

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Anna Dobrut

Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.

Praca doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda

Kraków, 2019

Składam serdeczne podziękowania:

Pani dr hab. Monice Brzychczy-Włoch

za opiekę naukową, nieocenione wsparcie,
cenne wskazówki i wszelką pomoc na każdym etapie
powstawania tej pracy,
nieustanną motywację i inspirację

Pani prof. dr hab. n. med. Małgorzacie Bulandzie

za okazaną życzliwość
oraz możliwość zrealizowania tej pracy
w Katedrze Mikrobiologii

Zespołowi Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej

za wsparcie, motywację, pomoc i stworzenie
przyjaznej atmosfery w pracy

Zespołowi badawczemu Pana Prof. dr hab. Andrzeja Gamiana z IITD

PAN we Wrocławiu

za możliwość zrealizowania kluczowych etapów badań
do niniejszej pracy, nieocenione wsparcie,
pomoc i stworzenie przyjaznej atmosfery w pracy

Mojemu mężowi, rodzicom, dziadkom i teściom

za wiarę we mnie, cierpliwość, motywację
i nieustanne wsparcie

*Niniejszą pracę dedykuję mojemu mężowi
Krzysztofowi
oraz
Rodzicom*

Niniejsza praca zrealizowana została w
Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej
w Katedrze Mikrobiologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie



oraz

w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu



Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej
realizowane były w ramach projektu OPUS
(nr UMO-2013/09/B/NZ6/00801),
pod kierownictwem
dr hab. Moniki Brzychczy-Włoch



WYKAZ SKRÓTÓW

ACN – acetylonitryl

ACOG – Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów, ang. *American College of Obstetrician and Gynecologists*

AP – białko pomocnicze, ang. *ancillary protein*

ATCC – Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, ang. *American Type Culture Collection*

BibA – immunogenna adhezyna bakteryjna, ang. *group B Streptococcus immunogenic bacterial adhesin*

BHI – infuzja z mózgu i serca, ang. *brain heart infusion*

β-h/c – β hemolizyna/cytolizyna, ang. *β-hemolysin/cytolysin*

BP – białko szkieletowe, ang. *backbone protein*

BSA – surowicza albumina wołowa, ang. *bovine serum albumin*

CDC – Centra Kontroli i Prewencji Chorób, ang. *Centers for Disease Control and Prevention*

CPS – otoczkowy wielocukier C, ang. *capsular polysaccharide*

cfb – gen kodujący czynnik CAMP

CspA – proteaza serynowa, ang. *cold shock protein A*

CylE – cytolizyna E, ang. *cytolysin E*

DIC – diisopropylkarbodiimid

DIPEA – N,N-diizopropylodetyloamina

DSMZ – Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych, niem. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

EDTA – kwas wersenowy, ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*

EF-Tu – czynnik elongacji Tu, ang. *elongation factor Tu*

ELISA – test immunoenzymatyczny, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*

EOD – zakażenie o wczesnym początku, ang. *early onset disease*

Et₂O – eter dietylowy

Fmoc – fluorenylometyloksykarbonylowa grupa zabezpieczająca, ang. *fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group*

FsbA – białko A wiążące fibronektynę, ang. *S. agalactiae fibrinogen-binding protein*

FsbB – białko B wiążące fibronektynę, ang. *S. agalactiae fibrinogen-binding protein*

GAPDH – dehydrogenaza 3-fosforanowa gliceraldehydu, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GAS – paciorkowce grupy A, ang. *group A Streptococci*

GBS – paciorkowce grupy B, ang. *group B streptococci*

HBTU – heksafluorofosforanu 2-(-1-benzotriazolo) 1,1,3,3-tetrametylo-uronianu

hCG – ludzka gonadotropina kosmówkowa, ang. *human chorionic gonadotropin*

HMBA – żywica 10-[(3-hydroksy-4-metoksybenzylideno)]-9(10H)-antracenonowa, ang. *10-[(3-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)]-9(10H)-anthracenone resin*

HMPA – żywica triamid heksametylofosforowa, ang. *hexamethylphosphoramide resin*

HoAt – 1-hydroksy-7-azabenzotriazol

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa, ang. *high-performance liquid chromatography*

Hsp – białka szoku cieplnego, ang. *Heat-shock protein*

IagA – gen związany z inwazją, ang. *invasion associated gene*

IAP – okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa, ang. *intrapartum antibiotics prophylaxis*

IF – immunofluorescencja, ang. *immunofluorescence*

IIFT – immunofluorescencja pośrednia, ang. *indirect immunofluorescence*

iMLSB – indukcyjny fenotyp oporności na makrolidy – linkozamidy – streptograminy B, ang. *inductive macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance*

IMP – monofosforan inozyny, ang. *inosine monophosphate*

IMPDH – dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny, ang. *inosine 5'-monophosphate dehydrogenase*

KCN – cyjanek potasu

kMLSB – konstytutywny fenotyp oporności na makrolidy – linkozamidy – streptograminy B, ang. *constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance*

LA – aglutynacja lateksowa, ang. *latex agglutination*

LC – chromatografia cieczowa, ang. *liquid chromatography*

Lmb – białko wiążące lamininę, ang. *laminin binding protein*

LOD – zakażenie o późnym początku, ang. *late onset disease*

M – fenotyp oporność na makrolidy, ang. *M phenotype*

MALDI-ToF – desorpcja laserowa i jonizacja wspomagana matrycą i analizatorem czasu przelotu, ang. *matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MHC – główny układ zgodności tkankowej, ang. *major histocompatibility complex*

MtaR – regulator transportu metioniny, ang. *regulator of methionine transport*

NAAT – testy amplifikacji kwasu nukleinowego, ang. *nucleic acid amplification tests*

NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*

NBT – błękit nitrotetrazolowy, ang. *nitroblue tetrazolium*

PBP 1a – białko wiążące penicylinę, ang. *penicillin-binding protein*

PBST – sól fizjologiczna buforowana fosforanem z Tween 20, ang. *phosphate buffered saline with Tween 20*

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *polymerase chain reaction*

PG – grupa zabezpieczająca, ang. *protecting group*

PVDF – polifluorek winylidenu, ang. *polyvinylidene fluoride*

RNA – kwas rybonukleinowy, ang. *ribonucleic acid*

SASRIN – superwrażliwa na kwas żywica, ang. *super acid sensitive resin*

ScpA – peptydaza C5a dla *Streptococcus pyogenes*, ang. *streptococcal peptidase C5a (group A)*

ScpB – peptydaza C5a dla *Streptococcus agalactiae*, ang. *streptococcal peptidase C5a (group B)*

SDS – siarczan dodecyłu sodu, ang. *sodium dodecyl sulfate*

SLS – laurylosiarczan sodu, ang. *sodium laureth sulfate*

SodA – dysmutaza ponadtlenowa, ang. *superoxide dismutase*

SPPS – synteza peptydów w fazie stałej, ang. *solid-phase peptides synthesis*

SPS – synteza peptydów w roztworze, ang. *solution phase peptides synthesis*

Srr – białka powtórzeniowe bogate w serynę, ang. *serine-rich repeat protein*

ST – typ sekwencyjny, ang. *sequence type*

tBu/tBoc – grupa zabezpieczająca tert-butyloksykarbonylowa, ang. *tert-butyloxycarbonyl protecting group*

TBS-T – sól fizjologiczna buforowana Tris z Tween 20, ang. *tris buffered saline with Tween 20*

