



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Dominik Lewandowski

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Otrzymywanie i charakterystyka wybranych białek *Ixodes ricinus* w kontekście ich zastosowania jako antygenów w szczepionkach chroniących przed zakażeniem *Borrelia burgdorferi*

Zachodzące w Europie ocieplenie klimatu, wzrost populacji dzikich zwierząt, a także rozwój turystyki na terenach leśnych powodują, że dochodzi do ciągłego zwiększania się liczby kleszczy oraz obszarów przez nie zasiedlanych. Kleszcze występują już nie tylko w lasach i na polach, ale również na terenach parków śródmiejskich. Są one pasożytami zewnętrznymi, żywiącymi się krwią kręgowców. Podczas żerowania, kleszcze mogą wprowadzać do organizmu gospodarza różne czynniki chorobotwórcze wywołujące zoonozy, w tym m. in. boreliozę. W ciągu ostatniej dekady nastąpił w Polsce gwałtowny wzrost zachorowalności na boreliozę, wywoływaną przez bakterie *Borrelia burgdorferi sensu lato*, do których zalicza się m. in. *B. burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* oraz *Borrelia afzelii*. W Polsce wektorem przenoszącym krętki boreliozy są kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Szacuje się, że w niektórych rejonach Polski nawet połowa populacji kleszczy może być zakażonych tą bakterią. Problem powstrzymania ekspansji tego groźnego patogenu jest zatem coraz bardziej alarmujący. Stworzenie skutecznych strategii prewencji i leczenia boreliozy wymaga jednak lepszego poznania mechanizmów molekularnych procesów zachodzących podczas oddziaływań bakterii, kleszcza i jego gospodarza.

Białkiem niezbędnym do skolonizowania kleszcza przez *B. burgdorferi* jest obecny w jelicie kleszcza receptor TROSPA. *B. burgdorferi* napływa do przewodu pokarmowego kleszcza podczas żerowania na zakażonym kręgowcu, wraz z jego krwią. W jelicie zachodzi synteza białek powierzchniowych bakterii, m.in. OspA (ang. *Outer Surface Protein A*). OspA umożliwia krętkowi przywieranie do nabłonka jelitowego roztocza i skolonizowanie go dzięki oddziaływaniu z białkiem TROSPA. Dodatkowo, zachodzące oddziaływanie TROSPA-OspA, zapobiega strawieniu bakterii w jelicie roztocza. Podczas kolejnego żerowania zakażonego

kleszcza na kręgowcu, bytująca w jelicie *B. burgdorferi*, pod wpływem kontaktu z krwią, zahamowuje syntezę OspA i rozpoczyna produkcję białka OspC. Zmianom tym towarzyszy przemieszczanie się bakterii. Część krętków migruje wtedy z jelita do gruczołów ślinowych kleszcza, gdzie bakteria opłaszczana się białkiem ślinowym kleszcza - Salp15 (ang. *Salivary protein 15kDa*). Oddziaływanie to jest możliwe dzięki lipoproteinie OspC, która znajduje się na powierzchni błony komórkowej bakterii. Salp15 występuje naturalnie w ślinie roztocza i wraz z nią jest wstrzykiwany do organizmu gospodarza podczas żerowania kleszcza. Białko to ma właściwości immunoprotekcyjne. Dzięki temu, bakterie opłaszczone Salp15, które wniknęły do organizmu żywiciela, chronione są przed przeciwciałami rozpoznającymi białko OspC. Ponadto, Salp15 osłabia działanie systemu immunologicznego gospodarza. W ten sposób krętek wykorzystuje strategię immunosupresyjną kleszcza, aby przetrwać w organizmie gospodarza. Co więcej, oddziaływania pomiędzy OspC i Salp15 mogą być korzystne również dla kleszcza. *B. burgdorferi* indukuje bowiem powstawanie większych ilości białka Salp15, dzięki czemu lepiej blokowany może być układ odpornościowy gospodarza, co zapewnia kleszczowi efektywniejsze żerowanie.

Głównym celem realizowanej przeze mnie pracy doktorskiej jest opracowanie wydajnej metody otrzymywania rekombinowanych białek TROSPA i Salp15, pochodzących z *Ixodes ricinus*, a następnie scharakteryzowanie tych białek w kontekście ich zastosowania jako potencjalnych antygenów szczepionkowych przeciwko bakterii *B. burgdorferi*. Dodatkowym celem jest charakterystyka strukturalna badanych biomolekuł.

