiem poddawano lizie w 0,5% roztworze Tritonu X-100 w jałowej wodzie, dlatego w późniejszych doświadczeniach pomijano etap lizy.

Liczbę żywych wewnątrzkomórkowych bakterii oceniano na podstawie liczby kolonii bakteryjnych po 24 godzinach wzrostu. Inwazyjność bakterii wyznaczono jako procent bakterii wewnątrzkomórkowych z liczby żywych bakterii nałożonych na dołek na początku infekcji (Rys. 11).



**Rys. 11. Inwazyjność bakterii VNP20009 i VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB, z nieindukowaną lub indukowaną ekspresją białka 6xHis-SipB.** Bakteriami zakażono komórki makrofagowe linii RAW264.7. Przedstawiono średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech niezależnych doświadczeń wykonanych w tryplikatach.

Indukcja ekspresji białka 6xHis-SipB pod wpływem 0,1 mM IPTG powoduje spadek liczby żywych bakterii odzyskiwanych z zakażonych makrofagów. Po 2 ½ godz. od początku infekcji z zakażonych makrofagów odzyskano średnio  $0,34 \pm 0,22\%$  użytych do infekcji żywych bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-sipB oraz  $0,17 \pm 0,09\%$  tych samych bakterii, ale z ekspresją 6xHis-SipB indukowaną 0,1 mM IPTG. W przypadku indukcji ekspresji 0,5 i 1 mM IPTG odzyskano odpowiednio  $0,32 \pm 0,37\%$  i  $0,32 \pm 0,26\%$  żywych bakterii, czyli liczbę równą liczbie

odzyskanych bakterii nieindukowanych IPTG.

Obecność plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* w bakteriach VNP20009, pozwalającego na syntezę białka 6xHis-SipB na niewielkim poziomie (por. Rys. 8) prowadzi do silnego (ośmiokrotnego) obniżenia inwazyjności bakterii ( $0,34\% \pm 0,22\%$  vs.  $2,81\% \pm 1,46\%$ ). Natomiast zwiększenie syntezy 6xHis-SipB przez indukcję promotora T5//*lacO* przy zastosowaniu różnych stężeń IPTG nie powoduje dalszego obniżania inwazyjności bakterii. Wprawdzie dla najniższego stężenia IPTG zaobserwowano spadek inwazyjności bakterii jednakże nie jest on statystycznie istotny.

Tak więc indukcja ekspresji 6xHis-SipB przez IPTG prowadzi do obniżenia ilości żywych bakterii w hodowli (w porównaniu z hodowlą bez IPTG, por. Tabela 14), ale te bakterie, które przeżywają, zachowują zdolność do zakażenia komórek eukariotycznych.

Wyniki badania żywotności i inwazyjności wskazują, że uzyskanie porównywalnej liczby inwazyjnych bakterii i zakażonych komórek wymagałoby stosowania do infekcji zawiesiny bakterii o około dwukrotnie wyższej gęstości optycznej w przypadku VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* w porównaniu z VNP20009. Jest to równoznaczne z dwukrotnym zwiększeniem całkowitej liczby bakterii użytych do infekcji w celu dostarczenia równej liczby żywych bakterii. O ile w badaniach *in vitro* byłoby to dopuszczalne, chociaż nieobojętne dla wyniku, to w badaniach na myszach mogłoby powodować wzrost toksyczności nieskorelowany z celem, którym jest dostarczenie białka 6xHis-SipB do wnętrza komórek makrofagowych i nowotworowych za pośrednictwem żywych, zdolnych do infekcji bakterii VNP20009. Należy pamiętać, że wszystkie tu opisane doświadczenia zmierzają do uzyskania szczepu *Salmonella* o najsilniejszych własnościach przeciwnowotworowych *in vivo*, które prawdopodobnie są związane ze zdolnością bakterii do zakażenia komórek.

## **2. Wykazanie proapoptotycznego działania białka SipB na komórki eukariotyczne.**

Wiadomo, że białko SipB ma własności proapoptotyczne w stosunku do komórek eukariotycznych [45]. Równoległe z badaniami nad wpływem ekspresji 6His-SipB na żywotność i inwazyjność bakterii podjęto próbę weryfikacji hipotezy, że nadekspresja białka SipB wywołuje apoptozę w komórkach eukariotycznych, modelowych dla tej pracy. Zbadano wpływ ekspresji SipB na:

- (1) żywotność komórek nowotworowych MC38CEA transfekowanych plazmidem kodującym *sipB* pod kontrolą promotora eukariotycznego,
- (2) żywotność makrofagów linii RAW264.7 i komórek MC38CEA, zakażonych

bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*.

Jedną z pierwszych zmian morfologicznych towarzyszących apoptozie jest utrata asymetrii błony komórkowej w wyniku translokacji fosfatydyloseryny (PS) z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony, podczas gdy integralność błony komórkowej pozostaje jeszcze zachowana. Obecność PS w zewnętrznej warstwie błony komórkowej makrofagów zakażonych *S. typhimurium* potwierdzono wiązaniem aneksyny V do tych komórek [120, 121]. Aneksyna V w obecności jonów wapnia wiąże fosfolipidy o negatywnym ładunku cząsteczki, takie jak fosfatydyloseryna, natomiast ma niewielkie powinowactwo do fosfatydylocholinyl i sfingomieliny. Ekspozycję fosfatydyloseryny na powierzchni komórki można oznaczyć cytofluorymetrycznie, wykorzystując aneksynę V znakowaną fluorochromem [122]. Do oznaczenia komórek transfekowanych plazmidem pEGFP lub pEGFP-*sipB* wykorzystano aneksynę V znakowaną allofikocyjaniną (APC). Dodatkowo komórki barwiono 7-aminoaktynowycyną (7-AAD), znakującą komórki, które utraciły integralność błony komórkowej.

Barwienie komórek barwnikiem 7-AAD w połączeniu z barwieniem znakowaną aneksyną V pozwala rozróżnić komórki apoptotyczne od komórek martwych, które również wiążą aneksynę V. W próbce barwionej 7-AAD i znakowanej aneksyną V komórki żywe pozostają podwójnie negatywne, komórki będące we wczesnym etapie apoptozy są aneksyno-pozytywne i 7-AAD-negatywne, natomiast komórki w późnym etapie apoptozy lub komórki martwe (również nekrotyczne) są podwójnie pozytywne.

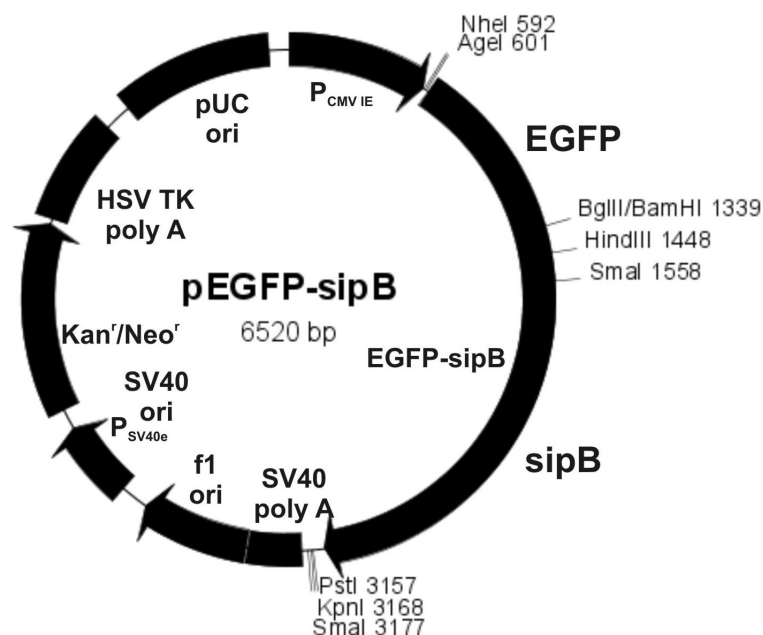
### **2.1. Ekspresja SipB pod kontrolą promotora eukariotycznego w komórkach linii MC38CEA.**

Sprawdzono, czy białko SipB dostarczane z eukariotycznego wektora ekspresyjnego pod kontrolą promotora  $P_{CMV}$ , powoduje spadek żywotności komórek MC38CEA. Do analizy cytotoksyczności SipB w stosunku do komórek, w których białko to ulegałoby ekspresji, przygotowano konstrukt kodujący białko SipB znakowane na N-końcu białkiem EGFP.

#### **Umieszczenie genu *sipB* w wektorze pEGFP, pod kontrolą promotora $P_{CMV}$ .**

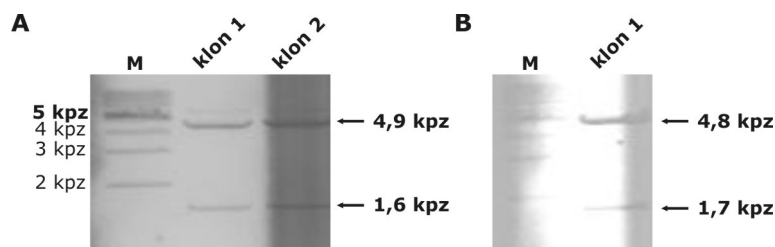
Sekwencję kodującą genu *sipB* uzyskano z DNA genomowego *Salmonella typhimurium* SL5319 w reakcji PCR ze starterami SipFPst i SipRBA, zawierającymi odpowiednio miejsca restrykcyjne *Pst*I i *Bam*HI (Tabela 6 w rozdziale Materiały i metody). Produkt reakcji strawiono enzymami restrykcyjnymi *Bam*HI i *Pst*I i wklonowano do plazmidu pEGFP, w miejsca *Bgl*II i *Pst*I, uzyskując plazmid pEGFP-*sipB* z otwartą ramką odczytu białka fuzyjnego EGFP-SipB (Rys. 12).





**Rys. 12. Schemat plazmidu pEGFP-sipB.** Sekwencję kodującą genu *sipB* wklonowano do plazmidu pEGFP pod kontrolę promotora  $P_{CMV}$ , w miejsca restrykcyjne *Bgl*II i *Pst*I, uzyskując otwartą ramkę odczytu białka fuzyjnego EGFP-SipB. Gen EGFP-*sipB* koduje białko SipB znakowane na N-końcu białkiem EGFP.

Prawidłową orientację genu *sipB* względem promotora  $P_{CMV}$  i genu kodującego EGFP, sprawdzono trawiąc DNA plazmidowe enzymami restrykcyjnymi *Sma*I oraz *Hind*III i *Kpn*I (Rys. 13).



**Rys. 13. Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia plazmidu pEGFP-sipB enzymami restrykcyjnymi.** Fragmenty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). DNA plazmidowe poddane działaniu enzymu *Sma*I (**A**) lub enzymów *Hind*III i *Kpn*I (**B**). M - wzorzec długości fragmentów DNA.

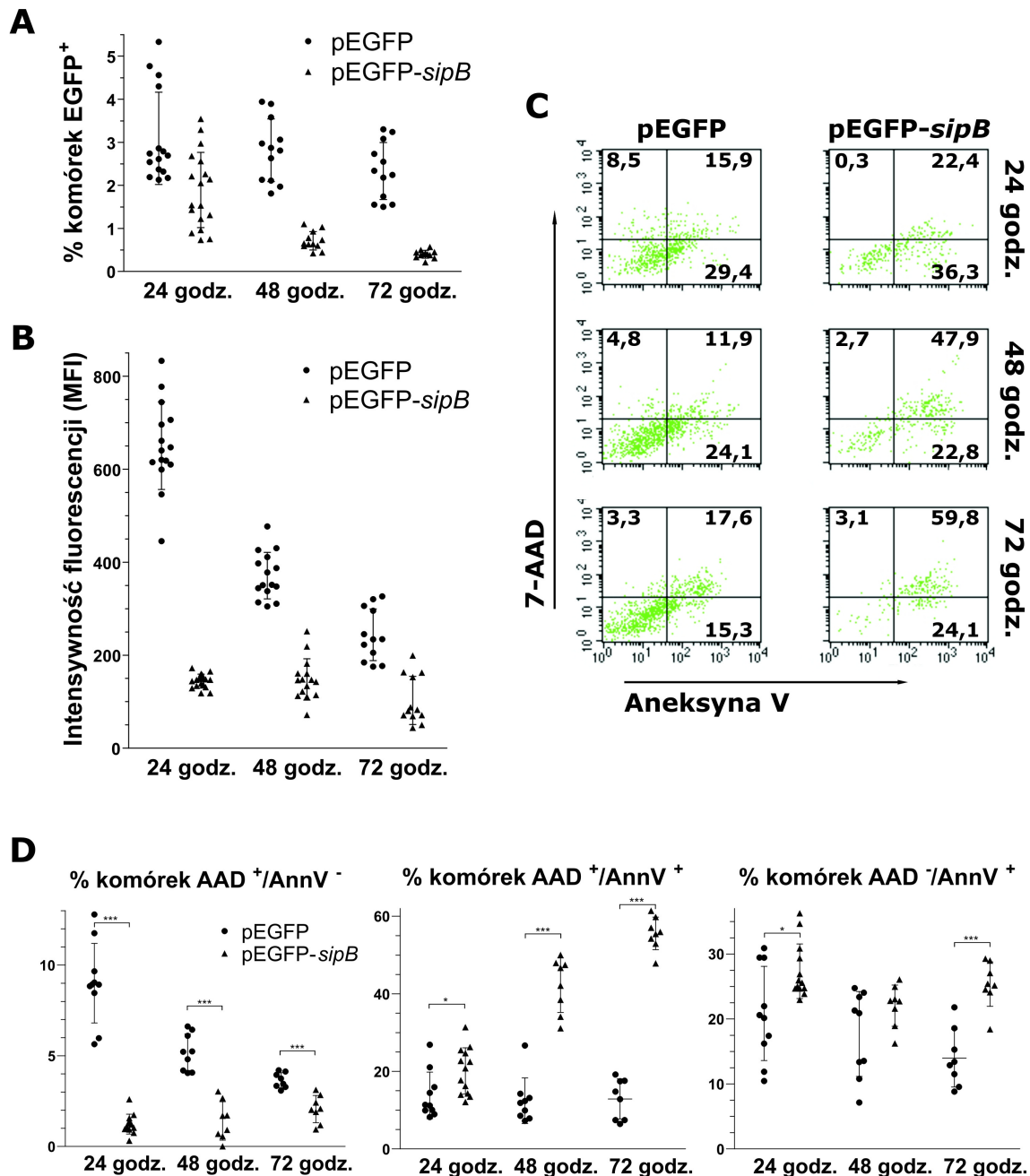
W wyniku trawienia DNA plazmidowego enzymami *Sma*I oraz *Hind*III i *Kpn*I otrzymano fragmenty DNA o długości potwierdzającej prawidłową orientację wklonowanego genu *sipB* względem sekwencji promotora  $P_{CMV}$ .

Plazmid pEGFP-*sipB* namnożono w bakterjach *E. coli* DH5 $\alpha$ , a uzyskanym DNA plazmidowym transfekowano przejściowo komórki linii MC38CEA. Jako kontrolę stosowano komórki transfekowane pustym plazmidem pcDNA3.1 lub plazmidem pEGFP.

### **Transfekcja przejściowa komórek linii MC38CEA.**

Komórki linii MC38CEA hodowano na 24-dołkowych płytkach w ilości  $7,5 \cdot 10^4$ , w kompletnej pożywce DMEM przez 24 godz. Komórki transfekowano 500 ng DNA plazmidowego pcDNA3.1, pEGFP lub pEGFP-*sipB* w 250  $\mu$ l pożywki Opti-MEM bez surowicy. Po 6 godz. inkubacji w standardowych warunkach dodawano 250  $\mu$ l pożywki Opti-MEM z 2% FBS. Po upływie 24, 48 lub 72 godzin z dołków zbierano pożywkę hodowlaną, adherentne komórki odczepiano od podłoża przy pomocy roztworu trypsyny w PBS i łączono z komórkami nieadherentnymi obecnymi w pożywce hodowlanej. Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC (AnnV) oraz 7-aminoaktynomycyną (7-AAD) i analizowano cytofluorymetrycznie (Rys. 14).

Zastosowano warunki ograniczające cytotoksyczność transfekcji i dlatego uzyskano niewielką ilość komórek wykazujących ekspresję EGFP. Znakowanie białkiem EGFP pozwoliło na analizę żywotności komórek, w których dochodziło do ekspresji EGFP lub EGFP-SipB. Zatem analizie poddano populację komórek wykazujących zieloną fluorescencję wyższą od autofluorescencji komórek transfekowanych plazmidem pcDNA3.1.



**Rys. 14. Analiza cytofluorymetryczna komórek linii MC38CEA transfekowanych plazmidem pEGFP lub pEGFP-sipB.** Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC oraz 7-aminoaktynomycyną po 24, 48 lub 72 godz. od transfekcji. **(A)** Procent komórek wykazujących ekspresję EGFP lub EGFP-SipB w całej badanej populacji. **(B)** Średnia intensywność fluorescencji (MFI, ang. *Mean Fluorescence Intensity*) komórek w obrębie bramki ustawionej na populację z ekspresją EGFP lub EGFP-SipB. **(C)** Analiza cytofluorymetryczna wybramkowanej populacji komórek; lewy górny kwadrant - komórki martwe, 7-AAD-pozytywne, prawy dolny kwadrant - komórki aneksyno-pozytywne, będące we wczesnej fazie apoptozy, prawy górny kwadrant - komórki aneksyno- i 7-AAD-pozytywne, w późnej fazie apoptozy. Wynik jest reprezentatywny dla czterech doświadczeń. **(D)** Procent komórek wiążących 7-AAD, aneksynę V lub 7-AAD i aneksynę V, w populacji komórek wykazujących ekspresję białka EGFP; wartości odczytano z odpowiednio: lewego górnego, prawego dolnego lub prawego górnego kwadrantu wykresu, którego przykład przedstawiono na panelu (C). Wykres pierwszy: \*\*\*  $p \leq 0,0003$ ; wykres drugi: \*  $p \leq 0,02$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; wykres trzeci: \*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ . (A, B, D) Średnia i odchylenie standardowe z czterech niezależnych doświadczeń, wykonanych w dwóch do czterech powtórzeniach.

Średnia intensywność fluorescencji (MFI) komórek transfekowanych pEGFP zmniejszyła się z około  $650 \pm 94$  po 24 godz. od transfekcji do odpowiednio  $371 \pm 50$  oraz  $244 \pm 56$  po 48 i 72 godz. Czas podwojenia komórek MC38CEA to około 20 godz. Prawdopodobną przyczyną spadku wartości MFI komórek transfekowanych plazmidem pEGFP jest podział komórek, prowadzący do rozcieńczenia plazmidu i białka EGFP w populacji. Natomiast MFI komórek z ekspresją EGFP-SipB w tych samych punktach czasowych wynosiła odpowiednio  $144 \pm 15$ ,  $148 \pm 44$  i  $103 \pm 52$ , co sugeruje zatrzymanie podziałów tych komórek. Ponadto obserwowano zmniejszenie nie tylko MFI, ale także liczby komórek z ekspresją EGFP-SipB, podczas gdy liczba komórek z ekspresją EGFP, ale o około dwukrotnie niższym MFI, ulegała tylko niewielkim zmianom w dwudziestoczterogodzinnych odstępach czasu. W okresie od 24 do 72 godziny po transfekcji liczba komórek wykazujących ekspresję EGFP obniżyła się o 25%, natomiast liczba komórek wykazujących ekspresję EGFP-SipB spadła aż o 79%. W tym okresie, wśród komórek produkujących EGFP-SipB znacząco wzrasta liczba komórek 7-AAD- lub aneksyno-pozytywnych oraz podwójnie pozytywnych (Rys. 14C i D, Tabela 15).

Większa liczba komórek barwiących się 7-AAD (7-AAD<sup>+</sup>/AnnV) w populacji z ekspresją EGFP w porównaniu z komórkami z ekspresją EGFP-SipB obserwowana 24 godz. po transfekcji może być związana z bezpośrednim efektem cytotoksycznym procedury transfekcji: około 1,5-krotnie więcej komórek uległo transfekcji plazmidem pEGFP niż pEGFP-*sipB*. Za taką przyczyną przemawia również zmniejszanie się liczby komórek 7-AAD-pozytywnych, aneksyno-pozytywnych oraz podwójnie pozytywnych wśród komórek syntetyzujących EGFP (czyli efekt ten jest przejściowy), natomiast w przypadku komórek wykazujących ekspresję EGFP-SipB tendencja jest odwrotna.

Podsumowując, otrzymane wyniki świadczą o istotnym negatywnym wpływie ekspresji EGFP-SipB na żywotność komórek MC38CEA.

Tabela 15. Żywotność komórek MC38CEA transfekowanych plazmidem pEGFP lub pEGFP-*sipB*.

		7-AAD <sup>+</sup> /AnnV <sup>-</sup>	
		pEGFP	pEGFP- <i>sipB</i>
<b>24 godz.</b>	9,0 ± 2,2	N = 10	1,2 ± 0,5 N = 13
<b>48 godz.</b>	5,2 ± 1,0	N = 9	1,4 ± 1,1 N = 8
<b>72 godz.</b>	3,6 ± 0,4	N = 8	2,1 ± 0,7 N = 8
		7-AAD <sup>+</sup> /AnnV <sup>+</sup>	
		pEGFP	pEGFP- <i>sipB</i>
<b>24 godz.</b>	13,8 ± 6,0		20,1 ± 6,0
<b>48 godz.</b>	12,4 ± 5,9		42,2 ± 7,0
<b>72 godz.</b>	12,9 ± 5,2		55,6 ± 4,2
		7-AAD <sup>-</sup> /AnnV <sup>+</sup>	
		pEGFP	pEGFP- <i>sipB</i>
<b>24 godz.</b>	20,8 ± 7,2		27,3 ± 4,2
<b>48 godz.</b>	17,7 ± 6,5		22,0 ± 3,2
<b>72 godz.</b>	14,0 ± 4,4		25,4 ± 3,3

Podano średni procent komórek ± odchylenie standardowe. N - łączna liczba powtórzeń z czterech niezależnych doświadczeń.

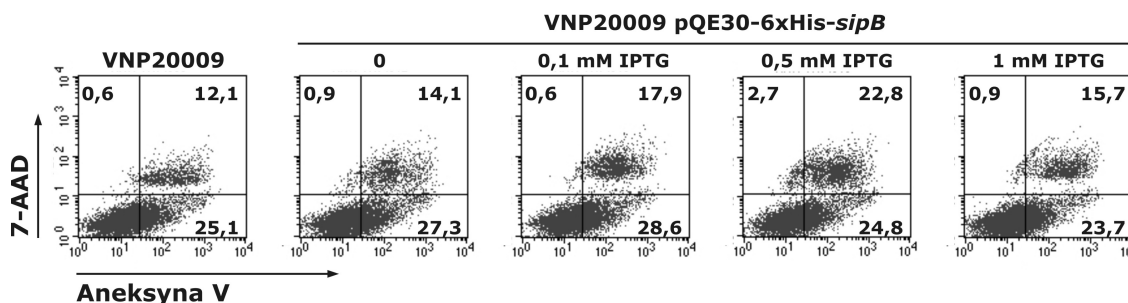
## 2.2. Apoptoza komórek fagocytujących i nefagocytujących zakażanych VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*.

Zbadano, czy ekspresja białka 6xHis-SipB w bakterjach VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, może zwiększyć własności proapoptotyczne VNP20009 i obniżyć żywotność zakażonych komórek linii makrofagowej RAW264.7 i gruczolakoraka MC38CEA.

Bakterie VNP20009 oraz VNP20009 transformowane plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* hodowano 16 godz. w 2 ml pożywki TB z ampicyliną i 1% glukozą, w temperaturze 30°C z wytrząsaniem. Całonocną hodowlę rozcieńczano w stosunku objętościowym 1:20 w 2 ml pożywki TB z ampicyliną i hodowano do gęstości optycznej OD<sub>600</sub> ≈ 0,3 w temperaturze 30°C. Ekspresję białka SipB indukowano 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG w temperaturze 25°C przez 1 ½ godz. Do indukcji zastosowano niższą temperaturę aby spowolnić proces akumulacji białka, co może sprzyjać poprawnemu fałdowaniu, a to wpływać na jego funkcjonalność. Następnie bakterie płukano dwukrotnie w buforze PBS, mierzono gęstość optyczną OD<sub>600</sub> zawiesiny bakterii i przygotowywano zawiesinę zawierającą 6,67 · 10<sup>6</sup> bakterii w 1 ml pożywki Opti-MEM.

Komórki linii makrofagowej RAW264.7 zakażano bakteriami w teście protekcji

gentamycynowej, w stosunku ilościowym dwudziestu bakterii przypadających na jedną komórkę (MOI = 20). Komórki inkubowano z bakteriami przez jedną godzinę, po czym bakterie pozakomórkowe eliminowano przy pomocy gentamycyny. Makrofagi zbierano po 14 godz. od zakażenia, barwiono aneksyną V znakowaną allofikocyjaniną (APC) oraz 7-aminoaktynomycyną (7-AAD) i analizowano cytofluorymetrycznie (Rys. 15).



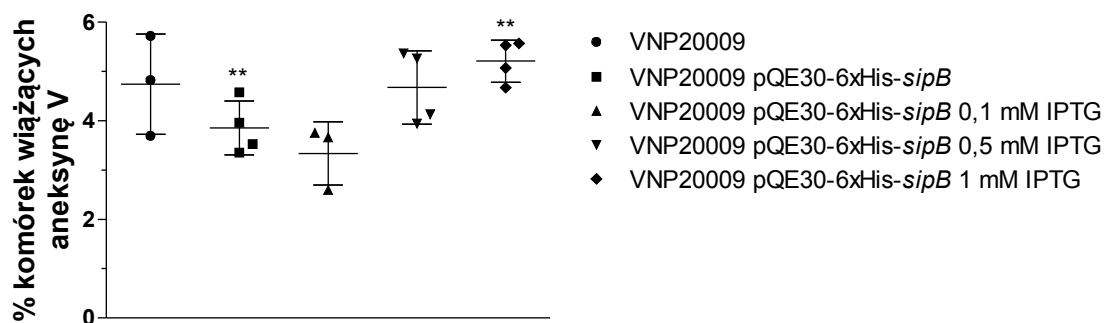
**Rys. 15. Analiza cytofluorymetryczna komórek linii RAW264.7 zakażonych bakteriami VNP20009.** Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC i 7-AAD po upływie 14 godz. od zakażenia VNP20009 lub VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-sipB, nieindukowanych lub z indukowaną ekspresją białka 6xHis-SipB. Wynik jest reprezentatywny dla trzech doświadczeń.

Największą liczbę komórek martwych, 7-AAD-pozytywnych, oraz 7-AAD- i aneksyno-pozytywnych otrzymano w przypadku komórek zakażonych bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-sipB z ekspresją 6xHis-SipB indukowaną 0,5 mM IPTG, które wykazywały najwyższą ekspresję 6xHis-SipB (por. Rys. 8 i 9). Natomiast największą liczbę komórek wyłącznie aneksyno-pozytywnych po 14 godz. od infekcji zaobserwowano po zakażeniu bakteriami indukowanymi 0,1 mM IPTG. Jest możliwe, że mniejsza ilość dostarczonego białka powoduje, że komórki giną wolniej niż te zakażone bakteriami z ekspresją indukowaną 0,5 mM IPTG.

Niezależnie od stosowanego MOI, około 2 - 3% bakterii VNP20009 było inwazyjnych (nie pokazano). Jeśli więc do zakażenia używano dwudziestokrotnie większej liczby bakterii od liczby makrofagów (MOI = 20), to prawdopodobnie około 40 - 60% komórek było zakażonych bakteriami VNP20009. VNP20009 transformowane plazmidem pQE30-6xHis-sipB były ośmiokrotnie mniej inwazyjne niż VNP20009 (Rys. 11), co przekłada się na 5 - 8% zakażonych makrofagów. Pomimo tego, liczba komórek apoptotycznych i martwych była większa po zakażeniu makrofagów tymi bakteriami niż po zakażeniu VNP20009. Możliwe jest, że bakterie, które były nieinwazyjne, mogły zostać sfagocytowane i w ten sposób 6xHis-SipB było dostarczone do makrofagów. Jeśli bakterie takie nie były zdolne do wzrostu, to liczba bakterii wewnątrzkomórkowych po 2 ½ godz. od zakażenia, wyznaczona na podstawie testu protekcji gentamycynowej, była niższa od liczby wszystkich bakterii wewnątrzkomórkowych.

Komórki nowotworowe linii MC38CEA zakażano w sposób identyczny jak komórki

RAW264.7. Bakterie użyte do infekcji indukowano różnymi stężeniami IPTG przez 1 godz. Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC oraz 7-AAD po 20 godz. od rozpoczęcia infekcji i analizowano cytofluorymetrycznie (Rys. 16).



**Rys. 16. Analiza cytofluorymetryczna komórek nowotworowych MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009.** Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC oraz 7-AAD po 20 godz. od zakażenia VNP20009 lub VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-sipB, nieindukowanych lub z indukowaną ekspresją białka 6xHis-SipB. Podano średnią liczbę komórek aneksyno-pozytywnych  $\pm$  odchylenie standardowe z 3 - 4 powtórzeń z jednego doświadczenia. \*\*  $p < 0,01$ .

Liczba komórek MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009 transformowanymi pQE30-6xHis-sipB wiążących aneksynę V była mniejsza od liczby komórek wiążących aneksynę V i zakażonych VNP20009, ale różnica nie była istotna statystycznie. Prawdopodobnie ta różnica była spowodowana mniejszą ilością zakażonych komórek. W grupach komórek zakażonych VNP20009 z ekspresją 6xHis-SipB indukowaną różnymi stężeniami IPTG najwyższy efekt cytotoksyczny zaobserwowano po zakażeniu bakteriami indukowanymi 1 mM IPTG w porównaniu z bakteriami nieindukowanymi ( $5,21 \pm 0,42$  vs.  $3,86 \pm 0,54$ ). Natomiast porównując komórki zakażone VNP20009 z którąkolwiek z grup komórek zakażonych VNP20009 pQE30-6xHis-sipB, nie zaobserwowano różnic w liczbie komórek aneksyno-pozytywnych. Podsumowując, niski stopień zakażenia komórek MC38CEA i brak możliwości wyodrębnienia zakażonych komórek nie pozwala stwierdzić, czy ekspresja 6xHis-SipB w bakteriach VNP20009 ma w tym przypadku jakiegokolwiek efekt cytotoksyczny na zakażone komórki nowotworowe.

### 3. Hamowanie wzrostu guzów nowotworowych przez VNP20009 w mysich modelach nowotworów transplantacyjnych.

Zbadano, czy ekspresja 6xHis-SipB pod kontrolą promotora T5/lacO w bakteriach VNP20009 zwiększa ich zdolność do hamowania wzrostu litych guzów nowotworowych u myszy w modelu podskórnym i płucnym. Porównano efektywność bakterii VNP20009 i VNP20009, które były transformowane dwoma plazmidami: pQE30-6xHis-sipB oraz

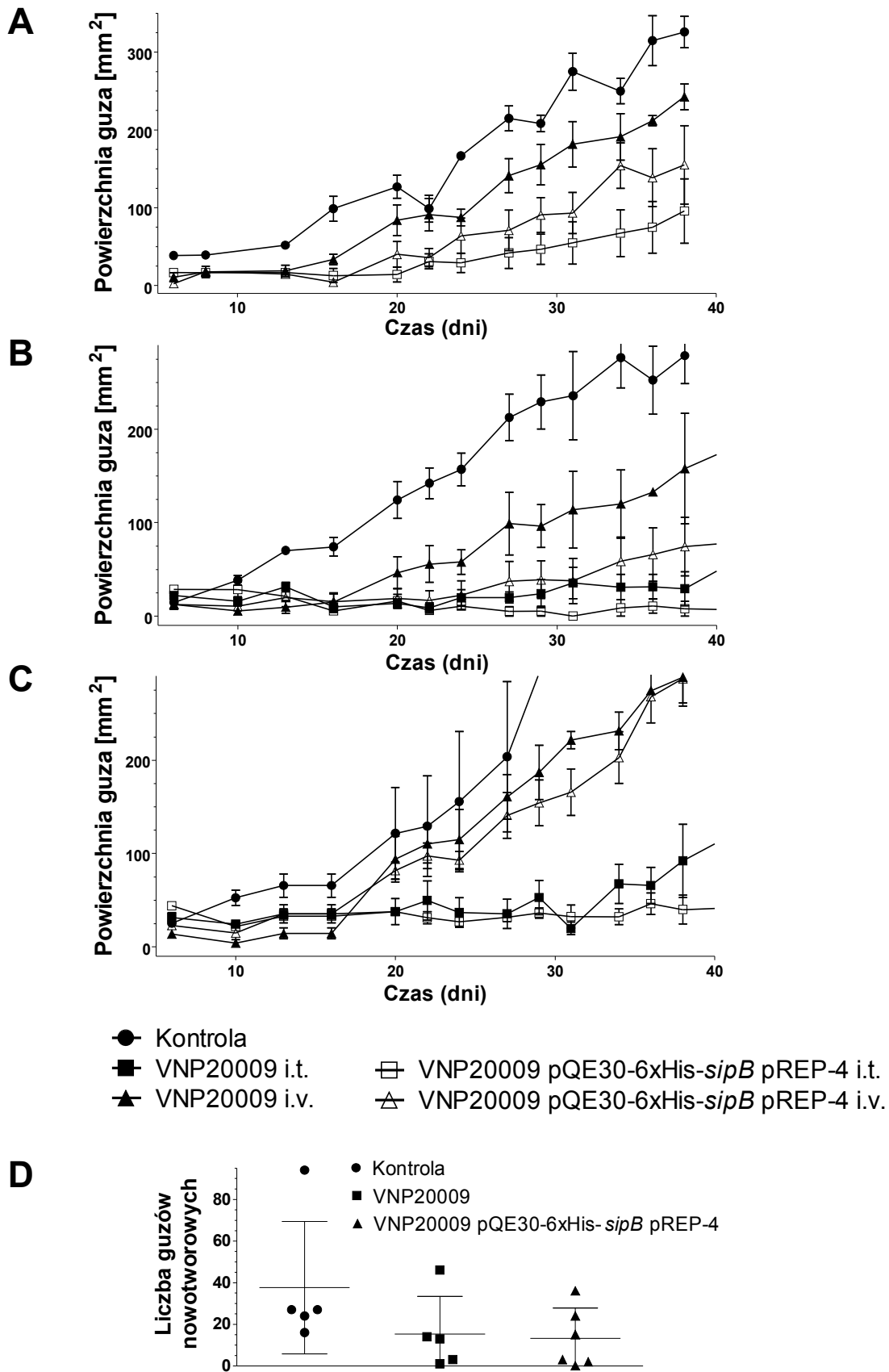
pREP-4, który kodował białko represorowe LacI, ograniczające aktywność PT5//lacO pod nieobecność induktora. W tym celu wykonano następujące doświadczenia.

W badaniach z wykorzystaniem modelu podskórnego samicom myszy szczepu Balb/c podano podskórną 3·10<sup>5</sup> komórek gruczolakoraka CT26CEA, a samicom myszy C57Bl/6 - 5·10<sup>5</sup> komórek gruczolakoraka MC38CEA lub czerniaka B16. Dwadzieścia cztery godziny po podaniu komórek nowotworowych myszom podano 2·10<sup>6</sup> bakterii dożylnie (i.v.) lub w miejsce implantacji nowotworu (i.t.), a wzrost guzów monitorowano mierząc dwa prostopadłe wymiary i obliczając powierzchnię guzów (Rys. 17A-C).

W badaniach z wykorzystaniem modelu płucnego samicom myszy szczepu C57Bl/6 podano dożylnie 10<sup>6</sup> komórek czerniaka B16F10, a dziewięćdziesiąt sześć godzin później myszom podano dożylnie 2·10<sup>6</sup> bakterii. Po 21 dniach od podania komórek nowotworowych od myszy pobrano płuca, wybarwiono roztworem kwasu pikrynowego, a efektywność wzrostu nowotworu oceniono na podstawie liczby guzów nowotworowych w płucach (Rys. 17D).

Bakterie VNP20009 pQE30-6xHis-*sipB* pREP-4 silniej niż VNP20009 hamowały wzrost guzów podskórnych CT26CEA, MC38CEA i B16. Lokalne podanie obu typów bakterii było bardziej efektywne niż podanie systemowe. U żadnej z myszy, którym bakterie podano dożylnie, nie doszło do całkowitej eliminacji nowotworu. Natomiast spośród myszy, którym lokalnie podano VNP20009 pQE30-6xHis-*sipB* pREP-4, u czterech na pięć myszy nowotwór MC38CEA był całkowicie wyeliminowany, a po podaniu VNP20009 - u jednej na pięć myszy. U pozostałych myszy wzrost guza był znacznie wolniejszy niż w grupie myszy kontrolnych, którym nie podano bakterii. W przypadku nowotworu B16 tylko u jednej myszy zaobserwowano całkowitą eliminację guza, w grupie myszy, którym podano VNP20009 pQE30-6xHis-*sipB* pREP-4, a u pozostałych leczonych myszy - hamowanie wzrostu. W modelu płucnym podanie bakterii zahamowało wzrost guzów, ale stopień zahamowania był podobny przy zastosowaniu obu typów: VNP20009 i VNP20009 pQE30-6xHis-*sipB* pREP-4.





Rys. 17. Porównanie efektów terapeutycznych VNP20009 oraz bakterii z ekspresją 6xHis-SipB w mysich modelach nowotworów transplantacyjnych. Mysiom szczepu Balb/c obarczonym nowotworem CT26CEA (A) oraz mysiom C57Bl/6 obarczonym nowotworem MC38CEA (B) lub B16 (C) 24 godz. po podaniu komórek nowotworowych podano dożylnie (i.v.)

lub podskórnice w miejsce implantacji guza (i.t.)  $2 \cdot 10^6$  bakterii. (D) Mysiom szczepu C57Bl/6 podano dożylnie bakterie 96 godz. po dożylnym podaniu komórek czerniaka B16F10; 21 dni po podaniu komórek nowotworowych od myszy pobrano płuca i policzono guzy nowotworowe.

#### 4. Klonowanie sekwencji promotorowej *PsifB*.

Badania komórek transfekowanych pokazały, że ekspresja białka EGFP-SipB pod kontrolą promotora eukariotycznego  $P_{CMV}$  w komórkach nowotworowych MC38CEA zwiększa liczbę komórek apoptotycznych, wiążących aneksynę V, oraz martwych. Zakażenie komórek linii makrofagowej RAW264.7 bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* powodowało wzrost liczby komórek wiążących aneksynę V i barwiących się 7-AAD. Ze względu na fakt zakażenia niewielkiej puli komórek MC38CEA cytotoksyczny efekt jest trudny do oszacowania. Wynik badania żywotności i inwazyjności bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB* pokazują, że indukcja ekspresji 6xHis-SipB powoduje obniżenie ilości żywych bakterii, a bakterie, które przeżyły indukcję, są zdolne do inwazji. Jest możliwe, że ograniczenie negatywnego wpływu indukcji na żywotność pozwoliłoby na dostarczenie większej ilości białka 6xHis-SipB do komórek eukariotycznych i tym samym na zwiększenie efektywności jego działania.

Ograniczenie efektu akumulacji 6xHis-SipB na żywotność bakterii można by osiągnąć w dwojaki sposób: (a) poprzez indukcję jego ekspresji nie w hodowli bakterii, ale dopiero w czasie trwania koinkubacji bakterii z komórkami eukariotycznymi, lub (b) przez zmianę systemu ekspresji 6xHis-SipB na system oparty o aktywację promotora w bakteriach wewnątrzkomórkowych. Rozwiązanie zaproponowane w punkcie (a) wymagałoby stosowania dużych ilości IPTG w badaniach *in vitro* i miałyby ograniczoną stosowalność *in vivo*.

Zdecydowano się na wykorzystanie do kontroli ekspresji 6xHis-SipB jednego z endogennych promotorów *S. typhimurium*, które są aktywowane w bakteriach żyjących w zakażonej komórce i nieaktywne w bakteriach w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli *in vitro*.

Kolejnym etapem pracy było więc opracowanie systemu nadekspresji białka 6xHis-SipB w oparciu o promotor aktywowany w bakteriach, które zakaziły komórkę eukariotyczną i żyją w jej wnętrzu. Na podstawie danych literaturowych wybrano promotor genu *sifB*, kodującego jedno z białek dostarczanych przez system sekrecji kodowany w obszarze drugiej wyspy patogenności (SPI2), który jest ważny dla wewnątrzkomórkowego przeżycia i replikacji *Salmonella*. Sekwencja promotora genu *sifB* została zidentyfikowana przez Bumanna, jako promotor, który jest aktywowany przede wszystkim w bakteriach ze śledziona zakażonej myszy, natomiast w bakteriach hodowanych *in vitro* ma bardzo niską aktywność [123]. Stwierdzono, że *PsifB* ulega aktywacji w bakteriach wewnątrzkomórkowych [124].

Do klonowania fragmentu kodującego *PsifB* wykorzystano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>. W celu oceny aktywności promotora *PsifB* uzyskanego z DNA genomowego *S. typhimurium* i wklonowanego do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> posłużono się genem reporterowym kodującym białko GFP. W pierwszym etapie pracy skonstruowano wektor pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp*, w którym pod kontrolą *PsifB* umieszczono fragment kodujący białko GFP. Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub> jest wysokokopijny, co przekładając się na wyższy poziom ekspresji kodowanych na nim genów, ułatwiło wstępną ocenę aktywności promotora *PsifB* przy pomocy analizy mikroskopowej i cytofluorymetrycznej komórek zakażonych bakteriami transformowanymi plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp*.

W następnym etapie zastosowano niskokopijny plazmid pBR322, ponieważ:

(a) w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub> jest obecna sekwencja promotorowa *P<sub>lac</sub>*, kontrolująca ekspresję genu *lacZ*, położona w odległości około 130 par zasad od miejsca wstawienia fragmentu DNA (*PsifB*), dlatego nie można wykluczyć wpływu aktywności tego promotora na aktywność *PsifB*;

(b) w perspektywie planowano zintegrowanie pojedynczej kopii kasety ekspresyjnej *PsifB*-6xHis-*sipB* z genomem VNP20009; stąd próba oceny czy znacznie niższa liczba kopii genu *gfp* kodowanego na pBR322 w porównaniu z genem kodowanym na pGEM-T<sub>Easy</sub>, może być źródłem ekspresji o znaczącym poziomie, wykrywalnej przy pomocy analizy cytofluorymetrycznej oraz mikroskopowej.

Uzyskanie wektora pBR322-*PsifB-gfp* obejmowało szereg etapów:

1. Uzyskanie sekwencji promotora genu *sifB* (*PsifB*) z DNA genomowego *Salmonella typhimurium* SL5319 w reakcji PCR.

2. Wklonowanie fragmentu *PsifB* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Uzyskanie plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*.

3. Uzyskanie sekwencji kodującej białko GFP z DNA plazmidowego pGFPuv w reakcji PCR.

4. Wklonowanie sekwencji kodującej białko GFP do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*. Uzyskanie plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp*.

5. Przeklonowanie kasety *PsifB-gfp* z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp* do pBR322. Uzyskanie plazmidu pBR322-*PsifB-gfp*.

#### 4.1. Izolacja sekwencji promotora *PsifB*.

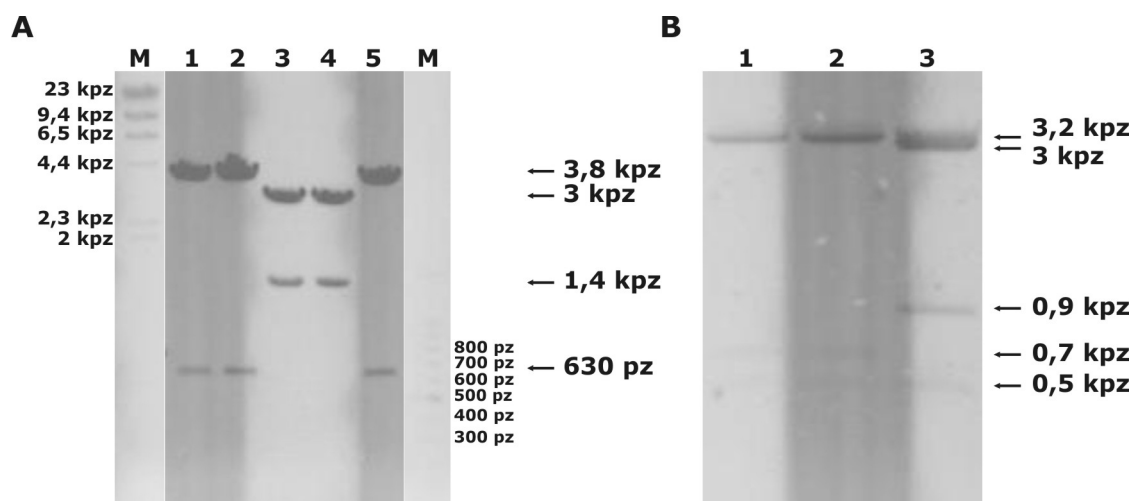
Sekwencję kodującą regionu promotorowego genu *sifB* otrzymano w reakcji PCR z DNA genomowego *Salmonella typhimurium* SL5319, ze starterami *sifF* i *sifR*, zawierającymi odpowiednio miejsce restrykcyjne *HindIII* i *BglII*. Produkt reakcji o długości 605 pz wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> i namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α. Potwierdzono zgodność otrzymanej sekwencji *PsifB* z sekwencją uzyskaną z

bazy GenBank (*Salmonella typhimurium* LT2, 1 691 572 - 1 692 152 pz), wykorzystując do sekwencjonowania startery pGEM-F i pGEM-R.

#### 4.2. Uzyskanie sekwencji kodującej GFP i umieszczenie jej pod kontrolą promotora *PsifB*.

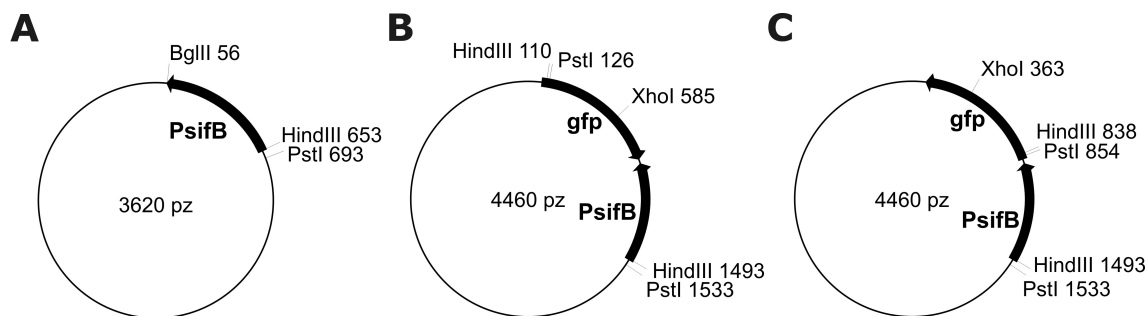
Fragment kodujący GFP otrzymano z plazmidu pGFPuv w reakcji PCR ze starterami ForGFP i RevGFP, zawierającymi miejsce restrykcyjne *Bgl*II. Produkt PCR (846 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> uzyskując plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*gfp* (4458 pz), który namnożono w bakterjach *E. coli* DH5 $\alpha$ . Zgodność otrzymanej sekwencji z sekwencją pGFPuv potwierdzono przeprowadzając sekwencjonowanie z wykorzystaniem starterów: pGEM-F i pGEM-R.

Z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*gfp* poddanego działaniu enzymu *Bgl*II otrzymano sekwencję *gfp*. Następnie w miejsce restrykcyjne *Bgl*II plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB* wstawiono fragment *gfp* (840 pz). Orientację sekwencji *gfp* względem promotora *PsifB* sprawdzono poddając DNA plazmidowe analizie restrykcyjnej przy pomocy enzymu *Hind*III (Rys. 18A), a następnie wynik zweryfikowano analizując produkty trawienia wybranych plazmidów enzymami *Xho*I i *Pst*I (Rys. 18B).



**Rys. 18. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-*gfp* poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych.** Fragmenty DNA rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). **(A)** 1 - 5 - DNA plazmidowe wyizolowane z pięciu różnych klonów bakterii, poddane działaniu *Hind*III. **(B)** Plazmidy wyizolowane z klonów numer 1, 2 i 3, poddane działaniu enzymów *Xho*I i *Pst*I. M - wzorec długości fragmentów DNA.

W wyniku trawienia DNA plazmidowego otrzymano fragmenty DNA potwierdzające orientację *gfp* zgodną (klon 1, 2, 5) lub przeciwną (klon 3, 4) względem orientacji sekwencji promotora *PsifB*. Na Rys. 19 przedstawiono schematy plazmidów z obiema orientacjami wstawki.



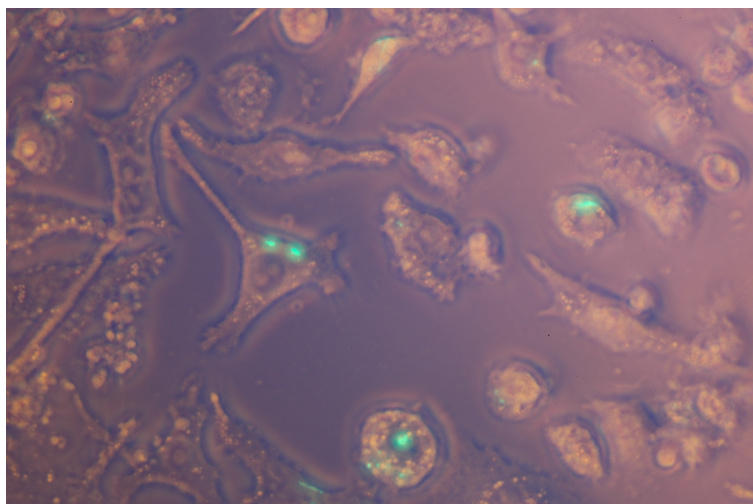
**Rys. 19. Klonowanie fragmentu *gfp* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*.** (A) Schemat plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB* przed wklonowaniem *gfp*. (B) Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-*gfp* z sekwencją *gfp* wstawioną w orientacji zgodnej z orientacją promotora *PsifB*. (C) Plazmid, w którym *gfp* był wklonowany w orientacji przeciwnej do orientacji *PsifB*.

Namnożono bakterie *E. coli* DH5α zawierające plazmidy GEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-*gfp* o zgodnej orientacji promotora z sekwencją kodującą *gfp* (klon 1) i o odwrotnej orientacji sekwencji *gfp* w stosunku do promotora (klon 3), wyizolowano plazmidowe DNA i wykorzystano do transformowania bakterii *S. typhimurium* VNP20009.

#### 4.3. Badanie funkcjonalności sekwencji promotorowej *PsifB*.

Przed rozpoczęciem kolejnych etapów pracy sprawdzono, czy uzyskany fragment *PsifB* może regulować ekspresję genu *gfp*. Zbadano indukcję ekspresji GFP pod kontrolą *PsifB* w bakteriach wewnątrz zakażonych makrofagów. Indukcję wewnątrzkomórkową promotora *PsifB* sprawdzono zakażając makrofagi linii RAW264.7 bakteriami *S. typhimurium* VNP20009 transformowanymi plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-*gfp*. Aby stwierdzić, czy *PsifB* odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji GFP, do infekcji użyto bakterii transformowanych plazmidem z sekwencją genu *gfp* wklonowaną zgodnie lub przeciwnie do orientacji promotora *PsifB*.