TFA – kwas trifluorooctowy, ang. *trifluoroacetic acid*

TSB – bulion tryptonowo-sojowy, ang. *tryptic soy agar*

UTI – zakażenie układu moczowego, ang. *urinary tracts infection*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia, ang. *World Health Organisation*

XMP – monofosforan ksantozyny, ang. *xanthosine monophosphate*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	5
1.1. Przesłanki do przeprowadzenia badań	12
1. 2. Rodzaj <i>Streptococcus</i>	12
1. 2. 1. Gatunek <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
1. 3. Nosicielstwo i chorobotwórczość <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
1. 3. 1. Zakażenia noworodków o wczesnym początku	15
1. 3. 2. Zakażenia noworodków o późnym początku.....	17
1. 3. 3. Okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa	17
1. 3. 4. Chorobotwórczość <i>Streptococcus agalactiae</i> w pozostałych grupach pacjentów	20
1. 4. Immunologia ciąży i noworodka – zagadnienia wybrane	21
1. 5. Czynniki wirulencji <i>Streptococcus agalactiae</i>	23
1. 6. Immunogenne białka <i>Streptococcus agalactiae</i>	27
1. 6. 1. Białka z rodziny Alp	27
1. 6. 2. Peptydaza C5a	30
1. 6. 3. Białko β	31
1. 6. 4. Białko Lmb	32
1. 6. 5. Białko Sip	32
1. 6. 6 .Białko BibA.....	33
1. 7. Metody identyfikacji bakterii z gatunku <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
1. 7. 1. Metody hodowlane	34
1. 7. 2. Metody molekularne	35
1. 7. 3. Metody serologiczne.....	36
1. 8. Synteza peptydów	42
1. 8. 1 .Synteza na żywicy metodą Fmoc	44
1. 8. 2 . Synteza na polietylenowych pinach metodą Pepscan	46

1. 9. Immunoprofilaktyka zakażeń	47
2. CEL PRACY	51
3. MATERIAŁY	52
3. 1. Grupa badana	54
4. METODY	58
4. 1. Izolacja immunogennych białek <i>Streptococcus agalactiae</i>	58
4. 2. Elektroforetyczny rozdział białek	58
4. 3. Immunoblotting	59
4. 4. Analiza bioinformatyczna	60
4. 5. Synteza peptydów na polietylenowych pinach metodą Pepsan	62
4. 6. Test immunoenzymatyczny do charakterystyki peptydów immobilizowanych na pinach	65
4. 7. Synteza peptydów na żywicy metodą Fmoc	66
4. 8. Desorpcja laserowa i jonizacja wspomagana matrycą i analizatorem czasu przelotu	68
4. 9. Biotynylacja peptydów	69
4. 10. Test immunoenzymatyczny z użyciem biotynylowanych peptydów syntetyzowanych na żywicy	70
4. 11. Analiza statystyczna	71
5. WYNIKI	73
5. 1. Wyniki detekcji immunogennych białek GBS przy zastosowaniu immunoblottingu	73
5. 2. Wyniki analizy bioinformatycznej	74

5. 3. Wyniki mapowania epitopów	95
5. 4. Modyfikacja peptydów poprzez skracanie	100
5. 5. Wyniki oceny specyficzności wybranych epitopów.....	108
5. 6. Modyfikacja peptydów poprzez podstawianie aminokwasów alaniną i/lub glicyną	109
5. 7. Wykorzystanie epitopów immunogennych białek GBS jako markerów zakażeń i/lub nosicielstwa w teście immunoenzymatycznym.....	110
5. 8. Porównanie reaktywności białka czynnik elongacji Tu i jego epitopów.....	113
6. DYSKUSJA.....	115
7. PODSUMOWANIE	123
8. WNIOSKI	125
9. STRESZCZENIE	126
10. SUMMARY	128
11. SPIS RYCIN	130
12. SPIS TABEL.....	134
13. BIBLIOGRAFIA.....	136
14. ZAŁĄCZNIKI	158

1. WSTĘP

1.1. Przesłanki do przeprowadzenia badań

Streptococcus agalactiae (ang. *group B streptococci*, GBS), będący oportunistycznym patogenem, kolonizującym drogi rodne i przewód pokarmowy kobiet ciężarnych, stanowi czynnik etiologiczny zakażeń na oddziałach neonatologicznych. Bakteria ta może w trakcie porodu przechodzić z matki na dziecko, wywołując u noworodka zagrażające życiu zakażenia, takie jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie płuc czy sepsa [155]. Nosicielstwo GBS wśród polskich ciężarnych kobiet wynosi około 30%, z kolei ryzyko transmisji patogenu w trakcie porodu osiąga aż 70% [195]. W celu zmniejszenia tego zjawiska amerykańska organizacja CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) w 1996 roku opracowała wytyczne, zgodnie z którymi kobiety między 35 a 37 tygodniem ciąży poddawane są badaniom przesiewowym w kierunku nosicielstwa GBS. W razie dodatniego wyniku posiewu wymazu pobranego z pochwy i odbytu wdrażana jest tzw. okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa (ang. *intrapartum antibiotics prophylaxis*, IAP), co z kolei przyczynia się do pogłębienia globalnego problemu, jakim jest rosnąca oporność bakterii na działanie antybiotyków [202]. W celu zminimalizowania tego niekorzystnego zjawiska naukowcy prowadzą liczne badania związane z opracowaniem alternatywnych metod walki z tym paciorkowcem, między innymi poprzez detekcję immunogennych białek i ich epitopów, które mogłyby stanowić komponent innowacyjnej podjednostkowej szczepionki przeciwko GBS.

1.2. Rodzaj *Streptococcus*

Rodzaj *Streptococcus* obejmuje kilkadziesiąt Gram-dodatnich względnie beztlenowych gatunków bakterii kolonizujących zarówno ludzi, jak i zwierzęta. Te niewielkie (0,5-1 μm) ziarenkowce noszą nazwę paciorkowców, z uwagi na charakterystyczny, liniowy sposób podziałów komórek, w wyniku których powstają struktury przypominające łańcuszki (paciorki). Paciorkowce chorobotwórcze, takie jak *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* czy *Streptococcus pneumoniae*, stanowią istotny czynnik etiologiczny zakażeń u człowieka, w tym m. in.: zakażenia

gardła, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, czy zapalenia płuc, a w skrajnych przypadkach mogą także doprowadzić do rozwoju sepsy.

Paciorkowce kolonizujące ludzi, w oparciu o filogenetyczne badania wykorzystujące analizy rRNA, kwalifikuje się do następujących grup:

- I) Paciorkowce ropotwórcze (ang. *pyogenic group*), a wśród niej gatunki *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* czy *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*,
- II) Grupa Bovis wraz z należącymi do niej gatunkami *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis* czy *S. pasterurianus*,
- III) Grupa Mitis, do której należą m.in. *S. mitis*, *S. pneumoniae* i *S. infantis*,
- IV) Grupa Mutans z gatunkami *S. mutans*, *S. sobrinus* i *S. rattii*,
- V) Grupa Salivarius zawierająca gatunki *S. salivarius* i *S. vestibularis*,
- VI) Grupa Anginosus obejmująca gatunki *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constelatus* subsp. *constelatus* czy *S. constelatus* subsp. *pharyngis* [183].