Jedną z metod pozwalających ograniczyć rozprzestrzenianie infekcji *B. burgdorferi* może być zastosowanie szczepionki opartej o białka kleszcza. Obecnie nie jest dostępna szczepionka przeciwko borrelii bazująca na białkach kleszcza, w żadnym kraju na świecie. Na rynku dostępne są jedynie szczepionki dla psów oparte o białko bakteryjne OspA. Ze względu na wysoką zmienność białka OspA, wynikającą ze znacznego zróżnicowania występujących w Europie gatunków *B. burgdorferi* s. l., szczepionka oparta o OspA może okazać się w naszym regionie niewystarczająco skuteczna. Dlatego też, ciągle poszukiwane są rozwiązania alternatywne dla zastosowania w szczepionce białek powierzchniowych bakterii. Wykorzystanie w szczepionce białek kleszcza -TROSPA i Salp15, które są wysoce konserwatywne w obrębie rodzaju *Ixodes* sprawia, że taka szczepionka może mieć znacznie szersze spektrum działania i ma potencjał stać się preparatem uniwersalnym przeciwko infekcjom *B. burgdorferi* s. l. Białko TROSPA zastosowane w szczepionce, która byłaby następnie podawana zwierzętom, mogłoby ograniczyć zakażenie kleszczy. Przeciwciała wytworzone w organizmie zwierzęcia, przechodząc wraz z krwią do przewodu pokarmowego kleszcza, wiązałyby się z receptorem TROSPA. Uniemożliwiłoby to kolonizację jelita roztocza przez *B. burgdorferi*, oraz zmniejszyłoby przeżywalność bakterii w wektorze. W rezultacie liczba krętków przenoszona do organizmu człowieka, podczas ugryzienia przez kleszcza

mogłoby ulec zmniejszeniu. Zastosowanie w takiej szczepionce dodatkowo białka Salp15 mogłoby doprowadzić do wytworzenia przeciwciał neutralizujących działanie immunosupresyjne tego białka i w efekcie do osłabienia żerowania kleszcza, powodując wytworzenie w organizmie gospodarza bardziej „wrogiego” środowiska zarówno dla kleszcza, jak i dla bakterii. Takie działanie pozwoli „przy okazji” ograniczyć transfer również innych patogenów (wywołujących zoonozy bakterii, wirusów, czy pierwotniaków) do organizmu gospodarza. Ponadto, przeciwciała anti-Salp15 mogłyby wiązać się z Salp15 występującym w kompleksie z białkiem błonowym krętka - OspC. Ułatwiałoby to usuwanie patogenu przez komórki układu odpornościowego.

Szczepionka zawierająca białka TROSPA i Salp15 mogłaby być rozprzestrzeniana w formie jadalnej, w lasach, wśród dzikiej zwierzyny, która stanowi główny rezerwuar *B. burgdorferi* s. l. (przede wszystkim wśród myszy i innych drobnych gryzoni). Dzięki takiej strategii można by osiągnąć dwa cele: i) zredukowanie liczby zwierząt zakażonych borelią oraz ii) zmniejszenie liczby kleszczy zainfekowanych *B. burgdorferi*. Bezpośrednią korzyścią dla regionu (i nie tylko) byłaby mniejsza liczba zachorowań na boreliozę wśród ludzi i zwierząt. Natomiast w przypadku gdyby u niektórych zwierząt udało się wywołać zjawisko odrzucenia kleszcza, można by ograniczyć transfer również innych patogenów do organizmu gospodarza.

Podając szczepionkę złożoną z białek TROSPA i Salp15 zwierzętom hodowlanym można by znacznie ograniczyć straty w rolnictwie jakie wynikają z zakażenia zwierząt krętkami boreliozy. Szacuje się, że kleszcze mają znaczący wpływ na hodowlę bydła poprzez zmniejszenie przyrostu masy ciała i produkcji mleka, a także obniżenie wartości skóry nawet o 30%. Oprócz tego, zastosowanie TROSPA w szczepionce dla bydła przyczyni się do ograniczenia zachorowalności tych zwierząt na babeszjozę, albowiem najnowsze badania wskazują, iż receptor TROSPA jest wykorzystywany do zasiedlania kleszczy również przez patogeny z rodzaju *Babesia*. Wprowadzenie zatem takiej szczepionki przyczyni się do znacznych oszczędności dla wielkopolskich rolników.

Od strony poznawczej, znajomość konformacji przestrzennej białka TROSPA, a także Salp15 pozwoli na dokładniejsze zrozumienie molekularnych podstaw procesu zakażenia kleszczy przez *B. burgdorferi*, jak również rozprzestrzeniania patogenu w organizmie żywiciela ostatecznego, w tym człowieka. W przyszłości, wiedza ta może zostać wykorzystana do opracowania skutecznych strategii zapobiegania, łagodzenia lub zwalczania infekcji tymi patogenami. Oprócz tego, posłuży jako model pozwalający wyjaśnić interakcje zachodzące pomiędzy innymi wektorami a przenoszonymi przez nie patogenami.