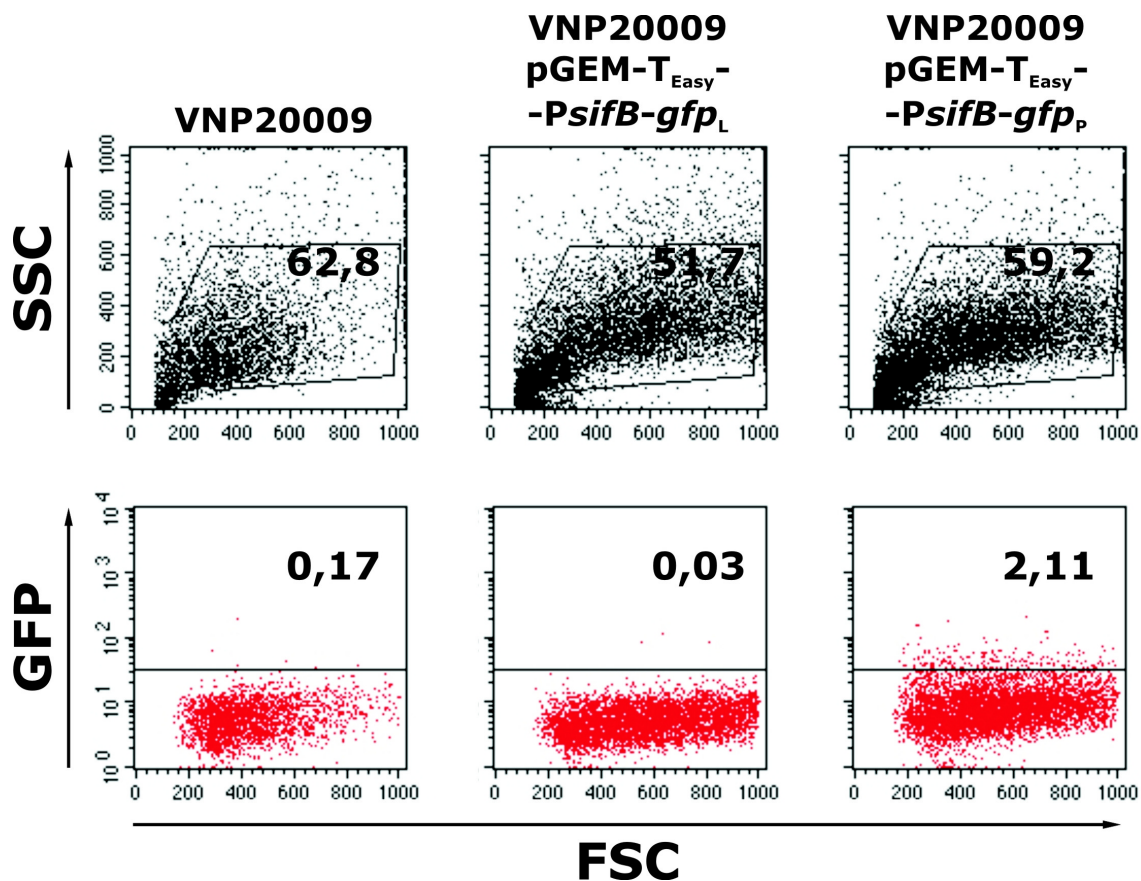
Komórki linii makrofagowej RAW264.7 zakażano bakteriami w sposób opisany w rozdziale Materiały i metody, z tą różnicą, że na jedną komórkę makrofagową przypadało sto bakterii (MOI = 100). Ekspresję GFP obserwowano przy pomocy mikroskopu odwróconego z epifluorescencją (Rys. 20).



**Rys. 20. Obraz mikroskopowy makrofagów linii RAW264.7, zakażonych bakteriami *S. typhimurium* VNP20009, transformowanymi plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp*. Zdjęcie wykonano po około 20 godz. od początku infekcji.**

Ekspresję GFP w bakteriach wewnątrz makrofagów można już było zaobserwować po około 4 godz. od początku infekcji i, zgodnie z oczekiwaniami, jedynie w komórkach zakażonych bakteriami zawierającymi plazmid ze zgodną orientacją *gfp* względem *PsifB*.

Po 24 godz. od zakażenia makrofagi zebrano z dołków hodowlanych przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS i ekspresję GFP w komórkach analizowano przy pomocy cytometru przepływowego (Rys. 21).

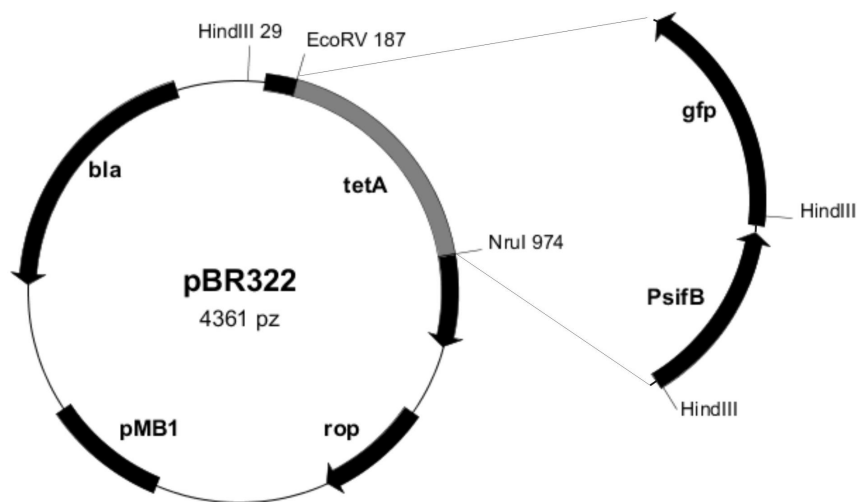


**Rys. 21. Analiza cytofluorymetryczna makrofagów linii RAW264.7, zakażonych bakteriami *S. typhimurium* VNP20009.** VNP20009 były transformowane plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp* z sekwencją *gfp* wklonowaną zgodnie (*gfp<sub>R</sub>*) lub przeciwnie (*gfp<sub>L</sub>*) do orientacji *PsifB*. Górny rząd - bramką zaznaczono analizowaną populację komórek; podano procent komórek z całkowitej liczby zliczeń, znajdujący się w obrębie tej bramki. Dolny rząd - analizowano ekspresję GFP w populacji w obrębie bramki; podano procent komórek z zieloną fluorescencją.

Uzyskana i wklonowana do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> sekwencja *PsifB* może kontrolować ekspresję GFP. Ekspresja zachodzi w bakteriach zakażających komórki makrofagowe, a poziom ekspresji wewnątrz makrofagów umożliwia detekcję cytofluorymetryczną.

#### 4.4. Przeklonowanie kasety *PsifB-gfp* z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp* do plazmidu pBR322.

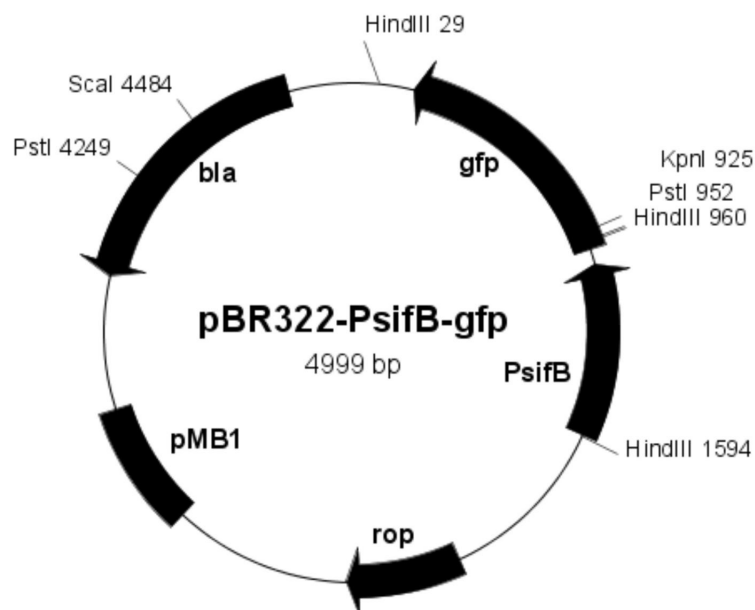
Fragment *PsifB-gfp* wycięto z pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-gfp* enzymem *EcoRI* i po wypełnieniu lepkich końców wklonowano do plazmidu niskokopijnego pBR322, strawionego enzymami restrykcyjnymi *EcoRV* i *NruI* (Rys. 22).



**Rys. 22. Schemat klonowania kasety *PsifB-gfp* do plazmidu *pBR322*.** *tetA* - gen warunkujący oporność na tetracyklinę; *rop* - gen kodujący białko Rop (Repressor of primer), wymagane do replikacji plazmidu; *pMB1* - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen kodujący  $\beta$ -laktamazę warunkującą oporność na ampicylinę; *gfp* - gen kodujący białko GFP; *PsifB* - promotor genu *sifB*.

Przeprowadzono analizę restrykcyjną plazmidów wyizolowanych z sześciu klonów bakterii. Miejsca restrykcyjne *EcoRV* i *NruI* w plazmidzie *pBR322* są zlokalizowane w obrębie genu warunkującego oporność na tetracyklinę (*tetA*). Aby ograniczyć możliwość transkrypcji genu *gfp* wynikającej z aktywności innych niż *PsifB* sekwencji promotorowych, a konkretnie z aktywności promotora genu oporności na tetracyklinę, spośród plazmidów wyizolowanych z sześciu różnych klonów bakterii wybrano plazmid, w którym kasetę *PsifB-gfp* (1419 pz) była wklonowana w orientacji przeciwnej do orientacji genu oporności na tetracyklinę. Produkty trawienia plazmidów enzymem *HindIII* o długościach odpowiadających 170 pz, 630 pz i 4200 pz świadczyły o orientacji kasety *PsifB-gfp* zgodnej z orientacją genu *tetA*, natomiast obecność produktów o długościach 970 pz, 630 pz i 3400 pz potwierdzały orientację przeciwną do orientacji *tetA*, czyli pożądaną. Schemat uzyskanego wektora *pBR322-PsifB-gfp* przedstawiono na Rys. 23.





**Rys. 23. Schemat plazmidu pBR322-PsifB-gfp.** *gfp* - gen kodujący białko GFP; *PsifB* - promotor genu *sifB*; *rop* - gen kodujący białko Rop, regulujące replikację plazmidu; *pMB1* - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen kodujący β-laktamazę warunkującą oporność na ampicylinę.

Namnożono bakterie z wybranego klonu *E. coli* DH5α zawierającego plazmid pBR322-PsifB-gfp i wyizolowane plazmidowe DNA wykorzystano do stransformowania bakterii *S. typhimurium* VNP20009.

#### 4.5. Uzyskanie konstruktów genetycznych PsifB-6xHis-sipB-gfp.

Stwierdzono, że sekwencja promotorowa *PsifB* może kontrolować ekspresję białka GFP w bakteriach wewnątrzkomórkowych. Następnie sprawdzono, czy gen 6xHis-*sipB* również będzie ulegał ekspresji pod kontrolą *PsifB*. W tym celu skonstruowano kasetę kodującą białko fuzyjne znakowane na C-końcu białkiem GFP. Otrzymany konstrukt umożliwił cytofluorymetryczną detekcję aktywności promotora.

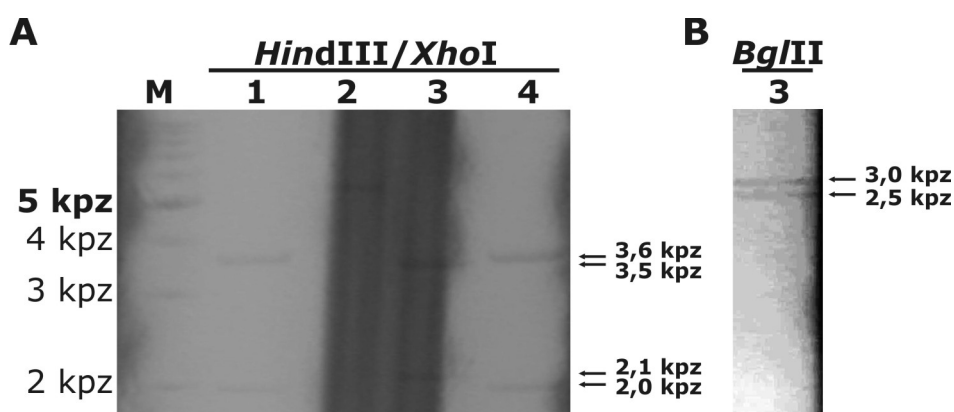
Plazmid pBR322-PsifB-6xHis-sipB-gfp uzyskano w kolejnych etapach:

1. Z plazmidu pQE30-6xHis-sipB w otrzymano sekwencję kodującą 6xHis-sipB, pozbawioną kodonu stop.
2. Fragment 6xHis-sipBΔSTOP wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Uzyskano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-sipBΔSTOP.
3. Z plazmidu pGFPuv uzyskano sekwencję kodującą białko GFP, pozbawioną kodonu start (*gfp*ΔATG).
4. Fragment *gfp*ΔATG wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-sipBΔSTOP. Otrzymano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-sipB-gfp.
5. Fragment 6xHis-sipB-gfp wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-PsifB. Uzyskano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-PsifB-6xHis-sipB-gfp.

6. Kasetę *PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* przeklonowano z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* do pBR322. Uzyskano plazmid pBR322-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp*.

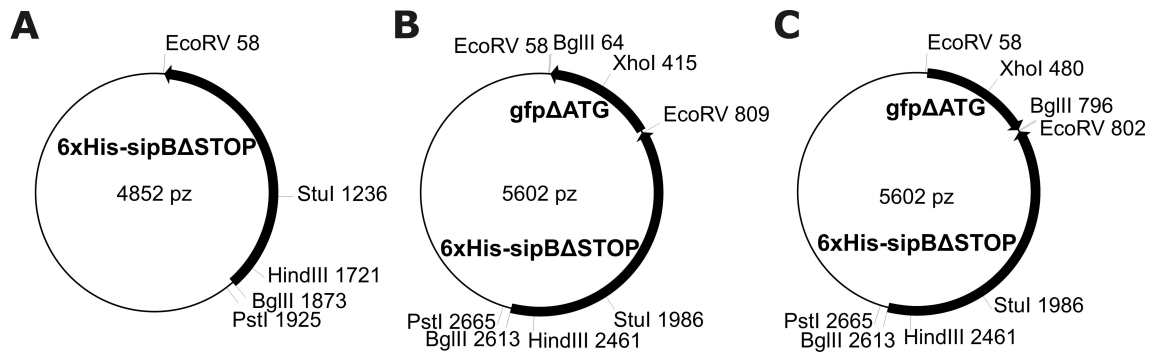
Z plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* otrzymano sekwencję genu 6xHis-*sipB* pozbawioną kodonu stop (6xHis-*sipB*ΔSTOP), w reakcji PCR ze starterami F<sub>sipB</sub>gl i dSTOP<sub>sip</sub> zawierającymi odpowiednio miejsca restrykcyjne *Bgl*II i *EcoRV*. Z plazmidu pGFPuv uzyskano sekwencję *gfp* pozbawioną kodonu ATG kodującego pierwszy aminokwas GFP w białku fuzyjnym LacZ-GFP (*gfp*ΔATG), w reakcji PCR ze starterami F<sub>gfp</sub>EcoV i R<sub>gfp</sub>EB zawierającymi odpowiednio miejsca restrykcyjne *EcoRV* oraz *EcoRV* i *Bgl*II.

Produkt PCR 6xHis-*sipB*ΔSTOP (1837 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>, namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α, a następnie w miejsce *EcoRV* wklonowano produkt PCR *gfp*ΔATG, strawiony enzymem *EcoRV* (750 pz). Wykonano analizę restrykcyjną DNA plazmidowego wyizolowanego z czterech klonów bakterii transformowanych plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*-*gfp* (Rys. 24).



**Rys. 24. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*-*gfp* poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych.** Rozdział wykonano w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). **(A)** DNA plazmidowe wyizolowane z czterech klonów bakterii, poddane działaniu enzymów *Hind*III i *Xho*I. **(B)** Plazmid z klonu numer 3, poddany działaniu enzymu *Bgl*II. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

Wstawka *gfp* mogła zostać wbudowana do pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB* w orientacji zgodnej lub przeciwnej do orientacji 6xHis-*sipB*, co przedstawiono na Rys. 25. W przypadku orientacji zgodnej z plazmidu poddanego działaniu enzymów *Hind*III i *Xho*I otrzymano fragmenty o długości około 3,5 kpb i 2,1 kpb, a w wyniku trawienia enzymem *Bgl*II - około 3 kpb i 2,5 kpb.



**Rys. 25. Klonowanie fragmentu *gfp* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*.** (A) Schemat plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*. (B) Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*-*gfp*ΔATG z sekwencją *gfp*ΔATG wklonowaną w orientacji zgodnej z orientacją 6xHis-*sipB*. (C) Plazmid, w którym *gfp*ΔATG był wstawiony w orientacji przeciwnej do 6xHis-*sipB*.

Z plazmidu wyizolowanego z klonu bakterii numer 3 otrzymano fragmenty DNA o długości potwierdzającej prawidłową orientację wklonowanego fragmentu *gfp*ΔATG względem sekwencji 6xHis-*sipB*.

Na Rys. 26 przedstawiono natywną sekwencję końca 3' genu 6xHis-*sipB* z kodonem STOP (A), koniec 5' *gfp* z kodonem kodującym pierwszy aminokwas GFP (B) oraz schemat miejsca fuzji genów 6xHis-*sipB* i *gfp* (C), uzyskanego w wyniku ligacji produktów PCR *sipB*ΔSTOP i *gfp*ΔATG w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub>.

#### A Natywny koniec 3' genu *sipB*

...CAG AGT CGC GCA TAA  
 ...Gln Ser Arg Ala STOP

#### B Natywny koniec 5' genu *lacZ* - *gfp*

...GTA GAA AAA ATG AGT AAA...  
 ...Val Glu Lys Met Ser Lys...

Pierwszy aminokwas sekwencji *gfp* ↑

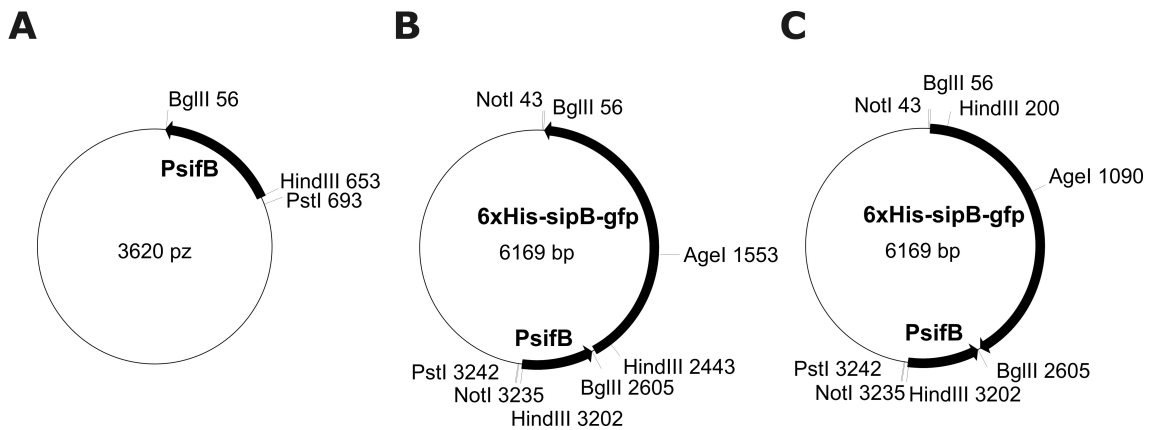
#### C Miejsce fuzji 6xHis-*sipB*ΔSTOP z *gfp*ΔATG

...CAG AGT CAT GGA TAT CTA AGT AAA...  
 ...Gln Ser His Gly Tyr Leu Ser Lys...

**Rys. 26. Schemat konstruktów genetycznych kodujących białko fuzyjne 6xHis-SipB-GFP.** (A) Koniec 3' sekwencji genu 6xHis-*sipB* w plazmidzie pQE30-6xHis-*sipB*. (B) Koniec 5' sekwencji *gfp*, występujący w sekwencji plazmidu pGFPuv w postaci fuzji z fragmentem genu *lacZ*. (C) Fragment sekwencji kodującej białko 6xHis-SipB, znakowane na C-końcu białkiem GFP, którą uzyskano w wyniku ligacji produktu reakcji PCR *sipB*ΔSTOP (umieszczonego w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub>) z *gfp*ΔATG. Podkreślono miejsce restrykcyjne *EcoRV*, wykorzystane do uzyskania otwartej ramki odczytu genu 6xHis-*sipB*-*gfp*.

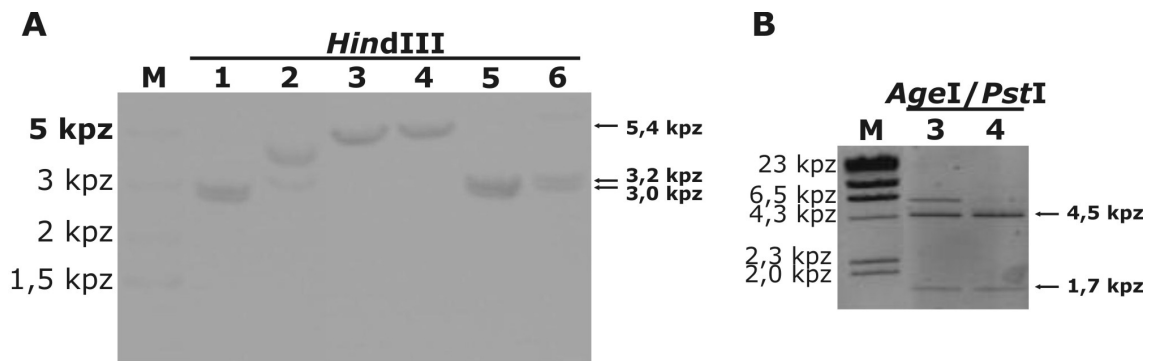
Seqwencję genu fuzyjnego 6xHis-*sipB*-*gfp* wycięto z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*-*gfp* enzymem *Bgl*III i wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB* w miejsce restrykcyjne *Bgl*III. Na Rys. 27 przedstawiono schematycznie plazmidy, w których klonowany fragment został wstawiony w orientacji zgodnej lub przeciwnej do orientacji

sekwencji *PsifB*.



**Rys. 27. Klonowanie sekwencji 6xHis-*sipB*-gfp do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*.** (A) Schemat plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*. (B) Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB*-gfp z wstawką wklonowaną w orientacji zgodnej z orientacją promotora. (C) Plazmid o odwrotnej orientacji wstawki względem *PsifB*.

Orientację sekwencji 6xHis-*sipB*-gfp względem *PsifB* sprawdzono poddając DNA plazmidowe wyizolowane z sześciu klonów bakterii działaniu enzymów *Hind*III oraz *Age*I i *Pst*I (Rys. 28).



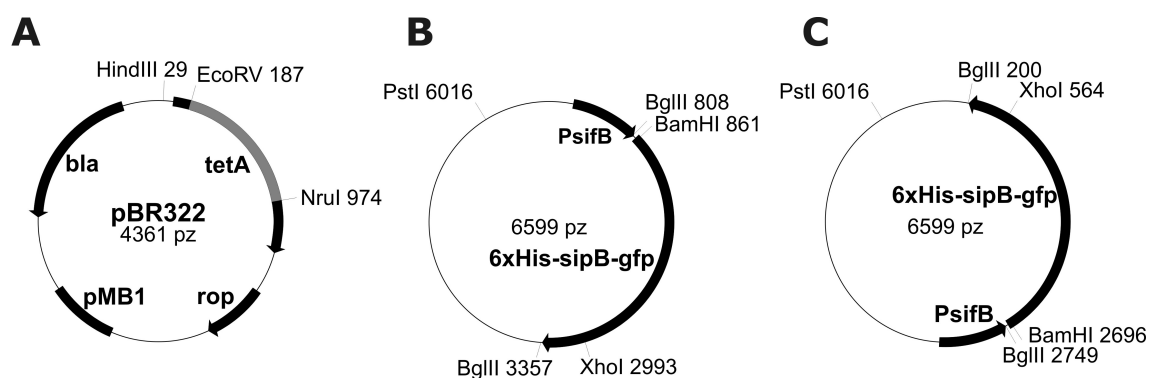
**Rys. 28. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB*-gfp poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych.** Fragmenty DNA rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). (A) DNA plazmidowe wyizolowane z sześciu klonów bakterii, poddane działaniu enzymu *Hind*III. (B) DNA plazmidowe wyizolowane z klonów 3 i 4, poddane działaniu *Age*I i *Pst*I. M - wzorec długości fragmentów DNA.

W wyniku trawienia enzymem *Hind*III DNA plazmidowego wyizolowanego z klonów numer 3 i 4 otrzymano fragmenty DNA o długości ok. 750 pz i 5400 pz, co potwierdziło prawidłową orientację wklonowanego fragmentu 6xHis-*sipB*-gfp względem sekwencji promotora *PsifB*, gdyż oczekiwane wielkości fragmentów DNA to 758 pz i 5434 pz (Rys. 27B i 28A).

Dodatkowe potwierdzenie prawidłowej orientacji uzyskano dzięki analizie plazmidowych DNA otrzymanych z klonów numer 3 i 4, poddanych działaniu enzymów

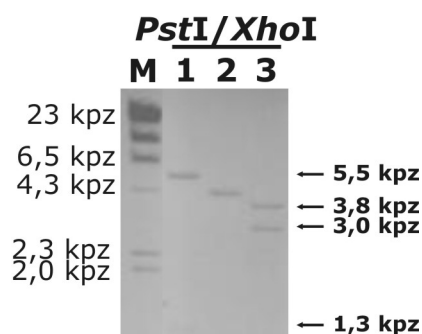
Agel i *Pst*I. Uzyskano fragmenty o długości ok. 4500 pz i 1700 pz, co odpowiada spodziewanym produktom trawienia plazmidowego DNA (4516 pz i 1676 pz; Rys. 27B i 28B). Prążek odpowiadający fragmentowi DNA o ok. 6300 pz to DNA niecałkowicie strawionego plazmidu.

W celu uzyskania plazmidu pBR322-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* kasetę *PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* wycięto z pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* enzymem *Not*I. Po wypełnieniu lepkich końców, kasetę wklonowano do docelowego plazmidu pBR322, poddanego uprzednio działaniu enzymów restrykcyjnych *Eco*RV i *Nru*I. Na Rys. 29 przedstawiono dwie możliwe orientacje wbudowania fragmentu *PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* do plazmidu pBR322.



**Rys. 29. Klonowanie sekwencji *PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* do plazmidu pBR322. (A)** Schemat plazmidu pBR322. Zaznaczono miejsca restrykcyjne *Eco*RV i *Nru*I wykorzystane do klonowania. **(B)** Plazmid pBR322-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* z wstawką wklonowaną w orientacji zgodnej z numeracją plazmidu. **(C)** Plazmid o odwrotnej orientacji wstawkę względem numeracji plazmidu.

DNA plazmidowe uzyskane z ośmiu klonów poddano działaniu enzymów *Bam*HI i *Pst*I. Wybrano trzy klony, które prawdopodobnie zawierały plazmid z wstawką, wyizolowano DNA plazmidowe i poddano je działaniu enzymów *Pst*I i *Xho*I (Rys. 30).

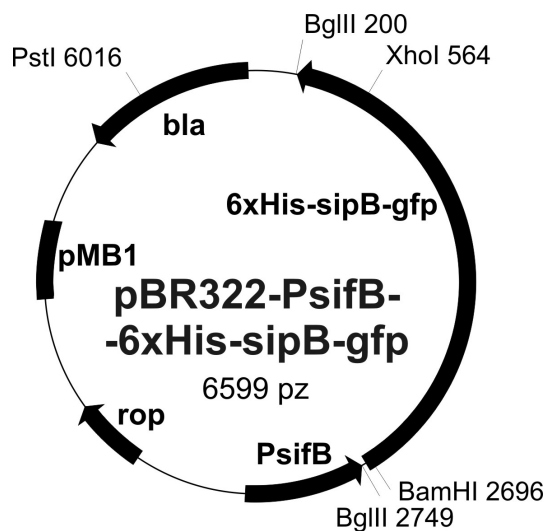


**Rys. 30. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pBR322-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp* poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych *Pst*I i *Xho*I.** Produkty reakcji rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). 1 - 3 - DNA plazmidowe uzyskane z trzech klonów bakterii transformowanych plazmidem pBR322-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*gfp*.

W wyniku trawienia DNA plazmidowego wyizolowanego z klonu numer 1 otrzymano

fragmenty o długości oczekiwanej w sytuacji, gdy kasetę *PsifB-6xHis-sipB-gfp* została wklonowana w orientacji przeciwnej do numeracji plazmidu i orientacji genu *tetA*, czyli odpowiadające długościom 1282 pz i 5508 pz. Klon numer 2 zawierał pusty plazmid pBR322 (4361 pz). Klon 3 zawierał plazmid o orientacji kasety zgodnej z orientacją *tetA*, a otrzymane produkty odpowiadały oczekiwanej długościom 3802 pz i 2988 pz.

Schemat plazmidu pBR322-*PsifB-6xHis-sipB-gfp*, uzyskanego z klonu bakterii numer 1, w którym orientacja kasety *PsifB-6xHis-sipB-gfp* jest przeciwna do numeracji plazmidu, przedstawiono na Rys.31.



**Rys. 31. Schemat plazmidu pBR322-*PsifB-6xHis-sipB-gfp*.** *6xHis-sipB-gfp* - fragment kodujący białko fuzyjne SipB-GFP, znakowane na N-końcu etykietką histydynową; *PsifB* - promotor genu *sipB*; *rop* - gen kodujący białko Rop, potrzebne do replikacji plazmidu; pMB1 - miejsce ori plazmidu; *bla* - gen oporności na ampicylinę.

Plazmid namnożono w bakteriiach *E. coli* DH5 $\alpha$ , a otrzymanym DNA plazmidowym transformowano bakterie *S. typhimurium* VNP20009.

#### 4.6. Badanie funkcjonalności konstruktów pBR322-*PsifB-gfp* i pBR322-*PsifB-6xHis-sipB-gfp*.

##### Analiza cytofluorymetryczna bakterii z ekspresją białka GFP pod kontrolą promotora *PsifB*.

Aktywność *PsifB* jest indukowana w warunkach wewnątrzkomórkowych. W badaniach dotyczących regulacji oraz poziomu ekspresji genów drugiej wyspy patogenności, do indukcji ekspresji genów SPI2 w hodowlach bakteryjnych *in vitro* stosuje się kilka rodzajów zdefiniowanej pożywki minimalnej imitującej środowisko wewnątrz wakuoli, w której żyje *Salmonella* [65, 124, 125]. Stymulację sekrecji białek kodowanych w obszarze SPI2, do których należy *sifB*, można uzyskać *in vitro* w warunkach ograniczonej dostępności czynników odżywczych, hodując bakterie w

pożywkach składających się z soli nieorganicznych, zawierających minimalne stężenia jonów magnezu, glicerol oraz kwaśny hydrolizat kazeiny, np. w pożywce MgM [65, 124]. Skład tych pożywek przedstawiono w Tabeli 24 w rozdziale Załączniki. Czynniki niezależnie aktywującymi SPI2 w tych warunkach są prawdopodobnie: (a) ograniczony dostęp fosforu nieorganicznego, występującego w stężeniu mniejszym niż 1 mM, (b) pH o wartości w zakresie 4,6 - 6,2, (c) niskie, kilkumikromolowe stężenie jonów magnezu [64, 124]. W odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska uczestniczy system regulacyjny SsrAB, który aktywuje ekspresję genów SPI2, jednakże nie znane są konkretne czynniki rozpoznawane przez ten system [126, 127].

Sprawdzono, czy promotor *PsifB* jest aktywowany w pożywce MgM o pH = 7,4. Sprawdzono również jak pożywka stosowana do hodowli komórek eukariotycznych i używana podczas zakażenia komórek eukariotycznych przez bakterie *S. typhimurium* (Opti-MEM) wpływa na aktywność promotora *PsifB*. W tym celu bakterie VNP20009 transformowane plazmidem pBR322-*PsifB-gfp* lub pBR322-*PsifB-6xHis-sipB-gfp* hodowano w pożywce TB lub LB, które nie powinny indukować *PsifB*, oraz w pożywce MgM lub Opti-MEM.

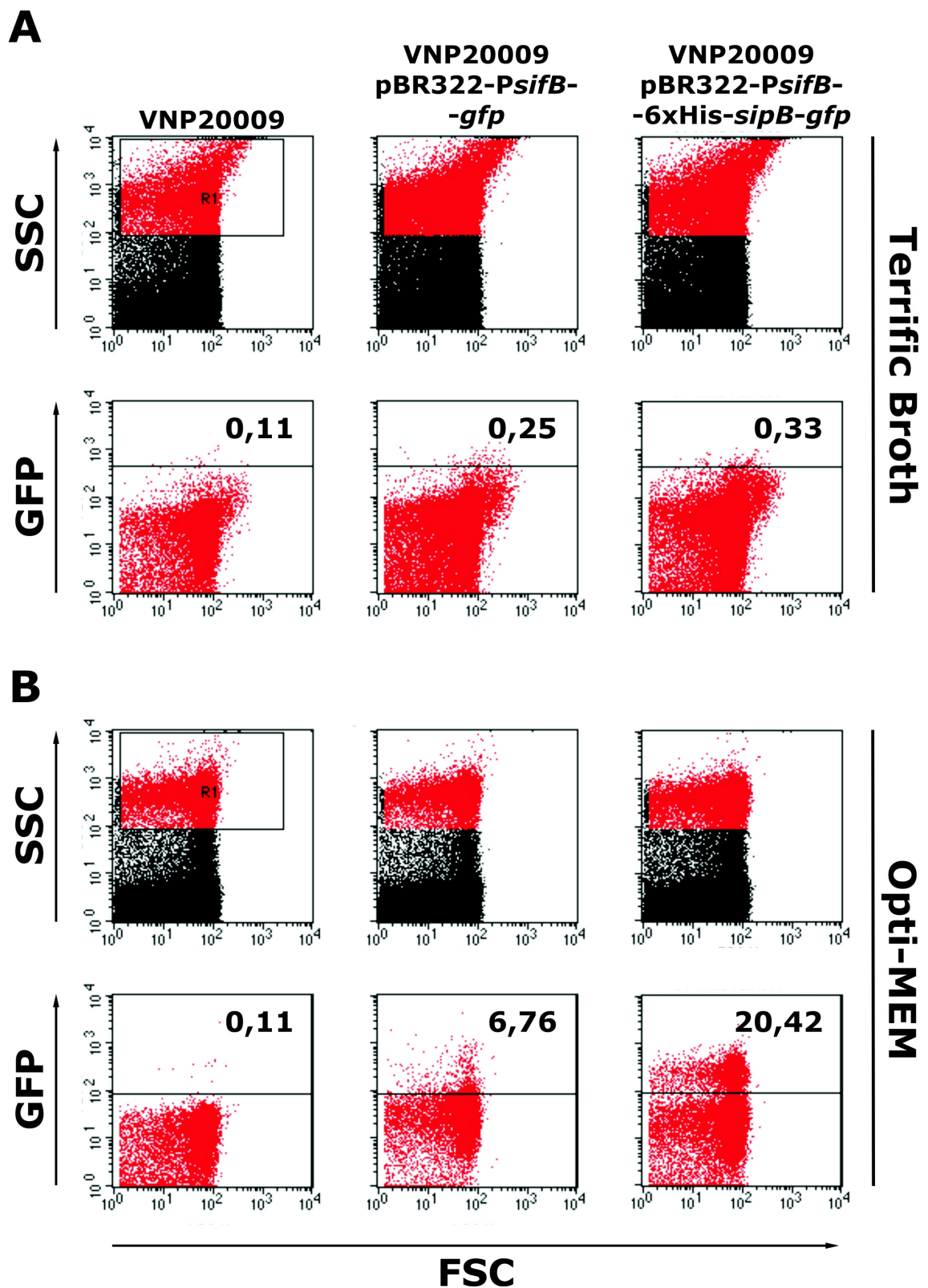
Bakterie w logarytmicznej fazie wzrostu zawieszono w różnych pożywkach, w gęstości  $6 \cdot 10^6$  bakterii/ml i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 30°C przez 16 godz. Następnie ekspresję GFP analizowano przy pomocy cytofluorymetru przepływowego. W Tabeli 16 przedstawiono wynik analizy ekspresji GFP i 6xHis-SipB-GFP w bakteriach hodowanych w pożywce LB, TB lub MgM.

**Tabela 16. Ekspresja białka GFP oraz 6xHis-SipB-GFP pod kontrolą promotora *PsifB* w bakteriach *S. typhimurium* VNP20009.**

	VNP20009 pBR322- <i>PsifB-gfp</i>	VNP20009 pBR322- <i>PsifB-6xHis-sipB-gfp</i>
<b>LB</b>	0,16*	0,15
<b>TB</b>	0,05	0,11
<b>MgM</b>	41,2	45,2

\* procent bakterii wykazujących ekspresję GFP lub 6xHis-SipB-GFP, z całej populacji bakterii.

W niezależnym doświadczeniu porównano ekspresję GFP i 6xHis-SipB-GFP w bakteriach hodowanych w pożywce TB lub Opti-MEM (Rys. 32).



**Rys. 32. Analiza cytofluorymetryczna ekspresji GFP oraz białka fuzyjnego 6xHis-SipB-GFP w hodowlach bakteryjnych.** Bakterie *S. typhimurium* VNP20009 transformowane plazmidem pBR322-*PsifB-gfp* lub pBR322-*PsifB-6xHis-sipB-gfp* hodowano w pożywce TB (A) lub Opti-MEM (B). Kontrolą były bakterie VNP20009. Analizowano ekspresję GFP w populacji bakterii zaznaczonej bramką R1. Podano procent komórek wykazujących zieloną fluorescencję. Wynik jest reprezentatywny dla trzech doświadczeń.



Bakterie hodowane w TB nie wykazywały ekspresji GFP. W hodowlach prowadzonych w pożywkach MgM oraz Opti-MEM pojawia się populacja bakterii wykazująca fluorescencję specyficzną dla białka GFP, co jest dowodem znaczącej ekspresji GFP lub białka fuzyjnego 6xHis-SipB-GFP. Indukcja ekspresji GFP świadczy o funkcjonalności sekwencji promotora *PsifB* oraz o wybiórczej aktywacji ekspresji pod kontrolą tego promotora w zależności od warunków hodowli.

Sprawdzono, czy promotor *PsifB* może być aktywowany w bakteriach *Escherichia coli*, które są spokrewnione z *S. typhimurium*, ale nie posiadają wysp genowych specyficznych dla *Salmonella*. Stwierdzono, że *E. coli* DH5 $\alpha$  stransformowane plazmidem pBR322-*PsifB-gfp* nie wykazywały fluorescencji właściwej GFP (nie pokazano). Ten wynik sugeruje, że do ekspresji białka pod kontrolą *PsifB* wymagane są białka regulatorowe nieobecne w *E. coli*, a specyficzne dla *S. typhimurium*.

## **5. Integracja kasety ekspresyjnej *PsifB*-6xHis-*sipB* do chromosomu VNP20009.**

Przy pomocy analizy cytofluorymetrycznej hodowli bakterii oraz komórek RAW264.7 zakażonych bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem kodującym GFP lub 6xHis-SipB-GFP pod kontrolą *PsifB* wykazano aktywność klonowanego promotora *PsifB*. *PsifB* może kontrolować ekspresję GFP oraz 6xHis-SipB znakowanego na C-końcu białkiem GFP. Specyficznie warunkowana aktywacja *PsifB* dopiero w bakteriach wewnątrzkomórkowych powinna prowadzić do ekspresji 6xHis-SipB, która nie będzie osłabiała żywotności bakterii hodowanych w pożywce nieindukującej *PsifB*. Osłabienie żywotności bakterii VNP20009 obserwowano, gdy ekspresja białka 6xHis-*sipB* była kontrolowana przez promotor PT5//*lacO*. Ekspresja 6xHis-SipB obniżająca żywotność bakterii, ale wyłącznie po zakażeniu komórek eukariotycznych i tylko bakterii wewnątrzkomórkowych, mogłaby być źródłem dodatkowej atenuacji szczepu VNP20009.

Nadekspresja białka z plazmidu jest związana z koniecznością koekspresji genu warunkującego oporność na czynnik selekcyjny. Najczęściej stosowane, również w tej pracy, systemy nadekspresji z wektora plazmidowego są oparte o selekcję antybiotykową, co znacząco ułatwia badania. Wadą jest to, że brak antybiotyku w środowisku wzrostu bakterii generuje presję selekcyjną prowadzącą do inaktywacji źródła nadekspresji toksycznego białka poprzez utratę kodującego go plazmidu. Tymczasem pożądaną cechą bakteryjnego wektora szczepionkowego jest jego stabilność genetyczna pod nieobecność czynnika selekcyjnego. Ponadto obecność lekooporności w żywym materiale szczepionkowym budzi obawy ze względu na ewentualny transfer genu oporności do spokrewnionych gatunków.

W celu uzyskania stabilnej genetycznie modyfikacji właściwości proapoptotycznych szczepu *S. typhimurium* VNP20009 kasetę ekspresyjną *PsifB*-6xHis-*sipB* wbudowano do chromosomu VNP20009.

Kasetę *PsifB*-6xHis-*sipB* skonstruowano w kolejnych etapach:

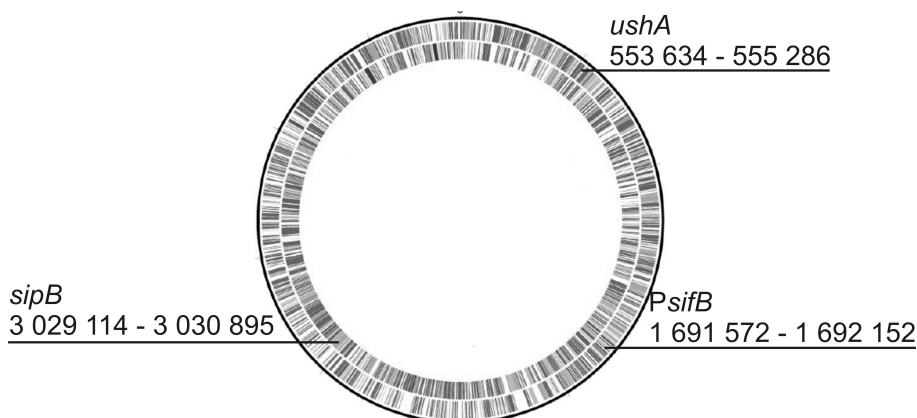
1. Z plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* w reakcji PCR otrzymano fragment 6xHis-*sipB*.
2. Produkt reakcji PCR wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Otrzymano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB*.
3. Z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB* uzyskano fragment 6xHis-*sipB*, który wklonowano do pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*. Otrzymano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB*.

Następnie przygotowano plazmid służący do wbudowania fragmentu *PsifB*-6xHis-*sipB* do genomu bakterii VNP20009. W tym celu kasetę tę wycięto z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB* i wstawiono do plazmidu pSG76C.

Do przeprowadzenia integracji kasety *PsifB*-6xHis-*sipB* z DNA genomowym wybrano metodę bazującą na naturalnej aktywności rekombinazowej i naprawczej rekombinazokompetentnych szczepów bakterii, która umożliwia miejscowo-specyficzne wprowadzenie delecji, insercji lub mutacji punktowych [111]. Warunkowo replikujący plazmid niosący planowaną mutację oraz miejsce restrykcyjne dla meganukleazy I-SceI zostaje wbudowany do genomu w wyniku rekombinacji homologicznej pomiędzy sekwencją dziką i zmutowaną. Przejściowy stan duplikacji sekwencji homologicznych prowadzi do wewnątrzcząsteczkowej rekombinacji, która dodatkowo jest stymulowana przecięciem chromosomu we wprowadzonym miejscu I-SceI. Skutkiem tej rekombinacji jest pozostawienie zmienionego fragmentu DNA w genomie lub powrót do formy dzikiej. W wyniku przeprowadzonej procedury otrzymuje się zmodyfikowany szczep pozbawiony lekooporności. Szczegółowy opis metody przedstawiono w rozdziale Materiały i metody.

Jako miejsce docelowe integracji, które było podstawą zajścia rekombinacji homologicznej z udziałem DNA genomowego VNP20009 i DNA plazmidowego, wybrano rejon genu *ushA* (*S. typhimurium* LT2, STM0494). Gen *ushA* *S. typhimurium* ma wysoką homologię z *ushA* *E. coli*, ale wykazuje bardzo niską ekspresję, a kodowana przez niego hydrolaza UDP-glukozy charakteryzuje się bardzo niską aktywnością enzymatyczną. Wynika to z faktu, że gen *ushA* w szczepach *S. typhimurium* uległ inaktywacji w wyniku mutacji punktowej (ang. *silent gene*). Jego funkcjonalnym aktywnym analogiem jest *ushB*; sekwencje tych genów nie wykazują znaczącej homologii [128, 129]. Z tego względu insercja dodatkowego fragmentu DNA w tym miejscu nie powinna wywołać zmian fenotypowych. Założono również, że znaczna odległość lokalizacji sekwencji *ushA* od *PsifB* i *sipB* w genomie *S. typhimurium* (Rys. 33), przynajmniej w sensie długości dzielących je fragmentów DNA

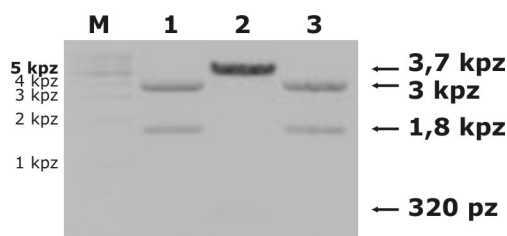
wzdłuż genomu, ograniczy niestabilność genomową zmodyfikowanego szczepu, związaną z wprowadzeniem dodatkowych kopii tych sekwencji, które mogą być substratem dla rekombinacji homologicznej (G. Pósfai, informacja ustna).



**Rys. 33. Względne położenie sekwencji genu *sipB*, promotora *PsifB* i miejsca insercji kasety *PsifB*-6xHis-*sipB* (gen *ushA*) w genomie *Salmonella typhimurium* LT2.** Położenie fragmentów *ushA*, *sipB* i *PsifB* podano według sekwencji genomu zdeponowanej w bazie GenBank pod numerem AE006468.1. Schemat genomu pochodzi z [4].

### 5.1. Uzyskanie genu 6xHis-*sipB* z plazmidu pQE30-6xHis-*sipB*. Umieszczenie 6xHis-*sipB* pod kontrolą *PsifB*.

Z plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* otrzymano sekwencję kodującą *sipB* wraz z sekwencją kodującą miejsce wiązania rybosomu (RBS), kodonem START oraz etykietką histydynową w reakcji PCR ze starterami F*sipB*gl oraz R*sipB*gl, zawierającymi miejsce restrykcyjne *Bgl*II. Produkt reakcji PCR o długości 1919 pz wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> i namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α. Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-6xHis-*sipB* poddano trawieniu enzymem *Bgl*II, a uzyskany fragment DNA (1908 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB* w miejsce restrykcyjne *Bgl*II. Orientację sekwencji 6xHis-*sipB* względem promotora *PsifB* sprawdzono poddając DNA plazmidowe działaniu enzymów restrykcyjnych *Ap*I i *Sma*I (Rys. 34).



**Rys. 34. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB* poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych *Ap*I i *Sma*I.** Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). 1, 2, 3 - DNA plazmidowe wyizolowane z trzech różnych klonów bakterii. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

W wyniku trawienia DNA plazmidowego uzyskanego z klonu 1 i 3 otrzymano fragmenty DNA o długości około 3 kpz i 1,8 kpz, potwierdzające orientację wklonowanego genu 6xHis-*sipB* zgodną z orientacją *PsifB*. Namnożono klon bakterii numer 1, a wyizolowane DNA plazmidowe wykorzystano w kolejnym etapie pracy.

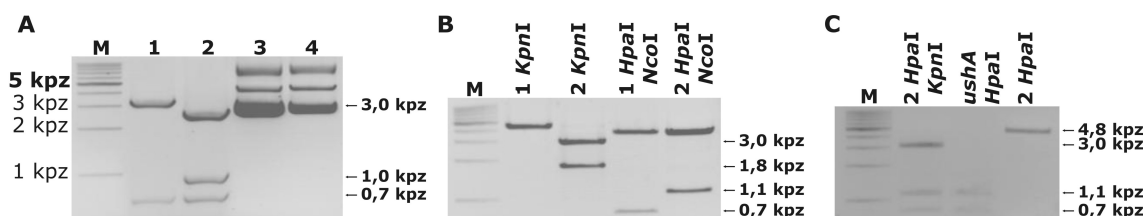
## 5.2. Klonowanie kasyety *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' do plazmidu pSG76C.

Do przeprowadzenia integracji wykorzystano warunkowo replikujący plazmid pSG76C. Uzyskanie konstruktów umożliwiających integrację plazmidu do genomu na drodze rekombinacji homologicznej wymagało wklonowania do pSG76C kasyety *PsifB*-6xHis-*sipB*, oflankowanej sekwencjami homologicznymi do sekwencji genomowego DNA w obszarze wybranego miejsca insercji. Zatem pełny konstrukt włączony do plazmidu pSG76C zawierał kolejno następujące fragmenty: *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3'.

Kolejne etapy pracy obejmowały:

1. Uzyskanie sekwencji kodującej *ushA* z DNA genomowego.
2. Włączenie genu *ushA* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Uzyskanie plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*.
3. Wklonowanie kasyety *PsifB*-6xHis-*sipB* wyciętej z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*, w obrębie *ushA*. Uzyskanie plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3'.
4. Przeklonowanie kasyety *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' do plazmidu pSG76C.

W pierwszym etapie pracy z DNA genomowego VNP20009 uzyskano sekwencję kodującą *ushA*, w reakcji PCR ze starterami FushA i RushA, zawierającymi miejsce restrykcyjne dla enzymu *KpnI*. Produkt PCR (1825 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> i namnożono w bakteriach *E. coli* DH5 $\alpha$ . Aby wybrać klony zawierające plazmid z wstawką i określić jej orientację, przeprowadzono analizę restrykcyjną DNA plazmidowego, wyizolowanego z czterech klonów bakterii (Rys. 35).