Paciorkowce kwalifikuje się również na podstawie sposobu, w jaki hemolizują erythrocyty na stałym podłożu agarowym wzbogaconym krwią. Na tej podstawie gatunki można podzielić na trzy grupy [Tabela 1]:

Tabela 1 Typy hemolizy występujące u paciorkowców obserwowane na agarowym podłożu z 5% dodatkiem krwi baraniej.

Typ hemolizy	Opis zmiany na płycie	Gatunek paciorkowca - przykład
α hemoliza	<ul style="list-style-type: none"> • częściowy rozpad erythrocytów • zazielenienie podłoża wokół wyhodowanych kolonii 	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
β hemoliza	<ul style="list-style-type: none"> • całkowity rozpad erythrocytów • przezroczyste podłoże wokół 	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>

	wyhodowanych kolonii	
γ hemoliza	<ul style="list-style-type: none"> • brak zmian na podłożu hodowlanym (brak hemolizy) 	<i>Streptococcus salivarius</i>

Paciorkowce β hemolizujące identyfikowane są na podstawie serologicznej metody opracowanej w latach trzydziestych XX wieku przez Profesora Rebecę Lancefield [110]. Sposób ten, wykorzystujący różnice w budowie otoczkowego wielocukru C (ang. *capsular polysaccharide*, CPS), pozwolił na wyodrębnienie ponad 20 grup serologicznych, z czego największe znaczenie kliniczne mają paciorkowce należące do grupy A, do której należy *S. pyogenes* oraz streptokoki z grupy B, obejmującej *S. agalactiae* [183].

1. 2. 1. Gatunek *Streptococcus agalactiae*

Paciorkowiec bezmleczności (łac. *Streptococcus agalactiae*) należy do Gram-dodatnich, β -hemolizujących ziarniaków. Według klasyfikacji Lancefield zaliczany jest do serologicznej grupy B, stąd też w literaturze występuje również pod skrótem GBS (ang. *group B streptococci*).

Streptococcus agalactiae jest oportunistycznym patogenem, stanowiącym fizjologiczną florę człowieka, który kolonizuje jamę ustną, drogi rodne oraz dolny odcinek przewodu pokarmowego. Bakteria ta stanowi jednak istotne zagrożenie przede wszystkim dla noworodków, wywołując zagrażające życiu zakażenia, ale także dla osób po 65 roku życia czy pacjentów z niedoborami odporności [45].

W latach trzydziestych XX wieku *Streptococcus agalactiae* traktowany był jako istotny problem weterynaryjny, ponieważ wywoływał zapalenie wymion u krów (łac. *mastitis*) [90]. Pierwszy śmiertelny przypadek zakażenia *Streptococcus agalactiae* u ludzi opisany został w 1938 roku przez Fry'ą [59], ale dopiero w latach sześćdziesiątych XX wieku odnotowano kilka poważnych zakażeń u noworodków [77]. Od lat siedemdziesiątych zachorowalność i śmiertelność z powodu GBS wśród niemowląt rosła i stanowiła istotny problem kliniczny zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i w Europie.

1. 3. Nosicielstwo i chorobotwórczość *Streptococcus agalactiae*

Nosicielstwo *Streptococcus agalactiae* wśród kobiet ciężarnych stanowi istotny czynnik ryzyka poważnych zakażeń u noworodków, które mogą ulec kolonizacji w czasie porodu [69, 78, 117]. Odsetek nosicielstwa wśród Europejek jest bardzo zróżnicowany, a kolonizacja może mieć charakter ciągły, przejściowy lub nawracający. W Grecji 6,6% populacji ciężarnych kobiet jest nosicielkami *S. agalactiae*, w Hiszpanii 7%, w Wielkiej Brytanii 14%, w Niemczech 16%, w Czechach 30%, a w Danii aż 36%. W Polsce, w zależności od regionu, zastosowanej metodyki diagnostycznej i wielkości badanej populacji, częstość ta waha się od 8% w Polsce centralnej i północnej do 27% w północno-zachodnim rejonie kraju [27]. W województwie małopolskim prawie co trzecia ciężarna kobieta (28%) jest nosicielką tego paciorkowca [26, 27].

Ryzyko kolonizacji noworodka przez *S. agalactiae* w następstwie wertykalnej transmisji w czasie porodu siłami natury wynosi aż 70%. Z kolei częstość zachorowań wśród niemowląt dotyczy 0,34-0,37 na 1000 żywo urodzonych dzieci [100, 202]. Zakażenia noworodków paciorkowcem bezmleczności mogą mieć wczesny (ang. *early-onset disease*, EOD) lub późny początek (ang. *late-onset disease*, LOD).

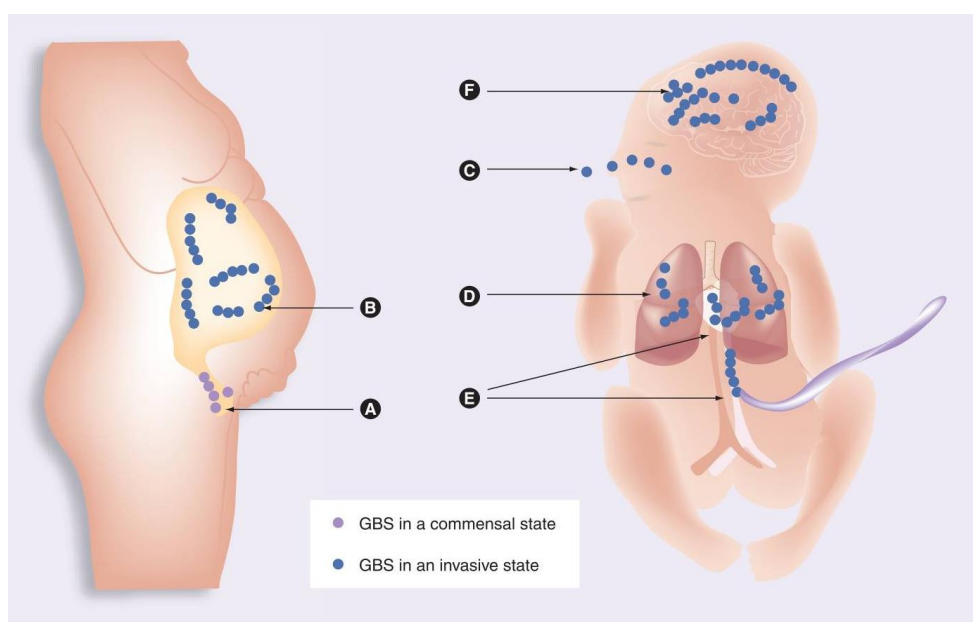
1. 3. 1. Zakażenia noworodków o wczesnym początku

Zakażenia o wczesnym początku (ang. *early-onset disease*, EOD), które występują w pierwszym tygodniu życia, objawiają się między innymi niewydolnością oddechową i przyjmują najczęściej postać sepsy i zapalenia płuc. Rzadziej prowadzą do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Pierwsze objawy, takie jak niewydolność oddechowa, bezdech czy początkowe symptomy sepsy, pojawiają się już w pierwszych 24-48 godzinach życia. Śmiertelność w przypadku wczesnych zakażeń utrzymuje się obecnie na poziomie 4-6%, podczas gdy w latach siedemdziesiątych umierało co drugie dziecko [7, 202]. Jak wynika z danych epidemiologicznych, przedwczesny poród dziesięciokrotnie zwiększa ryzyko śmierci noworodka (wskaźnik śmiertelności dla noworodków urodzonych przed 33 tygodniem ciąży wynosi 20-30%, podczas gdy dla dzieci urodzonych terminowo odsetek ten spada do 2-3%) [144, 163].

Do zakażeń o wczesnym początku dochodzi w trakcie transmisji wertykalnej, kiedy *Streptococcus agalactiae* przenosi się z pochwy do płynu owodniowego

podczasprzemieszczania się dziecka przez drogi rodne skolonizowanej matki, lub też w następstwie pęknięcia błon płodowych. Niemniej jednak, GBS może również zainfekować błony nieuszkodzone [202]. *Streptococcus agalactiae* po przedostaniu się do płuc płodu może wywołać sepsę, natomiast u niemowląt urodzonych siłami natury przez matki będące nosicielkami najczęściej dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego i dróg oddechowych, a dzieci pozostają zdrowe (Ryc. 1).

Wśród czynników ryzyka wystąpienia zakażenia o wczesnym początku należy wymienić między innymi: wiek ciążowy poniżej 37 tygodnia, pęknięcie błon płodowych utrzymujące się przez dłuższy okres (≥ 18 godzin) [140, 164], bakteriuria, zakażenie wewnątrzrodniowe, młody wiek matki, niski poziom przeciwciał anti-GBS ciężarnej, a także inwazyjne zakażenie *Streptococcus agalactiae* w poprzednich ciążach [202].



Ryc. 1. Kolejne etapy kolonizacji noworodka *S. agalactiae*. Legenda: A) GBS kolonizujący pochwy i/lub dolnego odcinka przewodu pokarmowego (flora fizjologiczna); B) bezobjawowa kolonizacja macicy ciężarnej (nosicielstwo GBS); C) transmisja paciorkowca do dróg oddechowych noworodka w macicy lub w trakcie porodu; D) zapalenie płuc wywołane przez GBS; E) sepsa i zapalenie wsierdza w następstwie przedostania się *Streptococcus agalactiae* do naczyń krwionośnych; F) zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych w następstwie pokonania przez *S. agalactiae* bariery krew-mózg [151].

1. 3. 2. Zakażenia noworodków o późnym początku

Zakażenia o późnym początku (ang. *late-onset disease*, LOD) mogą wystąpić od 7 dnia do 3 miesiąca życia, przyjmując najczęściej postać zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (łac. *meningitis*) i sepsy [42]. Patogeneza późnych zakażeń nie została tak dobrze poznana jak w przypadku zakażeń o wczesnym początku, a często źródło zakażenia u niemowlęcia jest niejasne. Drobnoustroj może przechodzić od matki na dziecko przez bezpośredni kontakt lub pochodzić ze środowiska szpitalnego [11].

1. 3. 3. Okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa

W związku z wysoką śmiertelnością niemowląt związaną z zakażeniami wywołanymi przez GBS, w 1996 roku Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ang. *American College Obstetricians and Gynecologists*, ACOG) wraz z Centrami Kontroli i Prewencji Chorób (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC), a rok później także Amerykańska Akademia Pedriatrii (ang. *American Academy of Pediatrics*, AAP) opracowały wytyczne, mające na celu zminimalizowanie tego niebezpiecznego zjawiska. Wytyczne CDC aktualizowano w roku 2002 [162], a następnie w 2010 roku do wersji, która obowiązuje do dziś [202]. Kraje Unii Europejskiej, podążając za przykładem Stanów Zjednoczonych, sukcesywnie zaczęły opracowywać własne rekomendacje, począwszy od Włoch w 1996 roku, przez Hiszpanię (1996 rok, aktualizacja w 2003 roku), Francję (2001 rok) i Niemcy (1996 rok, aktualizacja w 2008 roku). Belgia i Wielka Brytania opracowały swoje wytyczne w 2003 roku, Szwajcaria w 2007 roku, Czechy zaś w 2008 roku [155]. Polskie, obecnie obowiązujące rekomendacje opracowane zostały w 2008 roku przez zespół specjalistów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego [100].

Zgodnie z wytycznymi niniejszych rekomendacji, kobieta pomiędzy 35 a 37 tygodniem ciąży powinna zostać poddana przesiewowemu badaniu mikrobiologicznemu w kierunku obecności *Streptococcus agalactiae*. W tym celu pobierane są dwa wymazy przy użyciu dwóch jałowych wymazówek, jeden z przedsionka pochwy, drugi z odbytnicy, po pokonaniu oporu zwieracza odbytu. Pobrany materiał umieszcza się w osobnych namnażająco-różnicujących podłożach transportowych dedykowanych GBS, takich jak podłoże Stuarta czy Amies [202], i dostarcza do laboratorium mikrobiologicznego. Następnie, wymazówki usuwa się

z podłoża transportowego i inkubuje w płynnym wybiórczym podłożu hodowlanym, na przykład Todd-Hewitta z dodatkiem gentamycyny (8 µg/ml) i kwasu nalidyksowego (15 µg/ml) lub kolistyny (10 µg/ml) i kwasu nalidyksowego (15 µg/ml). Hodowla prowadzona jest przez 18-24 godzin w temperaturze 35-37°C, po czym materiał przesiewany jest na stałe podłoże agarowe z dodatkiem 5% krwi baraniej (Colombia agar).

Wstępna identyfikacja GBS obejmuje analizę materiału wyhodowanego na płycie opartą na poszukiwaniu kolonii z wąską strefą β-hemolizy. Czasami hemoliza jest trudna do zauważenia, dlatego kolonie o morfologii typowej dla *Streptococcus agalactiae* poddawane są dalszym testom, obejmującym m.in. test lateksowy, test CAMP, szeregi biochemiczne typu API, czy metody molekularne takie jak technika PCR.

Dodatkowo, w laboratorium wykonywane są także badania mające na celu zbadanie oporności wyizolowanych szczepów *Streptococcus agalactiae* na erytromycynę i klindamycynę wraz z określeniem fenotypu MLS_B przy zastosowaniu metody dyfuzyjno-krażkowej.

W razie stwierdzenia nosicielstwa GBS, określanego przy zastosowaniu metod hodowlanych [202], wdrażana jest okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa (ang. *intrapartum antibiotics prophylaxis*, IAP), która w trakcie porodu zalecana jest kobietom, u których wykazano nosicielstwo *S. agalactiae* lub tym ciężarnym, u których stwierdza się dodatkowe czynniki ryzyka zakażeń GBS, tj:

- Wynik posiewu bakteriologicznego był ujemny, ale w poprzednich ciążach ciężarnej doszło do okołoporodowego zakażenia GBS,
- Wynik posiewu bakteriologicznego pobranego z pochwy i odbytu był ujemny, ale we wcześniejszym etapie ciąży *S. agalactiae* wykryto w moczu,
- Wynik posiewu bakteriologicznego jest nieznany, lecz minęło ponad 18 godzin od pęknięcia błon płodowych,
- Wynik posiewu bakteriologicznego jest nieznany, ale temperatura ciała kobiety jest podwyższona ($\geq 38^{\circ}\text{C}$).

Zalecane jest wdrożenie antybiotykoterapii zaraz po przyjęciu pacjentki do szpitala. Algorytm postępowania ujmuje dożylnie podanie penicyliny G w pierwszej dawce 5 mln jednostek, a następnie, w czterogodzinnych odstępach podawanie 2,5 mln jednostek aż do zakończenia porodu. Alternatywnie podaje się ampicylinę w dożylniej dawce 2 g i, analogicznie, co cztery godziny 1 g leku [100].