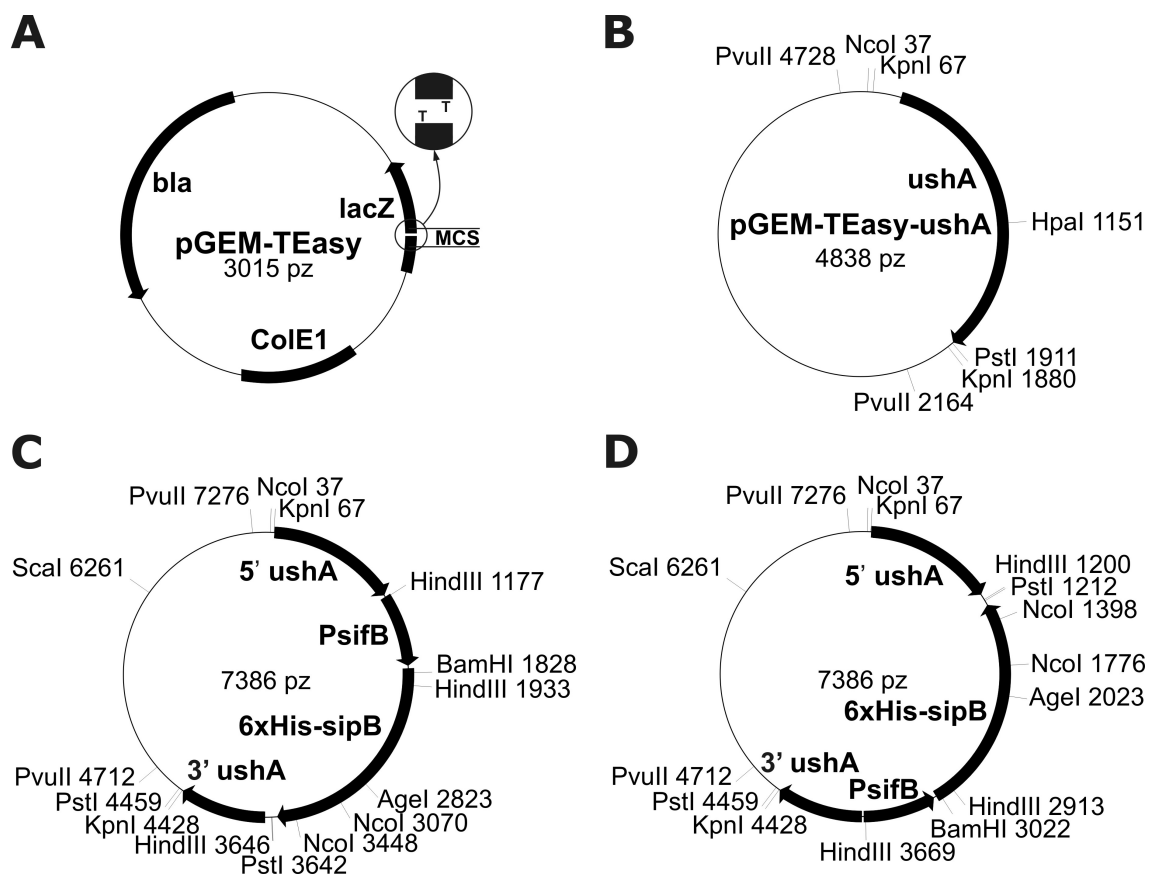
**Rys. 35. Rozdział elektroforetyczny fragmentów plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* uzyskanych w wyniku działania enzymów restrykcyjnych.** Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). (A) 1 - 4 - DNA plazmidowe wyizolowane z czterech różnych klonów bakterii, poddane działaniu enzymu *EcoRI*. (B) Plazmidy wybrane na podstawie

(A), otrzymane z klonów numer 1 i 2, poddane działaniu enzymów *KpnI* oraz *HpaI* i *NcoI*. (C) Plazmid wyizolowany z klonu 2 (ścieżka druga i czwarta) oraz produkt reakcji PCR, uzyskany z DNA genomowego VNP20009 (ścieżka trzecia), poddane działaniu enzymów *HpaI* i *KpnI* oraz *HpaI*. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

Enzym *EcoRI* trawił plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* na trzy fragmenty o długościach: 2997 pz oraz w zależności, czy *ushA* był wstawiony w orientacji zgodnej czy przeciwnej do numeracji plazmidu, odpowiednio 1070 lub 1076 pz i 771 lub 765 pz, a więc ta analiza nie pozwala na określenie orientacji wbudowanej sekwencji. Po stwierdzeniu obecności prążków o oczekiwanych wielkościach w elektroforezie plazmidowego DNA klonów bakterii 1 i 2 (Rys. 35A), zweryfikowano obecność prawidłowej wstawki poprzez trawienie plazmidów enzymem *KpnI* oraz parą enzymów *HpaI* i *NcoI*. Jedynie w wyniku trawienia plazmidu 2 w elektroforezie uzyskano prążki odpowiadające oczekiwany fragmentom: w przypadku trawienia *KpnI* - 3025 pz i 1813 pz, a w przypadku zastosowania *HpaI* i *NcoI*: 3724 pz i 1114 pz (Rys. 35B). Taki wynik świadczył o tym, że sekwencja kodująca fragment genu *ushA* została wstawiona do plazmidu w orientacji zgodnej z numeracją plazmidu. Aby potwierdzić orientację wstawki, plazmid wyizolowany z klonu 2 poddano działaniu enzymów *HpaI* i *KpnI* lub tylko *HpaI*. W elektroforezie uzyskano oczekiwany wzór prążków: po działaniu *HpaI* jeden prążek mogący odpowiadać fragmentowi 4838 pz (Rys. 35C, czwarta ścieżka); po działaniu *HpaI* i *KpnI* prążki mogące odpowiadać oczekiwany produktom: 3025 pz, 1084 pz i 729 pz (Rys. 35C, druga ścieżka). Porównano także produkty działania enzymu *HpaI* na produkt reakcji PCR *ushA* z produktami działania enzymów *HpaI* i *KpnI* na plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*. Otrzymane fragmenty DNA miały taką samą i zgodną z oczekiwaną długość (Rys. 35C, ścieżki druga i trzecia).

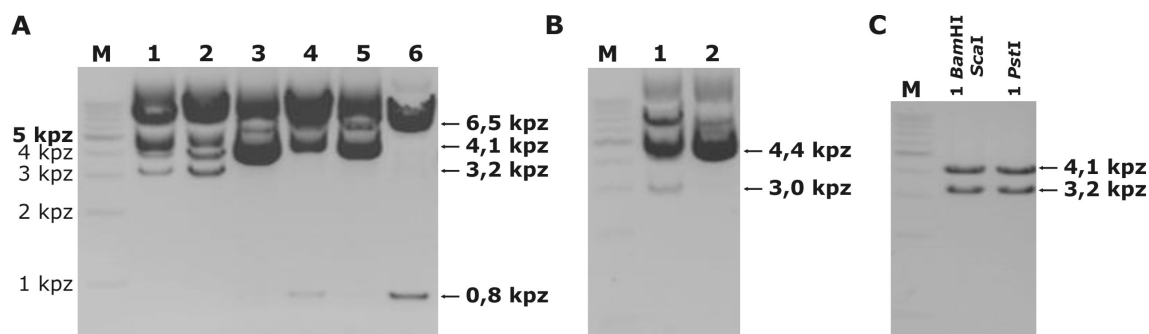
Na podstawie analizy restrykcyjnej wybrano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* wyizolowany z klonu numer 2, z genem *ushA* wstawionym w orientacji zgodnej z numeracją plazmidu.

Następnie z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*-6xHis-*sipB* uzyskano kasetę *PsifB*-6xHis-*sipB* poprzez poddanie go działaniu enzymu *NotI* i wypełnienie lepkich końców. Sekwencję tę wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* w obrębie *ushA*, wykorzystując miejsce restrykcyjne *HpaI*, zlokalizowane mniej więcej w połowie długości fragmentu *ushA*. Wstawka mogła zostać wbudowana do plazmidu w orientacji zgodnej lub przeciwnej do orientacji *ushA* (Rys. 36).



**Rys. 36. Klonowanie sekwencji *PsifB-6xHis-sipB* do plazmidu *pGEM-T<sub>Easy</sub>-ushA*. (A)** Schemat plazmidu *pGEM-T<sub>Easy</sub>*. *lacZ* - sekwencja kodująca peptyd  $\alpha$  enzymu  $\beta$ -galaktozydazy; MCS - polilinker; *ColE1* - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen kodujący oporność na ampicylinę. Zaznaczono miejsce wstawienia produktu PCR w obrębie MCS. **(B)** Plazmid *pGEM-T<sub>Easy</sub>-ushA*. **(C)** Plazmid *pGEM-T<sub>Easy</sub>-ushA* z fragmentem *PsifB-6xHis-sipB* wstawionym w orientacji zgodnej z orientacją *ushA*. **(D)** Plazmid o odwrotnej orientacji wstawki względem *ushA*.

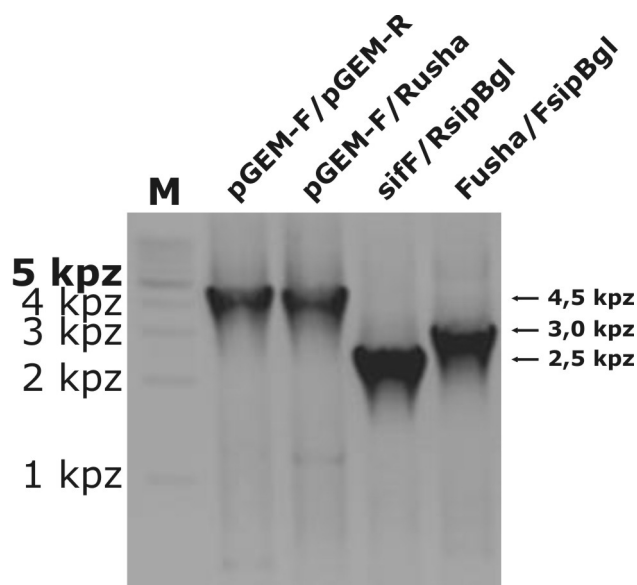
Przeprowadzono analizę restrykcyjną DNA plazmidowego wyizolowanego z sześciu różnych klonów bakterii transformowanych plazmidem *pGEM-T<sub>Easy</sub>-ushA-5'-PsifB-6xHis-sipB-ushA-3'* (Rys. 37). Celem analizy był wybór klonu bakterii zawierającego plazmid, w którym fragment *PsifB-6xHis-sipB* jest wstawiony tak, że orientacja promotora i genu jest przeciwna do orientacji sekwencji kodującej *ushA*. Uzasadnieniem wyboru takiej orientacji jest fakt, że w dalszym etapie pracy konstrukt miał zostać wbudowany do genomu VNP20009 w wyniku rekombinacji homologicznej z udziałem *ushA*. Gen *ushA* jest poprzedzony sekwencją promotorową. Ważne było, aby wyeliminować możliwość wpływu aktywności promotora genu *ushA* na ekspresję *6xHis-sipB*.



**Rys. 37. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych. Produkty reakcji analizowano w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). (A) 1 - 6 - DNA plazmidowe wyizolowane z sześciu różnych klonów bakterii, poddane działaniu enzymu *Pst*I. (B) Plazmidy wyizolowane z klonów 1, 2 i 6, trawione enzymem *Kpn*I. (C) DNA plazmidowe wyizolowane z klonu 1, poddane działaniu *Bam*HI i *Sca*I lub *Pst*I.**

Wynikiem działania enzymu *Pst*I powinny być fragmenty o długości: 817 pz i 6469 pz, gdy kasetta *PsifB*-6xHis-*sipB* została włączona do pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* w orientacji zgodnej z orientacją *ushA*, lub 3247 pz i 4139 pz, gdy kasetta była wstawiona w orientacji przeciwnej do orientacji *ushA*. Na podstawie rozdziału przedstawionego na Rys. 37A wybrano klony 1 i 2, które następnie poddano działaniu enzymu *Kpn*I. Niezależnie od orientacji wstawki oczekiwano fragmentów o długościach odpowiadających 4361 pz i 3025 pz. Do dalszej analizy wybrano klon 1. Z DNA plazmidowego wyizolowanego z klonu 1, poddanego działaniu *Bam*HI i *Sca*I oraz *Pst*I otrzymano fragmenty DNA o długościach odpowiednio około 3200 pz i 4150 pz oraz 3250 pz i 4100 pz, które potwierdzały orientację kasety *PsifB*-6xHis-*sipB* przeciwną do orientacji *ushA*.

W uzupełnieniu do analizy restrykcyjnej wykonano analizę sekwencji plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' metodą PCR. Na Rys. 38 przedstawiono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.



**Rys. 38. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych na matrycy DNA plazmidowego pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3'.** Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Reakcję PCR przeprowadzono ze starterami komplementarnymi do sekwencji plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> (pGEM-F i pGEM-R) oraz do sekwencji *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' (Rusha, sifF, RsipBgl, Fusha, FsipBgl).

W reakcji ze starterami pGEM-F i pGEM-R, komplementarnymi do sekwencji flankujących miejsce wstawienia *ushA* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>, uzyskano produkt o długości odpowiadającej długości oczekiwanej (4542 pz). Produktem reakcji ze starterami pGEM-F i Rusha był fragment o długości odpowiadającej 4452 pz, potwierdzający orientację *ushA* zgodną z numeracją plazmidu. W reakcji ze starterami sifF i RsipBgl otrzymano produkt potwierdzający prawidłową orientację 6xHis-*sipB* względem *PsifB*, o długości odpowiadającej 2498 pz, a w wyniku reakcji ze starterami Fusha i FsipBgl - produkt odpowiadający 3022 pz potwierdzający, że kasetka *PsifB*-6xHis-*sipB* jest wstawiona do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA* w orientacji przeciwnej do orientacji *ushA*. Długości produktów reakcji potwierdzają zaplanowaną orientację poszczególnych elementów konstruktów.

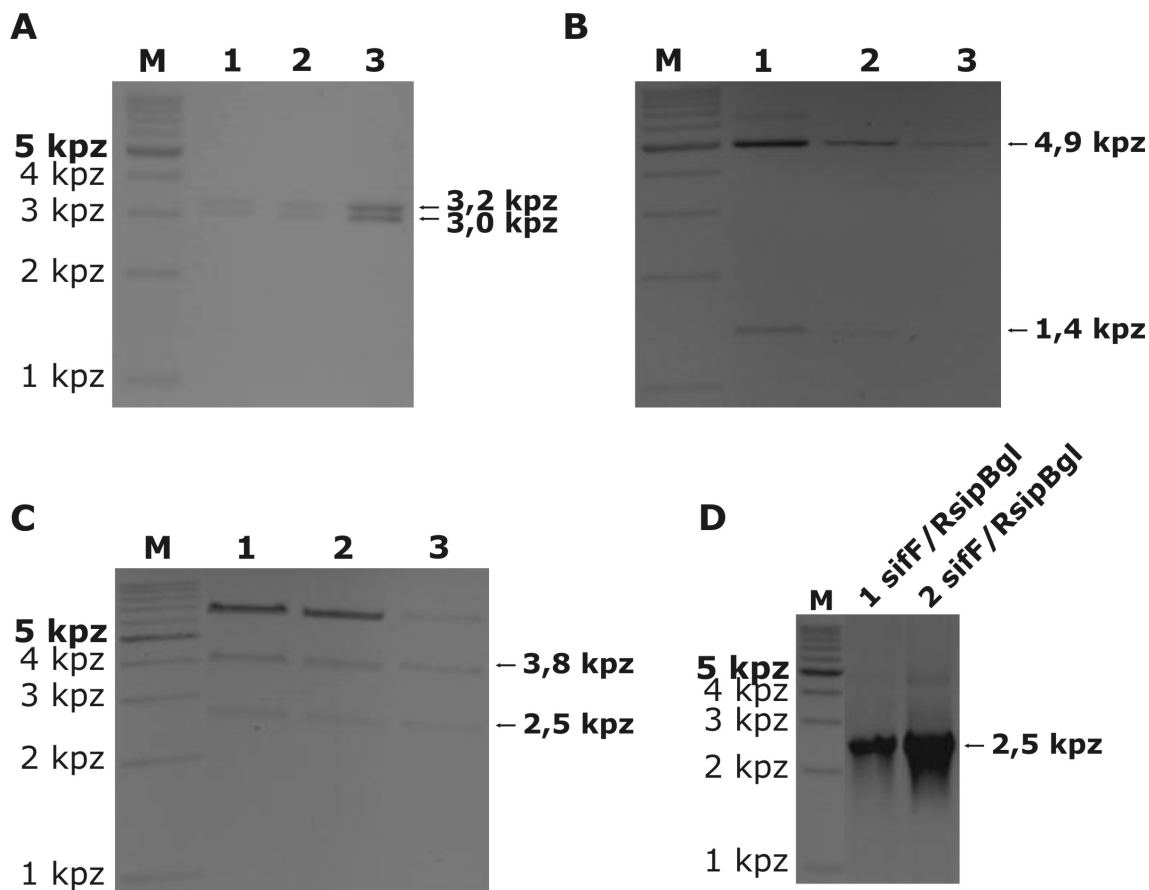
W efekcie kasetka *PsifB*-6xHis-*sipB* została oflankowana fragmentami homologii: *ushA*-5' o długości 1091 pz na końcu 5' i *ushA*-3' o długości 732 pz na końcu 3', spełniając tym samym warunek zalecanej dla efektywności metody, minimalnej długości fragmentów homologii (500 pz).

Kolejny etap polegał na przeklonowaniu konstruktów przygotowanego w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub> do plazmidu integracyjnego pSG76C. Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' namnożono w bakteriiach *E. coli* DH5 $\alpha$ , a następnie kasetę *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' (4361 pz) wycięto enzymem *KpnI* i wstawiono do plazmidu pSG76C w miejsce restrykcyjne *KpnI*. Plazmid pSG76C-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3', nazywany dalej pSG76C-USS, namnożono w bakteriiach DH5 $\alpha$ .*pir*.



Specyficzne miejsce *ori* plazmidu pSG76C powoduje, że do replikacji jest wymagane białko  $\Pi$ . Dlatego plazmid pSG76C-USS namnożono i oczyszczono z bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$ .*pir*, które mają genomową kopię genu *pir*, kodującego białko  $\Pi$ .

Przeprowadzono analizę restrykcyjną DNA plazmidowego wyizolowanego z trzech klonów bakterii DH5 $\alpha$ .*pir* transformowanych plazmidem pSG76C-USS oraz analizę sekwencji metodą PCR (Rys. 39).



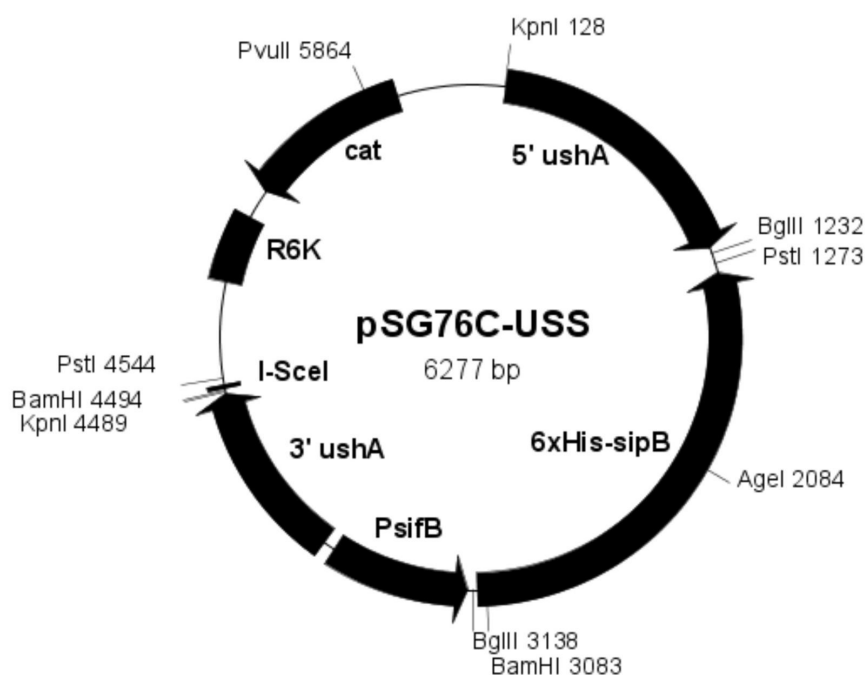
**Rys. 39. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pSG76C-USS poddane działaniu enzymów restrykcyjnych oraz produktów uzyskanych w reakcji PCR na matrycy DNA plazmidowego.** Fragmenty DNA rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). DNA plazmidowe wyizolowane z trzech klonów bakterii trawiono enzymami: **(A)** *Pst*I, **(B)** *Bam*HI lub **(C)** *Age*I i *Pvu*II. **(D)** Produkty reakcji PCR ze starterami *siff* i *RsipBgl* na matrycy DNA plazmidowego uzyskanego z klonu bakterii numer 1 lub 2.

W Tabeli 17 podano oczekiwane długości fragmentów plazmidu pSG76C-USS uzyskanych w wyniku działania enzymów restrykcyjnych, potwierdzające orientację *ushA* w klonowanej kasecie zgodną lub przeciwną do orientacji plazmidu.

**Tabela 17. Oczekiwane długości fragmentów plazmidu pSG76C-USS poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych.**

ENZYM RESTRYKCYJNY	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Age</i> I i <i>Pvu</i> II
<b>ORIENTACJA <i>ushA</i></b>			
Zgodna z orientacją plazmidu	3271 i 3006 pz	1411 i 4866 pz	3780 i 2497 pz
Przeciwna do orientacji plazmidu	1196 i 5081 pz	2964 i 3313pz	3335 i 2942 pz

Na podstawie analizy restrykcyjnej wybrano plazmid wyizolowany z klonu bakterii numer 1. W wyniku trawienia plazmidu enzymami *Pst*I, *Bam*HI oraz *Age*I i *Pvu*II uzyskano fragmenty DNA o długościach odpowiednio około: 3,0 i 3,2 kpz, 4,9 i 1,4 kpz oraz 2,5 i 3,8 kpz (Rys. 39A, B, C). Dodatkowy fragment o długości około 6,5 kpz jest prawdopodobnie produktem niekompletnego trawienia plazmidu, wynikającego z niskiej aktywności enzymu *Age*I. Długości uzyskanych fragmentów DNA wskazują, że kasetta *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' jest prawidłowo wstawiona do plazmidu, a orientacja fragmentów genu *ushA* jest zgodna z numeracją plazmidu. W reakcji PCR ze starterami *sifF* i *RsipBgl* uzyskano produkt o długości odpowiadającej oczekiwanej długości tego fragmentu (2498 pz, Rys. 39D). Schemat plazmidu pSG76C-USS przedstawiono na Rys. 40.



**Rys. 40. Schemat plazmidu integracyjnego pSG76C-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' (pSG76C-USS).** 6xHis-*sipB* - sekwencja kodująca białko 6xHis-SipB; *PsifB* - promotor genu *sifB*; 5' *ushA*, 3' *ushA* - fragmenty sekwencji genu *ushA*; R6K - miejsce *ori* plazmidu; I-SceI - 18-nukleotydowe miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez meganukleazę I-SceI; *cat* - gen kodujący acetylotransferazę chloramfenikolu, warunkującą oporność na chloramfenikol.

Plazmid pSG76C-USS namnożono i oczyszczono z bakterii *E. coli* DH5α.*pir*, a uzyskane DNA wykorzystano do transformacji bakterii VNP20009.

### **5.3. Integracja plazmidu pSG76C-USS do chromosomu VNP20009.**

Specyficzne miejsce *ori* plazmidu pSG76C powoduje, że do replikacji jest wymagane białko Π. Dlatego plazmid pSG76C-USS namnożono i oczyszczono z bakterii *E. coli* DH5α.*pir*, które mają genomową kopię genu *pir*, kodującego białko Π.

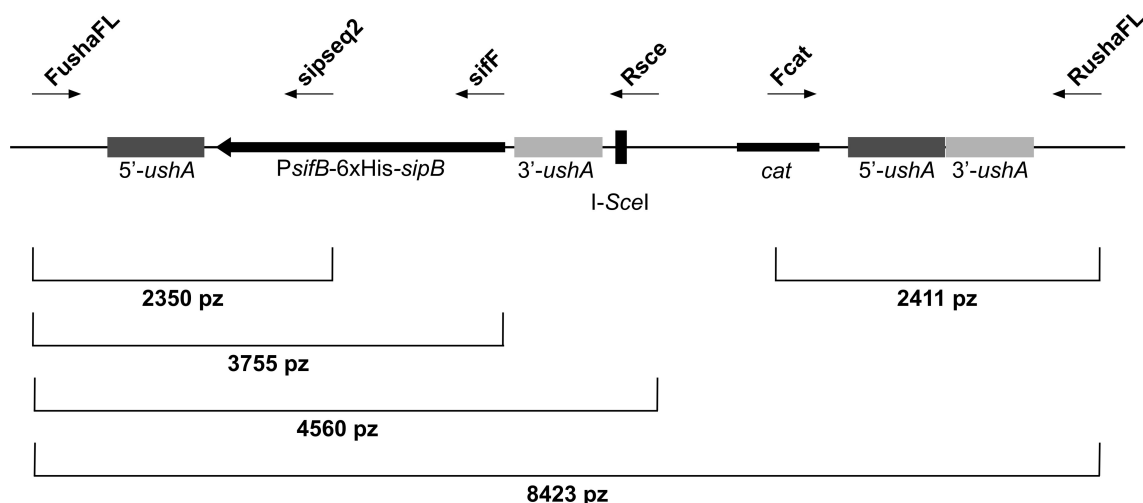
Warunkiem wbudowania plazmidu pS76C-USS do genomu VNP20009 w wyniku rekombinacji homologicznej jest jego replikacja i namnożenie w VNP20009. Aby dostarczyć gen *pir*, kodujący białko Π, bakterie VNP20009 transformowano plazmidem pPIR-A, kodującym Π. Plazmid ten posiada gen *bla* warunkujący oporność na ampicylinę oraz warunkowo replikujące *ori* pSC101 i może replikować w temperaturze 30°C, natomiast nie jest namnażany w temperaturze 37°C - 42°C. Warunkowa replikacja jest źródłem presji selekcyjnej w kierunku propagacji tych bakterii, w których doszło do włączenia pSG76C-USS do genomu VNP20009, kiedy temperatura hodowli bakterii zostaje zmieniona z 30°C na 42°C, i równocześnie zostaje utrzymana selekcja antybiotykowa.

W bakteriach hodowanych w temperaturze 30°C możliwe jest namnażanie plazmidu pPIR-A i równocześnie ekspresja białka Π. Po przeniesieniu bakterii do temperatury 42°C, białko Π jest stopniowo rozcieńczane w hodowli w wyniku kolejnych podziałów komórkowych. Konsekwencją tego procesu jest specyficzny wygląd kolonii bakteryjnych rosnących na podłożu stałym z chloramfenikolem, po zmianie temperatury hodowli z 30°C na 42°C. W wyniku utraty plazmidu pPIR-A, a w następstwie również pSG76C-USS, początkowo homogenna, okrągła kolonia zaczyna rosnać nierównomiernie. Część bakterii zaprzestaje podziałów ze względu na utratę oporności na chloramfenikol, kodowanej na plazmidzie pSG76C-USS, a dzielą się dalej bakterie potomne komórki, w której doszło do wbudowania pSG76C-USS z genem *cat* do genomu. Na podłożu stałym uzyskuje się liczne drobne kolonie oraz kilka do kilkunastu dużych kolonii. Opisane poniżej warunki hodowli opracowano w oparciu o literaturę [111], wprowadzając modyfikacje wynikające ze wstępnych doświadczeń.

Bakterie VNP20009 transformowane plazmidem pPIR-A transformowano plazmidem pSG76C-USS. Bakterie wysiano na podłoże stałe z ampicyliną i chloramfenikolem i hodowano w temperaturze 30°C przez 40 godz. Następnie dwie pojedyncze kolonie wysiano na podłoże stałe z chloramfenikolem i hodowano w temperaturze 30°C. Z uzyskanych pojedynczych kolonii, osiem kolonii przesiano na podłoże stałe z chloramfenikolem i hodowano przez 5 godz. w temperaturze 30°C, po czym to samo podłoże przeniesiono do temperatury 42°C i hodowano przez 17 godz., a przez

następne 7 godz. w temperaturze 37°C, w celu selekcji klonów, które uzyskały chromosomową oporność na chloramfenikol. Spośród kolonii opornych na chloramfenikol wybrano osiem dużych kolonii bakteryjnych, które przesiano na podłoże stałe z chloramfenikolem i hodowano przez 20 godz. w 37°C. Z uzyskanych pojedynczych kolonii wybrano osiem kolonii, po jednej spośród uzyskanych z każdego z ośmiu klonów, i przygotowano lizaty bakteryjne do reakcji PCR.

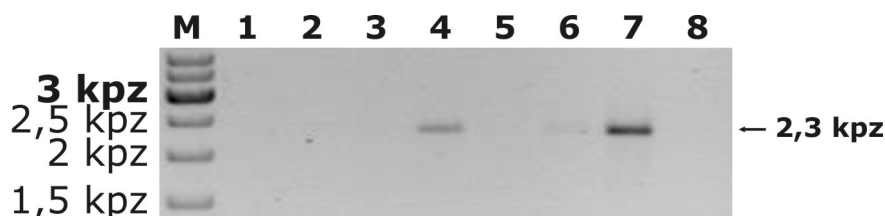
Przy pomocy analizy produktów reakcji PCR ze starterem komplementarnym do sekwencji flankujących miejsce integracji z genomem, czyli sekwencji *ushA* (FushaFL) oraz ze starterem komplementarnym do sekwencji plazmidowej pSG76C-USS (sipseq2 i RscE) sprawdzono, czy w wybranych koloniach zaszła integracja plazmidu do chromosomu na drodze rekombinacji homologicznej, czyli czy doszło do wbudowania plazmidu pSG76C-USS w miejsce genu *ushA*. Na Rys. 41 zaznaczono schematycznie lokalizację sekwencji komplementarnych do zastosowanych starterów. Na schemacie przedstawiono fragment DNA genomowego uzyskany w wyniku rekombinacji z udziałem genomowej sekwencji *ushA* oraz fragmentu 5'-*ushA* na DNA plazmidowym pSG76C-USS. Uwzględniono tę sytuację ze względu na długości fragmentów homologii 5'-*ushA* i 3'-*ushA* (odpowiednio 1091 pz i 732 pz). Przypuszczano, że większa długość 5'-*ushA* będzie zwiększać prawdopodobieństwo rekombinacji w udziale tego fragmentu.



**Rys. 41. Schemat sekwencji genomowej uzyskanej w wyniku rekombinacji homologicznej z udziałem genu *ushA* i plazmidowego regionu homologii 5'-*ushA*.** Zaznaczono startery użyte do analizy klonów opornych na chloramfenikol oraz długości produktów reakcji PCR z parami starterów (FushaFL i sipseq2, FushaFL i sifF, FushaFL i RscE, Fcat i RushaFL oraz FushaFL i RushaFL). 5'-*ushA* - fragment 5' genu *ushA* (1091 pz), 3'-*ushA* - fragment 3' genu *ushA* (732 pz); *PsifB-6xHis-sipB* - kasetę kodującą białko SipB znakowane etykietką histydynową pod kontrolą promotora *PsifB*; I-SceI - unikalne miejsce restrykcyjne o długości 18 pz, rozpoznawane i cięte przez endonukleazę I-SceI; *cat* - gen kodujący acetylotransferazę warunkującą oporność na chloramfenikol.

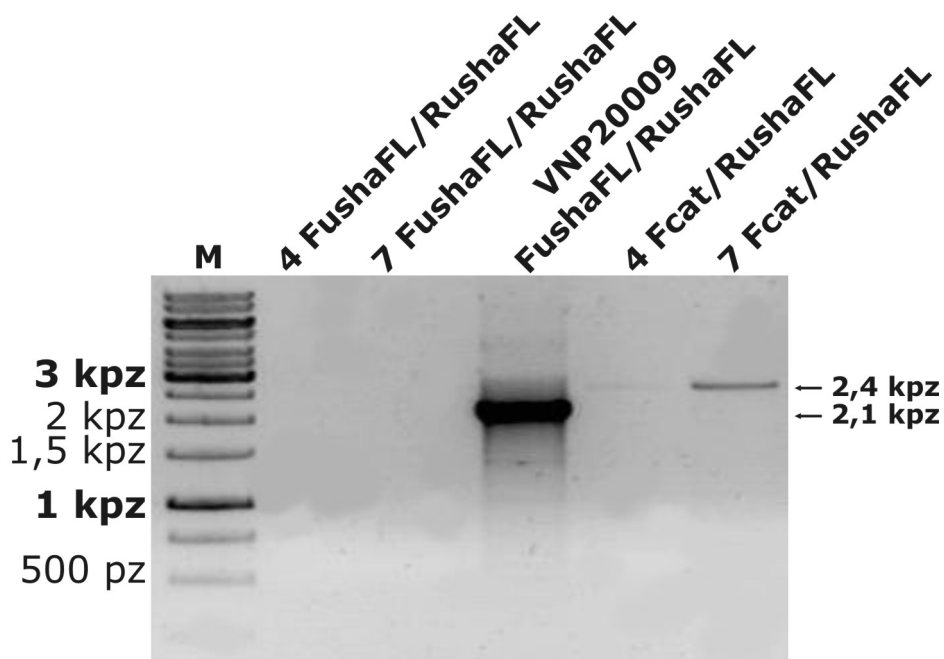
Integracja plazmidu mogła być wynikiem rekombinacji z udziałem fragmentu

homologii 5'-*ushA* lub 3'-*ushA*. Z tego względu mieszanina reakcyjna PCR zawierała startery FushaFL, sipseq2 i Rsce, aby w pojedynczej reakcji wykryć jedno z dwóch możliwych zdarzeń. Produkt reakcji o długości odpowiadającej 2349 pz świadczył o rekombinacji pomiędzy fragmentami 5'-*ushA* i był wynikiem amplifikacji ze starterami FushaFL i sipseq2. Natomiast produkt o długości 2000 pz mógł powstać w reakcji ze starterami FushaFL i Rsce, jeśli doszło do rekombinacji pomiędzy fragmentami 3'-*ushA*. Na Rys. 42 przedstawiono analizę produktów PCR.



**Rys. 42. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA genomowego bakterii, które otrzymano w wyniku integracji plazmidu pSG76C-USS do genomu VNP20009.** Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). 1 - 8 - DNA do reakcji PCR ze starterami FushaFL, sipseq2 i Rsce było przygotowane z ośmiu różnych klonów bakterii. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

Długość produktów PCR sugerowała, że w klonach numer 4 i 7 zaszła rekombinacja pomiędzy *ushA* w genomie VNP20009 a fragmentem 5'-*ushA* w plazmidzie pSG76C-USS. Przeprowadzono reakcje PCR z DNA genomowym klonów 4 i 7, ze starterami FushaFL i RushaFL oraz Fcat i RushaFL (Rys. 43).

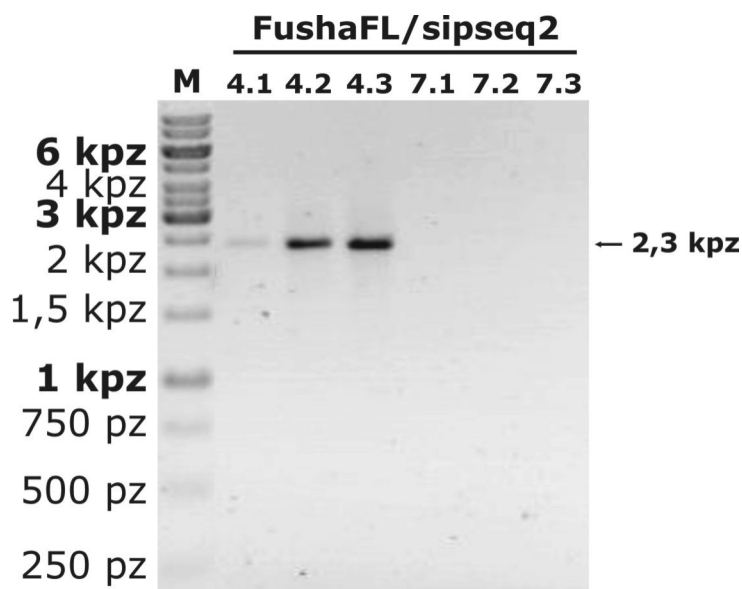


**Rys. 43. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA genomowego klonów bakterii otrzymanych w wyniku integracji pSG76C-USS do genomu VNP20009.** Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Reakcje przeprowadzono ze starterami FushaFL i RushaFL oraz Fcat i RushaFL, na DNA klonów bakterii numer 4 i 7 oraz niezmodyfikowanych bakterii VNP20009.

Jeśli, jak podejrzewano, nastąpiła integracja plazmidu pSG76C-USS z genomem VNP20009 w wyniku rekombinacji z udziałem fragmentu 5'-*ushA*, to reakcja PCR ze starterami FushaFL i RushaFL, w której zastosowano czas wydłużania starterów równy 2 min 30 s, nie umożliwiła uzyskania produktu (Rys. 43, ścieżki 2 i 3), gdyż miejsca hybrydyzacji starterów w zrekombinowanej matrycy były położone w odległości 8423 pz. Natomiast w tych samych warunkach reakcji możliwa była amplifikacja produktu o długości 2146 pz, specyficznego dla niezmodyfikowanej VNP20009 (Rys. 43, ścieżka 4). Tak więc, w tym wypadku brak produktu w ścieżkach 1 i 2 świadczył o zajściu rekombinacji udziałem fragmentu 5'-*ushA*.

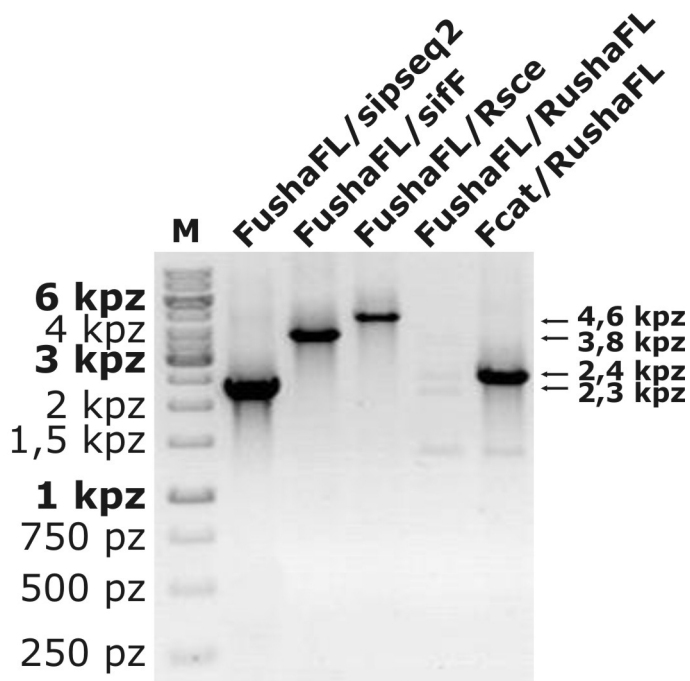
Dodatkowo sprawdzono koniec 3' zmodyfikowanego fragmentu genomu, przeprowadzając reakcje PCR ze starterami Fcat i RushaFL (Rys. 43, ścieżka 5 i 6).

We wstępnych doświadczeniach, w reakcji PCR ze starterami FushaFL i sipseq2 uzyskiwano fałszywie pozytywne produkty, podczas gdy z tego samego DNA matrycowego nie uzyskiwano produktów w reakcji ze starterami Fcat i RushaFL i równocześnie uzyskiwano produkt w reakcji ze starterami FushaFL i RushaFL o długości około 2100 pz, a więc specyficzny dla niezmodyfikowanej VNP20009. Fałszywy produkt reakcji wynikał z obecności plazmidu pSG76C-USS, która powodowała, że w początkowych cyklach reakcji PCR dochodziło do generowania matrycy z produktu uzyskanego na DNA genomowym i plazmidowym, której amplifikacja w kolejnych cyklach owocowała fałszywie pozytywnym wynikiem (zagadnienie opisano w rozdziale Załączniki). Dlatego, aby wyeliminować możliwość dalszego dziedziczenia plazmidu w hodowli, kolonie bakterii numer 4 i 7 uzyskane na podłożu stałym z chloramfenikolem ponownie przesiano na podłoże stałe z chloramfenikolem i hodowano w temperaturze 37°C przez 20 godz. Bakterie pochodzące z klonu 4 utworzyły na podłożu stałym duże kolonie, natomiast bakterie pochodzące z klonu 7 - kolonie małe oraz duże. Przeprowadzono reakcję PCR z DNA genomowym uzyskanym z trzech dużych kolonii pochodzących z każdego z klonów (Rys. 44).



**Rys. 44. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA przygotowanej z kolonii bakterii potomnych klonów numer 4 i 7.** Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Amplifikowano fragmenty DNA w reakcji PCR ze starterami FushaFL i sipseq2, na DNA uzyskanym z trzech kolonii potomnych klonu 4 (4.1, 4.2, 4.3) oraz trzech kolonii potomnych klonu 7 (7.1, 7.2, 7.3).

Wybrano klon numer 4.3 i przeprowadzono analizę DNA genomowego metodą PCR z kolejnymi parami starterów (Rys. 45).

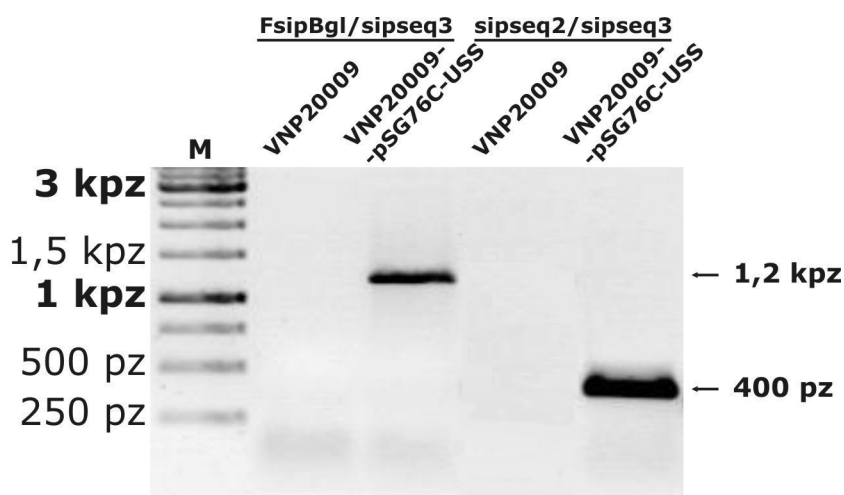


**Rys. 45. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA genomowego klonu bakterii numer 4.3, otrzymanych w wyniku integracji plazmidu pSG76C-USS do genomu VNP20009.** Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Amplifikowano fragmenty DNA rekombinowanego klonu w reakcji PCR ze starterami (w nawiasach podano oczekiwaną wielkość produktu): ścieżka 2 - FushaFL i sipseq2 (2350 pb); 3 - FushaFL i sifF (3755 pb); 4 - FushaFL i Rsce (4560 pb); 5 - FushaFL i RushaFL; 6 - Fcat i RushaFL (2411 pb).

Na podstawie analizy produktów reakcji PCR stwierdzono, że w wybranym klonie doszło do planowanej integracji plazmidu pSG76C-USS z genomem VNP20009, w wyniku rekombinacji pomiędzy fragmentem 5'-*ushA* na DNA plazmidowym oraz fragmentem genu *ushA* w genomie. Otrzymane bakterie z sekwencją plazmidową w genomie nazwano VNP20009-pSG76C-USS.

**Analiza ekspresji 6xHis-*sipB* kodowanego przez kasetę *PsifB*-6xHis-*sipB* umieszczoną w genomie VNP20009.**

Sprawdzono, czy zintegrowana z genomem kasetą ekspresyjną jest aktywna, analizując mRNA metodą RT-PCR. Z bakterii VNP20009 lub VNP20009-pSG76C-USS hodowanych w pożywce MgM wyizolowano całkowite RNA i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. Następnie w reakcji PCR na matrycy uzyskanego cDNA ze starterami sipseq2 i sipseq3 namnożono fragment genu *sipB* o długości 389 pz, a ze starterami FspBgl i sipseq3 - fragment 6xHis-*sipB* - 1222 pz (Rys. 46). Pierwsza para starterów jest komplementarna do natywnej sekwencji genu *sipB* oraz do 6xHis-*sipB*, natomiast druga para jest specyficzna tylko dla 6xHis-*sipB*, ponieważ starter FspBgl hybryduje z N-końcem 6xHis-*sipB*, kodującym etykietkę histydynową.



**Rys. 46. Analiza ekspresji *sipB* w bakteriach VNP20009-pSG76C-USS hodowanych w pożywce MgM.** Produkty reakcji RT-PCR rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Analizowano transkrypt *sipB* oraz 6xHis-*sipB* w bakteriach VNP20009 i VNP20009-pSG76C-USS. RNA wyizolowano z bakterii hodowanych w pożywce MgM indukującej aktywność *PsifB*. Fragmenty otrzymano z cDNA w reakcji z parą starterów specyficzną względem 6xHis-*sipB* (FspBgl i sipseq3) lub parą amplifikującą sekwencje: natywną *sipB* oraz 6xHis-*sipB* (sipseq2 i sipseq3). Wynik jest reprezentatywny dla dwóch doświadczeń.

Przeprowadzone doświadczenie pozwala stwierdzić, że kasetą *PsifB*-6xHis-*sipB* wbudowana do genomu VNP20009 w obrębie sekwencji *ushA*, jest funkcjonalna, a promotor *PsifB* może kontrolować ekspresję 6xHis-*sipB*. W niezmodyfikowanych

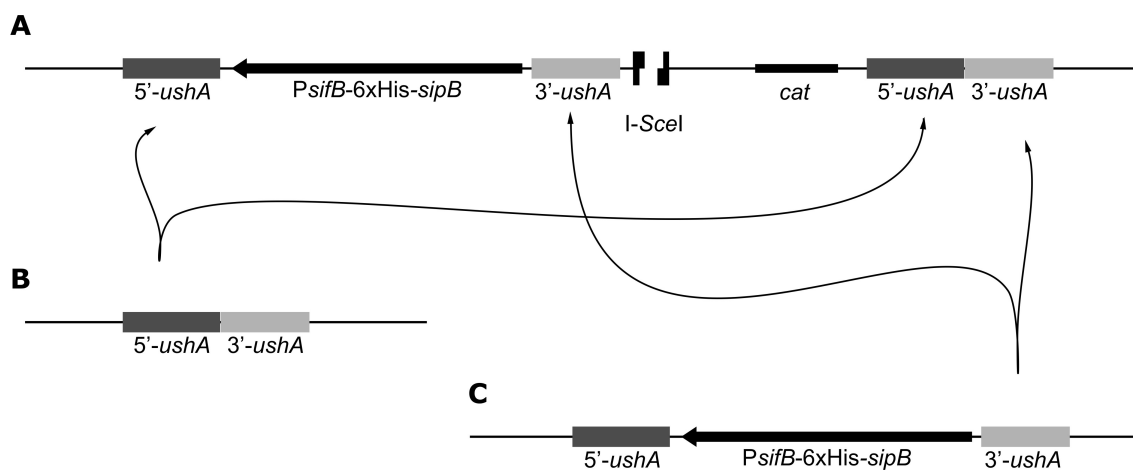


bakteriach VNP20009 nie wykryto transkryptu *sipB*, co może sugerować, że zastosowane warunki hodowli bakterii nie są odpowiednie dla ekspresji *sipB* pod kontrolą jego natywnego promotora.

#### **5.4. Usunięcie genu oporności na antybiotyki z genomu VNP20009-pSG76C-USS. Uzyskanie bakterii VNP/sipB.**

W wyniku przeprowadzonej procedury uzyskano zmodyfikowane bakterie, u których w genomie, w obrębie fragmentu kodującego genu *ushA*, został włączony plazmid pSG76C-USS. Na tym etapie sekwencja *ushA* jest w genomie zduplikowana (Rys. 47), przy czym jedna kopia genu ma zachowaną sekwencję natywną, natomiast druga kopia zawiera we wnętrzu kasetę *PsifB-6xHis-sipB*. Pomiędzy tymi kopiami znajduje się sekwencja plazmidowa, która zawiera między innymi gen oporności na chloramfenikol. Gen ten można usunąć wykonując drugi etap procedury integracji, dzięki czemu uzyskany zmodyfikowany szczep będzie pozbawiony oporności na antybiotyki. Ponadto obecność sekwencji plazmidu pSG76C w genomie bakterii utrudniałaby ewentualne wprowadzenie kolejnych modyfikacji do genomu stosowaną metodą, gdyż sekwencje te byłyby znacząco długimi fragmentami homologii z plazmidem integracyjnym. Również duplikacja sekwencji *ushA* mogłaby być nieobojętna dla stabilności otrzymanej rearanżacji. Dlatego przeprowadzono drugi etap metody, polegający na usunięciu sekwencji plazmidowej z genomu.

Bliskie sąsiedztwo sekwencji homologicznych może prowadzić do rekombinacji i wycięcia sekwencji plazmidowej pSG76C. W zastosowanej metodzie rekombinacja jest stymulowana przecięciem podwójnej nici DNA genomowego, które jest również podstawą selekcji klonów bakterii, które naprawiły pęknięcie w wyniku rekombinacji. Powstałe pęknięcie może być naprawione na drodze rekombinacji z udziałem fragmentów 5'-*ushA*, skutkując powrotem do sytuacji przed modyfikacją (Rys. 47B). Natomiast efektem naprawy poprzez rekombinację pomiędzy fragmentami 3'-*ushA* jest efektywna rearanżacja (Rys. 47C), równoznaczna z utratą genu oporności na chloramfenikol wraz z całą pozostałą sekwencją plazmidową, z wyjątkiem sekwencji *PsifB-6xHis-sipB*, która pozostaje w genomie.

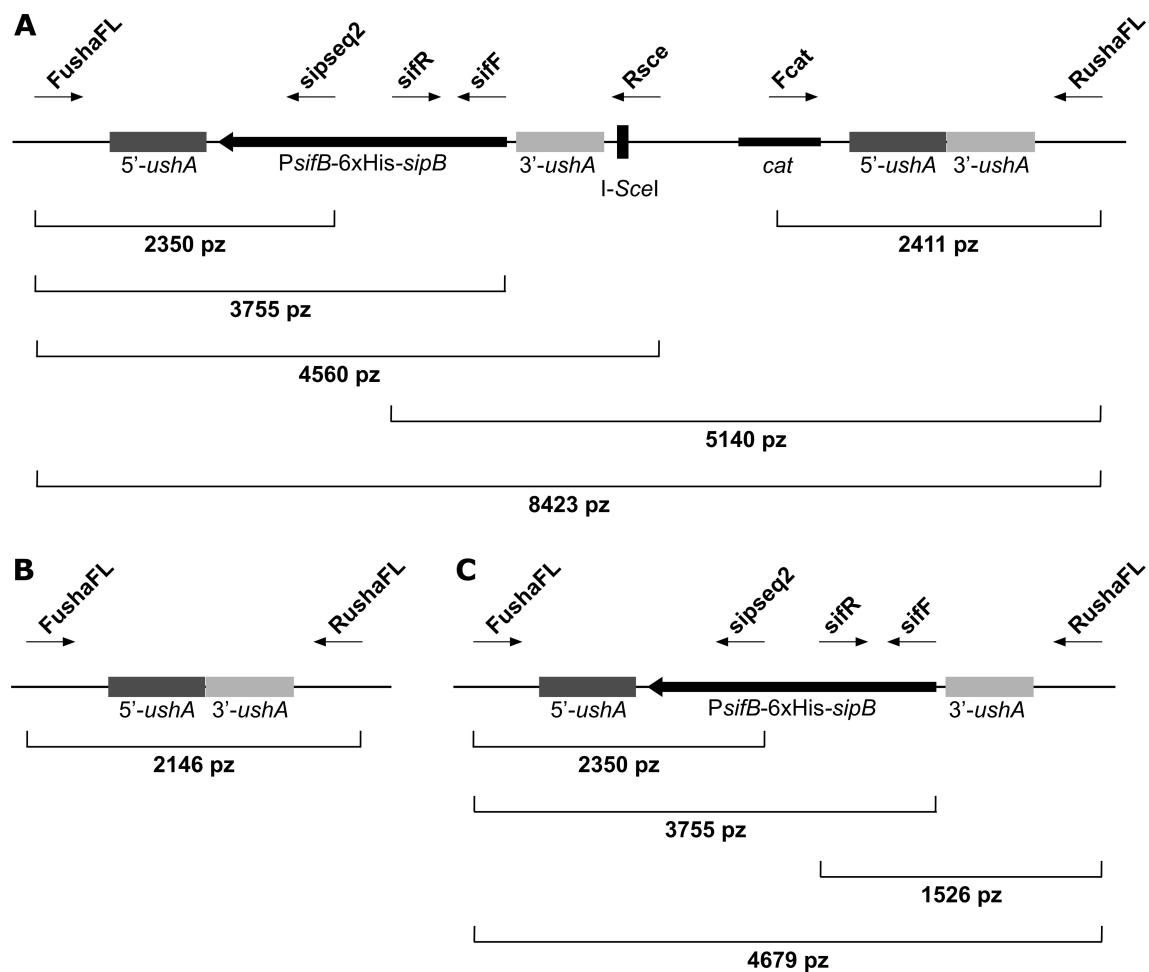


**Rys. 47. Schemat fragmentu sekwencji genomowej, uzyskanego w wyniku wbudowania plazmidu pSG76C-USS do genomu, w obrębie genu *ushA*.** (A) DNA genomowe jest przecięte przez endonukleazę rozpoznającą miejsce I-SceI, które zostało wprowadzone do sekwencji genomu wraz z DNA plazmidowym. Przedstawiono dwa możliwe sposoby naprawy pęknięcia podwójnej nici DNA na drodze rekombinacji pomiędzy fragmentami: (B) 5'-*ushA* lub (C) 3'-*ushA*. Wynikiem zdarzenia (B) jest powrót do formy dzikiej genu *ushA*, a (C) - włączenie kasety *PsifB-6xHis-sipB* do genomu we wnętrzu sekwencji genu *ushA*.

Bakterie VNP20009-pSG76C-USS transformowano plazmidem pSTKST, kodującym gen meganukleazy I-SceI pod kontrolą promotora tetracyklinowego, gen oporności na kanamycynę oraz temperaturo-wrażliwe *ori* pSC101. Obecność miejsca *ori* pSC101 powoduje, że plazmid może replikować w temperaturze 30°C, natomiast nie jest namnażany w temperaturze 37°C - 42°C. Bakterie hodowano na podłożu stałym z kanamycyną w temperaturze 30°C przez 20 godz. Następnie z pojedynczej kolonii zapoczątkowano hodowlę w pożywce płynnej z kanamycyną oraz termicznie inaktywowaną chlorotetracykliną (cTc) i hodowano przez 24 godz. w temperaturze 30°C. Termicznie inaktywowana cTc nie ma aktywności bakteriobójczej, natomiast indukuje ekspresję genu kodującego I-SceI pod kontrolą promotora tetracyklinowego, poprzez inaktywację represora tetracyklinowego. W czasie trwania hodowli mierzono gęstość optyczną, którą porównywano z gęstością hodowli niezmodyfikowanych bakterii VNP20009, transformowanych plazmidem pSTKS, hodowanych również w obecności kanamycyny i inaktywowanej cTc. Brak zahamowania wzrostu podczas indukcji ekspresji I-SceI w hodowli VNP20009 świadczył o niewystępowaniu miejsca rozpoznawanego przez tę endonukleazę w genomie VNP20009. Natomiast zahamowanie wzrostu gęstości optycznej obserwowane w pierwszych 8 - 10 godzinach hodowli bakterii rekombinowanych wynikało z aktywności enzymu I-SceI.

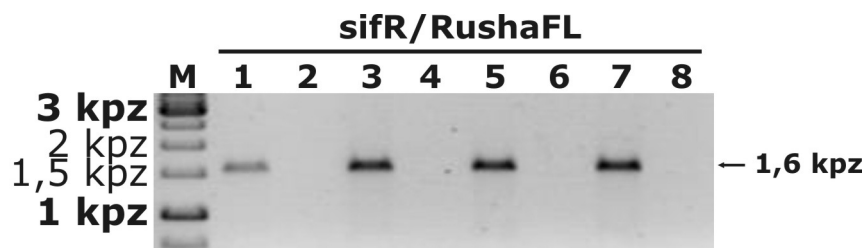
Po 24 godz. wzrostu hodowlę rozcieńczono 1:10<sup>6</sup>, wysiano na podłoże stałe z kanamycyną i inaktywowaną cTc i hodowano w temperaturze 30°C przez 20 godz. Do analizy wybrano osiem kolonii. Na Rys. 48 przedstawiono schematycznie położenie sekwencji komplementarnych do par starterów zastosowanych do analizy

zrekombinowanego fragmentu genomu metodą PCR oraz oczekiwane długości produktów reakcji.



**Rys. 48. Schemat fragmentu genomu z wbudowanym plazmidem pSG76C-USS oraz długości produktów PCR potwierdzające naprawę pęknięcia DNA w miejscu I-SceI.** Przecięcie DNA genomowego w miejscu I-SceI indukuje rekombinację homologiczną, naprawiającą powstałe pęknięcie. Zaznaczono startery i długości produktów reakcji PCR, które potwierdzały włączenie plazmidu pSG76C-USS do DNA genomowego VNP20009 (A) oraz długości produktów, które potwierdzały rekombinację pomiędzy fragmentami homologii: (B) 5'-*ushA* i powrót do formy dzikiej sekwencji genu *ushA*, lub (C) 3'-*ushA* i pozostawienie kasety *PsifB-6xHis-sipB* wbudowanej w obrębie sekwencji *ushA*.

W reakcji PCR z parą starterów sifF i RushaFL sprawdzono, czy w wybranych koloniach doszło do wycięcia genu oporności i rekombinacji fragmentów 3'-*ushA* (Rys. 49).



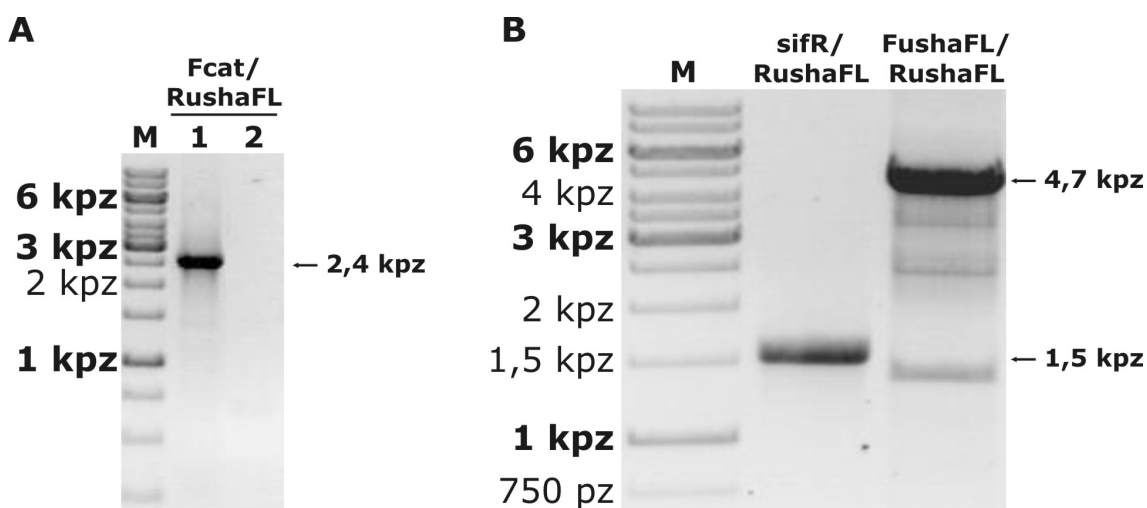
**Rys. 49. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR amplifikowanych na matrycy**

**DNA klonów bakterii poddanych działaniu enzymu I-SceI.** Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Produkty otrzymano w reakcjach z DNA klonów bakterii VNP20009-pSG76C-USS, które poddano działaniu endonukleazy I-SceI, stymulującej rekombinację i usunięcie sekwencji pSG76C z genomu. Analizowano osiem klonów w reakcji PCR ze starterami *sifR* i *RushaFL*. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

W reakcji PCR spośród ośmiu sprawdzonych kolonii bakterii, w przypadku czterech kolonii uzyskano produkt o długości odpowiadającej długości oczekiwanej (1526 pz).

W pozostałych klonach bakteryjnych nie uzyskano w ogóle produktu reakcji PCR. Prawdopodobnie doszło w nich do rekombinacji fragmentów 5'-*ushA* i powrotu do formy dzikiej.

Aby potwierdzić, że doszło do wycięcia sekwencji plazmidowej, a w genomie pozostała wbudowana kasetta *PsifB-6xHis-sipB*, przeprowadzono kolejne reakcje PCR na DNA uzyskanym z klonu numer 7 (Rys. 50).

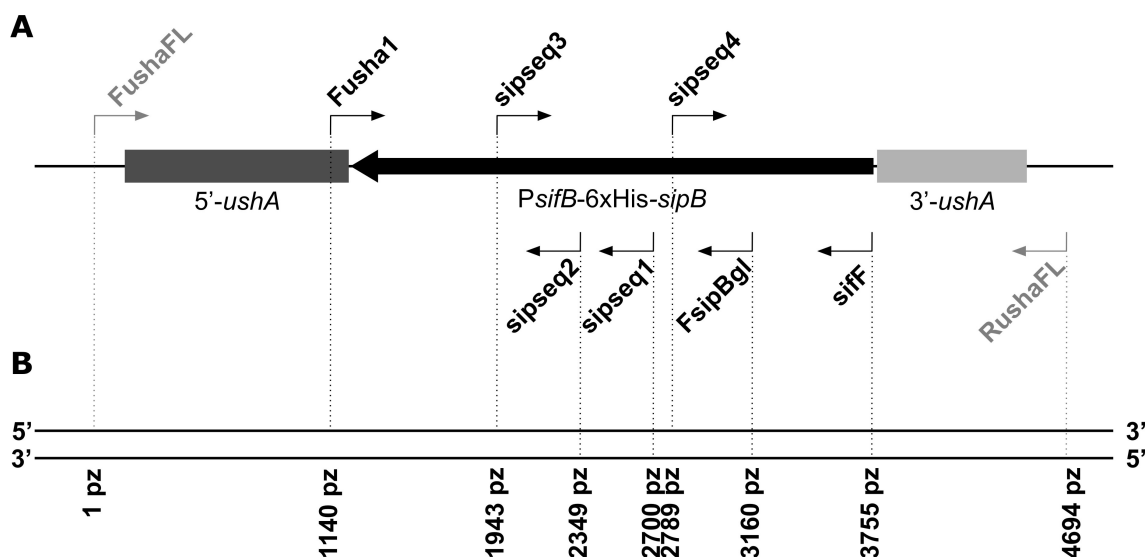


**Rys. 50. Analiza elektroforetyczna produktów reakcji PCR przeprowadzonej na matrycy genomowego DNA bakterii VNP20009-pSG76C-USS oraz bakterii uzyskanych po naprawie pęknięcia I-SceI. (A)** Produkty reakcji PCR ze starterami *Fcat* i *RushaFL*, na matrycy DNA bakterii przed poddaniem działaniu enzymu I-SceI (ścieżka 1) oraz bakterii poddanych działaniu I-SceI (klon 7; ścieżka 2). **(B)** Produkty reakcji PCR uzyskane z klonu 7 w reakcji ze starterami *sifR* i *RushaFL* (1526 pz) oraz *FushaFL* i *RushaFL* (4679 pz).

Porównano produkt reakcji PCR ze starterami: *Fcat*, hybrydującym z sekwencją plazmidową włączoną do genomu, i *RushaFL*, hybrydującym z sekwencją flankującą miejsce włączenia. W reakcji na matrycy DNA bakterii VNP20009-pSG76C-USS otrzymano produkt o długości około 2400 pz (Rys. 50A, ścieżka 1), natomiast w reakcji na matrycy DNA tych bakterii poddanych działaniu endonukleazy I-SceI, nie otrzymano produktu (Rys. 50A, ścieżka 2), co świadczy o usunięciu sekwencji plazmidowej pSG76C z genomu. W reakcji PCR o odpowiednio długim czasie syntezy produktu, ze starterami *FushaFL* i *RushaFL* z bakterii poddanych działaniu endonukleazy I-SceI uzyskano produkt o długości powyżej 4500 pz, odpowiadający długości sekwencji genu

*ushA* ze zintegrowaną z genomem kasetą *PsifB-6xHis-sipB* (4679 pz; Rys. 50B).

Przeprowadzona analiza wskazuje na to, że otrzymano zmodyfikowany szczep, który jest dalej określany jako VNP/*sipB*. Poprawność zintegrowanej sekwencji *PsifB-6xHis-sipB* potwierdzono poprzez sekwencjonowanie produktu uzyskanego w reakcji PCR ze starterami FushaFL i RushaFL. Do sekwencjonowania zastosowano startery FsipBgl, Fusha1, siff, sipseq1, sipseq2, sipseq3, sipseq4. Położenie miejsc hybrydizacji starterów zaznaczono na Rys. 51.



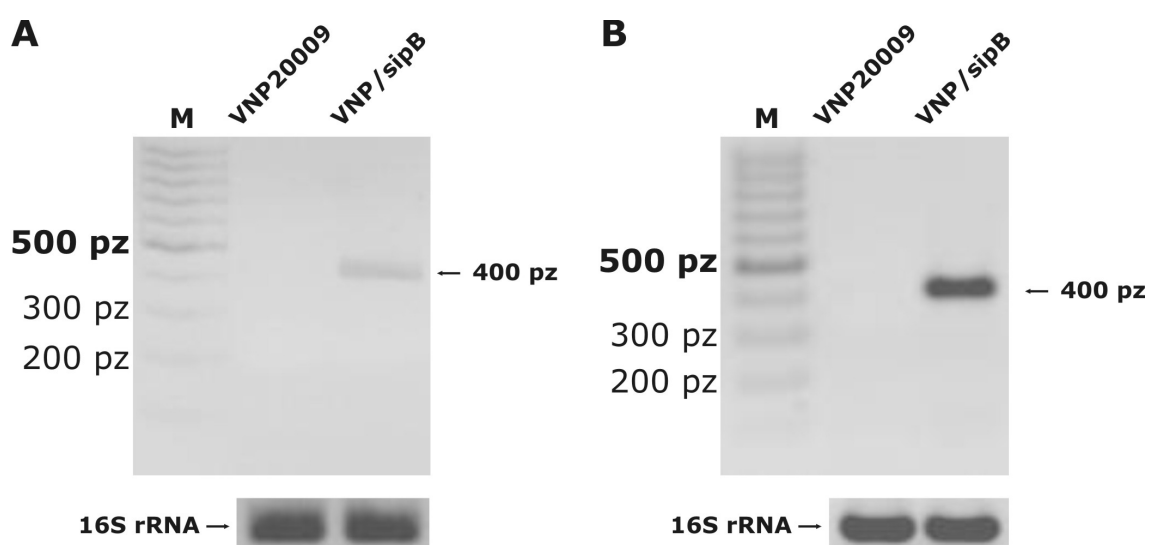
**Rys. 51. Schemat sekwencji genomowej ze zintegrowaną kasetą *PsifB-6xHis-sipB*. (A)** Lokalizacja sekwencji komplementarnych do oligonukleotydów zastosowanych do sekwencjonowania, zaznaczonych czarną czcionką. **(B)** Położenie sekwencjonowanych produktów względem pozycji oligonukleotydu FushaFL.

### 5.5. Badanie aktywności transkrypcyjnej kasety *PsifB-6xHis-sipB* włączonej do genomu *S. typhimurium* VNP20009.

Sprawdzono, czy promotor *PsifB* nadal jest aktywny w końcowym produkcie integracji kasety *PsifB-6xHis-sipB* do genomu, którym są bakterie VNP/*sipB*. Wykonano analizę mRNA dla *sipB* w bakteriach VNP20009 i VNP/*sipB* metodą RT-PCR.

Całkowite RNA wyizolowano z bakterii VNP20009 oraz VNP/*sipB* hodowanych w pożywce MgM, która indukuje aktywność promotora *PsifB*. Aby potwierdzić, że w hodowli w warunkach, które stymulują aktywność promotora *PsifB*, dochodzi do transkrypcji dodatkowej kopii genu *sipB* wprowadzonej do genomu bakteryjnego, zbadano poziom mRNA, które powinno powstawać w wyniku transkrypcji genu *6xHis-sipB* wykorzystując metodę RT-PCR. Przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie reakcję PCR ze starterami sipseq2 i sipseq3, komplementarnymi do *sipB*, zarówno do sekwencji genu naturalnie występującego, jak i do sekwencji *6xHis-sipB*

(Rys. 52). Jeśli w bakteriach dochodzi do transkrypcji dodatkowej kopii genu *sipB* pod kontrolą *PsifB*, to powinien powstać produkt o długości 389 pz w reakcji z cDNA uzyskanym z bakterii VNP/*sipB* hodowanych w pożywce MgM. W bakteriach VNP20009 hodowanych w tych warunkach nie powinno dochodzić do transkrypcji *sipB*, ponieważ warunki te są specyficzne dla indukcji ekspresji genów SPI2, a nie genów SPI1. Zgodnie z oczekiwaniami cDNA bakterii VNP/*sipB* zawierało sekwencję ulegającą amplifikacji (Rys. 52A). W dodatkowym doświadczeniu stwierdzono również, że transkrypcja *sipB* z pod promotora *PsifB* zachodzi nie tylko w pożywce MgM, ale także w buforze PBS wzbogaconym w 0,1% kwaśny hydrolyzaty kazeinowy (Rys. 52B).



**Rys. 52. Analiza transkryptu *sipB* metodą RT-PCR w bakteriach hodowanych w warunkach indukujących ekspresję genów SPI2.** RNA wyizolowano z bakterii VNP20009 lub VNP/*sipB*, inkubowanych przez 20 godz. w warunkach indukujących aktywność promotora *PsifB*, czyli w: **(A)** pożywce MgM lub **(B)** w buforze PBS zawierającym 0,1% kwaśnego hydrolyzaty kazeiny. Transkrypt wykryto w reakcji PCR ze starterami sipseq2 i sipseq3 (407 pz). Panel dolny: produkt amplifikacji cDNA 16S rRNA (350 pz). Produkty reakcji RT-PCR rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). Wynik jest reprezentatywny dla dwóch doświadczeń.

## 6. Badanie funkcjonalności zmodyfikowanego szczepu (VNP/*sipB*).

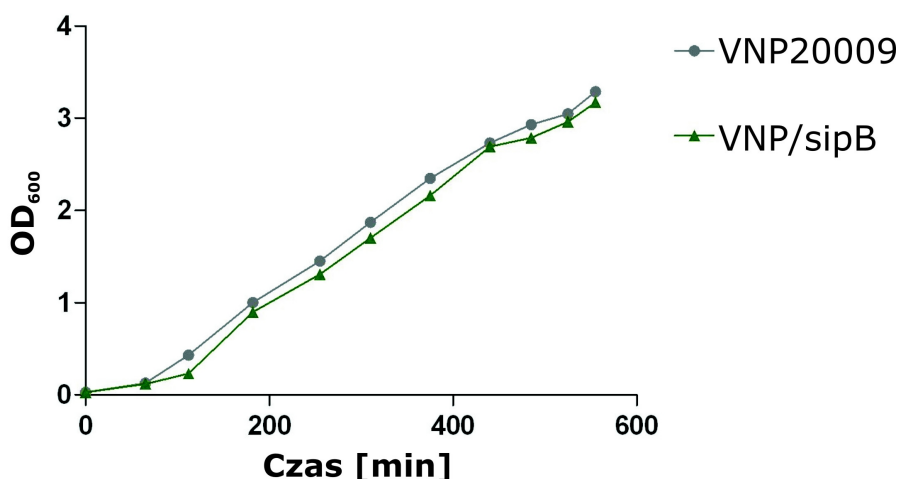
Następnym etapem pracy było porównanie własności zmodyfikowanego szczepu VNP/*sipB* ze szczepem wyjściowym VNP20009, a szczególnie tych, które są istotne dla potencjalnego wykorzystania nowego szczepu w terapii przeciwnowotworowej. Zbadano więc następujące parametry: szybkość wzrostu bakterii w płynnej pożywce, stabilność genetyczną wprowadzonej modyfikacji, zdolność do zakażenia komórek eukariotycznych i efekty terapeutyczne w mysich modelach nowotworowych.

## 6.1. Porównanie wzrostu *in vitro* oraz zdolności inwazyjnych bakterii VNP20009 i VNP/sipB.

### Krzywa wzrostu bakterii VNP20009 i VNP/sipB.

W wyniku wbudowania kasety *PsifB-6xHis-sipB* do genomu w obrębie sekwencji *ushA*, gen ten został zainaktywowany. Sprawdzone, czy ta zmiana, tak jak oczekiwano, nie ma znaczenia dla wzrostu bakterii w hodowli.

Bakterie VNP20009 i VNP/sipB hodowano przez 10 godz. w temperaturze 37°C, w pożywce MSB z wytrząsaniem. Wzrost bakterii monitorowano mierząc gęstość optyczną hodowli ( $OD_{600}$ ; Rys. 53). Hodowle prowadzono w pożywce, która nie pozwala na ekspresję 6xHis-SipB pod kontrolą *PsifB*. A więc nie sprawdzano efektu ekspresji transgenicznego białka na wzrost bakterii, a jedynie wpływ modyfikacji genetycznej polegającej na usunięciu *ushA*. Zmodyfikowany szczep VNP/sipB z kasetą ekspresyjną *PsifB-6xHis-sipB* wbudowaną do genomu zachował profil wzrostu bakterii VNP20009.



**Rys. 53. Krzywa wzrostu bakterii VNP20009 i VNP/sipB.** Bakterie hodowano w pożywce MSB w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Mierzono gęstość optyczną hodowli bakterii przy długości fali 600 nm.

### Wyznaczenie liczby żywych bakterii (CFU) w hodowli bakterii.

Bakterie VNP20009 i VNP/sipB hodowano z wytrząsaniem w pożywce MSB, w temperaturze 30°C lub 37°C. Hodowlę prowadzono przez 3 godz. do osiągnięcia gęstości optycznej  $OD_{600} \approx 0,4$ , lub przez 20 godz. do osiągnięcia stacjonarnej fazy wzrostu. Bakterie płukano jednokrotnie w buforze fosforanowym, zawieszano w niewielkiej ilości tego buforu i mierzono gęstość optyczną. Przygotowywano zawiesiny bakterii o równej gęstości optycznej, które rozcieńczano i wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Liczbę CFU obecną w 1 ml zawiesiny oznaczono na podstawie liczby kolonii uzyskanych po 24 godz. wzrostu na podłożu stałym. Uwzględniając rozcieńczenie, obliczono jaka liczba żywych bakterii znajdowałaby się w 1 ml zawiesiny bakterii

VNP20009 lub VNP/sipB o gęstości optycznej  $OD_{600} = 1$  (Tabela 18).

**Tabela 18. Liczba żywych bakterii w 1 ml zawiesin bakterii VNP20009 i VNP/sipB o równej gęstości optycznej.**

Temperatura hodowli	VNP20009		VNP/sipB	
	30°C	37°C	30°C	37°C
Hodowla w fazie wzrostu logarytmicznego	$5,26 \cdot 10^8 \pm 1,42 \cdot 10^8$ N = 9	$5,62 \cdot 10^8 \pm 2,42 \cdot 10^8$ N = 3	$5,49 \cdot 10^8 \pm 1,41 \cdot 10^8$ N = 9	$5,39 \cdot 10^8 \pm 1,02 \cdot 10^8$ N = 3
Hodowla w fazie stacjonarnej	$8,95 \cdot 10^8 \pm 2,39 \cdot 10^8$ N = 3	$6,49 \cdot 10^8 \pm 2,41 \cdot 10^8$ N = 6	$13,37 \cdot 10^8 \pm 2,14 \cdot 10^8$ N = 3	$7,90 \cdot 10^8 \pm 3,51 \cdot 10^8$ N = 6

\* - CFU w przeliczeniu na 1 ml zawiesiny bakterii o  $OD_{600} = 1$ . Podano średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. N - liczba doświadczeń.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w liczbie żywych bakterii w hodowli VNP20009 i VNP/sipB. Wartości uzyskane z hodowli w stacjonarnej fazie wzrostu są wyższe od liczby żywych bakterii w logarytmicznej fazie wzrostu (w obu przypadkach porównywano ilość bakterii przypadającą na tę samą objętość zawiesiny o tej samej gęstości optycznej). Wyjaśnieniem tego wyniku może być zmiana średniego rozmiaru komórki bakteryjnej w hodowli, wynikająca z akumulacji bakterii, które zaprzestały podziałów, a w związku z tym nie przechodzą przez etap zwiększenia rozmiaru komórki poprzedzającego podział. Zmniejszenie rozmiaru bakterii przekłada się na zmianę relacji pomiędzy zmierzoną gęstością optyczną a faktyczną liczbą bakterii w zawiesinie [130]. Do przygotowania zawiesin bakterii VNP20009 i VNP/sipB wykorzystano pomiar gęstości optycznej, na podstawie którego obliczono liczbę bakterii w 1 ml, korzystając z założenia, że w 1ml zawiesiny o  $OD_{600} = 1$  jest  $5 \cdot 10^8$  bakterii. W zawiesinach o równej gęstości optycznej, przygotowanych z bakterii w logarytmicznej lub stacjonarnej fazie wzrostu, w tej pierwszej mniejsza liczba ale większych bakterii będzie powodowała takie samo zmętnienie, jak większa liczba mniejszych bakterii w drugiej zawiesinie. A ponieważ będąc w fazie stacjonarnej, bakterie te są nadal zdolne do wzrostu, po przeniesieniu do nowej pożywki, w tym przypadku podłoża stałego, uzyskuje się większą liczbę kolonii niż wynikałoby to z pomiaru gęstości optycznej.

W stacjonarnej fazie wzrostu również liczba żywych bakterii VNP/sipB jest nieco wyższa niż bakterii VNP20009, szczególnie, gdy bakterie hodowano w 30°C. Wynika to albo z różnic w wielkości bakterii obu szczepów albo wprowadzona zmiana genetyczna wpłynęła pozytywnie na żywotność komórek VNP/sipB.

#### **Inwazyjność zmodyfikowanego szczepu.**

Zdolność VNP/sipB do zakażenia komórek makrofagowych linii RAW264.7 zbadano

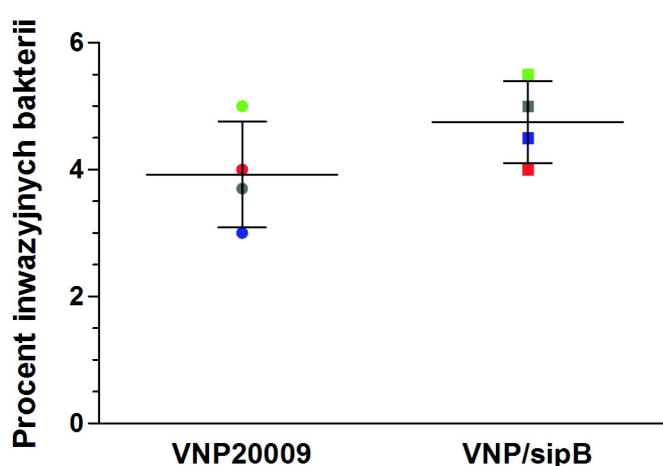


w teście protekcji gentamycynowej. Makrofagi RAW264.7 hodowano na 48-dołkowych płytkach, w ilości  $2,5 \cdot 10^4$ , w pożywce DMEM z 10% surowicą przez 24 godz.

Bakterie VNP20009 i VNP/sipB hodowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem, w pożywce MSB, która nie indukuje aktywności promotora *PsifB* i przygotowano do zakażenia komórek eukariotycznych tak, jak opisano w rozdziale Materiały i metody.

Komórki zakażano bakteriami zawieszonymi w 100  $\mu$ l pożywki Opti-MEM bez surowicy, w stosunku ilościowym pięciu bakterii przypadających na jedną komórkę (MOI = 5). Po 1 godz. koinkubacji komórek z bakteriami (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) dodawano 100  $\mu$ l pożywki Opti-MEM z surowicą i gentamycyną (końcowe stężenie wynosiło 2% surowicy, 100  $\mu$ g/ml gentamycyny) i inkubowano przez 1 ½ godz. w celu eliminacji bakterii pozakomórkowych. Następnie komórki zbierano przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA, liczone i wysiewano na płytki LB/agar. Liczbę żywych wewnątrzkomórkowych bakterii oceniano na podstawie liczby kolonii bakteryjnych po 24 godzinach wzrostu. W optymalnych warunkach podwojenie liczby bakterii w hodowli następuje po około 120 minutach (Rys. 53). Można więc z dużym prawdopodobieństwem założyć, że po 2 ½ godz. od początku koinkubacji z komórkami eukariotycznymi bakterie, które zostały przeniesione do nowych warunków, a następnie wniknęły do komórek, nie zdążyły się podzielić. Dlatego liczba bakterii wewnątrzkomórkowych po tym czasie odpowiada liczbie bakterii zdolnych do infekcji.

Równolegle rozcieńczano zawiesinę bakterii użytą do infekcji i wysiewano na podłoże stałe LB/agar. Na podstawie liczby kolonii bakteryjnych po 24 godzinach wzrostu na płytkach LB/agar oznaczano liczbę CFU przypadającą na dołek na początku infekcji. Liczbę inwazyjnych bakterii obliczono względem liczby bakterii użytych do infekcji, tak jak opisano w rozdziale Materiały i metody (Rys. 54).



**Rys. 54. Porównanie zdolności inwazyjnych bakterii VNP20009 i VNP/sipB w teście protekcji gentamycynowej.** Makrofagi RAW264.7 zakażano bakteriami hodowanymi w pożywce MSB. Komórki zbierano z dołków hodowlanych i określano liczbę wewnątrzkomórkowych bakterii na podstawie liczby kolonii uzyskanych z komórek wysianych

na podłoże stałe LB/agar. Inwazyjność wyrażono jako iloraz liczby bakterii odzyskanych z komórek po 2 ½ godz. od początku infekcji i liczby bakterii użytych do infekcji. Podano średnią i odchylenie standardowe z czterech doświadczeń. Punkty o tym samym kolorze reprezentują wartości średnie z trzech powtórzeń z jednego doświadczenia.

W hodowli VNP20009 bakterie zdolne do inwazji stanowiły 3,92% ± 0,83% żywych bakterii. W przypadku VNP/sipB inwazyjnych było 4,75% ± 0,64% bakterii. Różnica w inwazyjności VNP20009 i rekombinowanego szczepu VNP/sipB nie była istotna statystycznie.

Obecność dodatkowej kopii genu *sipB* nie obniża zdolności bakterii VNP/sipB do zakażenia komórek. W połączeniu z faktem, że pożywka MSB nie aktywuje ekspresji białka pod kontrolą *PsifB*, można wnioskować, że przygotowanie bakterii VNP/sipB *in vitro* poprzez hodowlę w tej pożywce może być odpowiednim sposobem uzyskania w pełni inwazyjnego szczepu, czyli inwazyjnego w stopniu specyficznym dla VNP20009. Promotor *PsifB* może zostać zaktywowany w bakteriach, które zakażyły komórki i żyją wewnątrzkomórkowo. Dzięki temu 6xHis-SipB będzie dostarczone z pominięciem negatywnego wpływu ekspresji tego białka na zdolność VNP20009 do zakażenia.

Inwazyjność VNP20009 była wyższa od obserwowanej podczas badania inwazyjności VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, gdzie procent inwazyjnych bakterii VNP20009 wynosił około 2,81% ± 1,46%. Ciekawe, że w tej serii doświadczeń inwazyjność niemodyfikowanych VNP20009 była wyższa niż podczas poprzednich doświadczeń, w których procent inwazyjnych bakterii VNP20009 wynosił około 2,81% ± 1,46% (por. punkt 1.3). Prawdopodobnie wynika to z faktu zastosowania różnych temperatur hodowli podczas namnażania bakterii. Być może inkubacja w temperaturze 37°C może stymulować zdolność *S. typhimurium* VNP20009 do zakażenia komórek eukariotycznych.

## **6.2. Stabilność genetyczna integracji kasety *PsifB*-6XHis-*sipB* do chromosomu VNP20009 w warunkach *in vitro* i *in vivo*.**

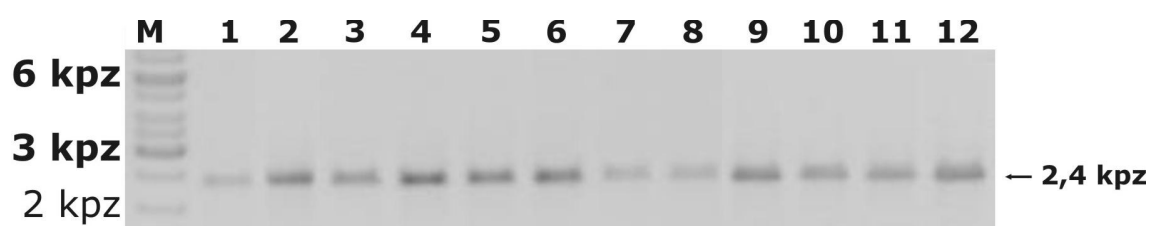
### **Badanie stabilności integracji *PsifB*-6XHis-*sipB* do chromosomu VNP20009 w hodowli bakteryjnej.**

Sprawdzono, czy zintegrowany z genomem fragment będzie dziedziczony w bakteriach hodowanych w warunkach *in vitro* przez szereg pokoleń.

Bakterie VNP/sipB hodowano w 2 ml pożywki MSB w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem (180 rpm). Całonocną hodowlę o gęstości 7·10<sup>8</sup> bakterii/ml rozcieńczono 1:10<sup>6</sup>. Następnie po 10 µl rozcieńczonej hodowli przeniesiono do 100 µl pożywki TB, umieszczonych w 12 studzienkach 96-dołkowej płytki o okrągłym dnie. W ten sposób uzyskano gęstość hodowli około 7 bakterii na dołek. Bakterie hodowano na płytce bez wytrząsania, w temperaturze 37°C i pasażowano co 12 godz., przenosząc 5 µl hodowli

do 100 µl pożywki TB, umieszczonej w kolejnych dołkach płytki. Bakterie przesiewano do momentu uzyskania 235 generacji. Generację liczono jako jeden podział komórkowy. Z krzywej wzrostu wynika, że czas podwojenia to około 120 min, a zatem liczbę generacji obliczono zakładając, że na jeden pasaż (12 godz.) przypada sześć podziałów.

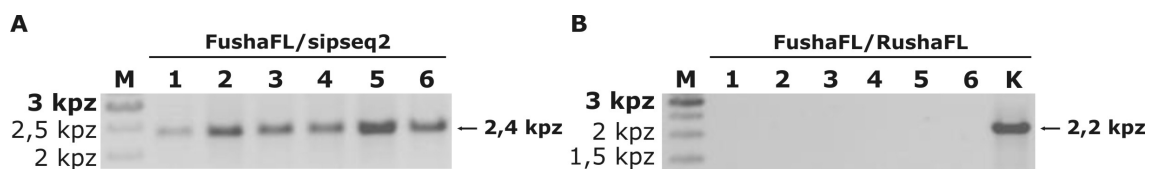
Z setnego pokolenia każdej z 12 hodowli bakteryjnych przygotowano matrycę do reakcji PCR, poprzez inkubację 10 µl hodowli w 50 µl buforu TE w temperaturze 100°C przez 2 min. W reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do sekwencji flankujących gen *ushA* (FushaFL) oraz do sekwencji genu *sipB* (*sipseq2*) sprawdzono stabilność genetyczną insercji (Rys. 55).



**Rys. 55. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR otrzymanych na matrycy DNA genomowego dwunastu klonów bakterii VNP/*sipB*.** Bakterie były pasażowane przez sto pokoleń w pożywce TB. Reakcję przeprowadzono ze starterami FushaFL i *sipseq2*. Fragmenty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

Z wszystkich dwunastu sprawdzonych hodowli uzyskano produkt o długości specyficznej dla VNP/*sipB* (2350 pz). Stąd wniosek, że w zastosowanych warunkach hodowli zintegrowana z genomem kasety *PsifB-6xHis-sipB* jest dziedziczona w bakteriach.

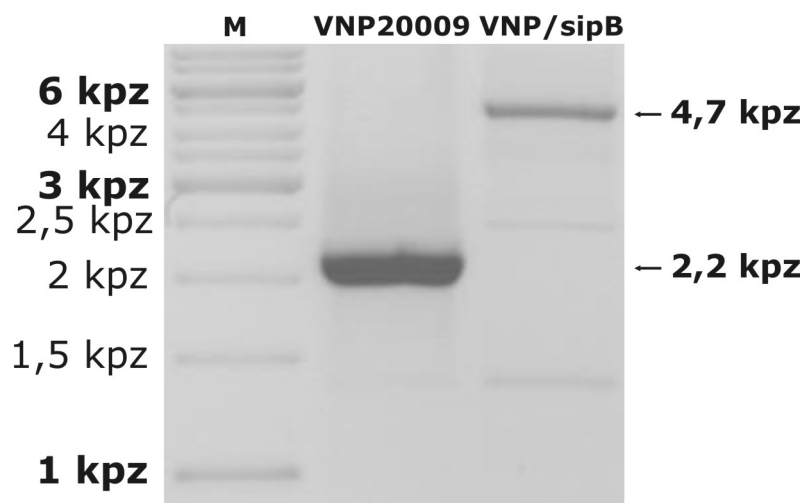
Ponownie obecność kasety *PsifB-6xHis-sipB* oraz brak produktu typowego dla niezmodyfikowanej VNP20009 sprawdzono w dwusetnym pokoleniu w reakcji PCR ze starterami odpowiednio FushaFL i *sipseq2* oraz FushaFL i RushaFL. W przypadku drugiej z wymienionych par starterów, komplementarnych do sekwencji flankującej miejsce integracji w genomie, oczekiwano braku produktu, gdyż już we wcześniejszych eksperymentach stwierdzono, że w przyjętych warunkach nie uzyskuje się tak dużego produktu reakcji. Gdyby jednak bakterie utraciły cały lub część wprowadzonego fragmentu DNA, to wówczas mógłby powstać jakiś produkt. Kontrolą pozytywną była matryca przygotowana z niezmodyfikowanych bakterii VNP20009, w której spodziewano się produktu typu „dzikiego” (2168 pz). Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR pokazano na Rys. 56.



**Rys. 56. Rozdział elektroforetyczny produktów otrzymanych w reakcji PCR na matrycy DNA genomowego sześciu klonów bakterii VNP/sipB.** Bakterie pasażowano w pożywce TB aż do uzyskania dwusetnego pokolenia. Przeprowadzono reakcje PCR z parami starterów: **(A)** FushaFL i sipseq2 oraz **(B)** FushaFL i RushaFL. K - reakcja kontrolna, do której matrycę przygotowano z bakterii VNP20009. Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

We wszystkich sześciu klonach wykryto produkt reakcji ze starterami FushaFL i sipseq2 o długości specyficznej dla VNP/sipB (2350 pz, Rys. 56A), natomiast zgodnie z oczekiwaniami nie wykryto żadnego produktu w reakcji ze starterami flankującymi miejsce insercji (FushaFL i RushaFL, Rys. 56B).

Jeśli jednak wydłużono czas amplifikacji DNA (4 min 30 s przez 10 cykli, a następnie o 10 s dłuższy w każdym kolejnym z 20 cykli) to udało się uzyskać produkt PCR ze starterami hybrydującymi do sekwencji flankujących gen *ushA* (FushaFL i RushaFL) na matrycy DNA wyizolowanego z VNP/sipB (Rys. 57). Uzyskany produkt miał oczekiwaną długość (4679 pz). Reakcję tę przeprowadzono na DNA wyizolowanym z 230 pokolenia bakterii po modyfikacji genetycznej. Zatem kasetę *PsifB-6xHis-sipB* w zastosowanych warunkach hodowli jest zachowana w bakteriach VNP/sipB przez co najmniej 230 kolejnych podziałów komórkowych.



**Rys. 57. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA bakterii VNP/sipB, które hodowano przez około 230 generacji w pożywce TB.** Produkty otrzymano w reakcji ze starterami FushaFL i RushaFL, komplementarnymi do sekwencji flankujących gen *ushA*, czyli miejsce insercji *PsifB-6xHis-sipB* do genomu VNP20009. Fragmenty DNA rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

## Badanie stabilności integracji w bakteriach odzyskanych ze śledziony zakażonej myszy.

Stwierdzono, że wprowadzony do genomu dodatkowy fragment DNA w postaci kasety *PsifB-6xHis-sipB* jest dziedziczony w bakteriach przez co najmniej dwieście pokoleń, jeśli bakterie są hodowane w pożywce TB. Jeśli uzyskany szczep bakterii miałby być stosowany w terapii, to ważne jest również, aby modyfikacja była zachowana w bakteriach *in vivo*. Teoretycznie, tak wysoka stabilność genetyczna pozwala przypuszczać, że obserwowane efekty zakażenia bakteriami komórek eukariotycznych oraz efekty terapeutyczne będą powtarzalne.

Jednakże należy pamiętać, że jeśli bakterie hoduje się w pożywce TB, to wówczas kasetka ekspresyjna, w której *6xHis-sipB* pozostaje pod kontrolą promotora *sifB*, nie jest aktywna lub jej aktywność jest niewielka. W takim przypadku wpływ ekspresji *6xHis-sipB* na żywotność bakterii może być na tyle niski, że nie stanowi istotnej presji selekcyjnej przeciwko utrzymaniu tej sekwencji w genomie. Bakterie, które są podane myszy, żyją w dużo bardziej niejednorodnym i zmiennym środowisku, a ponadto warunki *in vivo* powinny indukować aktywność kasety *PsifB-6xHis-sipB*. Dlatego sprawdzono, czy w takich warunkach fragment ten będzie zachowany w genomie.

Samcom myszy szczepu C57Bl/6 podano dożylnie  $5 \cdot 10^5$  bakterii VNP20009 lub VNP/sipB. Cztery tygodnie po podaniu bakterii od sześciu myszy z każdej z grup pobrano śledziony i wątroby. Fragmenty organów zważono i zhomogenizowano w buforze fosforanowym przy pomocy szkiełek mikroskopowych ze szlifem, a zawiesinę tkanki wysiano na podłoże stałe LB/agar i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 godz. Na podstawie liczby uzyskanych kolonii obliczono liczbę bakterii przypadającą na 100 mg tkanki. Średnią i odchylenie standardowe z liczby bakterii uzyskanych z homogenatów organów pobranych od sześciu myszy przedstawiono w Tabeli 19.

**Tabela 19. Liczba żywych bakterii w 100 mg tkanki zakażonej myszy cztery tygodnie po dożylnym podaniu bakterii.**

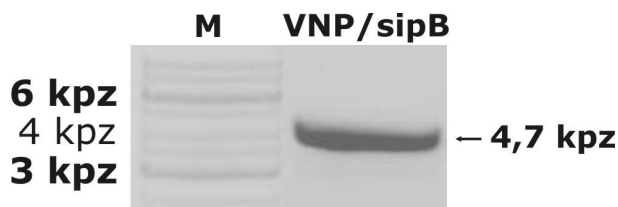
	Śledziona (CFU/100 mg)	Wątroba (CFU/100 mg)
VNP20009	3057 ± 1117	252 ± 125
VNP/sipB	3440 ± 1339	257 ± 100

Podano średnią liczbę żywych bakterii uzyskanych z fragmentów organów sześciu myszy ± odchylenie standardowe.

Integracja dodatkowej kopii genu *sipB* z chromosomem bakterii VNP20009 nie wpływa na jej przeżywanie w śledzionie i wątrobie myszy przez 4 tygodnie.

Zbadano także, czy bakterie znalezione w organach myszy nadal zawierają w genomie sekwencję *PsifB-6xHis-sipB*.

Z kolonii wyhodowanej na podłożu stałym LB/agar z homogenatu śledziony myszy zakażonej VNP/sipB przygotowano matrycę do reakcji PCR. Przeprowadzono reakcję ze starterami FushaFL i RushaFL, komplementarnymi do sekwencji flankujących fragment *PsifB-6xHis-sipB* w genomie VNP/sipB (Rys. 58).



**Rys. 58. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR uzyskanego na matrycy DNA bakterii wyhodowanej z homogenatu śledziony myszy C57Bl/6 zakażonej VNP/sipB.** Śledzionę pobrano od myszy cztery tygodnie po dożylnym podaniu bakterii. Homogenat wysiano na podłoże stałe LB/agar. Przeprowadzono reakcję PCR ze starterami komplementarnymi do sekwencji flankującej miejsce insercji kasety *PsifB-6xHis-sipB* do genomu, w której matrycą był lizat kolonii z płytki LB/agar. Produkt rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

W reakcji PCR uzyskano produkt o długości specyficznej dla namnażanego fragmentu z genomu bakterii VNP/sipB (4679 pz).

Podobne doświadczenie wykonano na samicach myszy szczepu Swiss, którym podano dożylnie  $1 \cdot 10^7$  bakterii VNP/sipB. Po pięciu tygodniach od myszy pobrano śledzionę, zhomogenizowano, a otrzymaną zawiesinę tkanki wysiano na podłoże LB/agar. Z kolonii otrzymanych po 24 godz. wzrostu wybrano losowo dwie, przygotowano lizaty w sposób opisany w rozdziale 6.2 Materiałów i metod, i przeprowadzono reakcje PCR z dwoma parami starterów (Rys. 59).



**Rys. 59. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA bakterii wyhodowanych z homogenatu śledziony myszy Swiss zakażonej VNP/sipB.** Śledzionę pobrano od myszy pięć tygodni po dożylnym podaniu bakterii. Homogenat wysiano na podłoże stałe LB/agar. Dwie losowo wybrane kolonie zlizowano, a uzyskanych nadsączy użyto jako matrycy w reakcjach PCR ze starterami: komplementarnym do sekwencji flankującej miejsce insercji *PsifB-6xHis-sipB* do genomu i specyficznym dla *sipB* (FushaFL i sipseq2) oraz komplementarnym do sekwencji flankującej miejsce insercji (FushaFL i RushaFL). Produkt rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

W reakcji PCR ze starterami FushaFL i sipseq2 otrzymano produkt o długości około

2400 pz, odpowiadającej produktowi specyficznemu dla VNP/sipB. W reakcji z parą starterów FushaFL i RushaFL, komplementarnych do sekwencji flankujących miejsce insercji *PsifB-6xHis-sipB* do genomu, zgodnie z oczekiwaniami ze względu na warunki reakcji (krótki czas syntezy produktu), nie otrzymano produktu. We wcześniejszych doświadczeniach stwierdzono, że w zastosowanych warunkach reakcji z tą parą starterów nie otrzymuje się produktu na matrycy DNA zmodyfikowanych bakterii. Brak produktu potwierdza więc nieobecność „dzikiej” sekwencji *ushA*, czyli niezawierającej we wnętrzu kasety *PsifB-6xHis-sipB* i specyficznej dla VNP20009, ale nie dla VNP/sipB.

Wyniki obu przeprowadzonych doświadczeń pozwalają stwierdzić, że w genomie bakterii VNP/sipB żyjących w organizmie zakażonych myszy szczepu C57Bl/6 i Swiss jest zachowana sekwencja *PsifB-6xHis-sipB*, wprowadzona do genomu w obrębie genu *ushA*.

### **6.3. Analiza ekspresji *sipB* metodą PCR w czasie rzeczywistym, w bakteriach oraz w komórkach eukariotycznych zakażonych VNP20009 i VNP/sipB.**

We wcześniejszych doświadczeniach przy pomocy analizy mRNA z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji i PCR stwierdzono, że kasetka ekspresyjna *PsifB-6xHis-sipB* jest aktywna transkrypcyjnie w bakteriach VNP-pSG76C-USS i VNP/sipB, hodowanych w pożywce MgM, imitującej warunki wewnątrzkomórkowe, w których żyją bakterie *Salmonella* zakażające komórki eukariotyczne. W uzupełnieniu do tych doświadczeń wykonano kolejne, w których obecność transkryptu *sipB* badano przy pomocy analizy cDNA metodą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Celem było zbadanie, w jakim stopniu może wzrastać ekspresja *sipB* z chromosomu bakterii VNP/sipB, jeśli został on umieszczony pod kontrolą promotora *PsifB*, w porównaniu z ekspresją w bakteriach VNP20009 pod kontrolą natywnego promotora *sipB*.

Z bakterii VNP20009 lub VNP20009/sipB hodowanych w pożywce MgM wyizolowano całkowite RNA. W reakcji odwrotnej transkrypcji, przeprowadzonej w sposób opisany w rozdziale 8 Materiałów i metod, otrzymano cDNA. Następnie na matrycy uzyskanego cDNA przeprowadzono reakcje PCR w czasie rzeczywistym, których produkty były znakowane barwnikiem SYBR Green. W reakcjach ze starterami sipseq5 i sipseq6 namnożono fragment genu *sipB* o długości 176 pz, a w reakcjach ze starterami F16RNA i R16RNA - fragment genu referencyjnego, kodującego 16S rRNA (350 pz). Startery sipseq5 i sipseq6 są komplementarne do naturalnej sekwencji genu *sipB* oraz do sekwencji 6xHis-*sipB* wbudowanej do genomu. W Tabeli 20 przedstawiono wartości Ct poszczególnych reakcji dla *sipB* i dla genu referencyjnego, czyli liczbę cykli reakcji PCR, po których wartość fluorescencji osiąga wartość progową.

Różnicę w poziomie ekspresji *sipB* w VNP20009 i VNP/sipB obliczono metodą delta-delta Ct. W bakterjach VNP/sipB było prawie dwudziestokrotnie więcej mRNA kodującego *sipB* niż w bakterjach niezmodyfikowanych.

**Tabela 20. Analiza transkryptu *sipB* w bakterjach VNP20009 i VNP/sipB techniką PCR w czasie rzeczywistym.**

	Ct		$\Delta\Delta Ct$
	<i>sipB</i>	Gen 16S rRNA	
VNP20009	24,87 ± 0,28	10,02 ± 0,04	19,8
VNP/sipB	20,73 ± 0,04	10,19 ± 0,04	

Podano średnią ± odchylenie standardowe z tryplikatów. Wynik jest reprezentatywny dla dwóch doświadczeń.

Aby sprawdzić, czy kasetę *PsifB-6xHis-sipB* jest aktywna w bakterjach wewnątrzkomórkowych, przeprowadzono analizę transkryptu *sipB* w reakcji na cDNA uzyskanym na matrycy całkowitego RNA izolowanego z komórek MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB.

Komórki MC38CEA w liczbie  $5 \cdot 10^5$  zakażano bakteriami przy MOI = 10, w sposób opisany w rozdziale Materiały i metody, z tą różnicą, że doświadczenie wykonano na większych płytkach hodowlanych i stosowano większe objętości pożywki. Po 24 godz. od początku infekcji komórki zebrano z dołków hodowlanych przy pomocy roztworu trypsyny i EDTA w PBS, zwirowano, a następnie osad wypłukano w 1 ml buforu PBS i odwirowano przy niskich obrotach w celu usunięcia bakterii, które mogły być obecne w hodowli na zewnątrz komórek. Z komórek izolowano całkowite RNA i otrzymano cDNA stosując jako startery mieszaninę heksadeoksynukleotydów, tak jak opisano w rozdziale Materiały i metody. Następnie wykonano reakcje PCR w czasie rzeczywistym, z parami starterów sipseq5 i sipseq6 lub F16RNA i R16RNA (Tabela 21).

**Tabela 21. Analiza transkryptu *sipB* w komórkach MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009 i VNP/sipB, wykonana metodą PCR w czasie rzeczywistym.**

	Ct		$\Delta\Delta Ct$
	<i>sipB</i>	Gen 16S rRNA	
MC38CEA VNP20009	41,9 ± 4,84	24,06 ± 0,03	1261
MC38CEA VNP/sipB	31,38 ± 0,85	23,84 ± 0,12	

Podano średnią ± odchylenie standardowe z pięciu powtórzeń. Doświadczenie wykonano jeden raz.

Otrzymany wynik pozwala stwierdzić, że kasetę *PsifB-6xHis-sipB* jest aktywna transkrypcyjnie w bakterjach VNP/sipB, które zakaziły komórki nowotworowe MC38CEA. Poziom mRNA kodującego *sipB* w wewnątrzkomórkowych VNP/sipB był ponad tysiąckrotnie wyższy niż w VNP20009. W wewnątrzkomórkowych bakterjach



VNP/sipB głównym źródłem ekspresji *sipB* był promotor *PsifB* w kasecie *PsifB-6xHis-sipB* wbudowanej do genomu.

#### **6.4. Indukcja apoptozy komórek MC38CEA zakażonych VNP20009 i VNP/sipB.**

Doświadczenia, w których komórki nowotworowe MC38CEA zakażano bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, nie pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, czy te bakterie są bardziej proapoptotyczne względem zakażonych komórek MC38CEA niż bakterie VNP20009 (Rys. 16). Bakterie VNP20009 transformowane plazmidem były mniej pQE30-6xHis-*sipB* inwazyjne niż VNP20009. Natomiast VNP/sipB w porównaniu z VNP20009 charakteryzowały się podobnym stopniem inwazyjności (Rys. 54). Ponadto brak plazmidu pQE30-6xHis-*sipB* w bakteriach VNP/sipB, który uprzednio był źródłem ekspresji 6xHis-SipB, pozwalał na wyznaczenie VNP/sipB plazmidem kodującym czerwone białko fluorescencyjne (RFP). Ekspresja RFP w bakteriach VNP/sipB i VNP20009 umożliwiła zbadanie cytotoksyczności w tej części populacji komórek MC38CEA, która była zakażona bakteriami.

Sprawdzono, czy taki sposób ekspresji, której źródłem jest kasetta *PsifB-6xHis-sipB* wbudowana do genomu bakterii, zwiększa ich zdolność do indukcji apoptozy zakażonych komórek eukariotycznych. Porównano poziom apoptozy komórek gruczolaka MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB w teście protekcji gentamycynowej. Do zakażenia komórek użyto bakterii transformowanych plazmidem pDsRed2, kodującym białko RFP, co pozwalało na oznaczenie apoptozy w populacji komórek zakażonych bakteriami wykazującymi czerwoną fluorescencję.

Aby zwiększyć procentowy udział w populacji bakterii, które wykazują ekspresję RFP, bakterie VNP20009 i VNP/sipB transformowane plazmidem pDsRed2 przygotowywano do infekcji na dwa sposoby:

(1) Bakterie hodowano na podłożu stałym LB/agar z ampicyliną, w temperaturze 30°C przez 24 godz., po czym podłoże inkubowano w temperaturze około 4°C przez 16 godz. Niska temperatura sprzyjała dojrzewaniu i akumulacji RFP w bakteriach. Tuż przed infekcją czerwone kolonie bakteryjne z podłoża stałego zawieszano w 2 ml pożywki TB z ampicyliną i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 2 godz.