Jeśli pacjentka deklaruje alergię na penicylinę, na którą, jak podają dane literaturowe, uczulonych może być aż 10% społeczeństwa [64], algorytm postępowania ulega zmianie i uwzględnia on, w przypadku szczepów niereprezentujących fenotypu *MLS_B*, dożylnie podanie erytromycyny w dawce 500 mg co 6 godzin lub klindamycyny w dożylniej dawce 900 mg co 8 godzin aż do zakończenia porodu. Jeśli natomiast wyizolowano szczep o fenotypie *MLS_B*, zaleca się podawanie co 12 godzin 1 g wankomycyny. W przypadku braku wiedzy dotyczącej fenotypu oporności szczepu wyizolowanego od pacjentki uczulonej na penicylinę podaje się cefalosporynę lub wankomycynę [100].

Z kolei dzieci urodzone przez kobiety będące nosicielkami, u których zastosowano okołoporodową profilaktykę antybiotykową, powinny zostać poddane obserwacji przez co najmniej dobę. W razie wystąpienia objawów zakażenia noworodek powinien zostać poddany pełnej diagnostyce w kierunku obecności *Streptococcus agalactiae*, obejmującej mikrobiologiczne badanie krwi, pełną morfologię z uwzględnieniem określenia liczby białych krwinek i płytek krwi oraz punkcji lędźwiowej w celu pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego. W razie wystąpienia zaburzeń oddechowych wykonuje się także badanie RTG [202]. Równocześnie zaleca się wdrożenie empirycznej terapii antybiotykowej, która może zostać zmodyfikowana na podstawie obserwacji stanu klinicznego noworodka lub wyników badań bakteriologicznych [202].

Jeśli u noworodka nie wystąpiły objawy zakażenia, lecz u matki doszło do zakażenia błon płodowych, zaleca się diagnostykę w kierunku GBS ograniczoną do bakteriologicznego badania krwi oraz pełnej morfologii wykonanej w ciągu 6-12 godzin od narodzin, z uwzględnieniem określenia liczby leukocytów i trombocytów oraz wdrożenie antybiotykoterapii. W razie gdy matka nie kwalifikowała się do wprowadzenia okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej, dziecko poddawane jest rutynowej obserwacji i, w razie wystąpienia objawów sepsy, wdrażana jest pełna

diagnostyka. Jeśli zaś matka na ≥ 4 godziny przed porodem otrzymała dożylnie odpowiedni antybiotyk, dziecko poddawane jest obserwacji na minimum 48 godzin, podobnie jak w przypadku pęknięcia błon płodowych po 37 tygodniu ciąży, trwającego poniżej 18 godzin. W razie pęknięcia błon płodowych przed 37 tygodniem ciąży, lub gdy od pęknięcia błon płodowych minęło ≥ 18 godzin, zalecane jest wdrożenie podstawowej diagnostyki i obserwacja dziecka przez co najmniej 18 godzin [3].

W związku z powszechnym stosowaniem antybiotyków, co wymuszane jest między innymi przez wytyczne okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej, w ostatnich latach odnotowuje się znaczny wzrost liczby szczepów opornych na działanie coraz większej liczby antybiotyków. To z kolei indukuje problemy terapeutyczne związane ze zmniejszającymi się zasobami leków przeciwbakteryjnych.

1. 3. 4. Chorobotwórczość *Streptococcus agalactiae* w pozostałych grupach pacjentów

W ostatnich latach zaczęto odnotowywać coraz częstsze przypadki zakażeń o etiologii *S. agalactiae* u dorosłych pacjentów. Problem ten szczególnie zauważalny jest w wysoko rozwiniętych i bogatych społeczeństwach, gdzie dane krajowych systemów monitorowania chorób zakaźnych we wszystkich grupach wiekowych są rzetelnie analizowane [13, 109, 131, 144, 173]. Na przykład w Stanach Zjednoczonych od roku 1999 do roku 2007 liczba przypadków zakażeń u dorosłych (mediana wieku 63 lata) wywołanych przez *S. agalactiae* wzrosła aż o 100% [173]. Zakażenia wywołane przez tego paciorkowca dotyczą najczęściej tkanek miękkich i skóry. Niemniej jednak, nierzadko odnotowuje się sepsę, zapalenia płuc, zakażenia kości i stawów, zakażenia układu moczowego, zapalenie opon mózgowo rdzeniowych czy też zapalenie wsierdzia [52].

Wśród kluczowych czynników ryzyka zakażeń wywołanych przez *Streptococcus agalactiae* u dorosłych najczęściej wymienia się cukrzycę (20% w Kanadzie, do $\geq 40\%$ w Stanach Zjednoczonych). Jednakże, zakażenia o etiologii GBS często współtowarzyszą takim chorobom jak: otyłość, choroby nerek, nowotwory, niewydolność serca, miażdżycowa choroba sercowo-naczyniowa czy niedobory odporności. Istotnym czynnikiem ryzyka jest także wiek. Dane z Europy, ze Stanów

Zjednoczonych oraz z Tajlandii wskazują, iż częstość zakażeń o etiologii *S. agalactiae* jest najwyższa w grupie wiekowej ≥ 65 lat [13, 16, 109, 173].

1. 4. Immunologia ciąży i noworodka – zagadnienia wybrane

Szczepionki podawane dzieciom w pierwszych miesiącach życia mogą zapewnić im ochronę przed poważnymi chorobami na wiele lat. Jednakże nabycie odporności poszczepiennej wymaga czasu, dlatego też przeciwciała przekazywane przez matkę w trakcie ciąży pełnią kluczową rolę w biernej ochronie noworodka przed zagrażającymi życiu chorobami. Warto zatem podkreślić, że szczepionki podawane matce zapewniają ochronę nie tylko jej, ale i noworodkowi [57].

Jak wynika z danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organisation*, WHO), prawie 2,4 miliona dzieci poniżej 5 roku życia zmarło z powodu chorób zakaźnych, z czego najbardziej narażone są noworodki [50]. W pierwszych miesiącach życia dziecka odporność zapewniają przeciwciała nabyte przezłożyskowo w czasie ciąży, a także te przekazywane z mlekiem matki w następstwie karmienia piersią [57].

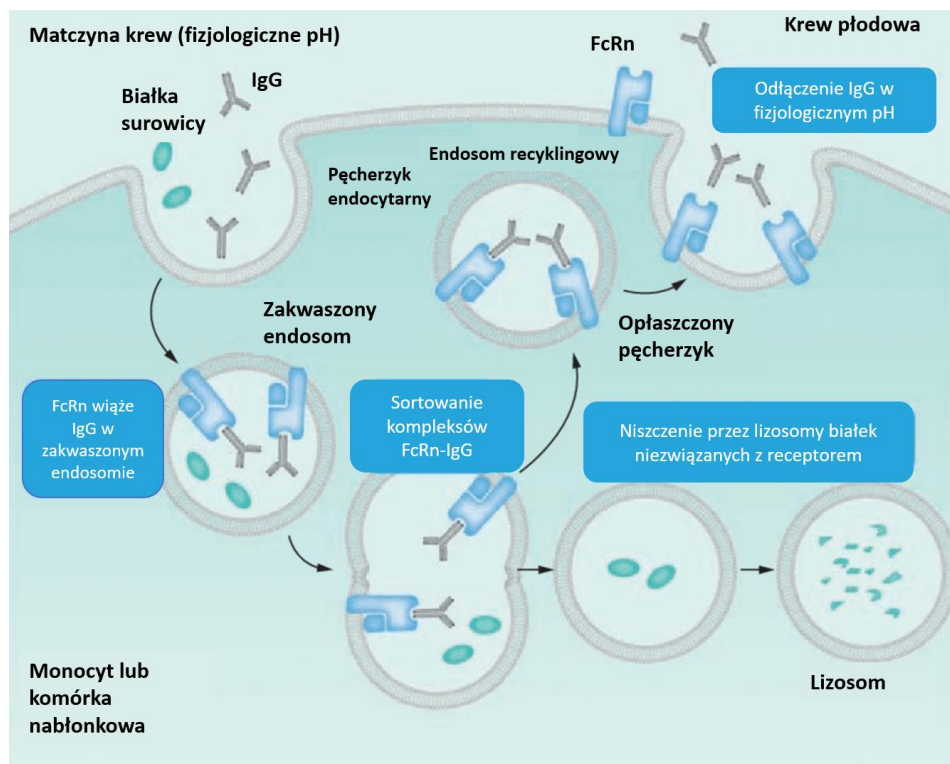
Jedyną klasą immunoglobulin zdolną do przejścia przez łożysko są przeciwciała IgG. Aby jednak dostać się do krwioobiegu płodu, muszą pokonać szereg barier anatomicznych, jakie stanowią warstwa syncytiotrofoblastów i warstwa cytotrofoblastów, następnie migrują przez kosmówkę, aby ostatecznie dotrzeć do światła naczyń śródbłonna krwionośnych [193]. Kluczową rolę w przezłożyskowym transferze przeciwciał IgG odgrywa noworodkowy receptor Fc (ang. *Fc neonatal receptor*, FcRn) [102, 144]. Receptor ten związany jest z głównym układem zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) klasy I, a wśród jego funkcji należy wymienić zachowanie homeostazy przeciwciał IgG oraz pokonywanie bariery, jaką stanowią spolaryzowane ściany komórek nabłonkowych [81, 156, 172]. Badania wykazują, że ekspresja receptora FcRn w komórkach syncytiotrofoblastarnych jest kluczowym czynnikiem wpływającym na przenoszenie przeciwciał IgG przez łożysko. FcRn znajdują się w cytozolu, gdzie w lekko kwasowym środowisku wiążą fragment Fc przeciwciał IgG. Matczyne IgG ulegają endocytozie do komórek syncytiotrofoblastycznych. W endosomach o obniżonym pH dochodzi do związania IgG przez receptory FcRn, które następnie przemieszczają się do błony podstawowej

komórki, gdzie w wyniku zmiany pH na neutralne IgG uwalniane są do światła kosmków łożyskowych. Niemniej jednak, dokładny mechanizm transportu IgG nie został jeszcze dokładnie poznany [113, 120, 156].

Przełożyskowy transfer matczynych przeciwciał IgG rozpoczyna się już w pierwszym trymestrze ciąży. Niewielkie stężenia IgG w krwi pępowinowej wykrywane już są między 8 a 10 tygodniem ciąży, podczas gdy największe stężenie osiągnięte jest w trzecim trymestrze ciąży, co może być związane z większym polem powierzchni wychwytu przeciwciał z krwi. Między 37 a 40 tygodniem ciąży stężenie matczynych przeciwciał w krwi pępowinowej może przewyższać ich stężenie we krwi matki, a stan ten może się utrzymywać aż do momentu porodu [49, 57, 92, 128, 171, 185]. Efektywność transferu przeciwciał przez łożysko jest zróżnicowana i uzależniona od tego, przeciwko jakiemu patogenowi są one skierowane, na przykład dla GBS wynosi ona 70% [8]. Ponadto, stężenie matczynych przeciwciał przenoszonych do krwi pępowinowej jest zależne od stanu zdrowia kobiety. Czynniki takie jak hipergammoglobulinemia, patologie łożyska, malaria, a także zakażenie np. wirusem HIV, skutkują znacznym obniżeniem liczby przekazywanych przeciwciał skierowanych przeciwko między innymi: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenza*, *Bordetella pertussis* czy wirusowi odry [1, 57].

Czas utrzymywania się matczynych przeciwciał we krwi noworodka jest różny, na przykład przeciwciała skierowane przeciwko krztuścowi nie są wykrywalne już u czteromiesięcznych niemowląt, podczas gdy immunoglobuliny IgG przeciwko odrze obecne są we krwi do roku. Przyczyny tych różnic nie zostały jednak jeszcze dokładnie poznane [138, 186, 201].

Schemat przełożyskowego przechodzenia matczynych przeciwciał ochronnych IgG na płód przedstawiono na Rycinie 2.



Ryc. 2. Schemat przełożyskowego transferu przeciwciał IgG. Źródło: Malek i wsp. [127] zmodyfikowane przez autora.

1. 5. Czynniki wirulencji *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, będący oportunistycznym patogenem, posiada szereg czynników wirulencji determinujących jego chorobotwórczość.

- **Otoczkowy polisacharyd C**

Jednym z najlepiej poznanych czynników wirulencji, będący jednocześnie ważną cechą diagnostyczną, jest otoczkowy, bogaty w kwas sjałowy, wielocukier C (ang. *capsular polysaccharide*, CPS). Umożliwia on adhezję do nabłonka, a także chroni komórki bakteryjne, zarówno przed szkodliwym działaniem środowiska, jak i układem immunologicznym gospodarza, poprzez między innymi maskowanie zewnątrzkomórkowych bakteryjnych determinant antygenowych [80], upodabnianie się (mimikrę) do antygenów gospodarza [70, 199] czy też interferencje z układem dopełniacza [33, 46, 93].

Na podstawie różnic w budowie tego polisacharydu wyodrębniono dziesięć serotypów: Ia, Ib, II-IX a ich dystrybucja w obrębie szczepów GBS uzależniona jest od

wielu czynników. Wśród nich można wymienić rodzaj zakażenia, wiek i rasę pacjenta a także szerokość geograficzną. W populacji europejskiej i północnoamerykańskiej dominują serotypy Ia, III i V, podczas gdy w Azji najczęściej izolowane są szczepy należące do serotypów VI i VIII [158]. W Polsce 70% szczepów GBS izolowanych od nosicieli i niemowląt reprezentuje serotypy Ia, III lub V [25]. Sepsa u niemowląt z zakażeniami o wczesnym początku wywoływana jest najczęściej przez szczepy o serotypach III (60%), V (22%) oraz Ia (10%). Z kolei zakażenia o późnym początku powodowane są przede wszystkim przez serotyp III. U dorosłych natomiast dominują serotypy V (42%) i III (25%). W związku z powyższym, serotyp III traktowany jest jako klinicznie istotny, ponieważ reprezentujące go szczepy dominują wśród zakażeń u noworodków – zarówno tych o wczesnym, jak i o późnym początku. Z kolei serotyp V związany jest z opornością na makrolidy [121, 143, 147].