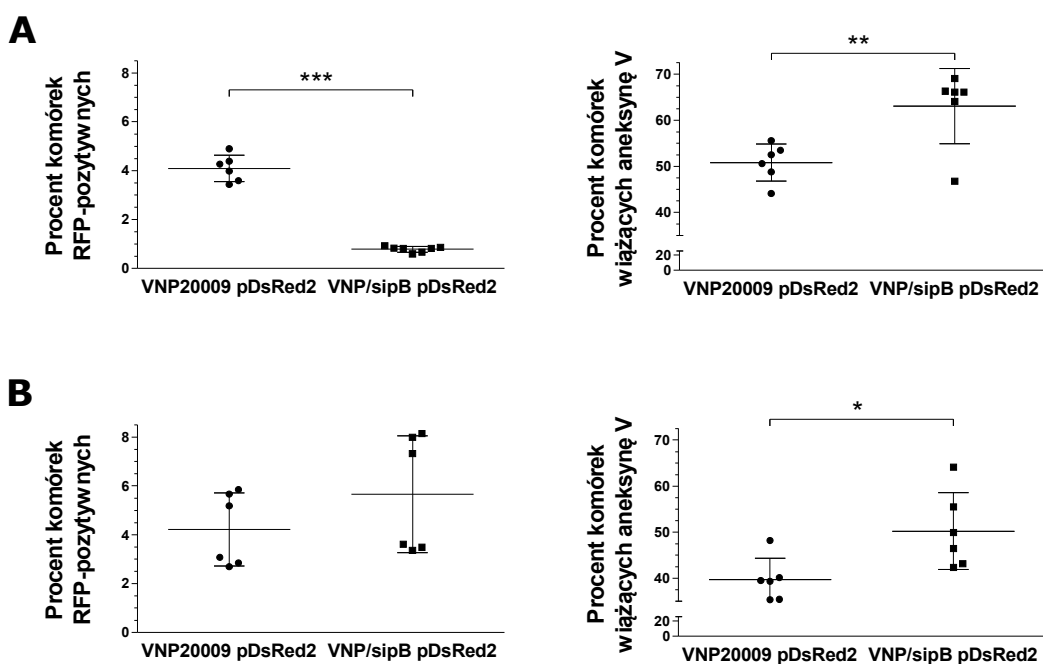
(2) Całonocną hodowlę płynną w pożywce TB z ampicyliną inkubowano na lodzie przez 24 godz., a następnie w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez 2 godz.

Zaobserwowano, że taki sposób przygotowania bakterii zwiększa liczbę bakterii wykazujących czerwoną fluorescencję, do około 50 - 70% z całej populacji bakterii. Dalej bakterie przygotowywano do infekcji w sposób opisany w rozdziale Materiały i

metody.

Komórki linii nowotworowej MC38CEA hodowano na 24-dołkowych płytkach w ilości  $7,5 \cdot 10^4$ , w pożywce DMEM z 10% FBS przez 24 godz. Komórki zakażano bakteriami zawieszonymi w 200  $\mu$ l pożywki Opti-MEM przy MOI = 20. Po 45 min koinkubacji komórek z bakteriami do hodowli dodawano 200  $\mu$ l pożywki Opti-MEM z gentamycyną (końcowe stężenie gentamycyny wynosiło 100  $\mu$ g/ml) i inkubowano przez 1  $\frac{1}{2}$  godz. Następnie pożywkę zmieniano na 0,5 ml Opti-MEM zawierającej 2% FBS i 20  $\mu$ g/ml gentamycyny i inkubowano przez 20 godz.

Z dołków zbierano pożywkę hodowlaną, a komórki zbierano używając roztworu trypsyny i EDTA w PBS, łączono z pożywką zebraną z dołków, wirowano (5 min, 400g, temperatura pokojowa). Komórki barwiono aneksyną V znakowaną APC w sposób opisany w rozdziale Materiały i metody i analizowano cytofluorymetrycznie. Analizie poddano populację komórek wykazujących czerwoną fluorescencję, pochodzącą od wewnątrzkomórkowych bakterii z ekspresją RFP. Na Rys. 60A przedstawiono wynik analizy wiązania aneksyny V przez komórki zakażone bakteriami przygotowanymi w sposób opisany w punkcie (1), a na Rys. 60B - bakteriami przygotowanymi tak jak opisano w punkcie (2).



**Rys. 60. Apoptoza komórek MC38CEA zakażonych bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB, mierzona poziomem wiązania aneksyny V.** Bakterie były transformowane plazmidem pDsRed2, kodującym RFP. Komórki zakażono bakteriami przygotowanymi do infekcji tak jak opisano w tekście, w punkcie (1) - **(A)** lub (2) - **(B)**. Analizowano cytofluorymetrycznie komórki wykazujące czerwoną fluorescencję specyficzną dla RFP. Pokazano procent komórek z czerwoną fluorescencją w całej populacji (lewa strona panelu A i B) oraz procent komórek wiążących aneksynę V znakowaną APC w populacji komórek z czerwoną fluorescencją (prawa strona obu paneli). Przedstawiono średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wykonanych w tryplikatach  $\pm$  odchylenie standardowe. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  w t-teście Studenta dla niesparowanych danych.

Na liczbę komórek MC38CEA z czerwoną fluorescencją specyficzną dla RFP wpływał poziom ekspresji tego białka w populacji bakterii oraz inwazyjność bakterii. Niezależnie od procentowego udziału zakażonych komórek wykazujących czerwoną fluorescencję w całej populacji komórek zaobserwowano, że dodatkowa kopia genu *sipB* wzmacnia proapoptotyczne efekty wywołane przez zakażenie komórek bakteriami *Salmonella*. Populacja zakażonych komórek wiążących aneksynę V była o około 10% liczniejsza, gdy komórki były zakażone VNP/*sipB* w porównaniu z komórkami zakażonymi VNP20009.

#### **6.5. Porównanie efektów terapeutycznych VNP20009 i VNP/*sipB* w mysich modelach nowotworowych.**

Bakterie VNP20009 są zdolne do hamowania wzrostu transplantacyjnych guzów nowotworowych. Wprowadzona modyfikacja polegająca na integracji kasety *PsifB-6xHis-sipB* do genomu, zwiększała właściwości proapoptotyczne VNP/*sipB*. Następnie sprawdzono, czy zmodyfikowane bakterie skuteczniej hamują wzrost guzów nowotworowych.

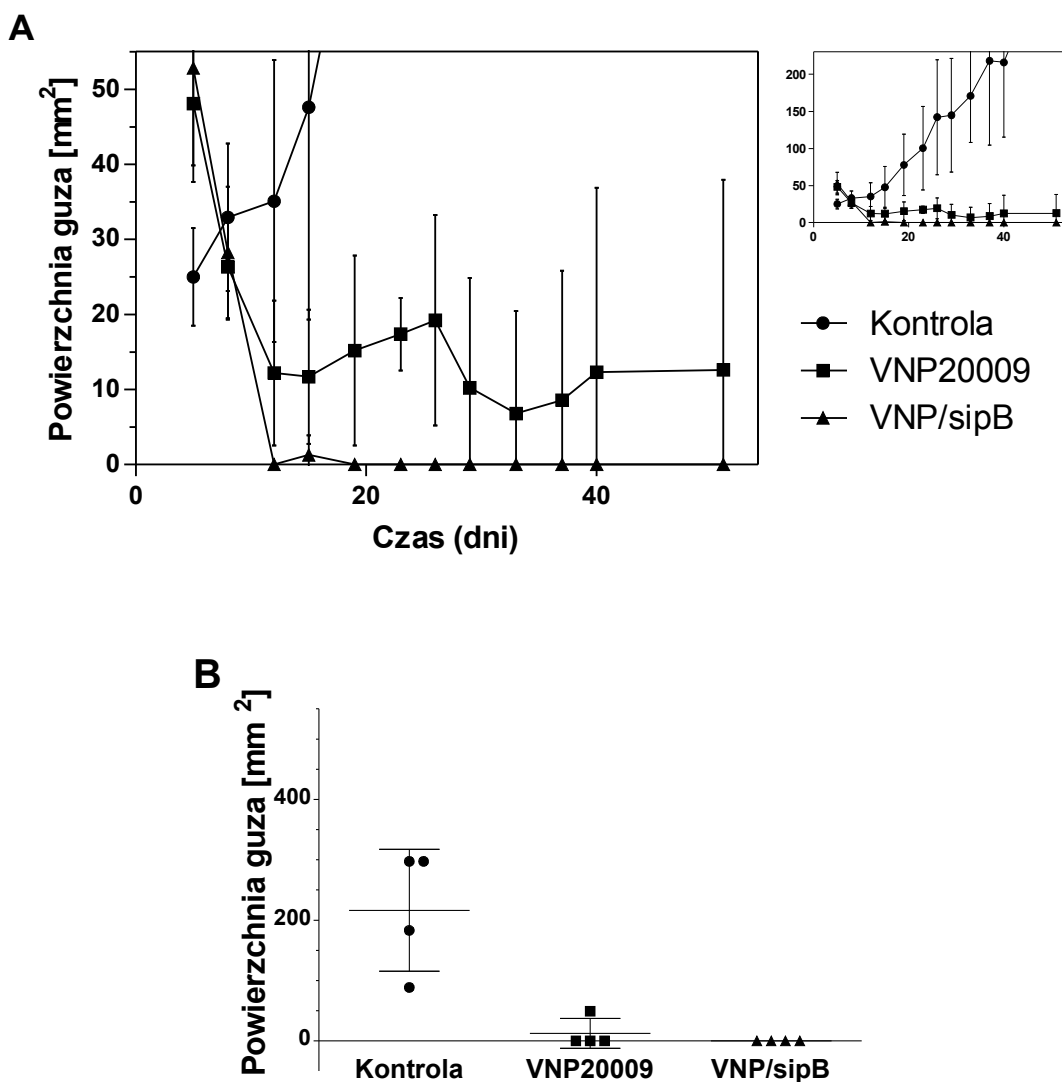
Samicom myszy szczepu C57Bl/6 podano podskórnie komórki nowotworowe linii gruczolakoraka MC38CEA. W drugim dniu po podaniu komórek nowotworowych w miejsce implantacji nowotworu podano PBS lub PBS zawierający  $2,5 \cdot 10^6$  bakterii VNP20009 lub VNP/*sipB*. Wzrost guzów nowotworowych określano mierząc dwa wzajemnie prostopadłe wymiary guza, a z iloczynu tych wartości obliczono powierzchnię guza (Rys. 61).

W każdej z grup były cztery myszy. We wszystkich grupach u każdej myszy doszło do uformowania i wzrostu guza. W ósmym dniu po inokulacji komórek nowotworowych w grupie kontrolnej średnia powierzchnia guzów wynosiła  $32,9 \pm 9,8$ , a w dwunastym dniu -  $35,1 \pm 18,8$  mm<sup>2</sup> i guzy rosły do zakończenia doświadczenia. W grupie myszy, którym podano VNP20009, w tym samym czasie (8 - 12 dzień) średnia powierzchnia guzów zmniejszyła się z  $26,3 \pm 7,0$  do  $12,2 \pm 9,6$  mm<sup>2</sup>. Natomiast powierzchnia guzów u myszy, którym podano VNP/*sipB* w ósmym dniu to  $28,2 \pm 8,7$  mm<sup>2</sup>, a w dniu dwunastym u żadnej z myszy rozmiar guza nie umożliwiał pomiaru i aż do terminacji w sześćdziesiątym siódmym dniu doświadczenia nie zaobserwowano wzrostu nowotworu w tej grupie myszy.

Wśród myszy, którym podano VNP20009 średni rozmiar guzów uległ redukcji do  $11,7 \pm 8,9$  mm<sup>2</sup> w piętnastym dniu, po czym zwiększał się, a w dwudziestym szóstym dniu wynosił  $19,2 \pm 14,0$  mm<sup>2</sup>, ale u jednej myszy w tym czasie doszło do eliminacji guza; w dwudziestym dziewiątym dniu eliminację guza zaobserwowano u dwóch myszy, a cztery dni później u kolejnej myszy nie stwierdzono obecności guza.

Natomiast u jednej myszy w grupie od dnia 33 do 51, kiedy zakończono doświadczenie, powierzchnia guza wzrosła z 27 do 50 mm<sup>2</sup>.

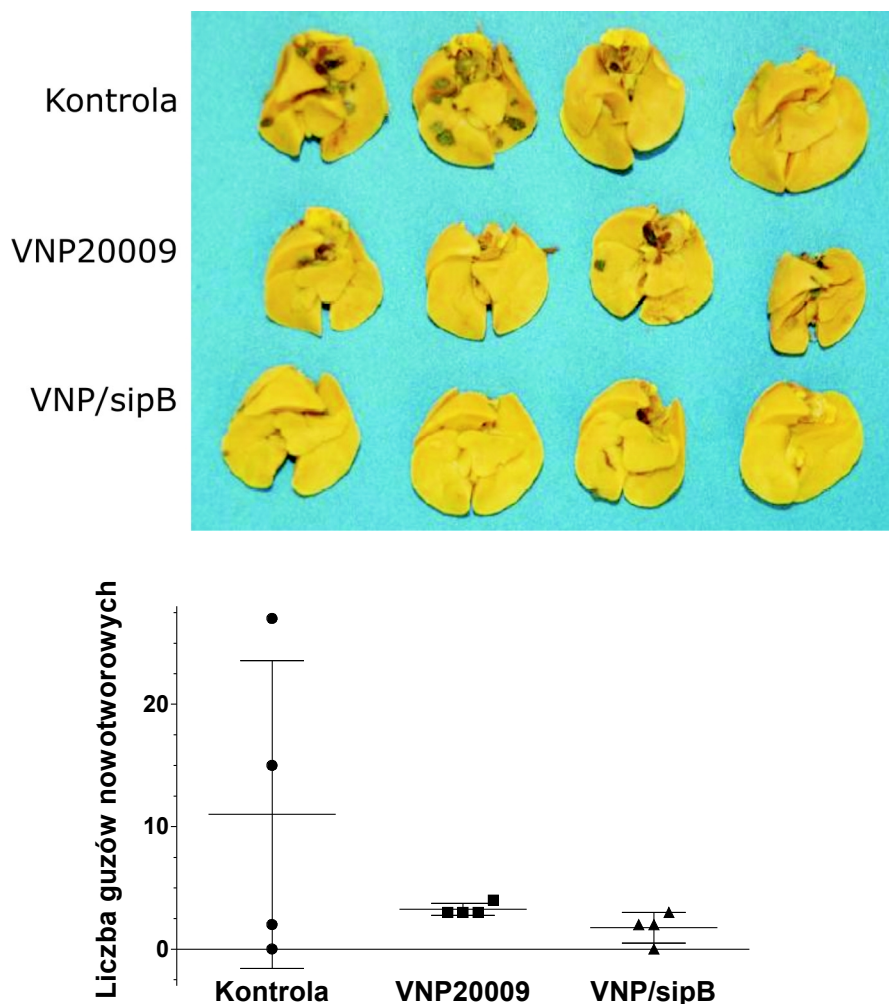
Bakterie VNP/sipB silniej niż VNP20009 hamowały wzrost guzów podskórnych MC38CEA, aż do ich całkowitej eliminacji u wszystkich badanych myszy. Większa średnia powierzchnia guzów na początku doświadczenia w obu grupach myszy, którym podano bakterie, w porównaniu z grupą kontrolną może wynikać z napływu leukocytów do miejsca wzrostu guza, wywołanego podaniem bakterii.



**Rys. 61. Porównanie efektywności bakterii VNP20009 i VNP/sipB w hamowaniu wzrostu guzów podskórnych MC38CEA u myszy szczepu C57Bl/6.** Bakterie w ilości  $2,5 \cdot 10^6$  podano dwa dni po podaniu komórek MC38CEA, w miejsce implantacji guza. **(A)** Kinetyka wzrostu guzów. **(B)** Powierzchnia guzów w czterdziestym dniu po implantacji komórek nowotworowych. Przedstawiono średnią powierzchnię guzów u czterech myszy w każdej z grup doświadczalnych  $\pm$  odchylenie standardowe.

Kolejnym modelem, w którym porównano skuteczność VNP/sipB i VNP20009, był model płucny czerniaka u myszy szczepu C57Bl/6. Komórki czerniaka B16F10, podane dożylnie formują guzy nowotworowe w płucach.

Samicom myszy podano dożylnie komórki B16F10, a 96 godzin później podano donosowo bufor PBS lub PBS zawierający  $2 \cdot 10^7$  bakterii. W 28 dniu po podaniu komórek nowotworowych od myszy pobrano płuca i barwiono roztworem kwasu pikrynowego. Guzy nowotworowe były widoczne w postaci ciemnych punktów (Rys. 62).

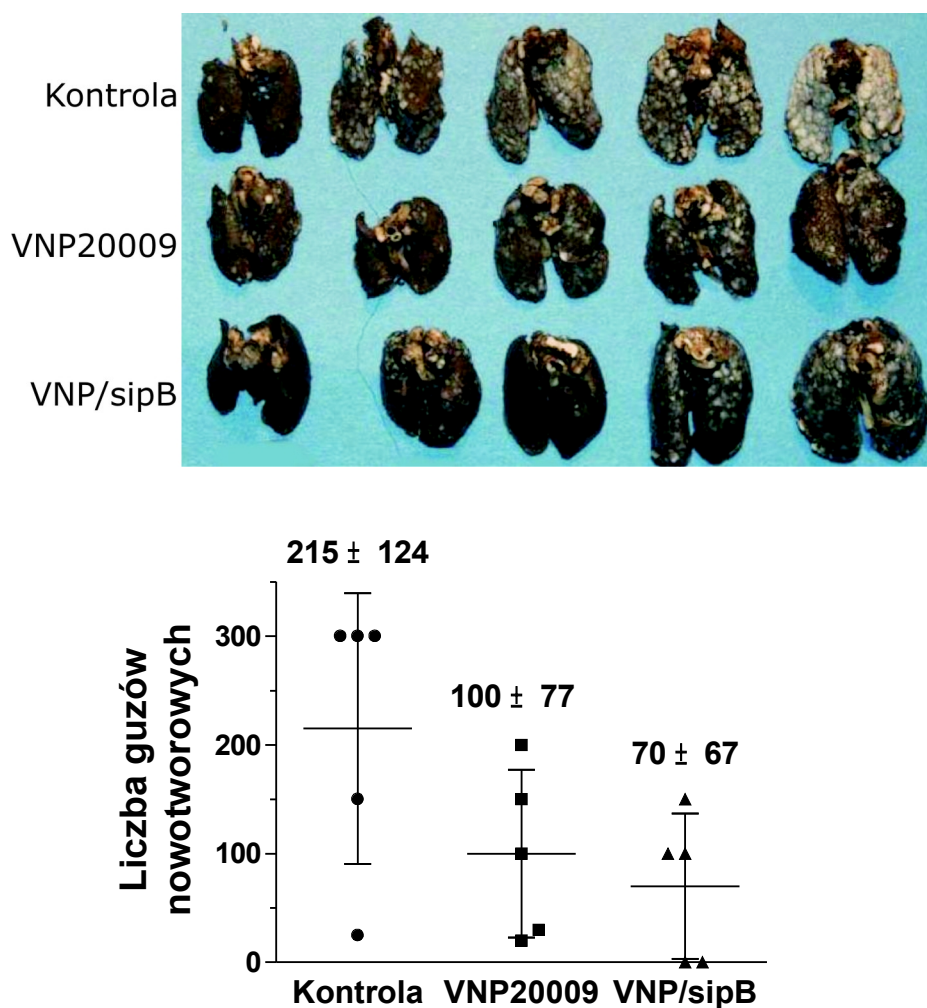


**Rys 62. Porównanie efektów terapeutycznych VNP20009 i VNP/sipB w płucnym modelu nowotworowym czerniaka B16F10.**  $2 \cdot 10^7$  bakterii podano donosowo 96 godz. po dożylnym podaniu komórek B16F10. Płuca były pobrane i wybarwione kwasem pikrynowym dwadzieścia osiem dni po podaniu komórek nowotworowych. Guzki nowotworowe są widoczne jako ciemne punkty na żółtym tle. Na wykresie pokazano średnią liczbę guzów w płucach  $\pm$  odchylenie standardowe.

W płucach myszy, którym podano bakterie VNP/sipB, znaleziono średnio mniej niż dwa guzy na płuco ( $1,75 \pm 1,26$ ). W grupie myszy, którym podano VNP20009 były średnio trzy guzy na płuco ( $3,25 \pm 0,5$ ).

W wykonanym doświadczeniu liczba guzów nowotworowych w płucach była niewielka również w grupie kontrolnej. Aby zweryfikować zaobserwowaną różnicę w efektywności przeciwnowotworowej obu typów bakterii, wykonano kolejne doświadczenie, wykorzystując model płucny u myszy szczepu Balb/c.

Samicom myszy podano dożylnie komórki nowotworowe linii gruczolakoraka CT26CEA, które podobnie jak komórki B16F10 u myszy C57Bl/6, osiedlają się w płucach i tworzą guzki nowotworowe. Dwa dni później myszom podano donosowo bufor PBS lub PBS zawierający  $2,5 \cdot 10^7$  bakterii VNP20009 lub VNP/sipB. W piętnastym dniu po podaniu komórek nowotworowych od myszy pobrano płuca, które barwiono czernią indyjską (Rys. 63A). Efektywność hamowania wzrostu nowotworu oceniono na podstawie liczby guzków w płucach (Rys. 63B).



**Rys. 63. Porównanie efektywności bakterii VNP20009 i VNP/sipB w hamowaniu wzrostu guzów płucnych CT26CEA u myszy szczepu Balb/c.** Bakterie w liczbie  $2,5 \cdot 10^7$  podano donosowo 48 godz. po dożylnym podaniu komórek CT26CEA. Płuca pobrano od myszy piętnaście dni po podaniu komórek nowotworowych; płuca były barwione czernią indyjską, a guzki nowotworowe są widoczne jako białe punkty na czarnym tle. Na wykresie pokazano liczbę guzów nowotworowych w płucach poszczególnych myszy oraz średnią liczbę guzków nowotworowych  $\pm$  odchylenie standardowe.

Liczba guzów nowotworowych w płucach myszy kontrolnych była duża, w trzech przypadkach w płucach było nawet ponad trzysta guzków. Wartość tę przyjęto jako najwyższą możliwą do policzenia. W płucach myszy, którym podano VNP20009, liczba guzów była około dwukrotnie mniejsza niż w płucach myszy kontrolnych. Natomiast

podanie VNP/sipB prowadziło do dalszego zahamowania wzrostu nowotworu, a średnia liczba guzków w tej grupie była o 30% mniejsza niż u myszy, którym podano VNP20009. Spośród myszy, którym podano VNP/sipB, w dwóch płucach nie stwierdzono obecności guzków nowotworowych.

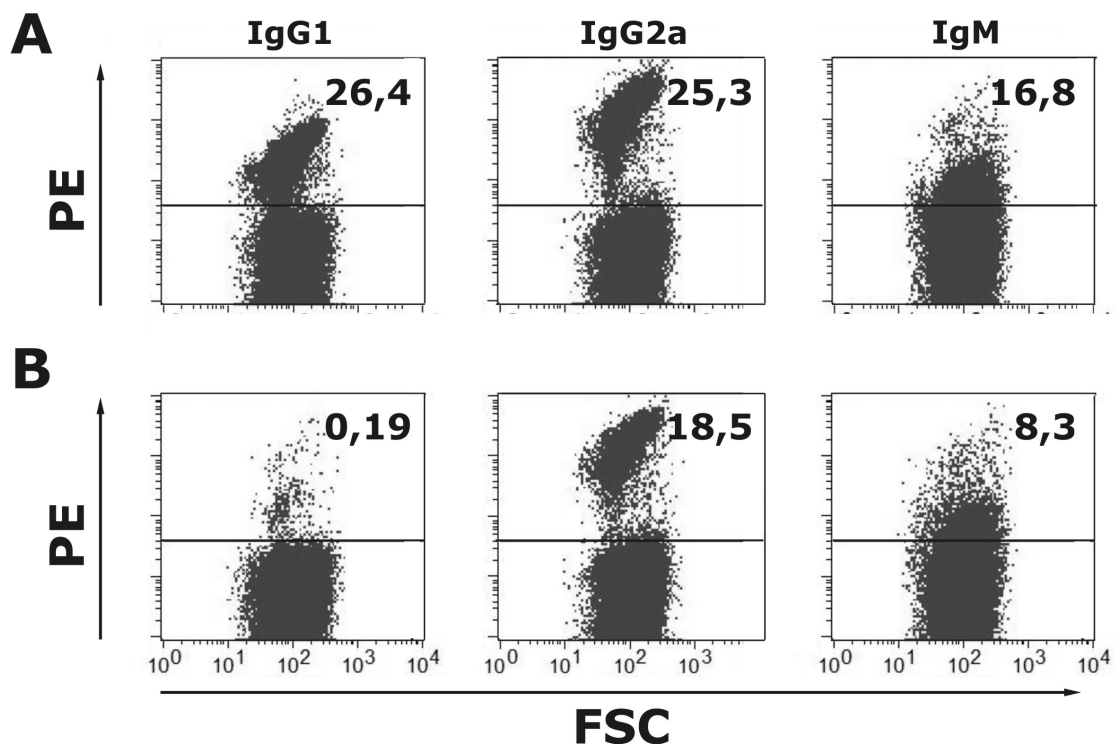
#### **6.6. Badanie izotypu przeciwciał w surowicy myszy immunizowanych bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB.**

Bakterie VNP/sipB silniej hamowały wzrost guzków nowotworowych niż bakterie VNP20009. Sprawdzone, czy podanie VNP/sipB myszom może ukierunkować reakcję immunologiczną w kierunku odpowiedzi komórkowej. Jednym z markerów świadczących o przewadze elementów odpowiedzi komórkowej bądź humoralnej w przebiegu reakcji odpornościowej jest izotyp produkowanych przeciwciał IgG. Rozwojowi odpowiedzi typu komórkowego towarzyszy produkcja interferonu- $\gamma$ , głównie przez limfocyty pomocnicze typu Th1. IFN $\gamma$  stymuluje ekspresję immunoglobulin o izotypie IgG2a. Natomiast interleukina-4, produkowana przez limfocyty pomocnicze typu Th2, promuje przełączenie izotypu przeciwciał na IgG1 oraz rozwój odpowiedzi humoralnej.

Aby sprawdzić, czy skutkiem podania bakterii może być ukierunkowanie reakcji immunologicznej, zbadano jakość odpowiedzi humoralnej, indukowanej podaniem VNP20009 lub VNP/sipB do organizmu myszy. Wybiórcza stymulacja odpowiedzi immunologicznej typu Th1 przez VNP/sipB mogłaby częściowo tłumaczyć silniejszy efekt terapeutyczny tych bakterii.

Samicom myszy szczepu Swiss podano dożylnie  $5 \cdot 10^6$  bakterii VNP20009 lub VNP/sipB, a po czterech tygodniach podano tą drogą drugą, dziesięciokrotnie wyższą dawkę VNP/sipB, w celu stymulacji syntezy przeciwciał. Dwa tygodnie po podaniu drugiej dawki od immunizowanych myszy pobrano krew i oznaczono izotyp przeciwciał przeciwko antygenom bakteryjnym, wiążących VNP20009 w teście opisanym w Materiałach i metodach.

Skutkiem podania VNP20009 było pojawienie się wszystkich analizowanych izotypów przeciwciał (IgG1, IgG2a i IgM), natomiast w surowicy myszy szczepionych VNP/sipB stwierdzono wysoki poziom IgG2a przy niemal braku IgG1 (Rys. 64). Takie ukierunkowanie odpowiedzi immunologicznej na odpowiedź typu Th1 zaobserwowano u połowy myszy Swiss, którym podano VNP/sipB. Jest bardzo prawdopodobne, że zaobserwowane przełączenie izotypów jest jednym z ogniw w łańcuchu reakcji odpornościowych stymulowanych przez VNP/sipB, których efektem jest zahamowanie wzrostu nowotworów w organizmie szczepionych myszy.



**Rys. 64.** Izotypowanie przeciwciał w surowicy immunizowanych myszy szczepu Swiss przy pomocy analizy cytofluometrycznej Ig związanych na powierzchni bakterii VNP20009. Bakterie były inkubowane w rozcieńczonej surowicy myszy, której podano VNP20009 (A) lub VNP/sipB (B). Przeciwciała anti-*Salmonella* związane do bakterii oznaczono poprzez wiązanie biotynylowanych przeciwciał rozpoznających mysie IgG1, IgG2a lub IgM, które wykryto poprzez wiązanie streptawidyny znakowanej fikoerytryną (PE). Wynik jest reprezentatywny dla doświadczenia, w którym danym typem bakterii immunizowano cztery myszy.

## 7. Konstrukcja syntetycznego promotora Psp2.

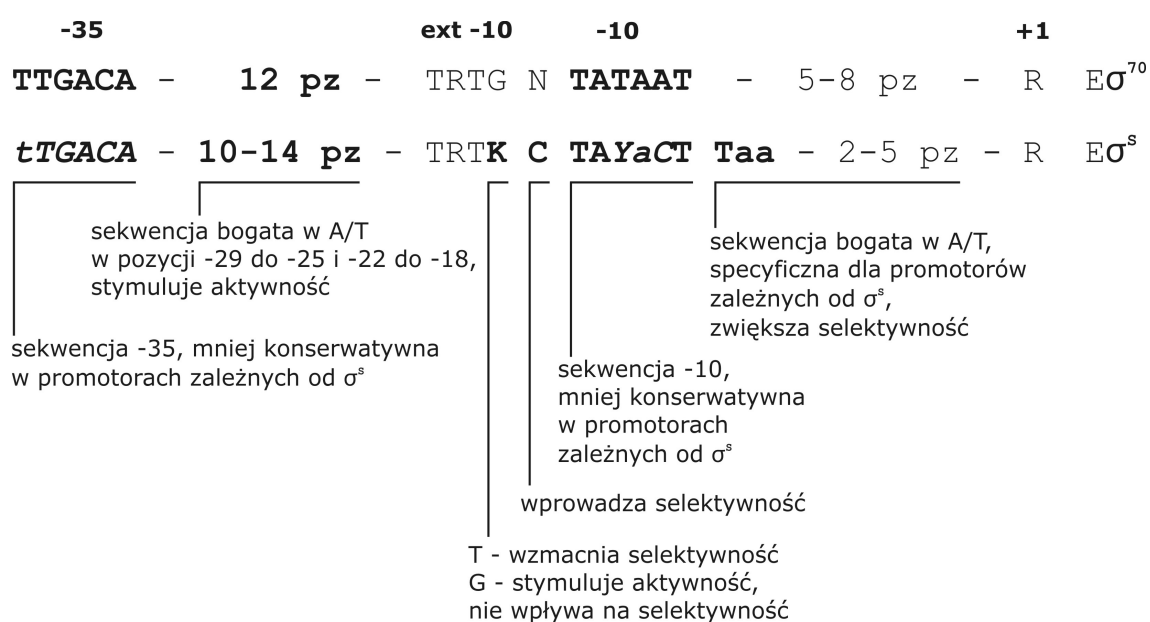
Aby spotęgować aktywność kasyety ekspresyjnej regulującej ekspresję 6xHis-*sipB* zaplanowano syntetyczną sekwencję promotorową Psp2. Sekwencja ta miała wykorzystywać endogenne mechanizmy regulacji ekspresji genów *Salmonella* i być aktywna w bakteriach, które zakaziły komórki eukariotyczne, podobnie jak *PsifB*. Wprawdzie promotor *PsifB* także kieruje ekspresją genu kodującego białko regulowane w sposób specyficzny dla genów SPI2 i ulega aktywacji w warunkach wewnątrzkomórkowych, to jednak naturalne sekwencje promotorowe mogą mieć niższą aktywność niż promotory syntetyczne obecne np. w wektorach ekspresyjnych. Wyższy poziom transkrypcji dodatkowej kopii genu *sipB* powinien umożliwić większą akumulację białka 6xHis-SipB w bakteriach, a to zwiększyłoby cytotoksyczność względem zakażonych komórek eukariotycznych.

Nowy promotor skonstruowano w oparciu o fragmenty regulujące ekspresję genów drugiej wyspy patogenności (SPI2). Aktywność promotorów genów drugiej wyspy patogenności i genów, których produkty są transportowane przez TTSS kodowany w obrębie SPI2 (między innymi *sifB*) jest pozytywnie regulowana wiązaniem czynnika



transkrypcyjnego SsrB. Sekwencja DNA wiązana przez ten czynnik nie jest konserwatywna i charakteryzuje się różną długością w przypadku poszczególnych genów, a jej położenie względem miejsca startu transkrypcji jest różne [131]. Spośród pięciu genów SPI2 analizowanych przez Walthersa i wsp., sekwencja ta występuje w pozycji od -122 do -95 oraz od -14 do +3 nukleotydu względem startu transkrypcji. Na podstawie dostępnej w literaturze analizy sekwencji promotorów genów SPI2 [131] wybrano sekwencję wiążaną przez białko SsrB, zidentyfikowaną w sekwencji promotorowej genu *ssaG*. Ekspresja *ssaG* była najwyższa w grupie przeanalizowanych genów. Fragment ten jest położony w odległości 49 - 36 nukleotydów na lewo od miejsca startu transkrypcji, a więc w pozycji od -49 do -36, i ma sekwencję: GGTATATACCGGAT.

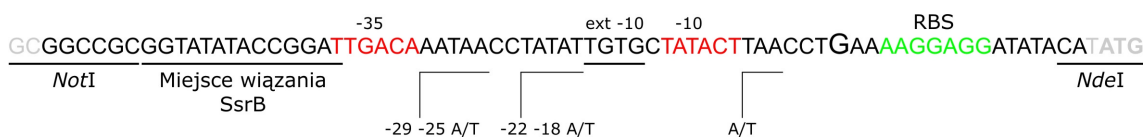
Planowany promotor Psp2 powinien umożliwiać transkrypcję genu w bakteriach wewnątrzkomórkowych. W warunkach głodu i stresu komórkowego, w *S. typhimurium* żyjących w makrofagach i komórkach nabłonkowych, głównym czynnikiem sigma zaangażowanym w transkrypcję jest białko RpoS [132]. Na Rys. 65 pokazano sekwencje rdzenia promotora selektywnie wiązane przez podjednostki sigma 70 (sigma D, RpoD) lub sigma 38 (sigma S, RpoS) *E. coli* [133], na podstawie których zaprojektowano część sekwencji syntetycznego promotora. Sekwencje aminokwasowe podjednostek sigma 70 i sigma 38 u *S. typhimurium* LT2 i wielu szczepów *E. coli* są odpowiednio w 97% lub 99% identyczne. To pozwoliło wzorować się na sekwencjach konsensusowych podawanych w literaturze jako specyficzne i optymalne dla rozpoznania przez te podjednostki w promotorach u bakterii *E. coli*.



**Rys. 65. Sekwencje konsensusowe promotorów preferencyjnie rozpoznawane i transkrybowane przez kompleks polimerazy z podjednostką sigma 70 lub sigma S.** Pogrubioną czcionką zaznaczono elementy konserwowane w większości promotorów zależnych

od  $E\sigma^{70}$  i  $E\sigma^S$ . Sekwencje zdegenerowane zaznaczono pochyłą czcionką, a najbardziej zmienne - małą czcionką. Wzajemne położenie elementu -35 i -10 jest bardziej zmienne w promotorach zależnych od  $E\sigma^S$  ( $17 \pm 2$  pz). ext -10 - rozszerzony rejon -10, R - nukleotyd purynowy (A lub G), miejsce startu transkrypcji; Y - nukleotyd pirymidynowy (T lub C), K - T lub G, W - A lub T, M - A lub C, E - holoenzym polimerazy RNA ze związaną podjednostką sigma. Zmodyfikowano z [133].

Aby zwiększyć prawdopodobieństwo selektywnej aktywności transkrypcyjnej promotora w bakteriach żyjących w wakuoli wewnątrz zakażonych komórek, w sekwencji Psp2 umieszczono elementy -35 i -10 preferencyjnie rozpoznawane przez kompleks polimerazy RNA z czynnikiem sigma S. Na Rys. 66 przedstawiono schematycznie poszczególne elementy Psp2.



**Rys. 66. Sekwencja syntetycznego promotora Psp2.** Zaznaczono miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego SsrB, regulującego ekspresję genów drugiej wyspy patogenności, rdzeń promotora (elementy -10 i -35) oraz odcinki bogate w nukleotydy adeninowe i tymidynowe (A/T), fragment kodujący sekwencję wiążącą rybosom (RBS) i miejsce startu transkrypcji (powiększona czcionka). Trzy ostatnie nukleotydy (ATG) to miejsce startu translacji. Na obu końcach fragmentu umieszczono sekwencje miejsc restrykcyjnych, które umożliwiły wklonowanie fragmentu do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>.

Miejsca restrykcyjne *NotI* i *NdeI* umożliwiły klonowanie fragmentu do odpowiednio przygotowanego wektora plazmidowego, a dzięki obecności miejsca *NdeI*, w obrębie którego występuje sekwencja ATG, możliwe było uzyskanie fuzji translacyjnej poprzez wstawienie w to miejsce sekwencji kodującej genu.

### 7.1. Uzyskanie syntetycznej sekwencji promotorowej Psp2.

Zaprojektowano sekwencję dwóch wzajemnie komplementarnych oligonukleotydów, o długości 71 nt (Psp2-sens) i 69 nt (Psp2-antysens).

Przeprowadzono reakcję hybrydyzacji oligonukleotydów w buforze do ligacji fragmentów DNA. Mieszanina reakcyjna o objętości 30  $\mu$ l zawierała 500 pmol każdego z oligonukleotydów. Mieszaninę inkubowano w termocyklerze przez 3 min w temperaturze 94°C, po czym ochładzano stopniowo do temperatury 25°C (spadek temperatury o 0,02°C na sekundę) i inkubowano w 25°C przez 2 min.

W wyniku hybrydyzacji otrzymano dwuniciowy fragment DNA, z fragmentami jednoniciowymi na obu końcach: końcem 5' kompatybilnym z miejscem restrykcyjnym *NotI* oraz z końcem 3' kompatybilnym z miejscem *NdeI* (Rys. 67).

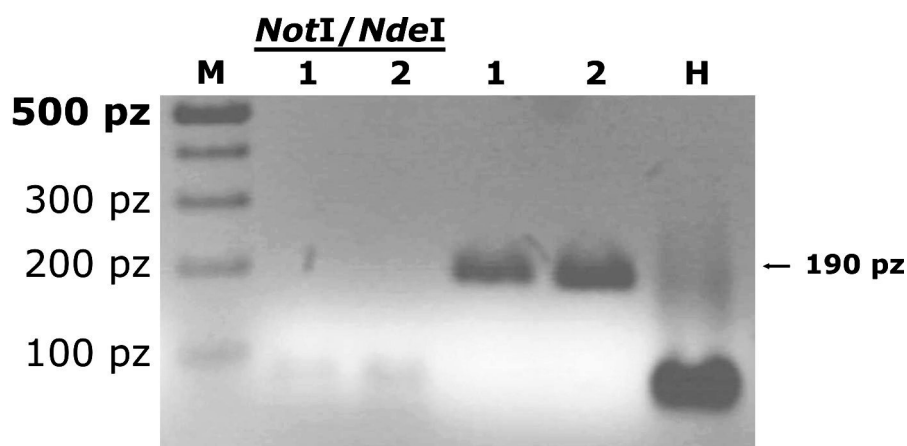
```

5' GGCCGCGGTATATACCGGATTGACAAATAACCTATATTGTGCTATACTTAACCTGAAAAGGAGGATATACA 3'
|||||
3' CGCCATATATGGCCTAACTGTTTATTGGATATAACACGATATGAATTGGACTTTTCCTCCTATATGTAT 5'

```

**Rys. 67. Fragment Psp2 otrzymany w wyniku hybrydyzacji dwóch oligonukleotydów.** Przeprowadzono reakcję hybrydyzacji oligonukleotydów: Psp2-sens i Psp2-antysens, w której otrzymano fragment gotowy do wklonowania do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>, poddanego działaniu enzymów *NotI* i *NdeI*.

Oligonukleotydy były fosforylowane na końcu 5' cząsteczki, co pozwoliło na wstawienie otrzymanego fragmentu bezpośrednio do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> poddanego uprzednio działaniu enzymów *NdeI* i *NotI*, w reakcji ligacji fragmentów DNA. Uzyskany plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2 (3032 pz) namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α. Na matrycy DNA plazmidowego wyizolowanego z dwóch klonów bakterii przeprowadzono reakcje PCR ze starterami pGEM-F i pGEM-R, komplementarnymi do sekwencji flankujących miejsca wstawienia fragmentu (*NdeI* i *NotI*) w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub>. Produkty reakcji PCR poddano działaniu enzymów *NdeI* i *NotI* i rozdzielono elektroforetycznie (Rys. 68).



**Rys. 68. Rozdział elektroforetyczny produktów uzyskanych w reakcji PCR na matrycy DNA plazmidowego pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2 oraz tych produktów poddanych działaniu enzymów restrykcyjnych.** Produkty PCR były otrzymane w reakcji ze starterami pGEM-F i pGEM-R na DNA plazmidowym wyizolowanym z dwóch klonów bakterii transformowanych plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2. Produkty PCR poddano działaniu enzymów *NdeI* i *NotI*. Fragmenty DNA rozdzielono w 2,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). H - fragment DNA uzyskany w wyniku hybrydyzacji oligonukleotydów Psp2-sens i Psp2-antysens. M - wzorzec długości fragmentów DNA.

W wyniku reakcji PCR z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2 otrzymano produkt o długości odpowiadającej oczekiwanej długości produktu na matrycy DNA plazmidu, w którym w miejsca *NdeI* i *NotI* został włączony fragment Psp2 (188 pz). W przypadku pustego plazmidu otrzymanoby produkt o długości odpowiadającej 119 pz. Produkty PCR poddano działaniu enzymów *NdeI* i *NotI*. W obrazie elektroforetycznym otrzymano dwa prążki, które mogły odpowiadać oczekiwanym fragmentom (jeden prążek odpowiadałby

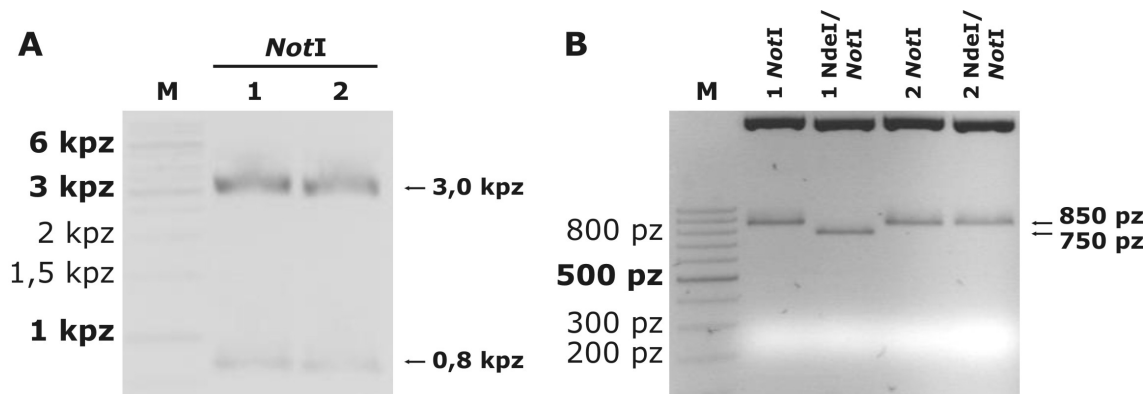
dwóm fragmentom 71 i 73 pz; drugi - 44 pz). Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2 namnożono i oczyszczono z klonu bakterii numer dwa i DNA plazmidowe wykorzystano do dalszej pracy.

## 7.2. Wstawienie sekwencji kodującej RFP pod kontrolę Psp2. Uzyskanie plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp*.

W celu oceny aktywności sekwencji promotorowej Psp2, pod kontrolą Psp2 umieszczono gen kodujący białko RFP. Dzięki temu możliwe było zbadanie aktywności promotora Psp2 przy pomocy analizy cytofluorymetrycznej bakterii transformowanych plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp*.

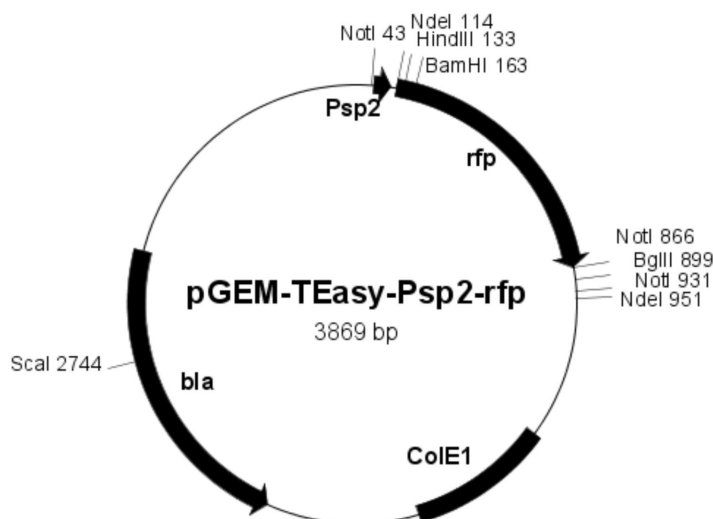
Z plazmidu pDsRed2 w reakcji PCR ze startami FgfpNde i RgfpEB uzyskano sekwencję kodującą białko RFP. Produkt PCR (760 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub> i namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α. Przeprowadzono analizę restrykcyjną, która pozwoliła na wybranie klonu zawierającego plazmid, w którym gen *rfp* był wstawiony w orientacji zgodnej z numeracją plazmidu. W plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub> poniżej miejsca wstawienia insertu jest obecne miejsce rozpoznawane przez enzym *NdeI*. Dzięki temu orientacja wstawki zgodna z numeracją plazmidu umożliwiła w następnym etapie wycięcie *rfp* przy pomocy enzymu *NdeI*.

Fragment kodujący RFP wycięty z plazmidu enzymem *NdeI* (838 pz) wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2, poddanego uprzednio działaniu *NdeI*. Przeprowadzono analizę restrykcyjną. DNA plazmidowe wyizolowane z ośmiu klonów bakterii poddano działaniu enzymu *HindIII*. Miejsce restrykcyjne *HindIII* występuje w pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp* jednokrotnie. Wybrano dwa klony z plazmidem o długości odpowiadającej oczekiwanej długości plazmidu zawierającego wstawkę (3870 pz). Następnie sprawdzono orientację *rfp* względem Psp2 poddając DNA plazmidowe działaniu enzymów *NotI* oraz *NdeI* i *NotI* (Rys. 69).



**Rys. 69. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp* poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych.** DNA plazmidowe uzyskane z dwóch klonów bakterii, poddane działaniu *NotI* (A) oraz *NdeI* i *NotI* (A, B). Fragmenty rozdzielono w 0,8% (A) lub 1,8% (B) żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

Produktami działania enzymu *NotI* powinny być fragmenty odpowiadające 823 pz, 66 pz i 2981 pz w przypadku orientacji *rfp* zgodnej z orientacją *Psp2* i z numeracją plazmidu, a w przypadku orientacji przeciwnej - 87 pz, 66 pz i 3717 pz. Z obu plazmidów poddanych działaniu *NotI* otrzymano fragmenty o długości około 3 kpz i 800 pz, świadczące o pożądanej orientacji wstawki, czyli zgodnej z orientacją *Psp2*. Orientację *rfp* względem *Psp2* zweryfikowano poddając plazmidy działaniu *NotI* oraz *NdeI* i *NotI*, a w celu dokładnego określenia długości fragmenty rozdzielono w 1,8% żelu agarozowym (Rys. 69B). W przypadku prawidłowej orientacji *rfp* względem *Psp2* w wyniku działania enzymów *NotI* i *NdeI* powinno się uzyskać fragmenty o długościach: 752 pz, 2961 pz, 71 pz, 66 pz i 20 pz. Na podstawie obecności prążka odpowiadającego fragmentowi o długości około 750 pz stwierdzono, że klon numer jeden zawiera plazmid o prawidłowo zorientowanych względem siebie sekwencjach *Psp2* i *rfp*. Na Rys. 70 przedstawiono schematycznie plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp*, w którym pod kontrolą promotora *Psp2* umieszczono gen kodujący białko RFP. Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp* namnożono i oczyszczono z bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$ , a otrzymanym preparatem DNA transformowano bakterie VNP20009.



**Rys. 70. Schemat plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp*.** *rfp* - gen kodujący białko RFP; *Psp2* - sekwencja promotorowa; *ColE1* - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen oporności na ampicylinę.

### 7.3. Porównanie aktywności promotorów *PsifB* i *Psp2*.

Aby porównać poziom ekspresji RFP pod kontrolą promotorów *Psp2* i *PsifB*, przygotowano plazmid, w którym gen *rfp* umieszczono pod kontrolą *PsifB*.

W tym celu z plazmidu pDsRed2 w reakcji PCR ze starterami ForGFP i RevGFP, zawierającymi miejsce restrykcyjne *BglII*, uzyskano sekwencję kodującą *rfp*. Produkt PCR (843 pz) poddano działaniu enzymu *BglII* i wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB*. Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-rfp* (4457 pz) namnożono w bakteriach *E. coli* DH5 $\alpha$ , a otrzymanym DNA plazmidowym transformowano bakterie VNP20009.

Bakterie VNP20009 transformowane plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*rfp* lub pGEM-T<sub>Easy</sub>-*PsifB-rfp*, w późnej logarytmicznej fazie wzrostu zawieszono w pożywce TB, MgM lub Opti-MEM, w gęstości 1·10<sup>8</sup> bakterii/ml i hodowano w temperaturze 37°C przez 24 godz. Ekspresję RFP analizowano przy pomocy cytofluorymetru przepływowego (Tabela 22).

**Tabela 22. Ekspresja białka RFP pod kontrolą promotora Psp2 lub PsifB w bakteriach *S. typhimurium* VNP20009.**

	VNP20009 pGEM-T <sub>Easy</sub> -Psp2- <i>rfp</i>	VNP20009 pGEM-T <sub>Easy</sub> - <i>PsifB-rfp</i>
<b>MgM</b>	3,7 ± 1,2*	0,5 ± 0,1
<b>Opti-MEM</b>	4,7 ± 2,5	0,6 ± 0,2

\* procent bakterii z ekspresją RFP; średnia ± odchylenie standardowe fluorescencji hodowli uzyskanych z trzech różnych klonów bakterii.

Oba typy bakterii hodowanych w pożywce TB nie wykazywały fluorescencji specyficznej dla RFP. W populacji bakterii hodowanych w warunkach indukujących aktywność *PsifB*, czyli w pożywkach MgM lub Opti-MEM, ekspresja RFP była kilkukrotnie wyższa pod kontrolą Psp2 w porównaniu z ekspresją z *PsifB*. A więc, w zastosowanych warunkach hodowli aktywność promotora Psp2 jest wyższa od aktywności *PsifB*. Wykonanie kolejnych doświadczeń, w których analizowana będzie ekspresja RFP w bakteriach, które zakaziły komórki eukariotyczne, pozwoli stwierdzić, czy ten promotor prowadzi do wyższej wewnątrzkomórkowej ekspresji RFP niż *PsifB* i czy warto go zastosować do kontroli ekspresji 6xHis-*sipB*.

## 8. Delecja genu *avrA* z chromosomu *S. typhimurium* VNP20009 i VNP/*sipB*.

W celu wzmocnienia proapoptycznego efektu ekspresji 6xHis-*sipB* z chromosomu bakterii VNP/*sipB* usunięto gen *avrA*. Gen kodujący białko AvrA zainaktywowano wstawiając w jego obrębie fragment kodujący acetylotransferazę chloramfenikolu (*cat*), wraz z sekwencją promotora warunkującą transkrypcję tego genu. Fragment ten wstawiono do *avrA* w genomie VNP20009 metodą wykorzystaną do integracji kasety *PsifB*-6xHis-*sipB*. W tym celu przygotowano plazmid integracyjny poprzez wstawienie kasety *avrA*::*cat* do warunkowo replikującego plazmidu pST76A.

Aby uzyskać plazmid pST76A-*avrA*::*cat* wykonano kolejno etapy:

1. Z DNA genomowego VNP20009 namnożono sekwencję kodującą genu *avrA*.
2. *avrA* wklonowano do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Uzyskano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA*.
3. Z plazmidu pKRP10 otrzymano fragment *cat* zawierający sekwencję kodującą acetylotransferazę chloramfenikolu z sekwencją promotorową.

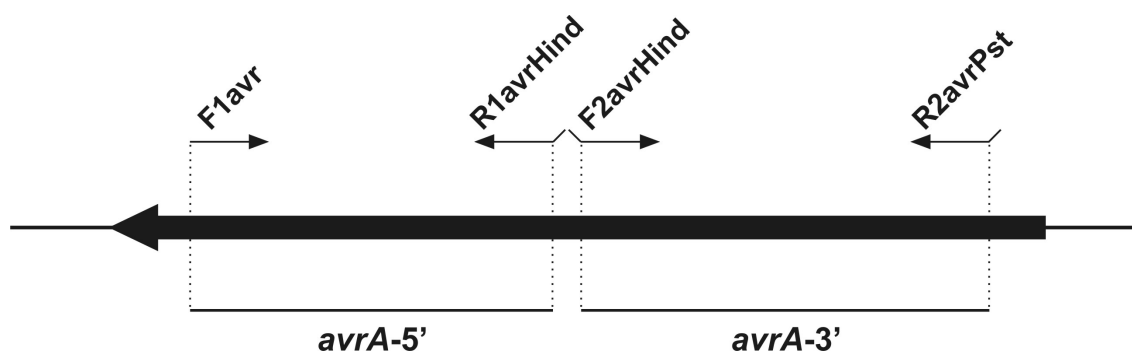
4. Do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA*, w obrębie *avrA* wstawiono fragment *cat*. Uzyskano plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA::cat*.

5. Z plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA::cat* uzyskano fragment *avrA::cat* i wstawiono go do plazmidu pST76A. Uzyskano plazmid pST76A-*avrA::cat*.

Otrzymanym plazmidem transformowano VNP20009. Wynikiem integracji plazmidu pST76A-*avrA::cat* do genomu były bakterie VNP20009-pST76-*avrA::cat*. Podobnie jak w przypadku integracji kasety *PsifB*-6xHis-*sipB*, w kolejnym etapie genom przecięto przy pomocy endonukleazy I-SceI. W ten sposób wyselekcjonowano bakterie, w których z genomu w wyniku rekombinacji i naprawy pęknięcia została usunięta sekwencja plazmidowa, a w obrębie *avrA* pozostała sekwencja *cat*. Otrzymano bakterie VNP/*avrA::cat* ze zinaktywowanym genem *avrA*.

### 8.1. Klonowanie kasety *avrA::cat* do plazmidu pST76A. Uzyskanie plazmidu pST76A-*avrA::cat*.

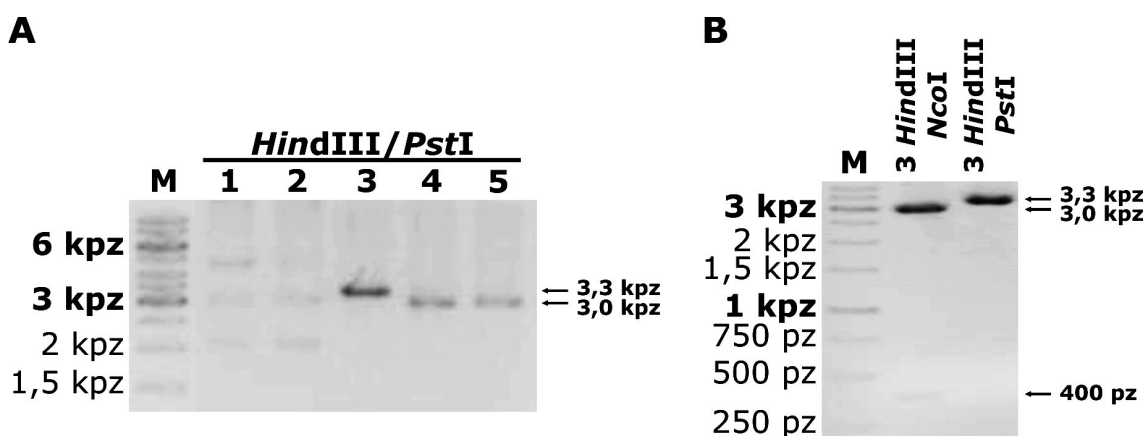
Sekwencję kodującą genu *avrA* (*Salmonella typhimurium* LT2, STM2865) uzyskano z DNA genomowego *S. typhimurium* VNP20009. W obrębie tej sekwencji nie występuje odpowiednie miejsce restrykcyjne, które można wykorzystać do wstawienia fragmentu *cat* w obrębie *avrA*. Dlatego namnożono osobno fragmenty 5' i 3' genu *avrA* (Rys. 71).



**Rys. 71. Schemat fragmentu kodującego *avrA* w genomie *S. typhimurium*.** Zaznaczono dwie pary starterów, które użyto do namnożenia fragmentów *avrA*-5' i *avrA*-3' w reakcji PCR na DNA genomowym *S. typhimurium* VNP20009.

W reakcji PCR ze starterami F1avr i R1avrHind otrzymano fragment *avrA*-5' (364 pz), a w reakcji z parą F2avrHind i R2avrPst zamplifikowano fragment *avrA*-3' (424 pz). W wyniku reakcji PCR wprowadzono na końcu 3' fragmentu *avrA*-5' miejsce restrykcyjne *Hind*III, natomiast do fragmentu *avrA*-3' - miejsce *Hind*III na końcu 5' i miejsce *Pst*I na końcu 3'.

Fragment *avrA-5'* wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>. Plazmid pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'</sub> namnożono w bakterjach *E. coli* DH5 $\alpha$ , a DNA plazmidowe wyizolowane z pięciu klonów bakterii poddano działaniu enzymów *Hind*III i *Pst*I (Rys. 72A). Na podstawie analizy restrykcyjnej wybrano klon bakterii numer trzy, a DNA plazmidowe wyizolowane z tego klonu poddano działaniu enzymów *Hind*III i *Nco*I oraz *Hind*III i *Pst*I. Z plazmidu poddanego działaniu *Hind*III i *Pst*I otrzymano oczekiwany fragment o długości ok. 3,3 kpz (przewidywane produkty: 3343 pz i 36 pz), a produktami działania *Hind*III i *Nco*I były fragmenty o długości odpowiadającej 379 pz i 3000 pz (Rys. 72B). Orientacja fragmentu genu *avrA-5'* w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'</sub> była przeciwna do numeracji plazmidu.

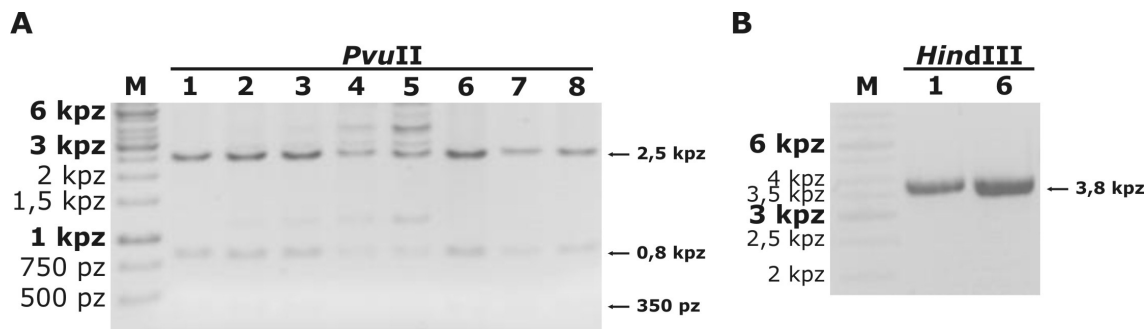


**Rys. 72. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'</sub> poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych. (A)** DNA plazmidowe wyizolowane z pięciu klonów bakterii, poddane działaniu enzymów *Hind*III i *Pst*I. **(B)** Plazmid otrzymany z klonu trzeciego, poddany działaniu enzymów *Hind*III i *Nco*I oraz *Hind*III i *Pst*I. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw). M - wzorzec długości fragmentów DNA.

W plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub> miejsce restrykcyjne *Pst*I znajduje się poniżej miejsca wstawienia *avrA-5'*. Aby zachować odpowiednią orientację fragmentów *avrA-5'* i *avrA-3'*, identyczną z orientacją tych sekwencji w genomie, do kolejnego etapu klonowania wykorzystano miejsce restrykcyjne *Pst*I obecne w pGEM-T<sub>Easy</sub> oraz miejsce *Hind*III, wprowadzone do pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'</sub> we fragmencie *avrA-5'*.

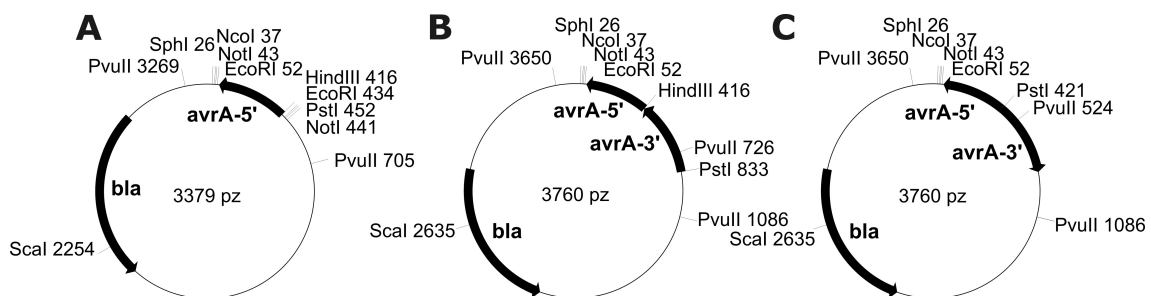
Produkt PCR *avrA-3'* poddano działaniu enzymów *Hind*III i *Pst*I i wstawiono do plazmidu pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'</sub> w miejsca restrykcyjne *Hind*III i *Pst*I. Otrzymano plazmid pGEM-T<sub>Easy-avrA-5'-avrA-3'</sub>. DNA plazmidowe wyizolowane z różnych klonów bakterii poddano działaniu enzymów *Pvu*II oraz *Hind*III (Rys. 73).





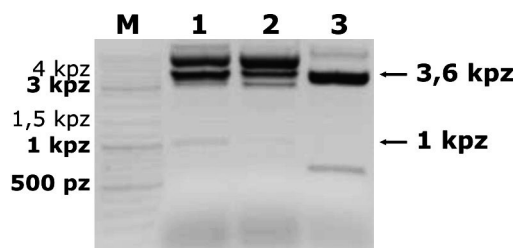
**Rys. 73. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-avrA-5'-avrA-3' poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych. (A)** DNA plazmidowe wyizolowane z ośmiu klonów bakterii, poddane działaniu enzymu *PvuII*. **(B)** Plazmidy otrzymane z klonów 1 i 6, poddane działaniu enzymu *HindIII*. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydydy (negatyw).

Długości fragmentów otrzymanych w wyniku trawienia enzymem *PvuII*, odpowiadające 360 pz, 836 pz i 2564 pz, świadczyły o prawidłowym wstawieniu fragmentu *avrA-3'* do pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'* (Rys. 73A, klony 1, 6 - 8; Rys. 74). Fragmenty plazmidów wyizolowanych z klonów 1 i 6, poddanych działaniu enzymu *HindIII*, miały oczekiwaną długość, odpowiadającą 3760 pz (Rys. 73B i 74). Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'-avrA-3'* namnożono i oczyszczono z klonu bakterii numer 6.



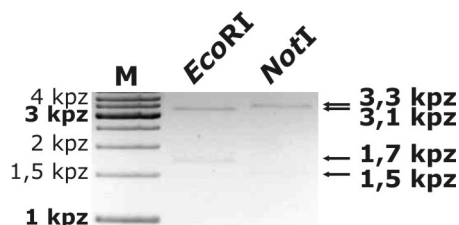
**Rys. 74. Klonowanie fragmentu *avrA-3'* do plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'*. (A)** Schemat plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'*. Do klonowania wykorzystano miejsca restrykcyjne *HindIII* i *PstI*. **(B)** Plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'-avrA-3'* z wstawką wklonowaną w orientacji zgodnej z orientacją fragmentu *avrA-5'*. **(C)** Plazmid o odwrotnej orientacji wstawkę względem orientacji *avrA-5'*.

Z plazmidu pKRP10 poddanego działaniu enzymu *HindIII* otrzymano fragment kodujący oporność na chloramfenikol, zawierający gen acetylotransferazy chloramfenikolu wraz z promotorem (*cat*). Pomiędzy fragmenty *avrA-5'* i *avrA-3'* w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA-5'-avrA-3'*, w miejsce restrykcyjne *HindIII*, wstawiono kasetę *cat*. Uzyskany plazmid pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA::cat*, wyizolowany z trzech klonów bakterii, poddano działaniu enzymu *NcoI* (Rys. 75). Klon bakterii numer 1 zawierał plazmid, w którym sekwencja kodująca *cat* była wstawiona przeciwnie do orientacji *avrA* i zgodnie z numeracją plazmidu, co potwierdziła długość fragmentów otrzymanych w wyniku działania enzymu *NcoI*, odpowiadających 992 pz i 3608 pz .



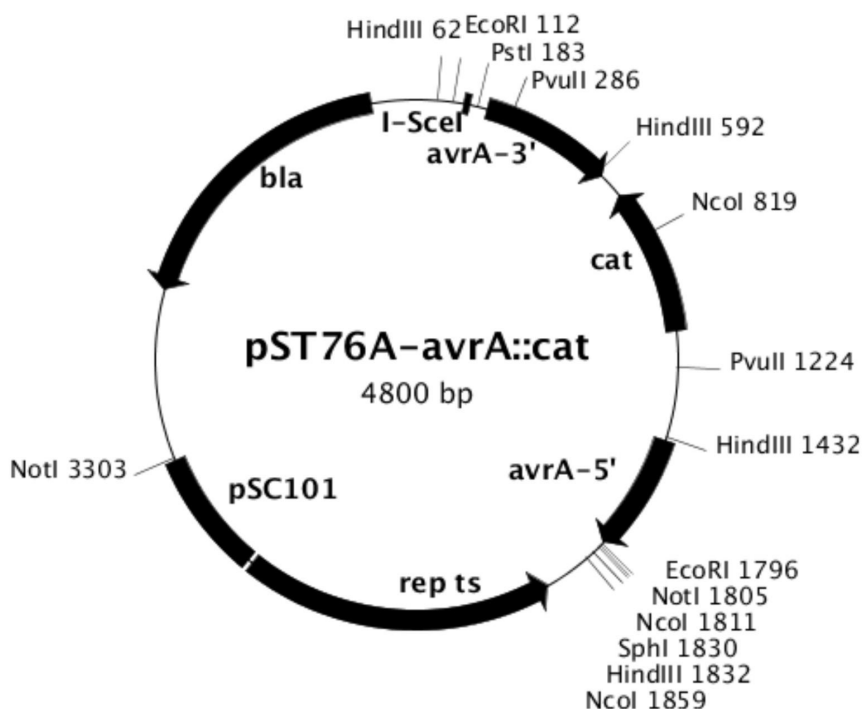
**Rys. 75. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pGEM-T<sub>Easy</sub>-*avrA::cat* poddanego działaniu enzymu *NcoI*. DNA plazmidowe było wyizolowane z trzech klonów bakterii, a fragmenty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).**

Sekwencję *avrA::cat* wycięto z plazmidu pGEM-TEasy-*avrA::cat* enzymami *SphI* i *PstI* i wstawiono do plazmidu integracyjnego pST76A, poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych *PstI* i *SphI*. DNA plazmidowe wyizolowane z sześciu klonów poddano działaniu enzymu *EcoRI*, a na podstawie analizy produktów wybrano jeden klon, z którego plazmid poddano działaniu *EcoRI* i *NotI* (Rys. 76).



**Rys. 76. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pST76A-*avrA::cat* poddanego działaniu enzymów *EcoRI* lub *NotI*. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).**

Z plazmidu pST76A-*avrA::cat*, w którym sekwencja genu *avrA* była zorientowana w kierunku zgodnym z numeracją plazmidu, w wyniku działania *EcoRI* lub *NotI* otrzymano fragmenty o długościach odpowiadających odpowiednio 1684 pb i 3116 pb oraz 1498 pb i 3302 pb. Na Rys. 77 przedstawiono schemat plazmidu pST76A-*avrA::cat*.



**Rys. 77. Schemat plazmidu pST76A-avrA::cat.** I-SceI - miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez endonukleazę I-SceI; *avrA-3'* i *avrA-5'* - fragmenty kodujące odpowiednio N- i C-koniec białka AvrA; *cat* - gen kodujący acetylotransferazę, warunkującą oporność na chloramfenikol; *rep ts* - gen kodujący białko Rep ts wymagane do replikacji plazmidu; *pSC101* - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen kodujący β-laktamazę, warunkującą oporność na ampicylinę.

W plazmidzie pST76A-avrA::cat regiony homologii miały długość 352 pz (fragment *avrA-5'*) i 394 (fragment *avrA-3'*). Plazmid ten koduje gen oporności na ampicylinę, warunkowo replikujące miejsce *ori*, umożliwiające namnażanie plazmidu w temperaturze 30°C, ale nie w 37 - 42°C, oraz miejsce I-SceI, rozpoznawane i cięte przez odpowiednią endonukleazę. Plazmid pST76A-avrA::cat namnożono w bakteriach *E. coli* DH5α, a otrzymanym DNA plazmidowym transformowano bakterie VNP20009.

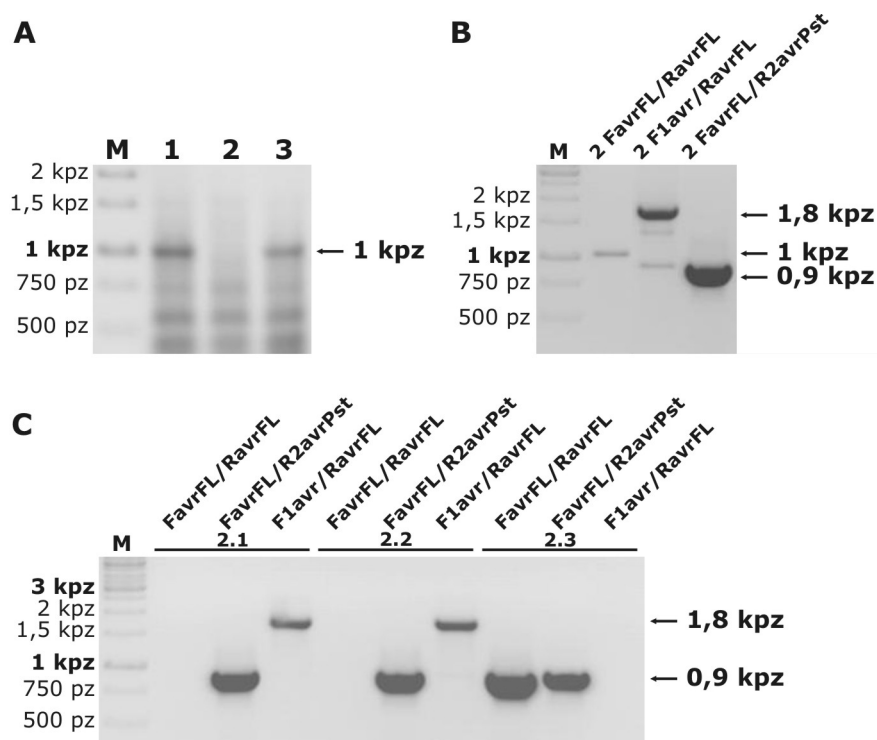
## 8.2. Integracja plazmidu pST76A-avrA::cat do chromosomu *S. typhimurium* VNP20009. Uzyskanie bakterii VNP20009 pST76A-avrA::cat.

Aby wbudować kasetę *avrA::cat* do genomu VNP20009 przeprowadzono procedurę analogiczną do tej, w wyniku której otrzymano bakterie VNP/sipB (rozdział 5). Transformowane plazmidem pST76A-avrA::cat bakterie inkubowano kolejno w temperaturach 30°C, 42°C i 37°C, w obecności antybiotyku, co umożliwiło selekcję bakterii, które wbudowały plazmid do genomu.

Bakterie *S. typhimurium* VNP20009 transformowano plazmidem pST76A-avrA::cat. Transformowane bakterie wysiano na podłoże stałe LB/agar z ampicyliną i hodowano w temperaturze 30°C przez 20 godz. Trzy kolonie przesiano na podłoże stałe LB/agar z ampicyliną i hodowano w temperaturze 42°C przez 6 godz., a następnie w 37°C (16

godz.) w celu selekcji klonów, które wbudowały plazmid do genomu. Spośród bakterii opornych na ampicylinę wybrano trzy duże kolonie bakteryjne, przygotowano lizaty i przeprowadzono reakcje PCR z parą starterów FavrFL i RavrFL, komplementarnych do sekwencji flankujących *avrA* w genomie. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR przedstawiono na Rys. 78A. W reakcji na matrycy DNA klonu bakterii numer 2 nie otrzymano produktu specyficznego dla tego fragmentu w dzikich VNP20009 (1048 pz). Zastosowany czas syntezy produktu (1 min) nie pozwalał na uzyskanie produktu obejmującego całą sekwencję plazmidu, wbudowaną pomiędzy sekwencje flankujące *avrA* (około 6 kpz), a więc brak produktu wskazywał na wbudowanie plazmidu pST76A-*avrA::cat* w obrębie *avrA*.

Bakterie z klonu numer 2 przesiano na podłoże stałe LB/agar z ampicyliną i hodowano przez 20 godz. w temperaturze 37°C. Wybrano trzy kolonie (2.1, 2.2 i 2.3) i przeprowadzono reakcje PCR z parami starterów FavrFL i RavrFL, FavrFL i R2avrPst oraz F1avr i RavrFL (Rys. 78C i Rys. 79).

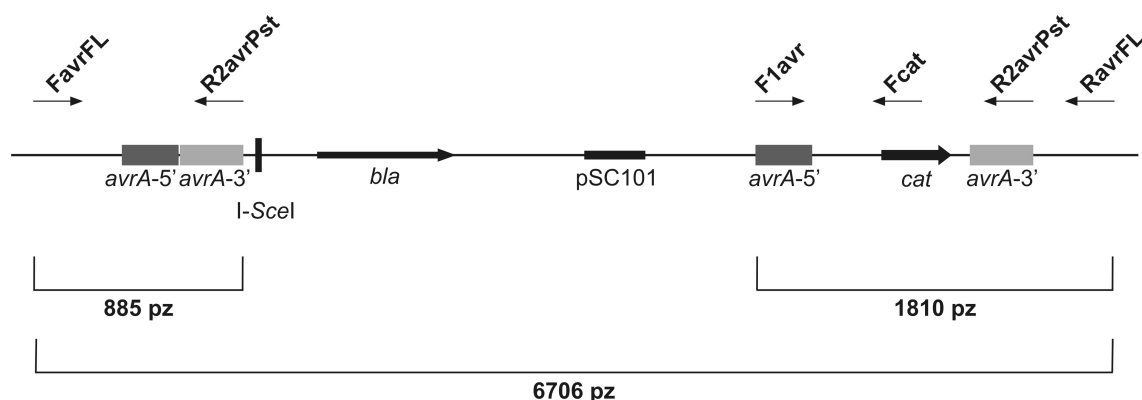


**Rys. 78. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA bakterii VNP20009-pST76A-*avrA::cat*.** (A) Produkty reakcji ze starterami FavrFL i RavrFL na matrycy DNA trzech klonów bakterii uzyskanych w wyniku selekcji w kierunku wbudowania plazmidu do genomu. (B) Produkty reakcji na matrycy DNA klonu numer 2 z trzema parami starterów. (C) Produkty reakcji na matrycy z klonów bakterii potomnych (2.1, 2.2 i 2.3) ze starterami FavrFL i RavrFL, FavrFL i R2avrPst lub F1avr i RavrFL. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

W reakcji ze starterami FavrFL i RavrFL z klonu drugiego otrzymano niewielką ilość produktu typu dzikiego (Rys. 78B, druga ścieżka), wynikającą prawdopodobnie z

obecności bakterii typu dzikiego w analizowanej kolonii. W klonach 2.1 i 2.2 bakterii potomnych, które otrzymano w wyniku przesiania bakterii na świeże podłoże selekcyjne i hodowli w temperaturze 37°C przez kolejne 20 godz., nie otrzymano tego produktu (Rys. 78C, ścieżki druga i piąta). Natomiast w reakcji ze starterami flankującymi *avrA* na matrycy DNA klonu 2.3 otrzymano produkt, który świadczył o tym, że w tych bakteriach nie doszło do wbudowania plazmidu do genomu w obrębie *avrA* (Rys. 78C, ósma ścieżka). Przyczyną uzyskania produktu w następnej reakcji na matrycy DNA klonu 2.3 (Rys. 78C, dziewiąta ścieżka), typowego dla bakterii zrekombinowanych, mogła być obecność plazmidu niewbudowanego do genomu w tych bakteriach.

Długości produktów PCR w reakcjach na matrycy z klonów 2.1 i 2.2, ze starterami F1avr i RavrFL oraz FavrFL i R2avrPst, odpowiadające odpowiednio 1810 pz i 885 pz, oraz brak produktu w reakcji ze starterami FavrFL i RavrFL świadczyły o wbudowaniu plazmidu pST76A-*avrA*::*cat* do genomu VNP20009 w wyniku rekombinacji z udziałem fragmentu *avrA*-3'. Na Rys. 79 przedstawiono schemat fragmentu genomu z plazmidem pST76A-*avrA*::*cat* wbudowanym do genomu w wyniku rekombinacji z udziałem fragmentów *avrA*-3' oraz zaznaczono pozycję starterów użytych do analizy.



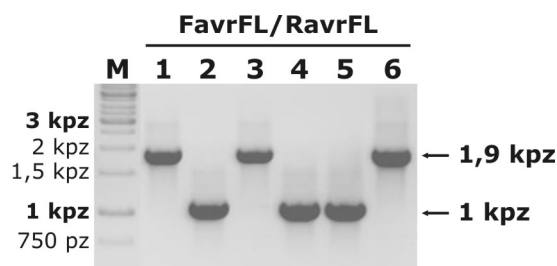
**Rys. 79. Schemat sekwencji genomowej uzyskanej w wyniku rekombinacji homologicznej z udziałem genu *avrA* i plazmidowego regionu homologii *avrA*-3'. Zaznaczono startery zastosowane do analizy klonów opornych na ampicylinę i długości produktów reakcji PCR z parami starterów: FavrFL i R2avrPst, F1avr i RavrFL oraz FavrFL i RavrFL. *avrA*-5' - fragment 5' genu *avrA* (352 pz), kodujący C-koniec AvrA; *avrA*-3' - fragment 3' genu *avrA* (394 pz), kodujący N-koniec AvrA; I-SceI - unikalne miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez endonukleazę I-SceI; *bla* - gen oporności na ampicylinę; pSC101 - miejsce *ori* plazmidu pST76A; *cat* - gen warunkujący oporność na chloramfenikol.**

### 8.3. Usunięcie sekwencji plazmidowej z genomu *S. typhimurium* VNP20009-pST76A-*avrA*::*cat*. Uzyskanie bakterii VNP/*avrA*::*cat*.

W kolejnym etapie z genomu bakterii VNP20009-pST76A-*avrA*::*cat* usunięto sekwencję plazmidową łącznie z genem kodującym oporność na ampicylinę, przeprowadzając procedurę identyczną z zastosowaną w przypadku integracji kasety

*PsifB-6xHis-sipB*. A więc sekwencja plazmidowa została usunięta w wyniku rekombinacji stymulowanej przecięciem genomu w miejscu I-SceI, wprowadzonym do genomu z sekwencją plazmidu pST76A-*avrA::cat*.

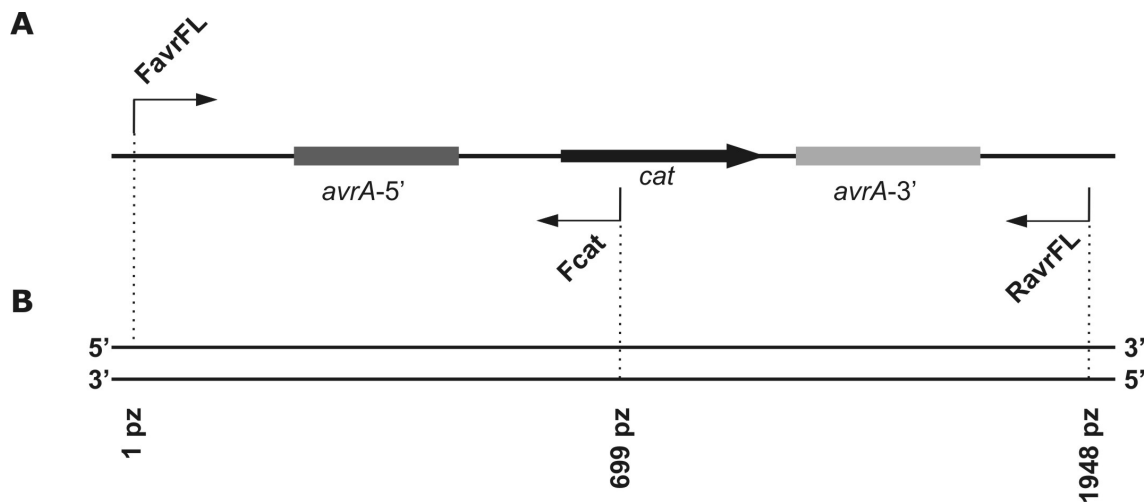
W tym celu bakterie VNP20009-pST76A-*avrA::cat* transformowano plazmidem pSTKST, kodującym gen oporności na kanamycynę i endonukleazę I-SceI oraz temperaturo-wrażliwe miejsce *ori*. Postępowano tak samo jak przy uzyskiwaniu VNP/*sipB* (rozdział 5.3). Wybrano sześć kolonii i w reakcjach PCR z parą starterów FavrFL i RavrFL sprawdzono, czy w wybranych klonach zaszła rekombinacja (Rys. 80).



**Rys. 80. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA bakterii VNP20009-pST76A-*avrA::cat*, poddanych działaniu endonukleazy I-SceI.** Produkty otrzymano w reakcji ze starterami FavrFL i RavrFL, na matrycy DNA sześciu klonów bakterii. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

Powstałe pęknięcie mogło być naprawione w wyniku rekombinacji z udziałem fragmentów *avrA-5'*, prowadząc do efektywnej rearanżacji, czyli inaktywacji *avrA* poprzez wbudowanie *cat*. W tym wypadku produktami reakcji PCR ze starterami FavrFL i RavrFL były fragmenty o długości odpowiadającej 1904 pz, a produkty takie otrzymano z klonów bakterii numer 1, 3 i 6. Natomiast rekombinacja pomiędzy fragmentami *avrA-3'* powodowała powrót do dzikiej formy genu *avrA*, a w reakcji PCR otrzymano produkty o długości odpowiadającej 1048 pz (klony numer 2, 4 i 5).

Sprawdzono poprawność sekwencji *avrA::cat* poprzez sekwencjonowanie produktu reakcji PCR ze starterami FavrFL i RavrFL, otrzymanego na matrycy DNA genomowego klonu bakterii numer 2. Do sekwencjonowania użyto starterów FavrFL, RavrFL i Fcat (Rys. 81). Wynik sekwencjonowania potwierdził insercję fragmentu *cat* w obrębie *avrA*.

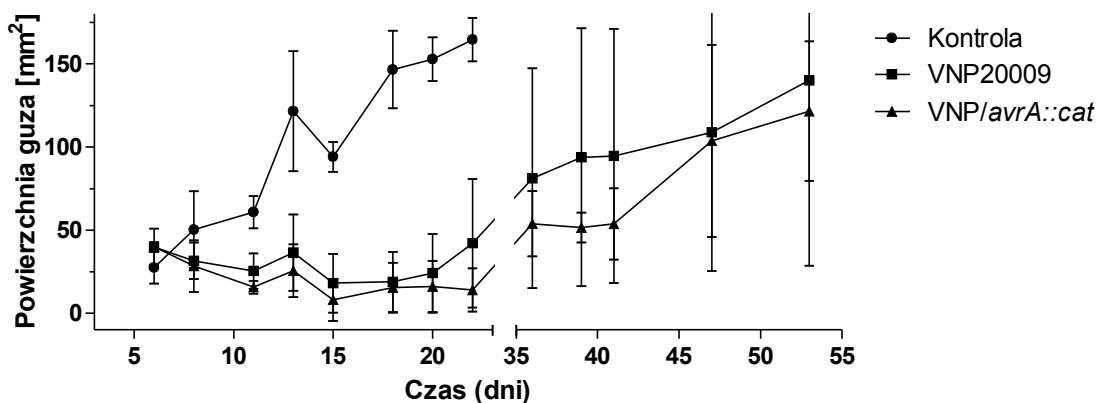


**Rys. 81. Schemat sekwencji genomowej z kasetą *cat* wbudowaną w obręb genu *avrA*. (A) Lokalizacja sekwencji komplementarnych do starterów FavrFL, Fcat i RavrFL, zastosowanych do sekwencjonowania. (B) Położenie sekwencjonowanych produktów względem pozycji oligonukleotydu FavrFL.**

#### 8.4. Porównanie efektywności VNP20009 i VNP/*avrA::cat* w hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych.

Sprawdzono, czy bakterie ze zinaktywowanym genem *avrA* skuteczniej hamują wzrost transplantacyjnych nowotworów mysich. W tym celu wykonano następujące doświadczenie:

Samicom myszy szczepu C57Bl/6 podano podskórnie komórki nowotworowe MC38CEA w ilości  $5 \cdot 10^5$ . Po 48 godz. w miejsce wzrostu guza podano 100  $\mu$ l PBS lub PBS zawierającego  $1 \cdot 10^5$  bakterii VNP20009 lub VNP/*avrA::cat*. Wzrost guzów nowotworowych monitorowano poprzez pomiar dwóch wzajemnie prostopadłych wymiarów guza, z iloczynu których obliczono powierzchnię guza (Rys. 82).



**Rys. 82. Porównanie efektywności bakterii VNP20009 i VNP/*avrA::cat* w hamowaniu wzrostu guzów podskórnych MC38CEA u myszy szczepu C57Bl/6.  $1 \cdot 10^5$  bakterii podano w miejsce implantacji guza, dwa dni po podaniu komórek MC38CEA. W każdej grupie doświadczalnej było pięć myszy. Podano średnią  $\pm$  odchylenie standardowe.**

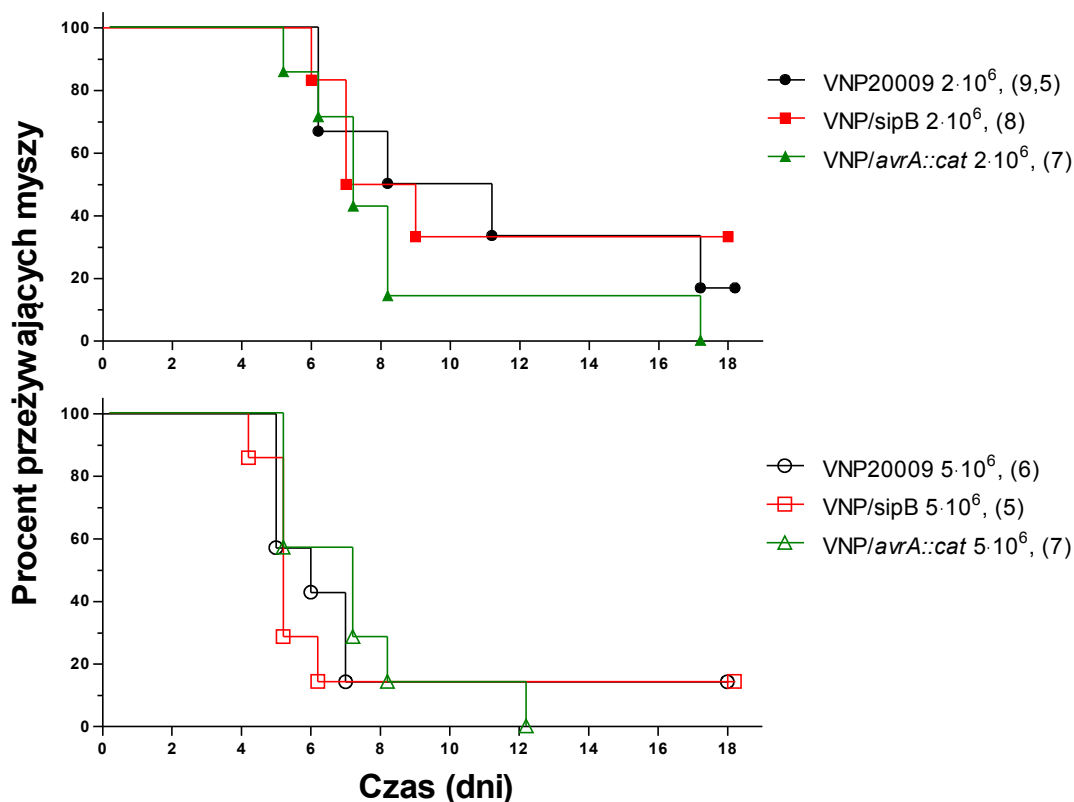
Doświadczenie wykonano na niewielkiej liczbie zwierząt (cztery myszy w każdej grupie doświadczalnej) i stąd różnice nie są statystycznie istotne. Jednakże rezultat jest o tyle zachęcający, że średnia powierzchnia guzów u myszy, którym podano VNP/*avrA::cat*, była mniejsza niż u myszy, którym podano VNP20009, a największą różnicę w hamowaniu wzrostu zaobserwowano między dwudziestym a czterdziestym dniem po podaniu komórek nowotworowych. Aby sprawdzić, czy również mniejsze dawki bakterii hamują wzrost nowotworu, w tym doświadczeniu myszom podano znacznie mniej bakterii niż w poprzednim, w którym porównano hamowanie wzrostu guzów przez VNP20009 i VNP/*sipB* (wtedy podano  $2,5 \cdot 10^6$  bakterii; Rys. 61). Podanie większej dawki VNP20009 i VNP/*avrA::cat* myszom obciążonym nowotworem powinno pozwolić zweryfikować uzyskany wynik i jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy VNP/*avrA::cat* może, podany w optymalnej dawce, skuteczniej hamować wzrost guzów nowotworowych niż wyjściowy szczep VNP20009. W przypadku większej skuteczności nowego szczepu będzie można rozważyć usunięcie fragmentu kodującego gen oporności na chloramfenikol z genomu VNP/*avrA::cat*.

#### **8.5. Porównanie atenuacji szczepu VNP20009, VNP/*sipB* i VNP/*avrA::cat* u myszy C57Bl/6.**

Aby sprawdzić czy wprowadzane modyfikacje wpływają na toksyczność szczepu bakteryjnego (lub patrząc z przeciwnej perspektywy - na stopień ich atenuacji) należałoby wyznaczyć wartość LD50 dla wszystkich stosowanych szczepów bakteryjnych. Aby wyniki takiego doświadczenia były miarodajne, wymagałoby ono poświęcenia bardzo wielu myszy (grupy o dużej liczebności, kilka dawek bakterii). Aby tego uniknąć zastosowano uproszczoną procedurę. Z wcześniejszych doświadczeń było wiadomo, że dawki VNP20009:  $5 \cdot 10^5$  lub  $1 \cdot 10^6$  bakterii nie są letalne (nie pokazano). Dlatego, aby porównać toksyczność szczepów, wybrano dwie wyższe dawki. Długość życia myszy po podaniu bakterii jest odwrotnie proporcjonalna do toksyczności podanej dawki określonego szczepu bakterii.

Samicom myszy szczepu C57Bl/6 podano dożylnie bakterie VNP20009, VNP/*sipB* lub VNP/*avrA::cat* w dwóch dawkach:  $2 \cdot 10^6$  lub  $5 \cdot 10^6$  bakterii. W każdej grupie doświadczalnej było po siedem myszy, oprócz grup myszy, którym podano bakterie VNP20009 lub VNP/*sipB* w ilości  $2 \cdot 10^6$ , w których było po sześć myszy (Rys. 83).





**Rys. 83. Przeżywalność myszy szczepu C57Bl/6, którym podano dożylnie 2·10<sup>6</sup> lub 5·10<sup>6</sup> bakterii VNP20009, VNP/sipB lub VNP/avrA::cat.** W nawiasach podano medianę przeżywalności (dni) w poszczególnych grupach doświadczalnych. W grupach było po 7 myszy, z wyjątkiem dwóch grup, w których myszom podano 2·10<sup>6</sup> VNP20009 lub VNP/sipB (6 myszy).

Bakterie VNP20009 oraz zmodyfikowane szczepy VNP/sipB i VNP/avrA::cat charakteryzowały się porównywalną toksycznością po systemowym podaniu do organizmu myszy szczepu C57Bl/6. Wprowadzona modyfikacja w postaci kasety *PsifB-6xHis-sipB* wbudowanej do genomu, równoznaczna z inaktywacją genu *ushA* i wzmożoną ekspresją genu *sipB*, nie wpływała na poziom atenuacji szczepu.

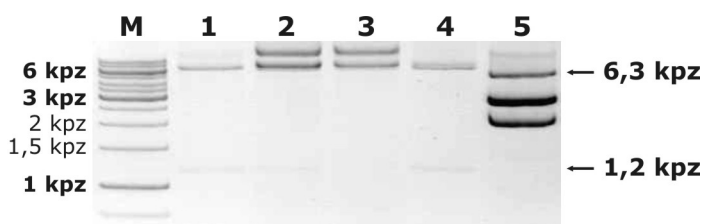
Różnice w medianach przeżywalności są nie większe niż 1,5 dnia. Przy niższej dawce bakterii mediana dla myszy szczepionych VNP/avrA::cat jest najniższa, ale już przy wyższej dawce bakterii najwyższa. Podsumowując: nie ma istotnych różnic w toksyczności szczepów VNP20009, VNP/sipB i VNP/avrA::cat.

### 8.6. Integracja kasety ekspresyjnej *PsifB-6xHis-sipB* do chromosomu *S. typhimurium* VNP/avrA::cat.

Aby uzyskać bakterie ze zinaktywowanym genem *avrA* i genomową kopią kasety *PsifB-6xHis-sipB*, do genomu VNP/avrA::cat wstawiono tę kasetę w sposób analogiczny do procedury integracji tej kasety do VNP20009. Nie można było ponownie wykorzystać plazmidu pSG76C-USS, ponieważ plazmid ten koduje gen

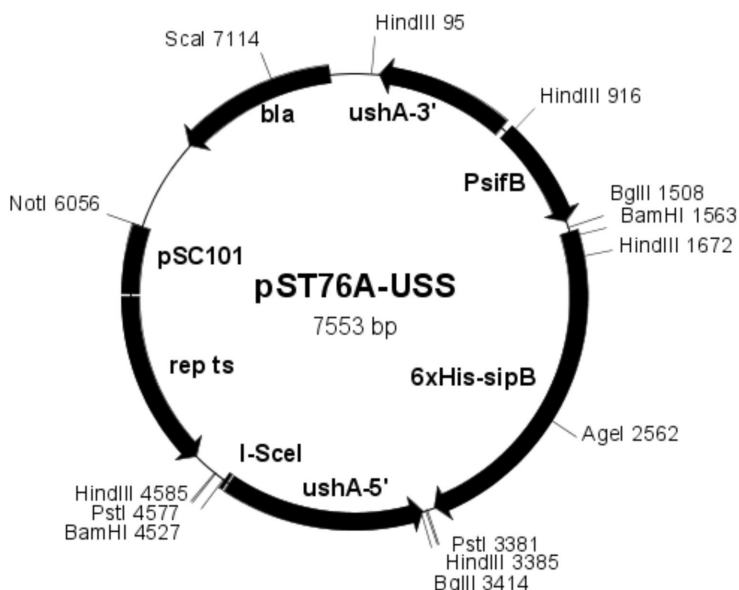
oporności na chloramfenikol, który jest obecny w genomie bakterii VNP/*avrA::cat*. Dlatego przygotowano nowy plazmid integracyjny pST76A-*PsifB*-6xHis-*sipB* (nazywany dalej pST76A-USS), kodujący gen oporności na ampicylinę, który następnie został wykorzystany do wprowadzenia kasety *PsifB*-6xHis-*sipB* do genomu bakterii VNP/*avrA::cat* w obrębie *ushA*.

W tym celu wykorzystano fragment *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3', uzyskany uprzednio w plazmidzie pGEM-T<sub>Easy</sub>-*ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3'. Kasetę *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' wycięto z tego plazmidu enzymem *KpnI* i wstawiono do plazmidu pST76A w miejsce *KpnI*. DNA plazmidowe wyizolowane z pięciu klonów bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$  transformowanych plazmidem pST76A-USS poddano działaniu enzymu *PstI* (Rys. 84).



**Rys. 84. Rozdział elektroforetyczny plazmidu pST76A-USS poddanego działaniu enzymu *PstI*.** DNA plazmidowe było wyizolowane z pięciu klonów bakterii. Rozdział prowadzono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

Fragmenty DNA odpowiadające długościom 1196 pz i 6324 pz świadczyły o tym, że do plazmidu pST76A sekwencja *ushA*-5'-*PsifB*-6xHis-*sipB*-*ushA*-3' była wstawiona w taki sposób, że kasetta *PsifB*-6xHis-*sipB* jest zorientowana zgodnie z numeracją plazmidu. Schemat plazmidu pST76A-USS przedstawiono na Rys. 85.



**Rys. 85. Schemat plazmidu pST76A-USS.** *ushA*-3' i *ushA*-5' - fragmenty homologiczne z

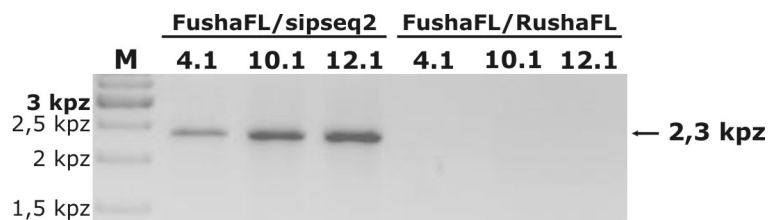
sekwencją *ushA* w genomie; *PsifB* - promotor genu *sifB*; 6xHis-*sipB* - sekwencja kodująca białko SipB znakowane etykietką histydynową; I-SceI - miejsce restrykcyjne rozpoznawane i cięte przez meganukleazę I-SceI; *rep* - gen kodujący białko Rep ts, wymagane do replikacji plazmidu; pSC101 - miejsce *ori* plazmidu; *bla* - gen warunkujący oporność na ampicylinę.

Plazmid pST76A-USS namnożono i oczyszczono z bakterii *E. coli* DH5 $\alpha$ , a otrzymanym DNA plazmidowym transformowano bakterie VNP/*avrA::cat*. Transformowane bakterie wysiano na podłoże stałe LB/agar z ampicyliną i hodowano w temperaturze 30°C przez 24 godz. Pojedyncze duże kolonie przesiano na podłoże stałe LB/agar z ampicyliną i hodowano w temperaturze 42°C przez 10 godz., a następnie w 37°C przez 8 godz. Wybrano trzynaście dużych kolonii bakteryjnych i w reakcji PCR ze starterami FushaFL i sipseq2 sprawdzono, czy w wybranych klonach plazmid został wbudowany do genomu (Rys. 86).



**Rys. 86. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA bakterii VNP/*avrA::cat* transformowanych plazmidem pST76A-USS.** Bakterie selekcjonowano w kierunku wbudowania plazmidu do genomu w obrębie *ushA*. Matrycę do reakcji PCR przygotowano z trzynastu klonów bakterii. Reakcje przeprowadzono ze starterami FushaFL i sipseq2, komplementarnymi do sekwencji flankującej *ushA* w genomie oraz do *sipB* w kasecie *PsifB*-6xHis-*sipB*.

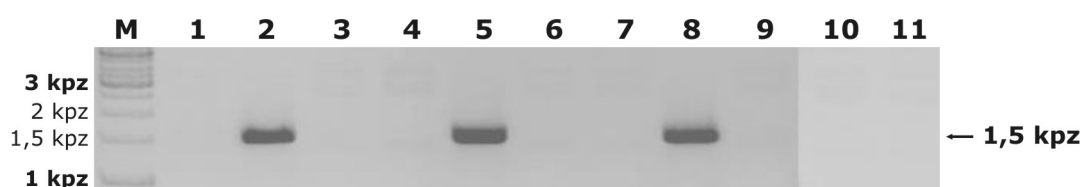
W reakcji PCR ze starterami FushaFL i sipseq2 na matrycy DNA klonów bakterii numer 1, 4, 10, 11 i 12 otrzymano produkt o długości specyficznej dla zrekombinowanego fragmentu DNA genomowego. Bakterie z klonów 4, 10 i 12 przesiano na świeże podłoże LB/agar i hodowano przez 18 godz. w temperaturze 37°C. Z pojedynczych kolonii wyhodowanych z każdego z klonów przygotowano matryce i przeprowadzono reakcje PCR z parami starterów FushaFL i sipseq2 oraz FushaFL i RushaFL (Rys. 87).



**Rys. 87. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA bakterii VNP/*avrA::cat*, w których plazmid pST76A-USS został wbudowany do genomu.** Bakterie otrzymano z klonów 4, 10 i 12, w których uprzednio stwierdzono wbudowanie plazmidu pST76A-USS w obrębie *ushA*. Matrycę do reakcji PCR przygotowano z trzech klonów bakterii potomnych (4.1, 10.1 i 12.1). Reakcje przeprowadzono ze starterami FushaFL i sipseq2 oraz FushaFL i RushaFL.

We wszystkich analizowanych klonach bakterii potwierdzono zajście rekombinacji, w wyniku której w obrębie *ushA* został wbudowany plazmid pST76A-USS. W reakcji ze starterami FushaFL i RushaFL nie otrzymano produktu ze względu na zastosowany czas syntezy produktu, który umożliwiał syntezę produktu charakterystycznego dla bakterii niezrekombinowanych, o długości 2146 pz, ale nie dla zrekombinowanych (9699 pz).

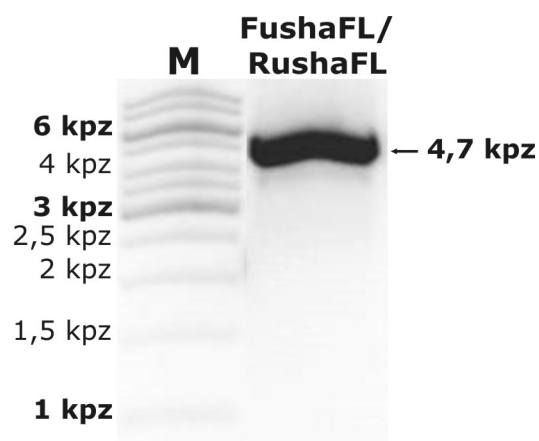
Następnie z bakterii VNP/*avrA::cat*-pST76A-USS (klony 4.1, 10.1, 12.1) usunięto sekwencję plazmidową, postępując dokładnie tak samo, jak w przypadku uzyskiwania VNP/*sipB* (rozdział 5.4) Sprawdzone, czy w wybranych klonach doszło do naprawy pęknięcia na drodze rekombinacji pomiędzy fragmentami *ushA*-5', w wyniku której w obrębie *ushA* została wbudowana kasetka *PsifB*-6xHis-*sipB*. W tym celu przeprowadzono reakcje PCR ze starterami *sifR* i RushaFL (Rys. 88).



**Rys. 88. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR uzyskanych na matrycy DNA bakterii VNP/*avrA::cat*-pST76A-USS poddanych działaniu endonukleazy I-SceI.** Matryce do reakcji przygotowano z jedenastu kolonii bakteryjnych. Reakcje przeprowadzono ze starterami *sifR* i RushaFL. Produkty rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).

Na matrycy DNA klonów bakterii numer 2, 5 i 8 otrzymano produkty specyficzne dla sekwencji genomowej otrzymanej w wyniku rekombinacji, której efektem jest pożądana modyfikacja.

Aby potwierdzić obecność kasetki *PsifB*-6xHis-*sipB* w obrębie genu *ushA*, przeprowadzono reakcję PCR ze starterami FushaFL i RushaFL, z czasem elongacji umożliwiającym amplifikację długiego produktu specyficznego dla zrekombinowanych bakterii. Otrzymano produkt o długości odpowiadającej 4679 pz, charakterystyczny dla fragmentu genomu *ushA* z wbudowaną kasetką *PsifB*-6xHis-*sipB* (Rys. 89).