- **Białka z rodziny Alp**

Do rodziny Alp zalicza się następujące białka: α C, Alp 1 (epsilon), Alp2, Alp3, Alp4 oraz Rib, które kodowane są przez geny: *bca*, *alp1*, *alp2*, *alp3*, *alp4*, i *rib*. Właściwości białek Alp określono na podstawie analizy sekwencji poszczególnych genów *alp*. Białka te składają się z głównej domeny, pełniącej funkcję peptydu sygnałowego, regionu N-końca, obszarów repetytywnych (ang. *repeat area*), charakteryzujących się licznymi tandemowo rozmieszczonymi powtórzeniami, oraz regionu C-końca [60, 104, 122, 124]. Ponadto, białka te są silnymi immunogenami. Sekwencje poszczególnych białek stanowiących rodzinę Alp wykazują wysokie podobieństwo sekwencji, co może prowadzić do krzyżowych reakcji pomiędzy nimi, a tym samym indukować odporność krzyżową. Jest to istotne szczególnie w kontekście potencjalnej szczepionki [178].

Te zakotwiczone, na powierzchni komórki, białka odgrywają istotną rolę w wirulencji *S. agalactiae* poprzez wspomaganie przylegania komórek bakteryjnych do komórek gospodarza. Z kolei białko α C pośredniczy w inwazji GBS komórek nabłonkowych szyjki macicy poprzez interakcję z glikozaminoglikanem obecnym w komórce gospodarza [12]. Jak podają dane literaturowe, mutacje wpływające na zmiany w strukturze glikozaminoglikanu skutkują zmniejszeniem udziału *S. agalactiae* w inwazji komórek nabłonkowych.

Jak wynika z licznych badań, których wyniki przedstawiono w dostępnej literaturze, istnieje zależność we współwystępowaniu poszczególnych serotypów i białek Alp. Białko Rib związane jest z serotypem III, białko epsilon z serotypem Ia, z kolei serotyp V najczęściej identyfikowany jest przy współobecności białka Alp3 [24, 35, 142].

Poza wielocukrem C i białkami z rodziny Alp istnieje szereg czynników wirulencji, z których wybrane opisano w Tabeli 2.

Tabela 2 Najważniejsze czynniki wirulencji *Streptococcus agalactiae* wraz z opisem sposobu ich patogenego działania [151].

Czynnik wirulencji	Sposób działania
Toksyny tworzące pory (ang. <i>pore-forming toxins</i>)	
β-hemolizyna/cytolizyna (β-h/c, CylE)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga inwazję komórek gospodarza i inicjuje ich lizę • Zaburza czynności serca i wątroby • Wywołuje reakcje zapalne i apoptozę komórek
CAMP factor (Cfb)	<ul style="list-style-type: none"> • Tworzy pory w ścianie komórkowej gospodarza • Wiąże się z białkami zakotwiczonymi w GPI
Otoczkowy polisacharyd C (CPS)	<ul style="list-style-type: none"> • Zapobiega rozpoznawaniu bakterii poprzez molekularne naśladowanie powierzchniowych glikokoniugatów występujących na powierzchni komórki gospodarza • Maskuje prozapalne komponenty ściany komórkowej
Dysmutaza nadtlenkowa (SodA)	<ul style="list-style-type: none"> • Odpowiada za neutralizację toksycznego dla bakterii nadtlenu i tlenu singletowego
Pigment (ramnopolienowy)	<ul style="list-style-type: none"> • Odpowiada za neutralizację toksycznego dla bakterii nadtlenu i tlenu singletowego
Peptydaza C5a (ScpB)	<ul style="list-style-type: none"> • Zapobiega rekrutacji neutrofilów w wyniku rozszczepienia dopełniacza C5a • Wspomaga adhezję w wyniku wiązania się z fibronektyną macierzy zewnątrzkomórkowej
Proteaza serynowa (CspA)	<ul style="list-style-type: none"> • Rozszczepia fibronektynę i chemokiny • Zaburza rekrutację neutrofilów i fagocytozę bakterii
Oporność na ampicylinę	
Alanylowanie kwasu lipoteichowego	<ul style="list-style-type: none"> • Zmniejsza ujemny ładunek na powierzchni komórki, odpycha AMP

Białko 1a wiążące penicyliny (PBP1a)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga oporność na ampicyliny poprzez nieznaną mechanizm
Pili	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga oporność na ampicyliny poprzez nieznaną mechanizm • Wspomaga adhezję bakterii do komórki gospodarza
Adherencja do komórek gospodarza i inwazja	
Białko A wiążące fibronektynę (FbsA)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga adhezję bakterii do komórek gospodarza poprzez wiązanie się do fibronektyny macierzy zewnątrzkomórkowej
Białko B wiążące fibronektynę (FbsB)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga przedostawanie się bakterii do wnętrza komórki gospodarza
Białko wiążące lamininę (Lmb)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga adhezję bakterii do komórek gospodarza poprzez wiązanie się do lamininy macierzy zewnątrzkomórkowej
Białka powtórzeniowe bogate w serynę (Srr)	<ul style="list-style-type: none"> • Srr 1 – wspomaga adhezję bakterii do ludzkiej keratyny i komórek nabłonka (HEp2) • Srr 2 – zwiększa zjadliwość <i>S. agalactiae</i>
Immunogenna adhezyna bakteryjna (BibA)	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga adhezję bakterii do komórek gospodarza i wiąże regulatorowe białko dopełniacza
Białko α C	<ul style="list-style-type: none"> • Wspomaga adhezję bakterii do komórek nabłonka
Gen związany z inwazją (<i>IagA</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Odgrywa ważną rolę w pokonywaniu bariery krew-mózg w wyniku błonowego kotwiczenia kwasu lipoteichowego
Inne czynniki zjadliwości	
Liaza hialuronianu	<ul style="list-style-type: none"> • Rozszczepia hialuron i sprzyja ekspansji GBS w trakcie zakażenia
Regulator transportu metioniny (MtaR)	<ul style="list-style-type: none"> • Odgrywa istotną rolę przy pobieraniu i transporcie metioniny

Legenda: GPI – glikolipid glikozylofosfatydyloinozytol odpowiadający za potranslacyjną modyfikację białek; AMP – ampicyliny.

1. 6. Immunogenne białka *Streptococcus agalactiae*

1. 6. 1. Białka z rodziny Alp

Jak wspomniano we wcześniejszym rozdziale, te chimeryczne lecz stabilne białka należące do rodziny Alp, poza tym, że wymieniane wśród czynników wirulencji, opisywane są w literaturze w aspekcie ich immunogenności.