**Rys. 89. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR uzyskanego na matrycy DNA bakterii VNP/*avrA::cat*, w których w obrębie genu *ushA* wbudowano kasetę *PsifB-6xHis-sipB*. Reakcję przeprowadzono ze starterami FushaFL i RushaFL. Produkt rozdzielono w 0,8% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (negatyw).**

W wyniku przeprowadzonej procedury otrzymano bakterie VNP/*avrA::cat/sipB* ze zinaktywowanym genem *avrA* oraz kasetą *PsifB-6xHis-sipB* wbudowaną do genomu. Bakterie te powinny charakteryzować się wyższą skutecznością w hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych u myszy, gdyż bakterie z pojedynczą modyfikacją w genomie (z dodatkową kopią *sipB* lub ze zinaktywowanym genem *avrA*) były bardziej efektywne niż niezmodyfikowany szczep VNP20009. Zbadanie tej hipotezy będzie przedmiotem dalszej pracy.

## Dyskusja

*Salmonella* jest cytotoksyczna względem zakażonych makrofagów i komórek nabłonkowych. Ten efekt jest w dużej mierze zależny od białka SipB, które wiąże i aktywuje kaspazę-1 oraz powoduje apoptozę zakażonych komórek eukariotycznych [44, 45]. Zdolność do indukcji apoptozy makrofagów przez *Salmonella* była podstawą hipotezy, że nadekspresja proapoptotycznego białka SipB w bakterjach VNP20009 zwiększy ich zdolność do hamowania wzrostu litych guzów nowotworowych u myszy. Szczep *S. typhimurium* VNP20009 charakteryzuje się zdolnością do preferencyjnej kolonizacji guzów nowotworowych oraz hamowana ich wzrostu. Poprzez nieodwracalną modyfikację genomu VNP20009 otrzymano nowy szczep VNP/sipB, który może być skutecznym wektorem do immunoterapii nowotworów.

Na wzrost guzów nowotworowych wpływa aktywność zarówno samych komórek transformowanych nowotworowo jak i komórek nietransformowanych: fibroblastów, komórek tucznych, limfocytów, neutrofilii, makrofagów i komórek śródbłonka. Udokumentowano różne aspekty udziału komórek nietransformowanych w tworzeniu mikrośrodowiska nowotworu oraz wzajemne oddziaływania komórek nowotworowych i komórek stromy, kształtujące progresję nowotworu [134]. Skuteczna immunoterapia powinna hamować wzrost nowotworu poprzez modyfikację mikrośrodowiska nowotworu, ukierunkowującą odpowiedź układu odpornościowego przeciwko tkance nowotworowej. Wyniki naszych badań pokazują, że aktywna infekcja bakteryjna, wywołana podaniem żywych bakterii *S. typhimurium* VNP20009 myszom obarczonym nowotworem, powoduje napływ leukocytów do wnętrza guza, a efektem zastosowanej terapii jest zahamowanie wzrostu guza [104].

Bakterie z rodzaju *Salmonella* zakażające komórki eukariotyczne mogą prowadzić do ich apoptozy. Chen i wsp. zaobserwowali, że *Salmonella* jest cytotoksyczna względem mysich makrofagów linii J774A.1 oraz makrofagów pochodzących z monocytów szpiku kostnego (ang. *bone marrow-derived macrophages*, BMM). Zakażone makrofagi wykazywały cechy morfologiczne typowe dla apoptozy, takie jak: kondensacja i fragmentacja chromatyny, uwypuklenie błony komórkowej formującej pęcherzyki i tworzenie ciałek apoptotycznych. Obecność cytochalazyny D, hamującej polimeryzację aktyny, nie chroniła makrofagów przed śmiercią, zatem stwierdzono, że obserwowany efekt cytotoksyczny nie jest zależny od internalizacji bakterii do komórek eukariotycznych. Natomiast wymagana była funkcjonalność bakteryjnego systemu sekrecji typu trzeciego, którego sekwencję kodującą zlokalizowano na dostępnej wówczas fizycznej mapie genomu; później ten rejon został zidentyfikowany jako

pierwsza wyspa patogenności *Salmonella* (SPI1). Bakterie hodowane w warunkach, które nie umożliwiały ekspresji tego zestawu genów, nie były cytotoksyczne dla makrofagów. Mutanty ze zinaktywowanymi genami strukturalnymi TTSS oraz pozbawione genów, których produkty są transportowane przez ten system sekrecyjny i są wymagane do zakażenia komórek niefagocytujących, między innymi genów *sipB*, *sipC* i *sipD*, również nie były cytotoksyczne [135]. Inna grupa badaczy porównała zdolność do wywołania apoptozy przez inwazyjne bakterie szczepu dzikiego (*S. typhimurium* SL1344) oraz mutanty nieinwazyjne (BJ66), a także przez te bakterie hodowane w warunkach indukujących fenotyp inwazyjny, czyli w pożywce LB z 1,75% chlorkiem sodu do momentu osiągnięcia późnej logarytmicznej fazy wzrostu hodowli, lub indukujących fenotyp nieinwazyjny, gdy hodowlę prowadzono w LB, aż do osiągnięcia fazy stacjonarnej. Po dwóch godzinach od zakażenia zbadano agregację chromatyny, wakuolaryzację cytoplazmy i fragmentację DNA. Mutanty, które nie indukowały fałdowania błony komórkowej, i bakterie w stacjonarnej fazie wzrostu, nie indukowały apoptozy makrofagów linii RAW264.7 i mysich BMM. Wyciągnięto wnioski, że inwazja makrofagów przez *S. typhimurium*, podczas której zachodzi fałdowanie błony komórkowej, jest sygnałem inicjującym apoptozę zakażonej komórki. W doświadczeniu, w którym makrofagi RAW264.7 preinkubowano z cytochalazyną D przed zakażeniem *S. typhimurium*, doszło do zmniejszenia fragmentacji DNA i poziomu apoptozy do poziomu kontrolnego, co świadczyło o zależności tego procesu od internalizacji bakterii [44].

Pokazano także, że zarówno bakterie inwazyjne jak i bakterie, które dostały się do wnętrza komórek w wyniku fagocytozy, namnażają się wewnątrzkomórkowo [44]. Oponizacja nieinwazyjnych bakterii surowicą myszy nieimmunizowanych wprawdzie zwiększała liczbę bakterii wewnątrzkomórkowych, ale nie indukowała apoptozy. Również w przypadku bakterii inwazyjnych oponizacja nie prowadziła do zwiększenia efektu cytotoksycznego [44]. A zatem tylko aktywne zakażenie makrofagów przez bakterie indukowało apoptozę.

Przyczyną sprzecznych wyników tych dwóch grup w odniesieniu do zależności cytotoksyczności od inwazji może być czas inkubacji makrofagów z bakteriami. Chen i wsp. zakażali je przez dwie godziny [135], natomiast Monack i wsp. przez 30 min [44]. Być może dłuższa inkubacja z bakteriami, które miały ekspresję genów SPI1, umożliwiła dostarczenie przez zewnątrzkomórkowe bakterie, które pozostawały w kontakcie z błoną komórki eukariotycznej, wystarczającej ilości cytotoksycznego białka i stąd pochodził obserwowany efekt cytotoksyczny niezależny od inwazyjności.

Znaczenie białka SipB dla indukcji apoptozy makrofagów poznano dzięki wcześniejszym pracom nad mechanizmem zakażenia i chorobotwórczości *Shigella*

*flexnerii*, które pokazały, że białko IpaB wiąże i aktywuje kaspazę-1 oraz powoduje apoptozę zakażonych makrofagów [136]. W nowo opisanej grupie genów wirulencji *Salmonella* zidentyfikowano gen potencjalnie kodujący 593-aminokwasowe białko, którego C-koniec byłby w 55% identyczny z C-końcem IpaB [137]. Na podstawie doświadczenia, w którym ludzkie komórki nabłonka jelita linii Henle-407 zakażono mutantami pozbawionymi tej sekwencji ORF, stwierdzono, że kodowane białko jest wymagane do inwazji i dlatego nazwano je SipB (ang. *Salmonella invasion protein B*). Mutant *sipB* transformowany plazmidem komplementującym mutację odzyskiwał zdolność do zakażenia komórek nabłonkowych. Analiza sekwencji aminokwasowej SipB nie ujawniła obecności sekrecyjnej sekwencji sygnałowej, ale stwierdzono, że SipB jest wydzielany przez bakterie, podobnie jak IpaB, który jest transportowany przez system sekrecji typu trzeciego. Masa cząsteczkowa białka SipB obecnego w pożywce hodowlanej, wyznaczona na podstawie ruchliwości elektroforetycznej techniką SDS-PAGE, była większa od obliczonej na podstawie sekwencji kodującej (około 68 kDa vs. 62,4 kDa). Podobną obserwację zanotowano uprzednio w przypadku IpaB [138].

W kolejnych doświadczeniach *in vitro*, wyjaśniających rolę białka SipB, w teście protekcji gentamycynowej pokazano, że *Salmonella* ze zinaktywowanym *sipB* jest znacznie mniej cytotoksyczna. Wskaźnikiem cytotoksyczności był poziom uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) po 10 godz. od zakażenia komórek. Dzika *S. typhi* Ty2 zabijała 52% mysich makrofagów linii J774A.1, mutant *sipB* - około 5% komórek, a komplementacja delekcji *sipB* z genomu genem *sipB* kodowanym na plazmidzie powodowała, że bakterie zabijały 40% komórek [45]. Mikroiniekcja rekombinowanego SipB pochodzącego z *S. typhi* Ty2, do mysich makrofagów otrzewnowych w hodowli *in vitro* prowadziła do ich śmierci w wyniku apoptozy: 75% komórek ginęło po podaniu białka fuzyjnego GST-SipB w porównaniu z 24% po podaniu białka kontrolnego (GST). Efekt cytotoksyczny stwierdzono na podstawie obserwacji morfologii komórek i wiązania jodku propidyny. Ponadto GST-SipB wiązało prokaspazę-1 z lizatu makrofagów J774A.1; również z makrofagów zakażonych bakteriami *Shigella*, transformowanymi plazmidem kodującym FLAG-SipB, uzyskano metodą immunoprecypitacji kompleks tego białka z prokaspazą-1. Preinkubacja makrofagów RAW264.7 w obecności inhibitora wybiórczego względem kaspazy-1 obniżała zdolność *S. typhimurium* SL1344 do zabijania makrofagów. Nie zaobserwowano cytotoksyczności po 8 godz. od zakażenia bakteriami makrofagów otrzewnowych myszy pozbawionych kaspazy-1. Podsumowując, SipB potęguje apoptozę makrofagów poprzez aktywację prokaspazy-1 [45].

W cytowanej publikacji rekombinowane białko GST-SipB, które wiązało prokaspazę-1, otrzymano w wyniku ekspresji genu klonowanego z genomu *S. typhi*



Ty2. Sekwencje aminokwasowe białek SipB *S. typhi* Ty2 i *S. typhimurium* LT2 różnią się jednym aminokwasem; w pozycji 161 występuje odpowiednio alanina lub treonina. Otrzymany w tej pracy gen kodujący SipB amplifikowano z genomu szczepu *S. typhimurium* SL5319, a identyczność tej sekwencji z sekwencją *sipB* *S. typhimurium* LT2 potwierdzono poprzez sekwencjonowanie DNA. Analiza sekwencji aminokwasowej kodowanej przez zsekwencjonowany fragment wykazała, że w pozycji 161 występuje, tak jak się spodziewano, treonina. Nie wiadomo, czy aminokwas w tej pozycji sekwencji ani też w ogóle który region SipB ma znaczenie w jego oddziaływaniu z prokaspazą-1.

Aby sprawdzić, czy białko SipB kodowane przez fragment namnożony z genomu *S. typhimurium* SL5319 indukuje apoptozę komórek eukariotycznych, otrzymano konstrukt kodujący białko fuzyjne EGFP-SipB (Rys. 12). Ekspresja tego białka pod kontrolą promotora eukariotycznego była cytotoksyczna dla komórek nowotworowych linii MC38CEA, transformowanych przejściowo plazmidem pEGFP-*sipB* (Rys. 14). Dzięki znakowaniu SipB białkiem GFP można było zaobserwować apoptozę komórek pomimo znacznie niższej ekspresji EGFP-SipB w porównaniu z EGFP. W literaturze udokumentowano niski poziom ekspresji bakteryjnych białek efektorowych TTSS w transfekowanych komórkach eukariotycznych: ekspresja SipB w makrofagach pochodzenia szpikowego była poniżej progu detekcji. Cytotoksyczność SipB powodowała, że komórki, w których zachodziła ekspresja na wyższym poziomie, nie przeżywały, co było prawdopodobnie przyczyną tego, że nie wykrywano wysokiej ekspresji SipB [139].

Doświadczenia z zastosowaniem komórek transfekowanych konstruktami kodującymi białka bakteryjne pod kontrolą promotorów eukariotycznych ułatwiają ocenę aktywności tych białek oraz badanie ich bezpośrednich oddziaływań z białkami komórki eukariotycznej. Ekspresja EGFP-SipB pod kontrolą  $P_{CMV}$  pozwoliła na weryfikację funkcjonalności klonowanego genu. W porównaniu z tym sposobem ekspresji, skutki ekspresji tego samego genu w bakteriach w kontekście zakażenia komórki eukariotycznej mogą mieć inne natężenie. Nawet silna nadekspresja białka w bakteriach niekoniecznie musi zdominować obserwowane efekty. Nadekspresja może wpłynąć na inne właściwości bakterii, na przykład na ich inwazyjność i wewnątrzkomórkowe przeżywanie, które również będą wpływały na obserwowane efekty zakażenia komórek eukariotycznych. Można rozważyć, czy nadprodukcja jednego białka efektorowego, ważnego dla procesu zakażenia i rozwoju infekcji, w warunkach naturalnego poziomu pozostałych elementów systemu, gwarantuje pożądane funkcjonowanie tego białka.

Jeśli nadekspresja białka jest obciążeniem metabolicznym dla bakterii

wewnątrzkomórkowych, możliwe jest, że bakterie te nie są zdolne do uformowania prawidłowego SCV, co ogranicza ich przeżycie wewnątrzkomórkowe. W doświadczeniach, w których makrofagi RAW264.7 zakażano bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-sipB z indukowaną IPTG ekspresją 6xHis-SipB, po 16 godz. od początku infekcji z zakażonych makrofagów odzyskiwano tylko około 2 - 3% żywych bakterii, w porównaniu z około 15% bakterii VNP20009 (nie pokazano). Nie wiadomo, jaki był los bakterii, które ginęły w makrofagach i czy uwolnione białko 6xHis-SipB miało możliwość oddziaływania z kaspazą-1 lub -2.

Pośrednim dowodem funkcjonalności 6xHis-SipB dostarczonego do komórek eukariotycznych w bakteriach jest wpływ zakażenia VNP20009 z jego ekspresją na żywotność makrofagów RAW264.7. Więcej makrofagów ulegało apoptozie i nie przeżywało po zakażeniu bakteriami VNP20009 transformowanymi plazmidem pQE30-6xHis-sipB, w porównaniu z makrofagami zakażonymi VNP20009, a efekt był skorelowany z poziomem ekspresji białka 6xHis-SipB (Rys. 15).

Kaspaza-1 należy do grupy kaspaz inicjatorowych i jest syntetyzowana w formie nieaktywnej, której N-końcowa domena CARD (ang. *caspase activation and recruitment domain*) oddziałuje z domeną CARD drugiej cząsteczki, prowadząc do dimeryzacji i autoaktywacji. Oligomeryzacja prokaspaz poprzez oddziaływanie domen CARD prowadzi do ich aktywacji w wyniku autoproteolizy, a aktywacja kaspazy-1 w makrofagach zachodzi w kompleksie białek określanym jako inflamasom, w którym ma miejsce dojrzewanie IL-1 $\beta$  [140]. Natomiast białko SipB oraz jego homolog IpaB nie mają domeny CARD. Nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do aktywacji kaspazy-1 w wyniku wiązania z białkiem SipB. Jednym z możliwych mechanizmów aktywacji prokaspazy-1 przez SipB jest jej lokalne zagęszczenie w komórce eukariotycznej, prowadzące do autoaktywacji. W literaturze są informacje, że w wyniku ekspresji rekombinowanych kaspaz w bakteriach z reguły otrzymuje się ich aktywne formy w wyniku autoproteolizy wywołanej prawdopodobnie ich wysokim lokalnym stężeniem. Wymuszona oligomeryzacja kaspaz prowadziła do ich aktywacji [141]. SipB ma powinowactwo do bakteryjnych, eukariotycznych i modelowych błon fosfolipidowych (liposomów), a wbudowując się do błon nie narusza ich integralności [142]. Być może lokalna przejściowa obecność w błonie i zagęszczenie SipB wiążącego prokaspazę-1 stwarza warunki do jej autoaktywacji alternatywne do inflamasomu.

Znaczenie aktywacji kaspazy-1 prowadzącej do indukcji apoptozy dla postępu zakażenia *S. typhimurium* w warunkach *in vivo* nie jest jednoznaczne. Apoptozę makrofagów stwierdzono u zakażonych myszy [18]. Czynnikiem wirulencji innych enteropatogennych bakterii - *Yersinia* i *Shigella* - również są białka aktywujące kaspazę-1 [135, 143]. Dowiedziono, że medianowa dawka letalna (LD50) *S.*

*typhimurium* podanych drogą pokarmową myszom pozbawionym kaspazy-1 była tysiąckrotnie większa niż po podaniu tych bakterii myszom szczepu dzikiego. U większości myszy z wyłączonym genem kaspazy-1 bakteria nie kolonizowała krezkowych węzłów chłonnych i wątroby. Po trzech godzinach od zakażenia obserwowano mniejszą liczbę wewnątrzkomórkowych bakterii i komórek apoptotycznych w kępkach Peyera oraz mniejszą liczbę napływających neutrofilii. Natomiast oba szczepy myszy były w równym stopniu wrażliwe na zakażenie po dootrzewnowym podaniu bakterii [47]. Monack i wsp. wnioskuje, że proapoptotyczny oraz prozapalny efekt aktywacji kaspazy-1 ma zasadnicze znaczenie dla kolonizacji nabłonka jelit i kępek Peyera oraz dla systemowej infekcji u myszy. Prozapalne działanie IL-1 $\beta$  i IL-18 uwalnianych w wyniku aktywności proteolitycznej kaspazy-1 prowadzi do lokalnej reakcji zapalnej w ścianie jelita, która narusza jej integralność. W ten sposób aktywacja kaspazy-1 wspomaga proces zakażenia kolejnych komórek, a neutrofile i komórki dendrytyczne napływające do miejsca infekcji mogą umożliwiać bakterii transport z kępek Peyera do krezkowych węzłów chłonnych [47].

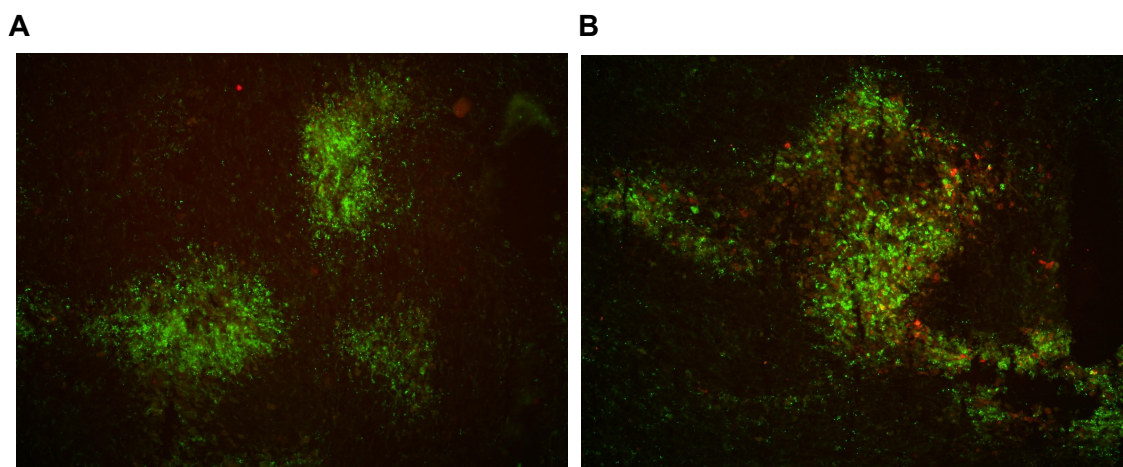
W badaniach Lara-Tejero i wsp. nad rolą kaspazy-1 w systemowym zakażeniu *S. typhimurium*, myszy pozbawione tej kaspazy były bardziej wrażliwe na zakażenie, a kaspaza-1 nie była potrzebna do przekroczenia bariery nabłonka jelit przez *Salmonella* [144]. Obie grupy badawcze stosowały myszy *nramp1*<sup>-/-</sup> ze zmutowanym allelem genu *nramp1*, co zwiększało wrażliwość tych myszy na zakażenie *S. typhimurium*.

Zasugerowano, że przyczyną sprzeczności tej obserwacji z wynikami Monacka i wsp. może być różny genotyp szczepów myszy, które krzyżowano w celu uzyskania szczepu transgenicznego, gdyż Monack i wsp. w przeciwieństwie do Lara-Tejero i wsp. wykonali eksperymenty na myszach o wyraźniej zaznaczonej polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 [144]. W świetle tych obserwacji bakterie VNP/sipB powinny wykazywać wyższy stopień atenuacji niż VNP20009 po podaniu do organizmu myszy szczepu C57Bl/6, które wykazują polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1. W celu weryfikacji hipotezy, czy nasilenie apoptozy w początkowym etapie naturalnej infekcji ma działanie atenuujące lub przeciwnie - zwiększa toksyczność bakterii, należałoby zbadać wpływ podania bakterii drogą pokarmową. Jednakże, w modelach nowotworów transplantacyjnych bardziej odpowiednią drogą podania bakterii w celu zahamowania wzrostu guzów jest podanie lokalne lub dożylnie. Dlatego zbadano toksyczność nowego szczepu po podaniu dożylnym.

Wprowadzenie dodatkowej kopii genu *sipB* do genomu VNP20009, który koduje cytotoksyczne białko SipB, miało na celu zwiększenie apoptozy zakażonych makrofagów i komórek nowotworowych. Zmodyfikowany szczep mógłby być bardziej toksyczny po podaniu do organizmu myszy, jeśli wzmożona aktywacja prokaspazy-1

zwiększałyby uwalnianie IL-1 $\beta$ , przyczyniając się do nasilenia reakcji zapalnej. Z drugiej strony ekspresja 6xHis-SipB w wewnątrzkomórkowych bakterjach VNP/sipB mogłyby ograniczać ich zdolność do namnażania i rozprzestrzeniania infekcji. W doświadczeniu, w którym bakterie podano dożylnie myszom szczepu C57Bl/6, nie stwierdzono, aby szczep VNP/sipB różnił się toksycznością w porównaniu ze szczepem wyjściowym VNP20009 (Rys. 83).

Ze względu na stosunkowo niską liczbę zakażonych makrofagów nie udało się zbadać, czy VNP/sipB w większym stopniu aktywuje kaspazę-1 niż VNP20009. Wyjaśnienie, czy VNP/sipB aktywuje kaspazę-1 silniej od VNP20009 wymaga dalszych badań. Natomiast stwierdzono, że nadekspresja SipB w postaci 6xHis-SipB w bakterjach wzmacnia apoptozę w hodowlach komórkowych (Rys. 15 i 60). Wyniki *in vitro* należałoby zweryfikować w analogicznym doświadczeniu *in vivo*. We wcześniejszych, nieopublikowanych jeszcze badaniach, aby sprawdzić, czy podanie VNP20009 zwiększa poziom apoptozy w obrębie guza, wykorzystaliśmy metodę obrazowania apoptozy *in vivo* przy użyciu znakowanego rodaminą B inhibitora aktywnych kaspaz (FLIVO), który podano myszom obciążonym guzami podskórnymi MC38CEA. Na Rys. 90 pokazano fragment guza nowotworowego uzyskanego od myszy kontrolnej (A) lub myszy, której na 48 godzin przed podaniem FLIVO podano do guza bakterie VNP20009 (B). Guzy izolowano 30 minut po dożylnym podaniu FLIVO i wybarwiono przeciwciałami anti-CD68 (występującym głównie na monocytach i makrofagach) i drugorzędowym anti-Ig-FITC. Efektem podania *S. typhimurium* VNP20009 było nasilenie apoptozy w obrębie guza. Barwienie czerwonopomarańczowe świadczy o wzmożonej aktywności apoptotycznej w obrębie guza nowotworowego po podaniu VNP20009 (Rys. 90B).



**Rys. 90. Obrazowanie apoptozy *in vivo* przy użyciu znakowanego rodaminą B inhibitora aktywnych kaspaz.** Mysiom podano dożylnie znacznik FLIVO, a 30 minut później pobrano guzy nowotworowe. Skrawek guza nowotworowego MC38CEA, uzyskanego od myszy kontrolnej (A) oraz myszy, której 48 godzin przed podaniem FLIVO podano bakterie VNP20009

**(B).** Guzy były barwione *ex vivo* przeciwciałami anti-CD68 i anti-Ig-FITC. Zdjęcia uzyskano we współpracy z dr Mariuszem Gajdą (Zakład Histologii UJ CM).

Nie można wykluczyć, że analogiczne doświadczenie przeprowadzone z zastosowaniem VNP/sipB pozwoliłoby stwierdzić, czy w warunkach *in vivo* zmodyfikowane bakterie zwiększają poziom apoptozy w guzie. Ale prawdopodobnie obserwowana różnica byłaby trudna do ilościowej oceny.

Oprócz aktywacji prokaspazy-1 SipB uczestniczy w formowaniu translokonu i dostarczaniu innych białek efektorowych uczestniczących w procesie inwazji, a zatem ma znaczenie dla fenotypu inwazyjnego [138, 139]. Nasuwa się pytanie, czy nadekspresja SipB w postaci 6xHis-SipB pod kontrolą promotora laktozowego w VNP20009, powinna prowadzić do wzrostu zdolności bakterii do zakażenia komórek eukariotycznych. Inwazyjność bakterii VNP20009 transformowanych plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*, z ekspresją 6xHis-SipB indukowaną dodaniem IPTG do hodowli bakterii, była niższa w porównaniu z VNP20009 (Rys. 11). Bakterie te miały dodatkowe kopie SipB jeszcze przed kontaktem z komórką eukariotyczną, a więc teoretycznie mogłyby być bardziej inwazyjne niż VNP20009. Ponieważ jednak zdolność do zakażenia nie jest zależna wyłącznie od SipB, a jego nadekspresja w postaci 6xHis-SipB negatywnie wpływa na kondycję bakterii (Tabela 14), VNP20009 pQE30-6xHis-*sipB* były mniej inwazyjne niż VNP20009.

*Salmonella* może zakażać komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC). Komórki dendrytyczne są populacją komórek prezentujących antygen (APC), która najbardziej efektywnie stymuluje naiwne limfocyty T. LPS, TNF $\alpha$  i IL-1 $\beta$  [145, 146] oraz fagocytoza ciałek apoptotycznych [147] indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych: wzrasta powierzchniowa ekspresja cząsteczek kostymulatorowych, sekrecja cytokin i zdolność do migracji. Stymulowane DC osiedlają się w obwodowych organach limfatycznych i aktywują naiwne limfocyty T, prowadząc do rozwoju swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Szereg prac dokumentuje wpływ zakażenia bakteriami *Salmonella* na prezentację antygenów i stymulację odpowiedzi immunologicznej przeciwko epitopom bakteryjnym przez komórki dendrytyczne i makrofagi. Makrofagi i DC ulegają apoptozie, jeśli były zakażone bakteriami *S. typhimurium*, które hodowano w warunkach umożliwiających ekspresję genów SPI1 [121]. W tym wypadku nie dochodzi do prezentacji antygenów bakteryjnych limfocytom T. Natomiast zakażenie makrofagów i DC bakteriami, które nie są cytotoksyczne, czyli np. bakteriami w stacjonarnej fazie wzrostu, prowadzi do prezentacji antygenów bakteryjnych na cząsteczkach MHC klasy I i II [148-150]. Oprócz bezpośredniej prezentacji, antygeny bakteryjne mogą być prezentowane przez DC, które sfagocytowały apoptotyczne makrofagi. Yrlid i Wick pokazali, że mysie

komórki dendrytyczne, które sfagocytowały apoptotyczne makrofagi BMM, prezentują epitopy pochodzące z antygenów bakteryjnych w kontekście cząsteczek kompleksu zgodności tkankowej klasy pierwszej i drugiej (MHCI i MHCII). A więc apoptoza zainfekowanych makrofagów może przyczyniać się do indukcji odporności przeciwbakteryjnej. Jeśli makrofagi były zakażone w warunkach indukujących nekrozę, np. w wyniku użycia bardzo dużej ilości bakterii w stosunku do ilości makrofagów, to prezentacja epitopów na cząsteczkach MHCII była podobna jak w przypadku makrofagów apoptotycznych, ale prezentacja epitopów związanych do cząsteczek MHCI była drastycznie zredukowana [121]. Ta obserwacja sugeruje, że apoptoza zakażonych makrofagów może sprzyjać stymulacji limfocytów cytotoksycznych (CTL). Ciekawym byłoby zbadanie, czy fagocytoza apoptotycznych komórek innych niż makrofagi, np. komórek nowotworowych MC38CEA zakażonych *Salmonella*, może prowadzić do prezentacji antygenów bakteryjnych przez DC i czy w tych warunkach może zachodzić efektywna prezentacja antygenów nowotworowych prowadząca do przełamania tolerancji immunologicznej na te antygeny i stymulacja CTL.

Kolejnych informacji świadczących o zależności pomiędzy sposobem dostania się bakterii *Salmonella* do wnętrza komórki a wpływem na prezentację antygenów dostarczyły badania z zastosowaniem DC myszy szczepu C3H/HeN. Zakażenie *in vitro* komórek dendrytycznych opsonizowanymi bakteriami osłabiało zdolność do prezentacji antygeny modelowego w kontekście MHCII, a osłabienie prezentacji antygenów było w dużej mierze zależne od ekspresji genów SPI2 [151]. A więc efekt zakażenia komórek dendrytycznych jest różny w zależności od ekspresji szczególnych czynników bakteryjnych oraz od tego, czy *Salmonella* jest zdolna do inwazji (z hodowli w logarytmicznej fazie wzrostu) i wtedy jest cytotoksyczna dla DC, lub pochodzi z hodowli w stacjonarnej fazie wzrostu, nie zabija DC, ale zmniejsza zdolność tych komórek do prezentacji antygenów.

Badając specyficzność gatunkową oddziaływania *Salmonella* z komórkami dendrytycznymi stwierdzono, że zakażenie mysich DC bakteriami *S. typhi* lub *S. enteritidis* prowadzi do aktywacji limfocytów T, także *in vivo*, a bakterie te nie namnażały się w DC i szybko były degradowane. Natomiast w ludzkich komórkach dendrytycznych przeżywały bakterie *S. typhi*, ale nie *S. typhimurium* i *S. enteritidis* [152].

W badaniach *in vivo* Sundquist'a i Wick całkowita liczba komórek DC CD8<sup>+</sup> w węzłach chłonnych krezki jelita (MLN) spadała w pierwszym i drugim dniu po podaniu drogą pokarmową bakterii *S. typhimurium* myszom szczepu C57Bl/6. W trzecim dniu poziom tych komórek był podobny, jak u myszy, którym nie podano bakterii, prawdopodobnie w wyniku rekrutacji DC do MLN. Zbadano żywotność tych komórek.

Komórki DC CD8+, prezentujące antygeny głównie limfocytom cytotoksycznym T CD8+, ulegały apoptozie w MLN [153]. Nasilenie tego procesu było zależne od dawki bakterii. Subpopulacje DC, wyizolowane w oparciu o markery powierzchniowe, charakteryzowały się różną podatnością na indukcję apoptozy i zdolnością do prezentacji antygenów. Komórki dendrytyczne CD8+ wyizolowane z MLN zakażonych myszy miały znacznie osłabioną zdolność do prezentacji antygenów *ex vivo* w porównaniu z komórkami CD8+ izolowanymi ze śledziony, które były zdolne do prezentacji antygenów. Prawdopodobną przyczyną była większa wrażliwość DC CD8+ w węzłach krezkowych na indukcję apoptozy na badanym etapie infekcji. Natomiast komórki DC CD8- (prezentujące antygen limfocytom T CD4+) w MLN były mniej wrażliwe na indukcję apoptozy [153]. Jednakże komórki DC CD8+ wyizolowane ze śledziony zakażonych myszy prezentowały antygen limfocytom T, a więc być może, przynajmniej na tym etapie infekcji drogą pokarmową, tylko DC w lokalnych węzłach chłonnych są podatne na apoptozę indukowaną zakażeniem.

Oslabienie bezpośredniej prezentacji antygenów bakteryjnych przez zakażone DC może sprzyjać efektywności przeciwnowotworowej bakterii, ponieważ wpływa na ich niską immunogenność. Słaba odpowiedź immunologiczna przeciwko bakterii może gwarantować ich efektywność w terapii, która wymagałaby podania kilku dawek wektora. Dla skuteczności hamowania wzrostu nowotworów przez bakterie *Salmonella* ważna jest możliwość krzyżowej prezentacji antygenów pochodzących ze sfagocytowanych komórek nowotworowych, które uległy apoptozie w wyniku zakażenia *Salmonella*, lub makrofagów, które sfagocytowały apoptotyczne komórki nowotworowe.

Krzyżowa prezentacja antygenów to proces, w którym aktywowane są limfocyty T CD8+. Cytotoksyczne limfocyty T (CTL) mają zasadnicze znaczenie w odpowiedzi przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym oraz komórkom transformowanym nowotworowo. Aktywacja tej populacji limfocytów jest wynikiem dwóch wydarzeń: rozpoznania epitopu w kontekście cząsteczki MHC klasy I, któremu towarzyszy odpowiedni sygnał kostymulujący. Obydwu sygnałów aktywujących naiwne limfocyty T CD8+ mogą dostarczyć tylko profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC) [154]. Większość peptydów wiązanych do MHC klasy I pochodzi z polipeptydów endogennych, syntetyzowanych w komórkach APC, czyli z własnych białek, a także z białek wirusów lub wewnątrzkomórkowych bakterii, które zakażają APC. Drugim źródłem peptydów wiązanych przez MHCI są polipeptydy syntetyzowane poza APC prezentowane w procesie krzyżowej prezentacji antygenów. Krzyżowa prezentacja antygenów komórkowych jest możliwa, gdy apoptotyczny lub nekrotyczny materiał pobrany w wyniku fagocytozy, uzyskuje dostęp do szlaku przetwarzania i prezentacji antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy I [155]. Komórki dendrytyczne, które

pochłonęły taki materiał, mogą ulec dojrzewaniu pod wpływem cytokin prozapalnych i w lokalnych węzłach chłonnych prezentować antygen naiwnym limfocytom T. Stwierdzono, że komórki dendrytyczne CD8<sup>+</sup> przetwarzają antygeny pochodzące z martwych komórek i prezentują je limfocytom CD4<sup>+</sup> [156] oraz, co zaprezentowano również w doświadczeniach *in vivo*, limfocytom CD8<sup>+</sup> [157]. Znaczenie krzyżowej prezentacji antygenów nowotworowych w generowaniu odpowiedzi CTL jest szczególne ze względu na brak ekspresji cząsteczek kostymulujących na wielu nowotworach [158].

Ograniczony dostęp limfocytów T do tkanki nowotworowej, przechodzenie limfocytów w stan anergii wewnątrz guza lub obniżenie ekspresji cząsteczek MHC na powierzchni komórek nowotworowych mogą być przyczyną niewystarczającej skuteczności immunoterapii opartych o stymulację odpowiedzi antygenowo swoistej [159]. Lurquin i wsp. opublikowali ciekawą obserwację pochodzącą z badań klinicznych [160]. U niektórych pacjentów chorujących na czerniaka, którym podano szczepionkę przeciwnowotworową w postaci antygeny nowotworowego, obserwowano wzrost liczby limfocytów cytotoksycznych specyficznych pod względem tego antygeny. Jednak w wyniku podania szczepionki znacznie silniej była stymulowana proliferacja limfocytów rozpoznających inny antygen nowotworowy niż ten, który zawierała szczepionka. Pomimo, że limfocyty te były obecne w przerzutach także przed rozpoczęciem terapii, dopiero po podaniu szczepionki dochodziło do regresji nowotworu. To sugeruje, że pod wpływem szczepionki zostały aktywowane limfocyty przeciwnowotworowe, w tym limfocyty o innej specyficzności niż te sprzed terapii, i to one odpowiadały za eliminację komórek nowotworowych [160].

Aby zintensyfikować krzyżową prezentację antygenów nowotworowych stosowano różne strategie wywołujące lokalną odpowiedź immunologiczną, np. poprzez krioblację lub podanie komórek dendrytycznych bezpośrednio do guza [161, 162]. Jednakże rozwojowi nowotworu towarzyszą procesy osłabiające funkcjonalność komórek dendrytycznych i limfocytów T. Dopełnieniem takich terapii powinien więc być czynnik immunostymulujący, dzięki któremu wynikiem krzyżowej prezentacji antygeny będzie krzyżowa stymulacja (ang. *cross-priming*), a nie tolerancja (ang. *cross-tolerance*).

Dobrym czynnikiem stymulującym wrodzoną odpowiedź immunologiczną jest *Salmonella*, której specyficzne bakteryjne komponenty (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) są ligandami receptorów TLR, silnie stymulującymi komórki dendrytyczne. Preferencyjna kolonizacja guzów nowotworowych przez szczepy *Salmonella* prowadzi do lokalnego stanu zapalnego, którego skutkiem może być między innymi krzyżowa prezentacja antygenów nowotworowych. Dla rezultatu



prezentacji krzyżowej decydujące znaczenie ma stopień dojrzałości komórek APC, przejawiający się np. wzrostem ekspresji cząsteczek kostymulujących i cytokin; niedojrzałe APC mogą indukować stan tolerancji [163]. Nieobojętny jest również czynnik stymulujący dojrzewanie komórek dendrytycznych, gdyż to on niejednokrotnie decyduje czy dojrzałe DC będą wykazywały aktywność immunostymulatorową czy będą (jak niedojrzałe DC) indukować tolerancję limfocytów T CD8+ [164, 165].

Dojrzałe immunostymulujące DC produkują IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\alpha$  i  $\beta$ , aktywujące limfocyty T, a IL-12 ma kluczowe znaczenie dla polaryzacji reakcji immunologicznych w kierunku Th1. Cząsteczki pochodzenia bakteryjnego (PAMP) rozpoznawane przez receptory TLR na komórkach dendrytycznych są sygnałem stymulującym ich dojrzewanie w kierunku fenotypu immunostymulującego [165].

Dane literaturowe wskazują, że możliwa jest krzyżowa prezentacja i stymulacja limfocytów CD8+ rozpoznających antygeny nowotworowe, przez komórki dendrytyczne myszy obarczonych nowotworem, którym podano bakterie *Salmonella*. W badaniach nad aktywnością przeciwnowotworową pochodnej szczepu *S. typhimurium* SL1344, auksotroficznej względem aminokwasów aromatycznych (mutant *aroA*), podawano bakterie ( $10^8$  CFU) do guza w dziewiątym dniu po podskórnej inokulacji komórek czerniaka B16, kiedy powierzchnia guzów wynosiła średnio 25 mm<sup>2</sup> [166]. U sześćdziesięciu procent myszy po trzech miesiącach od podania bakterii nie stwierdzono obecności guza. Podanie bakterii prowadziło do spadku produkcji cytokin przeciwzapalnych: IL-10, IL-13, IL-4 i TGF- $\beta$ , w lokalnych węzłach chłonnych do poziomu obserwowanego u myszy nieobarczonych nowotworem, w 4 - 7 dniu po podaniu bakterii. Natomiast wzrastał poziom cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ . Komórki dendrytyczne wyizolowane z węzłów chłonnych myszy obarczonych czerniakiem B16-OVA z ekspresją modelowego antygeny - owoalbuminy (OVA), którym podano bakterie z ekspresją tego antygeny, charakteryzowały się bardziej dojrzałym fenotypem, prezentowały modelowy epitop pochodzący z owoalbuminy w kontekście cząsteczek MHC I i indukowały proliferację limfocytów rozpoznających ten epitop oraz uwalnianie przez nie IFN- $\gamma$ . Zaobserwowano również depigmentację skóry leczonych myszy, co świadczyło o przełamaniu tolerancji względem własnych antygenów (wspólnych z komórkami B16) [166].

Doświadczenia z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie kompleksów MHC I z epitopami pochodzenia nowotworowego, np. z modelowego antygeny CEA, rozpoznawanymi przez receptory TCR (tzw. tetramery MHC) powinny pozwolić odpowiedzieć na pytanie, czy zakażeniu VNP20009 lub VNP/sipB myszy obarczonych nowotworem MC38CEA towarzyszy wzrost populacji limfocytów cytotoksycznych rozpoznających antygen nowotworowy. Pomimo braku ekspresji antygenów

nowotworowych w bakteriiach wykorzystywanych w mojej pracy, swoiste limfocyty T mogłyby być stymulowane w procesie krzyżowej prezentacji tych antygenów w wyniku fagocytozy apoptotycznego materiału w obrębie guza.

Podczas zakażenia myszy bakteriami *S. typhimurium* obecność bakterii stwierdzono w wielu populacjach komórek: limfocytach T i B, neutrofilach, komórkach dendrytycznych, monocytach i makrofagach [18, 167]. Z badań *in vitro* wiadomo, że funkcjonowanie białek kodowanych przez geny SPI2 zależy nie tylko od typu komórki (nabłonkowa vs. makrofagowa lub DC), ale także od wykorzystanego mechanizmu inwazji komórek [168-174]. Istotne znaczenie dla procesu dojrzewania i losów SCV ma sposób dostania się bakterii do wnętrza komórki eukariotycznej. Inwazyjne bakterie *S. typhimurium* SL1344 z ekspresją białek SPI1 lub nieinwazyjne opsonizowane białkami dopełniacza ludzkiej surowicy zaczynały dzielić się w makrofagach RAW264.7 już po ośmiu godzinach od zakażenia, a bakterie opsonizowane przeciwciałami IgG rozpoznającymi LPS *Salmonella* lub nieopsonizowane były zabijane. Po godzinie od zakażenia makrofagów inwazyjnymi bakteriami (MOI = 5) w około 35% zakażonych komórkach była jedna bakteria, a w 20% - dwie bakterie; tylko w około 10% zakażonych makrofagów stwierdzono obecność 4 - 10 bakterii. Odwrotne proporcje zaobserwowano, gdy do zakażenia użyto bakterii nieinwazyjnych opsonizowanych białkami dopełniacza [171].

Ciekawym byłoby zbadanie, czy wprowadzona w bakteriiach VNP/sipB modyfikacja wpływa na ich przeżywalność wewnątrz różnych populacji komórek w zakażonej myszy oraz czy nowy szczep z dodatkową kopią genu *sipB* pod kontrolą promotora genu *sifB* różni się ekspresją SipB na poszczególnych etapach zakażenia. W literaturze przeważa taki obraz zakażenia *S. typhimurium*, w którym geny kodowane w obszarze SPI1 (czyli m.in. *sipB*) ulegają ekspresji w początkowej fazie infekcji i decydują głównie o inwazyjności tych bakterii, a geny SPI2 - podczas systemowej fazy infekcji. Niedawno zaobserwowano obecność SipB również w bakteriiach żyjących w śledzionie po pięciu lub siedmiu dniach od podania *S. typhimurium* ST14028s odpowiednio dootrzewnowo lub drogą pokarmową. Brakuje informacji, czy bakterie te były wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowe [172]. Zatem nie wiadomo czy ekspresja SipB w tym momencie infekcji jest regulowana przez czynniki zewnątrzkomórkowe, a więc typowe dla regulacji genów SPI1, czy przez czynniki wewnątrzkomórkowe, które są uznawane za aktywujące ekspresję genów SPI2. Dotychczas nie określono precyzyjnie czynnika rozpoznawanego przez system regulacyjny SsrAB, kontrolujący ekspresję genów kodowanych w obszarze SPI2 [127].

Zastanawiające jest, że genetycznie identyczne bakterie (przynajmniej pod względem jednej konkretnej właściwości) nie miały identycznego fenotypu: nie

wszystkie bakterie transformowane plazmidem kodującym GFP lub RFP pod kontrolą *PsifB* wykazywały fluorescencję specyficzną dla tych białek (Rys. 32, Tabela 16 i 22). Taki wynik mógł być spowodowany zbyt niską ekspresją tych białek w części populacji bakterii, niemożliwą do wykrycia zastosowaną metodą (analiza cytofluorymetryczna i obserwacja w mikroskopie fluorescencyjnym). Obojętnie, czy ekspresja tych białek była niska czy nie było jej w ogóle, świadczy to o nieidentycznym fenotypie bakterii w populacji. Stosunkowo niskiej ekspresji GFP lub RFP nie może tłumaczyć utrata plazmidu przez bakterie, ponieważ hodowlę prowadzono w obecności antybiotyku, a ponadto w warunkach stosowanych do indukcji aktywności *PsifB* i *Psp2* bakterie dzielą się bardzo powoli. Z krzywej wzrostu bakterii VNP20009 hodowanych w pożywce MgM wynika, że w tych warunkach czas podwojenia to około 16 godz. (nie pokazano). A więc jeśli ekspresję białek fluorescencyjnych obserwowano po 16 godz. hodowli w obecności antybiotyku to przyczyną nierównomiernej ekspresji w populacji nie mogła być utrata plazmidu. Populacje genetycznie identycznych bakterii mogą być niejednorodne pod względem ekspresji genów [173]. Heterogenną ekspresję genów opisano w hodowli *S. typhimurium* [174]. Bakterie *S. typhimurium*, które przeżywają wewnątrz zakażonych komórek, również prawdopodobnie nie są jednorodną populacją. Stwierdzono, że nie wszystkie bakterie dzielą się wewnątrz zakażonych *in vitro* komórek eukariotycznych. W hodowli makrofagów BMM w niektórych komórkach zaobserwowano dzielące się bakterie, a w innych nie. Podobnie, tylko w części makrofagów śledziony zakażonej myszy Balb/c były proliferujące bakterie. Znaczna część bakterii przeżywała nie dzieląc się [175]. W tym przypadku podział bakterii nie zależy wyłącznie od ich właściwości, ale również od metabolizmu lub fazy cyklu komórkowego zakażonej komórki eukariotycznej. Niezależnie od tego, czy przyczyna heterogenności populacji bakterii leży w ich fizjologii czy wynika z oddziaływania z zakażoną komórką eukariotyczną, prawdopodobnie nie we wszystkich zakażonych komórkach zachodzi ekspresja 6xHis-*sipB* pod kontrolą *PsifB*. Tę hipotezę można by zbadać przy pomocy analizy transkrypcji metodą odwrotnej transkrypcji i PCR na matrycy RNA pochodzącego z pojedynczej komórki zakażonej bakteriami VNP20009 lub VNP/*sipB* (ang. *single-cell RT-PCR*).

Przyczyną ograniczonej ekspresji GFP pod kontrolą *PsifB* lub *Psp2* w bakteriach VNP20009, której źródłem były sekwencje kodowane na plazmidzie, mogła być również niewystarczająca dostępność białka SsrB. Mengesha i wsp. pokazali, że dostarczenie na plazmidzie wysokokopijnym dodatkowych kopii genu czynnika regulującego promotor aktywowany warunkami tlenowymi zwiększa ekspresję lucyferazy pod kontrolą tego promotora w bakteriach VNP20009 [177].

Kaseta ekspresyjna *PsifB*-6xHis-*sipB* została umieszczona w genomie VNP/*sipB* we

wnętrzu genu *ushA*. Odległa lokalizacja miejsca integracji (Rys. 33) od natywnych sekwencji *PsifB* i *sipB* w genomie miała gwarantować trwałe dziedziczenie wprowadzonej do genomu modyfikacji oraz stabilność natywnych sekwencji. W genomie bakterii VNP/*sipB* sekwencje *sipB* i *PsifB* są zduplikowane. Rekombinacja homologiczna pomiędzy oryginalną sekwencją *PsifB* lub *sipB*, a sekwencją w kasecie *PsifB*-6xHis-*sipB* prowadziłyby do utraty znacznej części genomu, znajdującej się pomiędzy tymi sekwencjami, lub do duplikacji tej części genomu. Taka zmiana w genomie prawdopodobnie byłaby letalna [177]. Wbudowanie dodatkowych kopii tych sekwencji w miejscu odległym od lokalizacji natywnych sekwencji powinno być źródłem presji selekcyjnej sprzyjającej zachowaniu tych sekwencji w genomie i przeciwdziałającej ich eliminacji. Fragment *PsifB*-6xHis-*sipB* był dziedziczony w bakteriach hodowanych w warunkach *in vitro* przez co najmniej 200 pokoleń (Rys. 56) oraz w bakteriach odzyskanych ze śledziona zakażonej myszy (Rys. 58 i 59). Zatem znaczna odległość miejsca integracji *PsifB*-6xHis-*sipB* od natywnych sekwencji może być korzystna dla stabilności wprowadzonej do genomu modyfikacji.

Natomiast położenie sekwencji *PsifB*-6xHis-*sipB* poza obszarem, w którym są geny kodujące białka efektorowe systemu sekrecji (TTSS) drugiej wyspy patogenności (wśród nich *sifB*), może budzić wątpliwość, czy taka lokalizacja jest optymalna dla aktywności transkrypcyjnej promotora *PsifB*. Ekspresja tej grupy genów jest pozytywnie regulowana przez czynnik transkrypcyjny SsrB [124]. Geny SPI2 oraz geny kodujące białka transportowane przez kodowany tam TTSS pozostają ponadto pod negatywną kontrolą białka H-NS (ang. *histone-like nucleoid structuring protein*). H-NS wiąże DNA i hamuje ekspresję genów we fragmentach genomu, które charakteryzują się niższą zawartością nukleotydów guaninowych i cytozynowych (ang. *guanine-cytosine content*) niż pozostała część genomu i które *Salmonella* uzyskała w wyniku horyzontalnego transferu materiału genetycznego [178-180]. W tych obszarach znajdują się wyspy patogenności, a H-NS wiąże DNA głównie w obrębie SPI2, 3 i 5 [180]. Średnia zawartość procentowa nukleotydów guaninowych i cytozynowych (GC) w genomie *S. typhimurium* LT2 to 52,2%, natomiast w regionach zawierających geny, które podlegają represji przez H-NS 46,8% stanowią nukleotydy G i C [180]. Czynniki aktywujące ekspresję genów SPI znoszą represję przez H-NS i umożliwiają wiązanie polimerazy RNA do promotorów. Aby sprawdzić, czy wiązanie fragmentu DNA o niskiej zawartości GC przez białko H-NS zależy od zawartości GC w regionach bezpośrednio sąsiadujących, Navarre i wsp. przeprowadzili następujące doświadczenie. Do genomu *S. typhimurium* w obszarze o zawartości GC powyżej 50%, o którym było wiadomo, że nie wiąże H-NS, wbudowano gen (833 pz) pochodzący z genomu *Helicobacter pylori*, o zawartości GC równej 39,7%. Stwierdzono, że H-NS wiązało i wyciszało ekspresję

genu *H. pylori*, czyli wysoka procentowo zawartość nukleotydów adeninowych i tymidynowych była wystarczająca do wiązania H-NS niezależnie od lokalizacji genomowej [180]. Analiza mikromacierzy cDNA pokazała, że *sifB* ulega silnej ekspresji w obecności H-NS [180]. Zawartość GC we fragmencie obejmującym promotor genu *sifB* wykorzystanym w tej pracy wynosi 36%, a sekwencji 6xHis-*sipB* - 52%, natomiast zawartość GC w całej kasecie to 48%. Biorąc pod uwagę dane literaturowe można było przypuszczać, że aktywność tej sekwencji będzie specyficznie regulowana nawet jeśli zostanie ona umieszczona w innym niż natywny rejonie genomu. Analiza transkryptu *sipB* w bakteriach VNP20009 i VNP/*sipB* hodowanych w różnych pożywkach pozwoliła stwierdzić, że w warunkach specyficznych dla ekspresji genów SPI2 (w pożywce MgM) zachodzi ekspresja dodatkowej kopii *sipB* (Tabela 20). Aktywność transkrypcyjną kasety *PsifB*-6xHis-*sipB* potwierdziło doświadczenie, w którym porównano ekspresję *sipB* w makrofagach zakażonych jednym lub drugim typem bakterii (Tabela 21).

Z opublikowanych w tym roku danych wynika, że dla wiązania czynnika transkrypcyjnego SsrB optymalna jest osiemnastonukleotydowa zdegenerowana sekwencja palindromowa z siedmionukleotydowymi powtórzeniami, rozdzielonymi czterema nukleotydami (7-4-7). Sekwencję **ATCAGGT-ATTA-TCCTGAT** zidentyfikowano jako konsensusową (pogrubiona czcionka oznacza najbardziej konserwatywne nukleotydy). Jest ona obecna w promotorach genów SPI2 oraz genów kodujących białka transportowane przez system sekrecji kodowany w obszarze SPI2 [181]. Ponownie stwierdzono, że położenie miejsca wiązania SsrB względem startu transkrypcji nie ma krytycznego znaczenia.

W zaprojektowanym syntetycznym promotorze Psp2 umieszczono sekwencję związaną przez SsrB z promotora genu *ssaG* (Rys. 66), której koniec 5' w porównaniu z ostatnio zidentyfikowanym [181], jest krótszy o cztery nukleotydy (TTCA). Analiza ekspresji GFP w bakteriach VNP20009 transformowanych plazmidem pGEM-T<sub>Easy</sub>-Psp2-*gfp* pozwoliła stwierdzić, że sekwencja Psp2 może kontrolować ekspresję *gfp* i że ekspresja zachodzi w warunkach specyficznych dla aktywacji genów SPI2 (Tabela 22). Zmodyfikowane sekwencje promotora genu *ssaG* przygotowane przez Tomljenovic-Berube i wsp., w których jedno z siedmionukleotydowych powtórzeń było w orientacji przeciwnej do oryginalnej względem drugiego, miały bardzo niską aktywność. Natomiast konstrukty, w których usunięto jeden z siedmionukleotydowych powtórzeń lub odwrócono orientację całego 18-nukleotydowego fragmentu względem startu transkrypcji, zachowały oryginalną aktywność [181].

Aktywny kompleks bakteryjnej polimerazy RNA jest zbudowany z sześciu podjednostek. Podjednostka sigma odpowiada za wybiórcze wiązanie przez holoenzym polimereazy RNA (RNAP) tych fragmentów DNA, które stanowią sekwencje

promotorów [182]. Poznano siedem czynników sigma *E. coli*, które biorą udział w modulowaniu transkrypcji genów w odpowiedzi na zmieniające się środowisko wzrostu bakterii. Kompleks polimerazy RNA zawierający czynnik sigma 70 (RpoD) uczestniczy w transkrypcji genów podstawowego metabolizmu *E. coli* i *S. typhimurium*. Natomiast ekspresja genów aktywowana w odpowiedzi na specyficzne warunki środowiska jest związana między innymi z udziałem alternatywnych czynników sigma w inicjacji transkrypcji. Pomimo, że sekwencje aminokwasowe różnych podjednostek sigma, np. RpoD i RpoS (sigma S) są konserwatywne i kompleksy RNAP zawierające jedną z tych podjednostek mogą wiązać identyczne sekwencje konsensusowe rdzenia promotora (sekwencje -10 i -35) [183], to znane są promotory, z których transkrypcja zachodzi wyłącznie z udziałem RNAP z podjednostką sigma S [133]. Przyczyny takiej wybiórczości są związane z: (a) większą tolerancją RpoS na odstępstwa od sekwencji konsensusowej rozpoznawanej w obrębie promotora, (b) powinowactwem RpoS do sekwencji sąsiadujących z rdzeniem promotora, (c) zachowaniem w promotorach zależnych od RpoS elementów stymulujących aktywność, które chronią przed redukcją aktywności promotora. Różna kombinacja tych czynników powoduje, że promotor jest całkowicie lub częściowo zależny od RpoS [133]. Specyficzne elementy tych promotorów odróżniają je od typowych promotorów kontrolujących ekspresję genów podstawowego metabolizmu komórkowego (Rys. 65) [133]. Dlatego w sekwencji syntetycznego promotora Psp2 wzorowano się na sekwencji konsensusowej optymalnej dla wiązania RpoS.

W badaniach, których celem było wskazanie prawdopodobnych przyczyn preferencyjnej kolonizacji litych guzów nowotworowych przez *Salmonella typhimurium*, zidentyfikowano 26 sekwencji promotorowych, które były znacznie bardziej aktywne w bakteriach w guzie niż w bakteriach w śledzionie [184]. Selekcji dokonano na podstawie analizy biblioteki sekwencji genomowych o długości 300 - 500 pz, pod kontrolą których umieszczono gen kodujący intensywnie fluoryzujące białko TurboGFP. Wybrano klony bakteryjne na podstawie analizy cytofluorymetrycznej i sortowania bakterii obecnych w homogenacie śledziony lub guza uzyskanych od zakażonych myszy bezgranicznych. Ponownej analizie poddano pięć spośród tych sekwencji, przy pomocy metody obrazowania całego ciała (ang. *whole body imaging*). Myszom obciążonym nowotworem podskórnym (komórki ludzkiego raka prostaty PC3) podano dożylnie *S. typhimurium* transformowane plazmidem kodującym TurboGFP pod kontrolą badanych promotorów. Potwierdzono znacznie wyższą indukcję trzech promotorów w bakteriach w guzie niż w śledzionie; jeden promotor miał niską aktywność, a kolejny był wysoce aktywny, ale fluorescencję wykryto również w śledzionie [184]. Dwa spośród trzech wybiórczo aktywowanych w guzie to promotory

genów, które są regulowane przez globalne systemy regulatorowe metabolizmu beztlenowego. Trzeci zidentyfikowany promotor kontroluje ekspresję genu, którego produkt jest wymagany do formowania flagelli [184]. Promotory *Salmonella* aktywowane w warunkach hypoksji mogą być szczególnie przydatne do konstrukcji wektorów bakteryjnych dostarczających materiału genetycznego, który ma ulegać ekspresji w guzach litych. Obszary hypoksji występują w miejscach rozwoju stanu zapalnego w zainfekowanej lub uszkodzonej tkance i w guzach nowotworowych [185], a stan hypoksji przyczynia się do progresji nowotworu i obniża skuteczność terapii przeciwnowotworowych [185, 186]. W grupie klonów bakteryjnych, które wykazywały zieloną fluorescencję w śledzionie i/lub wątrobie, nie było takich, które kodowały sekwencję promotora genu *sifB*. Natomiast w doświadczeniach Bumanna pokazano, że gdy cDNA kodujące GFP umieszczono pod kontrolą *PsifB* to liczba kopii GFP była około 180-krotnie wyższa w bakteriach w śledzionie zakażonej myszy Balb/c niż w bakteriach hodowanych w warunkach *in vitro* [123].

Promotory aktywowane specyficznymi warunkami panującymi wewnątrz litych guzów nowotworowych, np. aktywowane hypoksją, są szczególnie przydatne do ekspresji czynnika terapeutycznego w wektorach, których celem jest przede wszystkim dostarczenie tego czynnika do guza. Ekspresja ograniczona do miejsca wzrostu nowotworu będzie wtedy sprzyjała ograniczeniu niekorzystnych skutków ubocznych i wybiórczości terapii przeciwnowotworowej. W przypadku szczepów *Salmonella* kodujących regulatorowe RNA lub geny białek enzymatycznych metabolizujących nieaktywne prekursorów chemoterapeutyków [187-190] istotą terapii jest, aby dostarczany czynnik działał lokalnie i bezpośrednio na komórki nowotworowe. Jednakże, wektor szczepionkowy ma być nie tylko nośnikiem terapeutyka, ale przede wszystkim powinien mieć odpowiednie działanie immunostymulujące i aktywujące odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko nowotworowi. Ograniczanie miejsca ekspresji czynnika terapeutycznego, np. 6xHis-SipB w VNP/sipB, do rejonów hypoksji, wydaje się być niekorzystne, zwłaszcza w sytuacji kiedy nie jest jeszcze poznany mechanizm efektorowy odpowiedzialny za zahamowanie wzrostu guzów po podaniu bakterii.

Drugą modyfikacją wprowadzoną do genomu VNP20009 była inaktywacja genu kodującego białko AvrA. Dane literaturowe wskazują, że bakterie *Salmonella* pozbawione genu *avrA* podane drogą pokarmową myszom prowadzą do silniejszego stanu zapalnego w obrębie jelita, charakteryzującego się napływem większej liczby neutrofilii niż po podaniu dzikich bakterii. Efektem podania tych bakterii było również nasilenie apoptozy komórek nabłonkowych wyścielających jelito [58]. Skoro rolą AvrA jest hamowanie apoptozy zakażonych komórek, to inaktywacja tego genu w genomie

bakterii VNP/sipB powinna wzmocnić ich proapoptotyczne właściwości. We wstępnym doświadczeniu, w którym myszom obciążonym nowotworem MC38CEA podano bakterie VNP/*avrA::cat* lub VNP20009 w niższej dawce niż uprzednio stosowane, zaobserwowano wolniejszy wzrost guzów u myszy po podaniu zmodyfikowanego szczepu (Rys. 82), co sugeruje, że również ta zmiana w genomie VNP20009 może zwiększać ich efektywność terapeutyczną. Natomiast nie zaobserwowano, czego można by się spodziewać, większej toksyczności VNP/*avrA::cat* w porównaniu z bakteriami VNP20009 lub VNP/sipB (Rys. 83).



## Podsumowanie wyników

1. Z DNA genomowego bakterii *S. typhimurium* uzyskano sekwencję genu *sipB*, który koduje białko o znanym z literatury proapoptotycznym działaniu na zakażone komórki eukariotyczne. Otrzymano plazmid ekspresyjny pQE30-6xHis-*sipB*.
2. Nadekspresja SipB pod postacią białka znakowanego etykietką histydynową (6xHis-SipB) pod kontrolą promotora T5/lacO obniżała żywotność i inwazyjność bakterii *S. typhimurium* VNP20009.
3. Ekspresja białka SipB-GFP pod kontrolą promotora eukariotycznego w komórkach linii nowotworowej MC38CEA była cytotoksyczna dla tych komórek.
4. Bakterie *S. typhimurium* VNP20009 z ekspresją 6xHis-SipB (transformowane plazmidem pQE30-6xHis-*sipB*) były bardziej cytotoksyczne względem zakażonych makrofagów linii RAW264.7 niż bakterie VNP20009.
5. Bakterie VNP20009 transformowane plazmidami pQE30-6xHis-*sipB* oraz pREP-4 silniej niż VNP20009 hamowały wzrost transplantacyjnych guzów podskórnych CT26CEA, MC38CEA i B16 u myszy.
6. Aby ograniczyć negatywny wpływ ekspresji 6xHis-SipB na żywotność i inwazyjność bakterii, zmieniono promotor kontrolujący ekspresję tego białka z T5/lacO na promotor aktywowany w bakteriach żyjących wewnątrz zakażonych komórek eukariotycznych. Wykorzystano sekwencję promotorową występującą w genomie *S. typhimurium*, która reguluje ekspresję genu *sifB*. Fragment *PsifB* uzyskano z DNA genomowego bakterii VNP20009 i potwierdzono jego aktywność w warunkach specyficznych dla aktywacji tego typu genów.
7. Do genomu bakterii *S. typhimurium* VNP20009 wprowadzono trwałą modyfikację w postaci kasety ekspresyjnej kodującej 6xHis-SipB pod kontrolą promotora *PsifB* (*PsifB*-6xHis-*sipB*), którą wbudowano do genomu w obrębie genu *ushA*. Otrzymano nowy szczep: VNP/sipB, który jest pozbawiony oporności na antybiotyki i charakteryzuje się inwazyjnością równą inwazyjności szczepu wyjściowego (VNP20009). Bakterie VNP/sipB były bardziej cytotoksyczne wobec zakażonych komórek nowotworowych MC38CEA niż bakterie VNP20009.
8. Bakterie VNP/sipB silniej niż VNP20009 hamowały wzrost guzów podskórnych MC38CEA i guzów płucnych B16F10 i CT26CEA.
9. Aby wzmocnić proapoptotyczny efekt ekspresji 6xHis-*sipB* w chromosomie bakterii

VNP/sipB zinaaktywowano gen *avrA*, kodujący białko o działaniu przeciwapoptotycznym. Otrzymano szczep VNP/*avrA::cat*, który we wstępnym doświadczeniu skuteczniej niż VNP20009 hamował wzrost guzów podskórnych MC38CEA.

10. Stwierdzono, że bakterie VNP20009, VNP/sipB i VNP/*avrA::cat* charakteryzują się porównywalną toksycznością po dożylnym podaniu myszom C57Bl/6.
11. Otrzymano bakterie VNP/*avrA::cat/sipB*, w których genomie jest obecna kasetta *PsifB-6xHis-sipB* i gen *avrA* jest zinaaktywowany. Weryfikacja skuteczności tego szczepu w hamowaniu wzrostu nowotworów transplantacyjnych wymaga dalszej pracy.

## Streszczenie

*Salmonella typhimurium* jest wewnątrzkomórkowym pasożytem aktywnie zakażającym nefagocytyjające komórki nabłonkowe i makrofagi. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja bakterii stwarza możliwości dostarczenia czynnika terapeutycznego do tych komórek, jak również wygenerowania odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego, której celem jest zakażona komórka. Modułacja naturalnych właściwości *Salmonella* prowadząca do ukierunkowania jej inwazyjności względem określonej populacji komórek może prowadzić do ich eliminacji. Ta koncepcja została wykorzystana do opracowania szczepionek bakteryjnych, których zadaniem jest zahamowanie wzrostu lub eliminacja litych guzów nowotworowych.

VNP20009 to szczep *S. typhimurium* o właściwościach przeciwnowotworowych, zdolny do preferencyjnej kolonizacji guzów litych. VNP20009 jest szczepem atenuowanym i auksotroficznym, między innymi dzięki delecji *purl*, jednego z genów szlaku metabolizmu puryn. Ponadto VNP20009 jest dobrze tolerowany przez ssaki dzięki częściowej delecji *msbB*, obniżającej zdolność lipopolisacharydu VNP20009 do stymulacji produkcji TNF $\alpha$ .

Infekcja *Salmonella typhimurium* prowadzi do apoptotycznej śmierci zakażonych komórek. Jednym z głównych czynników proapoptotycznych jest białko SipB (ang. *Salmonella invasion protein B*), kodowane w obrębie pierwszej wyspy patogenności (SPI1). W ramach prezentowanej pracy doktorskiej zweryfikowano hipotezę, że nadekspresja białka SipB może zwiększać proapoptotyczne własności *S. typhimurium*.

Sekwencję kodującą białko SipB uzyskano z DNA genomowego *S. typhimurium*. Scharakteryzowano wpływ nadekspresji SipB z plazmidu pod kontrolą operatora laktozowego na wzrost i inwazyjność VNP20009. Zastosowanie analizy Western blotting oraz testu protekcji gentamycynowej pozwoliły stwierdzić, że w takim przypadku nadekspresja tego białka była istotnym stresem metabolicznym dla bakterii i upośledzała zdolność do zakażenia komórek linii makrofagowej RAW264.7 oraz komórek nowotworowych linii MC38CEA.

Przejsiowa ekspresja białka EGFP-SipB pod kontrolą promotora eukariotycznego P<sub>CMV</sub> w komórkach linii MC38CEA, prowadziła do wzrostu poziomu apoptozy, mierzonej ekspozycją fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej przy pomocy analizy cytofluorymetrycznej komórek barwionych aneksyną V.

Aby ograniczyć negatywny wpływ nadekspresji na żywotność i zdolności inwazyjne, przygotowano wektor plazmidowy, w którym gen kodujący SipB umieszczono pod kontrolą promotora genu regulowanego przez czynniki aktywujące geny drugiej wyspy patogenności (SPI2). Sekwencję promotorową *PsifB* uzyskano z DNA genomowego *S.*

*typhimurium*. Otrzymano konstrukty kontrolne umożliwiające ocenę aktywności promotora. Analiza cytofluorymetryczna i mikroskopowa bakterii z ekspresją białka GFP i białka SipB-GFP pod kontrolą *PsifB*, pokazały aktywację promotora w warunkach odpowiadających środowisku wewnątrz wakuoli, w której żyje *S. typhimurium* (SCV). Potwierdzono również aktywację *PsifB* w bakteriach wewnątrz zakażonych makrofagów.

Pożądaną cechą bakteryjnego wektora szczepionkowego jest jego stabilność genetyczna pod nieobecność czynnika selekcyjnego. Dlatego też kasetę ekspresyjną kodującą SipB pod kontrolą *PsifB* zintegrowano z genomem VNP20009, stosując metodę opartą o naturalne zdolności rekombinacyjno-naprawcze szczepu VNP20009, z wykorzystaniem warunkowo replikującego plazmidu. W wyniku przeprowadzonej procedury uzyskano nowy szczep, określany jako VNP/sipB. Szczep ten również wydajnie jak VNP20009 zakażał komórki eukariotyczne, charakteryzował się wysoką stabilnością genetyczną i, co istotne, nie zawierał żadnego genu oporności na antybiotyki.

Doświadczenia wykonane na modelach nowotworów transplantacyjnych u myszy wykazały wyższą skuteczność zmodyfikowanego szczepu VNP/sipB w hamowaniu wzrostu nowotworów, w porównaniu do szczepu VNP20009.

Stwierdzono, że w surowicy połowy myszy szczepionych zmodyfikowanym szczepem VNP/sipB znacząco przeważają przeciwciała o izotypie IgG2a, co świadczy o ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej na odpowiedź typu Th1, co z kolei może w istotny sposób przyczynić się do eliminacji nowotworu.

Skonstruowano również szczep bakteryjny ze zinaktywowanym genem *avrA*, który koduje białko o aktywności przeciwapoptotycznej. Otrzymano bakterie VNP/*avrA::cat*, w których genomie w obrębie sekwencji kodującej *avrA* wstawiono fragment warunkujący oporność na chloramfenikol. Przeprowadzono wstępne badania nad aktywnością tego szczepu w hamowaniu wzrostu nowotworów.

## Abstract

*Salmonella typhimurium* is an intracellular parasite actively infecting nonphagocytic epithelial cells and macrophages. The intracellular localization of the bacteria gives opportunity to deliver a therapeutic agent to these cells, as well as to generate a cellular immune response towards infected cells. Modification of the natural features of *Salmonella* directing the invasion against a particular population of cells may lead to the elimination of these cells. This concept has been used to develop bacterial vaccine vectors that are intended to reduce the growth and eliminate solid tumors.

VNP20009 is a genetically modified strain of *S. typhimurium* with attenuated virulence due to the deletion of *purl*, one of the purine metabolism pathway genes, capable of preferential colonization of solid tumors. In addition, VNP20009 is well tolerated by mammals due to a partial deletion of *msbB* which decreases the ability of lipopolysaccharide to stimulate the production of TNF $\alpha$ .

*Salmonella typhimurium* infection leads to apoptotic death of infected cells. One of the main factors responsible is the proapoptotic protein SipB (Salmonella invasion protein B), encoded on SPI1.

The aims of this study were:

- 1) to test the hypothesis that an overexpression of SipB can increase antitumor action of VNP20009;
- 2) in case this hypothesis is correct - to modify the chromosome of VNP20009 in order to obtain a stable overexpression of SipB in intracellular bacteria;
- 3) to determine the biological effects of this modification.

The coding sequence of *sipB* was amplified from *S. typhimurium* genomic DNA and cloned into multicopy plasmid under the control of T5/*lacO* promoter. Western blot analysis and gentamicin protection assay indicated that SipB overexpression decreased the viability and invasiveness of VNP20009.

Transient expression of EGFP-SipB under the control of eukaryotic P<sub>CMV</sub> promoter increased MC38CEA adenocarcinoma apoptosis.

In order to reduce the negative effect of SipB overexpression on bacterial viability and invasiveness a plasmid was constructed, encoding *sipB* under the control of *PsifB*, SPI2 regulated promoter. *PsifB* sequence was cloned from *S. typhimurium* genomic DNA. Control plasmids were prepared to define the promoter activity. Flow cytometric and microscopic analysis of bacteria expressing GFP and SipB-GFP from *PsifB* showed activation of the promoter under conditions corresponding to the environment inside the SCV (Salmonella containing vacuole). *PsifB* was also activated in bacteria inside infected macrophages.

A bacterial vaccine vector should be genetically stable in the absence of a selective agent. Therefore, the expression cassette coding SipB under the control of *PsifB* was integrated into VNP20009 genome. A new strain was obtained, termed VNP/sipB. This strain shows an invasiveness similar to VNP20009, is genetically stable and is free of any antibiotic resistance gene. Animal studies indicate that VNP/sipB inhibits the growth of transplantable tumors in mice more efficiently than VNP20009.

The serum from half of the mice injected with VNP/sipB contained significantly more antibodies of IgG2 isotype. This isotype switch indicates skewing of the immune response towards Th1 type, which in turn can contribute to the eradication of cancer.

## Załączniki

**Tabela 23. Plazmidy wykorzystane do klonowania i do rekombinacji z udziałem DNA genomowego bakterii oraz plazmidy, z których zamplifikowano sekwencje kodujące geny *gfp*, *rfp* i *cat* w reakcji PCR.**

Nazwa	Rozmiar (pz)	<i>ori</i>	Liczba kopii	Marker oporności	Źródło/Referencja	Nr GenBank
pQE-30	3461	ColE1	20-30	ampicylina	Qiagen	—
pEGFP-C1	4731	pUC	~500	kanamycyna	Clontech	U55763
pGEM-T <sub>Easy</sub>	3015	zmutowany pMB1	300-700	ampicylina	Promega	—
pDsRed	3587	pUC	~500	ampicylina	Clontech	—
pGFPuv	3615	pUC	~500	ampicylina	Clontech	U62636
pBR322	4361	pMB1	>25 (30-40)	tetracyklina, ampicylina	[191]	J01749
pKRP10	3809	pMB1	>25 (30-40)	ampicylina, chloramfenikol	[192]	—
pREP-4	3740	p15A	~10 (15-20)	kanamycyna	Qiagen	—
pSG76-C	1916	R6K $\gamma$	~4	chloramfenikol	[193]	Y09893
pST76-A	3159	pSC101	~6 (5-8)	ampicylina	[193]	Y09895
pSTKST	4663	pSC101	~6	kanamycyna	[194]	AF406953
pPIR-A	4089	pSC101	~6	ampicylina	[193]	—

**Tabela 24. Skład pożywek stosowanych do indukcji ekspresji genów SPI2.**

	MgM [65, 125]	LPM [125]	M9 [65]	ISM [65]
KCl	5 mM	5 mM	-	-
NaCl	-	-	8,5 mM	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 mM	0,5 mM	-	6 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,5 mM	7,5 mM	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	18,7 mM	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	0,34 mM	23 mM	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	47,7 mM	-
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	170 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 μM	8 μM	-	-
MgSO <sub>4</sub>	-	-	2 mM	0,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	1 μM
Glicerol	0,3%	0,3%	-	-
Glukoza	-	-	0,4%	0,4%
Kwas nikotynowy	-	-	-	16 μM
Kwaśny hydrolizat kazeiny	0,1%	0,1%	-	-
Tris-Cl	100 mM pH 4,5 lub 7,5*	100 mM pH 7,4**	-	-
MES	170 mM pH 4,5 lub 7,5*	80 mM pH 5,8**	-	-

\* pożywkę buforowano Tris-Cl [18] lub MES (kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy) [124]

\*\* pożywkę o pH 7,4 lub 5,8 buforowano odpowiednio Tris-Cl lub MES [125]

### **Identyfikacja klonów bakterii, w których doszło do rekombinacji pomiędzy fragmentami DNA genomowego i plazmidowego.**

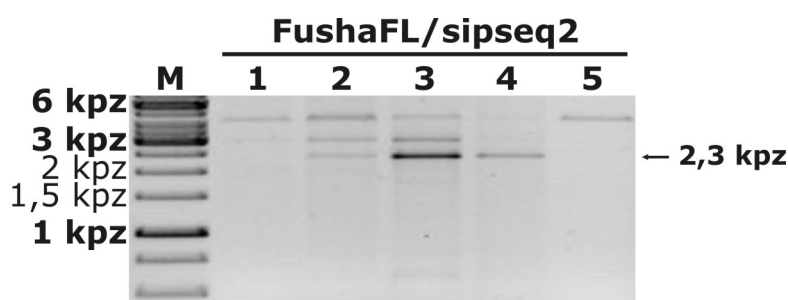
Do uzyskania bakterii VNP/sipB, w których genomie umieszczono fragment *PsifB-6xHis-sipB*, zastosowano metodę wykorzystującą rekombinację homologiczną z udziałem sekwencji w genomie bakteryjnych oraz homologicznych do nich sekwencji dostarczonych do bakterii na warunkowo replikującym plazmidzie integracyjnym. Aby stwierdzić, czy w wyniku przeprowadzonej procedury selekcji doszło do wbudowania fragmentu DNA do genomu, pojedyncze kolonie bakteryjne analizowano metodą PCR. Przeprowadzono reakcje PCR z parami starterów, z których jeden był komplementarny do sekwencji w obrębie fragmentu wprowadzanego do genomu (*PsifB-6xHis-sipB*), a drugi starter był komplementarny do sekwencji sąsiadującej z miejscem wbudowania kasety. Dzięki takiemu doborowi starterów produkt powinien powstać tylko w tych reakcjach, w których matrycą było DNA genomowe z plazmidem włączonym do genomu.

Jednakże we wstępnych doświadczeniach w reakcjach na matrycy DNA z części klonów bakterii otrzymywano fałszywy produkt reakcji ze starterami, z których jeden był komplementarny do sekwencji flankującej miejsce insercji od strony końca 5' (Rys. 41), natomiast nie otrzymywano produktu w reakcji z drugą parą starterów, których jeden był komplementarny do sekwencji flankującej miejsce insercji od strony końca 3'.



Prawdopodobnie przyczyną było powstawanie niekompletnych, krótkich produktów reakcji wydłużania obu starterów: hybrydującego z sekwencją DNA genomowego oraz hybrydującego z sekwencją plazmidową w obrębie wbudowywanego fragmentu (G. Pósfai, informacja ustna). Produkt powstający w wyniku wydłużania startera komplementarnego do sekwencji flankującej sekwencję homologiczną do DNA genomowego na plazmidzie był częściowo komplementarny do sekwencji plazmidu, czyli równocześnie do sekwencji produktu powstałego na matrycy DNA plazmidowego w wyniku wydłużania drugiego ze starterów. A więc te produkty miały homologiczne końce 3', które mogły hybrydować i zostać uzupełnione przez polimerazę DNA i w kolejnych cyklach mogły służyć jako matryca reakcji. Wykonano doświadczenie potwierdzające taką możliwość.

Przeprowadzono reakcje PCR, w których jako matrycę zastosowano mieszaninę DNA genomowego oczyszczonego z bakterii VNP20009 i DNA plazmidu integracyjnego pSG76C-USS. W takich reakcjach faktycznie otrzymywano produkt (Rys. 91).



**Rys. 91. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA genomowego bakterii VNP20009 i/lub plazmidu integracyjnego pSG76C-USS.** Reakcje przeprowadzono ze starterami FushaFL i sipseq2. Matrycą w kolejnych reakcjach (ścieżki 1 - 5) było: **(1)** 130 ng plazmidu pSG76C-USS, **(2)** 130 ng plazmidu pSG76C-USS i 30 ng DNA genomowego bakterii VNP20009, **(3)** 130 ng plazmidu i 30 ng DNA genomowego, **(4)** 6,5 ng plazmidu i 30 ng DNA genomowego, **(5)** 130 ng plazmidu, ale mieszanina reakcyjna nie zawierała polimerazy DNA.

# Literatura

1. Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 66(10):4579-87.
2. Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 1):521-4.
3. Lilleengen K. 1948. Typing *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77(Suppl.):11-125.
4. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Nature* 413(6858):852-6.
5. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2(2):145-56.
6. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30(1):175-88.
7. Bäumler AJ, Kusters JG, Stojiljkovic I, Heffron F. 1994. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect Immun* 62(5):1623-30.
8. Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol Microbiol* 29(3):883-91.
9. Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V. 2007. *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1(1):63-75.
10. Giacomodonato MN, Uzzau S, Bacciu D, Caccuri R, Sarnacki SH, Rubino S, Cerquetti MC. 2007. SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* 153(Pt 4):1221-8.
11. Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Méresse S, Lopez A, Finlay BB. 2002. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 4(1):43-54.
12. Brown NF, Vallance BA, Coombes BK, Valdez Y, Coburn BA, Finlay BB. 2005. *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* 1(3):e32.
13. Yoon H, McDermott JE, Porwollik S, McClelland M, Heffron F. 2009. Coordinated regulation of virulence during systemic infection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *PLoS Pathog* 5(2):e1000306.
14. Eswarappa SM, Janice J, Nagarajan AG, Balasundaram SV, Karnam G, Dixit NM, Chakravorty D. 2008. Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS One* 3(12):e3829.
15. Gaines S, Sprinz A, Tully J. 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge and the relationship between the numbers of bacilli and morphological lesions. *J Infect Dis* 118:293-306.
16. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2(4):361-7.
17. Dunlap NE, Benjamin WH Jr, McCall RD Jr, Tilden AB, Briles DE. 1991. A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb Pathog* 10(4):297-310.
18. Richter-Dahlfors A, Buchan AMJ, Finlay BB. 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186(4):569-80.
19. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5189-93.
20. Patel JC, Galan JE. 2005. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*—all in the name of

entry. *Curr Opin Microbiol* 8:10-15.

21. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. 1999. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401(6755):804-8.
22. Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galán JE, Unger VM. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306(5698):1040-2.
23. Cossart P, Sansonetti PJ. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304(5668):242-8.
24. Blocker A, Komoriya K, Aizawa S. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6):3027-30.
25. van der Goot FG, Harder T. 2001. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 13(2):89-97.
26. Shi J, Casanova JE. 2006. Invasion of host cells by Salmonella typhimurium requires focal adhesion kinase and p130Cas. *Mol Biol Cell* 17(11):4698-708.
27. Hayward RD, Koronakis V. 1999. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. *EMBO J* 18(18):4926-34.
28. Higashide W, Dai S, Hombs VP, Zhou D. 2002. Involvement of SipA in modulating actin dynamics during Salmonella invasion into cultured epithelial cells. *Cell Microbiol* 4(6):357-65.
29. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galán JE. 1998. S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93(5):815-26.
30. Patel JC, Galán JE. 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J Cell Biol* 175(3):453-63.
31. Fu Y, Galán JE. 1999. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401(6750):293-7.
32. Kubori T, Galán JE. 2003. Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* 115(3):333-42.
33. Ibarra JA, Knodler LA, Sturdevant DE, Virtaneva K, Carmody AB, Fischer ER, Porcella SF, Steele-Mortimer O. 2010. Induction of Salmonella Pathogenicity Island 1 under different growth conditions can affect Salmonella-host cell interactions in vitro. *Microbiology* 156(Pt 4):1120-33.
34. Abrahams GL, Hensel M. 2006. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular Salmonella enterica and its host cells. *Cell Microbiol* 8(5):728-37.
35. Steele-Mortimer O, Méresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB. 1999. Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1(1):33-49.
36. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC. 2000. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287(5458):1655-8.
37. Méresse S, Unsworth KE, Habermann A, Griffiths G, Fang F, Martínez-Lorenzo MJ, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW. 2001. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell Microbiol* 3(8):567-77.
38. Miao EA, Brittnacher M, Haraga A, Jeng RL, Welch MD, Miller SI. 2003. Salmonella effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 48(2):401-15.
39. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. 1999. A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 18(14):3924-33.
40. Kuhle V, Jäckel D, Hensel M. 2004. Effector proteins encoded by Salmonella pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host cells. *Traffic* 5:356-70.
41. Salcedo SP, Holden DW. 2003. SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network. *EMBO J* 22:5003-14.
42. Boucrot E, Henry T, Borg JP, Gorvel JP, Méresse S. 2005. The intracellular fate of Salmonella depends on the recruitment of kinesin. *Science* 308:1174-78.
43. Diacovich L, Dumont A, Lafitte D, Soprano E, Guilhon AA, Bignon C, Gorvel JP, Bourne Y, Méresse S. 2009. Interaction between the SifA virulence factor and its host target SKIP is essential for Salmonella pathogenesis. *J Biol Chem* 284(48):33151-60.

44. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. 1996. Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9833-8.
45. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. 1999. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2396-401.
46. Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M. 2000. Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* 192(7):1035-46.
47. Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. 2000. Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 192(2):249-58.
48. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768-74.
49. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256(5053):97-100.
50. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75(4):653-60.
51. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267(5206):2000-3.
52. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 80(3):401-11.
53. Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. 2007. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem* 282(50):36321-9.
54. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 12(9):1304-14.
55. Liao AP, Petrof EO, Kuppireddi S, Zhao Y, Xia Y, Claud EC, Sun J. 2008. Salmonella type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 3(6):e2369.
56. Ye Z, Petrof EO, Boone D, Claud EC, Sun J. 2007. Salmonella effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am J Pathol* 171(3):882-92.
57. Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, Madara JL, Orth K, Neish AS. 2002. Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* 169(6):2846-50.
58. Jones, R.M., H. Wu, C. Wentworth, L. Luo, L. Collier-Hyams, and A.S. Neish. 2008. Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe* 3:233-44.
59. Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccarini M. 1999. Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 181(11):3433-7.
60. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. 1996. Co-ordinate regulation of Salmonella typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* 22(4):703-14.
61. Temme K, Salis H, Tullman-Ercek D, Levskaya A, Hong SH, Voigt CA. 2008. Induction and relaxation dynamics of the regulatory network controlling the type III secretion system encoded within Salmonella pathogenicity island 1. *J Mol Biol* 377(1):47-61.
62. Valdivia RH, Falkow S. 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277:2007-11.
63. Pfeifer CG, Marcus SL, Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB. 1999. Salmonella typhimurium virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and non-phagocytic cells. *Infect Immun* 67:5690-8.
64. Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S, Hensel M. 1999. Environmental regulation of Salmonella Pathogenicity Island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31:1759-73.
65. Beuzón CR, Banks G, Deiwick J, Hensel M, Holden DW. 1999. pH dependent secretion of SseB, a

- product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 33:806-16.
66. Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S. 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun* 64(7):2765-73.
67. Kaper J, Rappuoli R, Buckley M. 2005. Vaccine Development: Current Status and Future Needs. A Report from the American Academy of Microbiology.
68. Cheminaya C, Hensel M. 2008. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 298(1-2):87-98.
69. Raupach B, Kaufmann SH. 2001. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? *Microbes Infect* 3(14-15):1261-9.
70. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26(4):339-53.
71. Raupach B, Kurth N, Pfeffer K, Kaufmann SH. 2003. *Salmonella typhimurium* strains carrying independent mutations display similar virulence phenotypes yet are controlled by distinct host defense mechanisms. *J Immunol* 170(12):6133-40.
72. Hoiseth SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291(5812):238-9.
73. Dougan G, Chatfield S, Pickard D, Bester J, O'Callaghan D, Maskell D. 1988. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *J Infect Dis* 158(6):1329-35.
74. Sydenham M, Douce G, Bowe F, Ahmed S, Chatfield S, Dougan G. 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68(3):1109-15.
75. Chatfield SN, Strahan K, Pickard D, Charles IG, Hormaeche CE, Dougan G. 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog* 12(2):145-51.
76. Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F. 1996. Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS ( $\sigma$  S) regulon. *Mol Microbiol* 22(1):149-60.
77. Dougan G, Hormaeche CE, Maskell DJ. 1987. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. *Parasite Immunol* 9(2):151-60.
78. O'Callaghan D, Maskell D, Liew FY, Easmon CS, Dougan G. 1988. Characterisation of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c Mice. *Infect Immun* 56(2):419-23.
79. VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, Yamamoto M, Kiyono H, McGhee JR. 1998. Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat Med* 4(11):1247-52.
80. Hone DM, Attridge SR, Forrest B, Morona R, Daniels D, LaBrooy JT, Bartholomeusz RC, Shearman DJ, Hackett J. 1988. A *galE* via (*Vi* antigen-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in humans. *Infect Immun* 56(5):1326-33.
81. Kotton CN, Hohmann EL. 2004. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun* 72(10):5535-47.
82. Germanier R, Furer E. 1975. Isolation and characterization of *galE* mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J Infect Dis* 141:553-8.
83. Levine MM, Ferreccio C, Cryz S, Ortiz E. 1990. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet* 336(8720):891-4.
84. Germanier R, Furer E. 1983. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "S. typhi" Ty 21a. *Dev Biol Stand* 53:3-7.
85. Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SHE. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4):1458-63.
86. McSorley SJ, Xu D, Liew FY. 1997. Vaccine Efficacy of *Salmonella* Strains Expressing Glycoprotein 63 with Different Promoters. *Infect Immun* 65(1):171-8.
87. Pasetti MF, Anderson RJ, Noriega FR, Levine MM, Sztein MB. 1999. Attenuated  $\Delta$ guaBA *Salmonella typhi* Vaccine Strain CVD 915 as a Live Vector Utilizing Prokaryotic or Eukaryotic Expression Systems to Deliver Foreign Antigens and Elicit Immune Responses. *Clin Immunol* 92(1):76-89.

88. Kotton CN, Lankowski AJ, Scott N, Sisul D, Chen LM, Raschke K, Borders G, Boazc M, Spentzou A, Galan JE, Hohmann EL. 2006. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine* 24(37-39):6216-24.
89. Pan Z, Zhang X, Geng S, Fang Q, You M, Zhang L, Jiao X, Liu X. 2010. Prime-boost immunization using a DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and a killed vaccine completely protects chickens from H5N1 highly pathogenic avian influenza. *Clin Vaccine Immunol* 17(4):518-23.
90. Keitel WA, Bond NL, Zahradnik JM, Cramton TA, Robbins JB. 1994. Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. *Vaccine* 12(3):195-9.
91. Xiang R, Lode HN, Chao TH, Ruehlmann JM, Dolman CS, Rodriguez F, Whitton JL, Overwijk WW, Restifo NP, Reisfeld RA. 2000. An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5492-97.
92. Nishikawa H, Sato E, Briones G, Chen LM, Matsuo M, Nagata Y, Ritter G, Jäger E, Nomura H, Kondo S, Tawara I, Kato T, Shiku H, Old LJ, Galán JE, Gnjjatic S. 2006. In vivo antigen delivery by a *Salmonella typhimurium* type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* 116(7):1946-54.
93. Rosenberg SA. 2005. Cancer immunotherapy comes of age. *Nat Clin Pract Oncol* 2(3):115.
94. Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. 2007. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clin Cancer Res* 13(13):3776-82.
95. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. 1997. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res* 57(20):4537-44.
96. Bermudes D, Zheng LM, King IC. 2002. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5(2):194-9.
97. Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthöft T, Kagnoff MF. 1998. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* 102(10):1815-23.
98. Brode S, Macary PA. 2004. Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* 112(3):345-51.
99. Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. 2009. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* 14(4):364-75.
100. Clairmont C, Lee KC, Pike J, Ittensohn M, Low KB, Pawelek J, Bermudes D, Brecher SM, Margitich D, Turnier J, Li Z, Luo X, King I, Zheng LM. 2000. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis* 181(6):1996-2002.
101. Thamm DH, Kurzman ID, King I, Li Z, Sznol M, Dubielzig RR, Vail DM, MacEwen EG. 2005. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation. *Clin Cancer Res* 11(13):4827-34.
102. Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng L, King I, Pawelek JM, Bermudes D. 1999. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF $\alpha$  induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol* 17(1):37-41.
103. Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Stock F, Freezer LJ, Morton KE, Seipp C, Haworth L, Mavroukakis S, White D, MacDonald S, Mao J, Sznol M, Rosenberg SA. 2002. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 20(1):142-52.
104. Bereta M, Hayhurst A, Gajda M, Chorobik P, Targosz M, Marcinkiewicz J, Kaufman HL. 2007. Improving tumor targeting and therapeutic potential of *Salmonella* VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies. *Vaccine* 25(21):4183-92.
105. Villarejo MR, Zabin I. 1974.  $\beta$ -Galactosidase from Termination and Deletion Mutant Strains. *J Bacteriol* 120(1): 466-74.
106. Nevola JJ, Stocker BA, Laux DC, Cohen PS. 1985. Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect Immun* 50(1):152-9.
107. Low KB, Ittensohn M, Luo X, Zheng LM, King I, Pawelek JM, Bermudes D. 2004. Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting *Salmonella* for parenteral administration in humans. *Methods Mol Med* 90:47-60.
108. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233(4770):1318-21.

109. Hu F, Lesney PF. 1964. The isolation and cytology of two pigment cell strains from B-16 mouse melanomas. *Cancer Res* 24:1634-43.
110. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nowy Jork.
111. Pósfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR. 1999. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 27:4409-15.
112. Kempell KE, Cox CJ, Hurle M, Wong A, Wilkie S, Zanders ED, Gaston JS, Crowe JS. 2000. Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue. *Infect Immun* 68(10):6012-26.
113. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
114. Peters JH, Baumgarten H. 1992. *Monoclonal antibodies*. Springer Verlag, Nowy Jork.
115. Jacob F, Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-56.
116. Kim HG, Kim BH, Kim JS, Eom JS, Bang IS, Bang SH, Lee IS, Park YK. 2008. N-terminal residues of SipB are required for its surface localization on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 154(Pt 1):207-16.
117. Kim BH, Kim HG, Kim JS, Jang JI, Park YK. 2007. Analysis of functional domains present in the N-terminus of the SipB protein. *Microbiology* 153(Pt 9):2998-3008.
118. Lloyd SA, Norman M, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* 39(2):520-31.
119. Löwer M, Schneider G. 2009. Prediction of Type III Secretion Signals in Genomes of Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE* 4(6): e5917.
120. <http://falkow.stanford.edu/whatwedo/supplementarydata/pub5/chapter.pdf>
121. Yrlid U, Wick MJ. 2000. *Salmonella*-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J Exp Med* 191(4):613-24.
122. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-20.
123. Bumann D. Method for the identification of tissue-specific regulatory sequences. 2005. US Patent 7425429. Patent Application Publication US 2005/0164962 A1
124. Garmendia J, Beuzón CR, Ruiz-Albert J, Holden DW. 2003. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 149(Pt 9):2385-96.
125. Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB. 2004. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* 279(48):49804-15.
126. Xu X, Hensel M. 2010. Systematic analysis of the SsrAB virulon of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 78(1):49-58.
127. Holzer SU, Hensel M. 2010. Functional dissection of translocon proteins of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2-encoded type III secretion system. *BMC Microbiol* 10(1):104.
128. Burns, D. M., I.R. Beacham. 1986. Identification and sequence analysis of a silent gene (ushA0) in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 192:163-75.
129. Innes D, Beacham IR, Beven CA, Douglas M, Laird MW, Joly JC, Burns DM. 2001. The cryptic ushA gene (ushAc) in natural isolates of *Salmonella enterica* (serotype Typhimurium) has been inactivated by a single missense mutation. *Microbiology* 147(Pt 7):1887-96.
130. Benjamin WH Jr, Posey BS, Briles DE. 1986. Effects of in vitro growth phase on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in mice. *J Gen Microbiol* 132(5):1283-95.
131. Walthers D, Carroll RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ. 2007. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 65(2):477-93.
132. Chen CY, Eckmann L, Libby SJ, Fang FC, Okamoto S, Kagnoff MF, Fierer J, Guiney DG. 1996. Expression of *Salmonella typhimurium* rpoS and rpoS-dependent genes in the intracellular environment of

eukaryotic cells. *Infect Immun* 64(11):4739-43.

133. Typas A, Becker G, Hengge R. 2007. The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol* 63(5):1296-1306.

134. Joyce JA. 2005. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 7(6):513-20.

135. Chen LM, Kaniga K, Galán JE. 1996. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21(5):1101-15.

136. Hilbi H, Chen Y, Thirumalai K, Zychlinsky A. 1997. The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during Shigella flexneri-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 65(12):5165-70.

137. Hermant D, Ménard R, Arricau N, Parsot C, Popoff MY. 1995. Functional conservation of the Salmonella and Shigella effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol* 17(4):781-9.

138. Kaniga K, Tucker S, Trollinger D, Galán JE. 1995. Homologs of the Shigella IpaB and IpaC invasins are required for Salmonella typhimurium entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol* 177(14):3965-71.

139. Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galán JE. 2003. A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol* 163(5):1123-31.

140. Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10(2):417-26.

141. Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9(3):459-70.

142. Hayward RD, McGhie EJ, Koronakis V. 2000. Membrane fusion activity of purified SipB, a Salmonella surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol Microbiol* 37(4):727-39.

143. Lilo S, Zheng Y, Bliska JB. 2008. Caspase-1 activation in macrophages infected with Yersinia pestis KIM requires the type III secretion system effector YopJ. *Infect Immun* 76(9):3911-23.

144. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Flavell RA, Galán JE. 2006. Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis. *J Exp Med* 203(6):1407-12.

145. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182(2):389-400.

146. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 185(2):317-28.

147. Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA. 1998. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161(9):4467-71.

148. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361(6410):359-62.

149. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158(9):4229-36.

150. Wick MJ. 2002. The role of dendritic cells during Salmonella infection. *Curr Opin Immunol* 14(4):437-43.

151. Cheminay C, Möhlenbrink A, Hensel M. 2005. Intracellular Salmonella inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 174(5):2892-9.

152. Bueno SM, González PA, Carreño LJ, Tobar JA, Mora GC, Pereda CJ, Salazar-Onfray F, Kalergis AM. 2008. The capacity of Salmonella to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology* 124(4):522-33.

153. Sundquist M, Wick MJ. 2009. Salmonella induces death of CD8alpha(+) dendritic cells but not CD11c(int)CD11b(+) inflammatory cells in vivo via MyD88 and TNFR1. *J Leukoc Biol* 85(2):225-34.

154. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-67.

155. Carbone FR, Bevan MJ. 1990. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med* 171(2):377-87.

156. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM, Inaba K. 2002. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med*



195(10):1289-302.

157. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192(12):1685-96.

158. Otahal P, Hutchinson SC, Mylin LM, Tevethia MJ, Tevethia SS, Schell TD. 2005. Inefficient cross-presentation limits the CD8+ T cell response to a subdominant tumor antigen epitope. *J Immunol* 175(2):700-12.

159. Finn OJ. 2003. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3(8):630-41.

160. Lurquin C, Lethé B, De Plaen E, Corbière V, Théate I, van Baren N, Coulié PG, Boon T. 2005. Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med* 201(2):249-57.

161. Redondo P, del Olmo J, López-Díaz de Cerio A, Inoges S, Marquina M, Melero I, Bendandi M. 2007. Imiquimod enhances the systemic immunity attained by local cryosurgery destruction of melanoma lesions. *J Invest Dermatol* 127(7):1673-80.

162. Guo J, Zhu J, Sheng X, Wang X, Qu L, Han Y, Liu Y, Zhang H, Huo L, Zhang S, Lin B, Yang Z. 2007. Intratumoral injection of dendritic cells in combination with local hyperthermia induces systemic antitumor effect in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* 120(11):2418-25.

163. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194(6):769-79.

164. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2(11):1010-7.

165. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 82(6):1365-74.

166. Avogadri F, Mittal D, Saccheri F, Sarrafiore M, Ciocca M, Larghi P, Orecchia R, Rescigno M. 2008. Intra-tumoral Salmonella typhimurium induces a systemic anti-tumor immune response that is directed by low-dose radiation to treat distal disease. *Eur J Immunol* 38(7):1937-47.

167. Geddes K, Cruz F, Heffron F. 2007. Analysis of cells targeted by Salmonella type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* 3(12):e196.

168. Brumell JH, Tang P, Mills SD, Finlay BB. 2001. Characterization of Salmonella-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between Salmonella-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2(9):643-53.

169. García-Del Portillo F, Jungnitz H, Rohde M, Guzmán CA. 2000. Interaction of Salmonella enterica serotype Typhimurium with dendritic cells is defined by targeting to compartments lacking lysosomal membrane glycoproteins. *Infect Immun* 68(5):2985-91.

170. Niedergang F, Sirard JC, Blanc CT, Kraehenbuhl JP. 2000. Entry and survival of Salmonella typhimurium in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26):14650-5.

171. Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O. 2006. The mechanism of Salmonella entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* 7:39-51.

172. Gong H, Su J, Bai Y, Miao L, Kim K, Yang Y, Liu F, Lu S. 2009. Characterization of the expression of Salmonella Type III secretion system factor PrgI, SipA, SipB, SopE2, SpaO, and SptP in cultures and in mice. *BMC Microbiol* 17:9:73.

173. Dubnau D, Losick R. 2006. Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* 61(3):564-72.

174. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. 2010. Bistable expression of CsgD in biofilm development of Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol* 192(2):456-66.

175. Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C, Holden DW. 2010. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8):3746-51.

176. Mengesha A, Dubois L, Lambin P, Landuyt W, Chiu RK, Wouters BG, Theys J. 2006. Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated Salmonella. *Cancer Biol Ther* 5(9):1120-8.

177. Petit MA. 2005. Mechanisms of homologous recombination in bacteria. W: The Dynamic Bacterial Genome. Pod redakcją Mullany P. Cambridge University Press, Londyn.

178. Papanikolaou N, Trachana K, Theodosiou T, Promponas VJ, Iliopoulos I. 2009. Gene socialization:

gene order, GC content and gene silencing in Salmonella. *BMC Genomics* 11;10:597.

179. Baños RC, Vivero A, Aznar S, García J, Pons M, Madrid C, Juárez A. 2009. Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genet* 5(6):e1000513.

180. Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in Salmonella. *Science* 313(5784):236-8.

181. Tomljenovic-Berube AM, Mulder DT, Whiteside MD, Brinkman FSL, Coombes BK. 2010. Identification of the Regulatory Logic Controlling Salmonella Pathoadaptation by the SsrA-SsrB Two-Component System. *PLoS Genet* 6(3): e1000875.

182. Browning DF, Busby SJ. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* 2(1):57-65.

183. Gaal T, Ross W, Estrem ST, Nguyen LH, Burgess RR, Gourse RL. 2001. Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol Microbiol* 42(4):939-54.

184. Arrach N, Zhao M, Porwollik S, Hoffman RM, McClelland M. 2008. Salmonella promoters preferentially activated inside tumors. *Cancer Res* 68(12):4827-32.

185. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. 2005. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 175(10):6257-63.

186. Coleman CN, Mitchell JB, Camphausen K. 2002. Tumor hypoxia: chicken, egg, or a piece of the farm? *J Clin Oncol* 20(3):610-5.

187. Xu DQ, Zhang L, Kopecko DJ, Gao L, Shao Y, Guo B, Zhao L. 2009. Bacterial delivery of siRNAs: a new approach to solid tumor therapy. *Methods Mol Biol* 487:161-87.

188. Yang N, Zhu X, Chen L, Li S, Ren D. 2008. Oral administration of attenuated *S. typhimurium* carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. *Cancer Biol Ther* 7(1):145-51.

189. Zhang L, Gao L, Zhao L, Guo B, Ji K, Tian Y, Wang J, Yu H, Hu J, Kalvakolanu DV, Kopecko DJ, Zhao X, Xu DQ. 2007. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res* 67(12):5859-64.

190. King I, Bermudes D, Lin S, Belcourt M, Pike J, Troy K, Le T, Ittensohn M, Mao J, Lang W, Runyan JD, Luo X, Li Z, Zheng LM. 2002. Tumor-targeted *Salmonella* expressing cytosine deaminase as an anticancer agent. *Hum Gene Ther* 13(10):1225-33.

191. Covarrubias L, Cervantes L, Covarrubias A, Soberón X, Vichido I, Blanco A, Kupersztoch-Portnoy YM, Bolivar F. 1981. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 13(1):25-35.

192. Reece KS, Phillips GJ. 1995. New plasmids carrying antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 165(1):141-2.

193. Pósfai G, Koob MD, Kirkpatrick HA, Blattner FR. 1997. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J Bacteriol* 179(13):4426-8.

194. Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, Fehér T, Pósfai J, Blattner FR, Pósfai G. 2002. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res* 12(4):640-7.