Alpha C (α C) jest białkiem o masie 103 kDa, które kodowane jest przez gen *bca*. Składa się ono z dziewięciu 82-aminokwasowych powtórzeń tandemowych oraz motywu LPXTG (Leu-Pro-dowolny aminokwas-Thr-Gly) [104, 122, 189]. Ponadto, charakteryzuje się ono odpornością na działanie trypsyny, co wykorzystywane jest w ich identyfikacji wśród szczepów GBS [122]. Jak podaje literatura, alpha C najczęściej współwystępuje z serotypami Ia, Ib, II, bardzo rzadko z serotypem V, natomiast nigdy nie jest identyfikowane wśród izolatów reprezentujących serotyp III [122]. α C uczestniczy w patogenezie GBS, co potwierdzają badania prowadzone na mysim modelu, w których wykazano, że delecja genu kodującego to białko przyczyniła się do obniżenia wirulencji GBS u tych zwierząt [118]. Mechanizm patogenyzy, jak zostało wspomniane w poprzednim rozdziale, opiera się na jego oddziaływaniu z glikozaminoglikanem, stanowiącym element komórki gospodarza, i wnika do cytolozu komórek eukaryotycznych poprzez aktynozależny mechanizm. To z kolei umożliwia bakterii pokonanie bariery, jaką stanowią komórki nabłonkowe, i w rezultacie doprowadzić do zakażenia [12]. Poza swoją rolę odgrywaną w patogenezie Alpha C wykazuje także właściwości immunogenne. Co więcej, zostało ono opisane jako pierwsze białko GBS wykazujące swój antygenowy charakter. α , wraz z białkiem β , kodowanym przez gen *bac*, tworzy tak zwany antygen c, który wykryty został w obecności surowicy przeciwko całej komórce bakteryjnej [72, 171]. Już w 1985 roku dwójka badaczy, Bevanger i Naess, udowodniła, że oczyszczone białko α wyizolowane z paciorkowcowej komórki wywołuje odpowiedź immunologiczną i chroni myszy przed infekcjami wywołanymi przez GBS [15]. Ich wyniki potwierdzone zostały sześć lat później w toku badań prowadzonych na białku rekombinowanym [134], jak również w licznych późniejszych pracach [104, 106, 118].

Kolejnym powierzchniowym białkiem z rodziny Alp, znanym ze swojej immunogennej funkcji, jest białko Rib. Jest ono podobne do α C, a ich podobieństwa

wykazane zostały w następstwie porównania ze sobą tych dwóch, oczyszczonych, białek oraz w wyniku analizy ich N-końcowych sekwencji. Ponadto, podobnie jak białko Alpha C, Rib wykorzystane zostało jako wzorzec do markera wielkości prążków w metodzie Western blot. Dodatkowo, obydwa białka odporne są na działanie trypsyny. Co ciekawe, nie wykazują one reakcji krzyżowych pomiędzy sobą. Rib jest dużym białkiem powierzchniowym związanym przede wszystkim z serotypem III, ale także możliwym do identyfikacji wśród izolatów należących do serotypu II i V [180]. Białko Rib składa się z dwunastu 79-aminokwasowych powtórzeń tandemowych, motywu LPXTG oraz 174-aminokwasowej sekwencji na N-końcu (Ryc. 3). Sekwencje repetytywne białka Rib i Alpha C są identyczne na poziomie nukleotydów. Natomiast na poziomie aminokwasów podobieństwo w rejonie powtórzeń tandemowych wynosi 47%, zaś w rejonie N-końca aż 61%, co wskazuje na ich wysoką powtarzalność sekwencji. Ponadto, białko Rib przez wzgląd na swoją immunogenność rozpatrywane jest przez naukowców jako dobry kandydat na składnik szczepionki przeciwko zakażeniom wywołanym przez GBS [135, 194]. Badania nad białkową szczepionką składającą się z N-końcowych domen białek Rib i Alpha C (GBS-NN) dotarły do pierwszej fazy badań klinicznych [71].

Do rodziny białek Alp należy również białko Alp3, występujące w literaturze także pod nazwą R28. W przeciwieństwie do dwóch powyżej opisanych członków rodziny Alp, jest to niewielkie białko o masie cząsteczkowej rzędu 68 kDa [190]. Składa się ono, podobnie jak większość powierzchniowych białek bakterii Gram-dodatnich, z regionu C-końcowego z motywem LPXTG, obszaru tandemowego oraz fragmentu nierepetytywnego N-końca z 56 aminokwasową sekwencją sygnałową (Ryc. 3) [179]. Po raz pierwszy Alp3 zidentyfikowano dla szczepu należącego do gatunku *Streptococcus pyogenes* [111], jednakże, najprawdopodobniej w wyniku horyzontalnego transferu genów, gen *alp3*, kodujący to białko, został włączony do proteomu *Streptococcus agalactiae*, a białka te są w 98% takie same [179]. Zastosowanie odpowiednich technik molekularnych umożliwiło określenie przynależności tego białka do rodziny Alp. Wykazano, że region repetytywny jest w 95% identyczny z białkiem Rib. Z kolei konserwatywny region na N-końcu jest dwukrotnie dłuższy niż w przypadku Rib i Alpha C [111]. Białko Alp3 najczęściej identyfikowane jest w izolatach *Streptococcus agalactiae* należących do serotypów V i VIII, a białka produkowane przez te szczepy, poza liczbą sekwencji repetytywnych, są

identyczne [5, 99, 104, 105]. Alp3, podobnie jak pozostałe białka Alp, jest jednym z czynników wirulencji, wykazującym powinowactwo do komórek szyjki macicy. W przypadku infekcji o etiologii *S. pyogenes* jest ono wiązane z wywoływaniem śmiertelnych gorączek połogowych [179]. Ponadto, Alp3 jest także silnym immunogenem wykazującym reaktywność krzyżową zarówno wobec białka Rib, jak i R28 *S. pyogenes*, co wynika z ich dużego podobieństwa [178, 179]. Eksperymenty oparte na immunizacji myszy białkiem Alp3 dały obiecujące wyniki, a tym samym pozwoliły na rozpatrywanie go w kontekście komponentu szczepionki [125, 179, 206].

Białkiem będącym w 2/3 identycznym z Alp3 jest białko Alp2. Nie występuje ono tak powszechnie jak pozostałe białka należące do rodziny Alp i związane jest najczęściej z serotypami Ia, III i V [63, 99, 104]. Cechą wyróżniającą Alp2 na tle innych białek Alp jest fakt posiadania przez nie dwóch typów powtórzeń tandemowych. Pierwszy z nich odpowiada nierepetytywnemu odcinkowi białka R28, wspólnemu z białkiem β i składa się z jednego lub dwóch powtórzeń [63, 104, 179]. Natomiast drugi typ tandemowych powtórzeń ulokowany jest w odcinku C-końcowym i przypomina powtórzenia charakterystyczne dla pozostałych białek z rodziny Alp, które w zależności od szczepu *Streptococcus agalactiae* występują w liczbie od 2 do 4 powtórzeń [63, 104]. Dodatkowo, region C-końcowy podobny jest do fragmentów repetytywnych typowych dla białka Alpha C, a to wskazuje na większą złożoność budowy Alp2 w porównaniu z pozostałymi przedstawicielami tej rodziny [179]. Białko to charakteryzuje się także immunogennością i, co ciekawe, nie wykazuje krzyżowych reakcji z Rib pomimo ich dużego podobieństwa [106].

Najsłabiej poznanym przedstawicielem rodziny Alp jest białko epsilon (Alp1), które przez wiele lat uznawane było za immunologicznie identyczne jak Alpha C. W 2004 roku, w wyniku sekwencjonowania wykazano, że Alp1 jest wariantem mozaiki białka α C [103]. W związku z dużym podobieństwem tych białek, a co za tym idzie, częstym występowaniem reakcji krzyżowych pomiędzy nimi, długo uważano, że białko Alpha C dominuje wśród szczepów reprezentujących serotyp Ia [122], podczas gdy to właśnie epsilon związany jest z tym serotypem. Co jest jednak najistotniejsze, Alp1 wykazuje właściwości immunogenne, co kwalifikuje je jako kolejny potencjalny składnik szczepionki przeciwko zakażeniom GBS [103].

1. 6. 2. Peptydaza C5a

Paciorkowcowa peptydaza C5a jest enzymatycznym białkiem powierzchniowym, należącym do proteaz serynowych, które odpowiada za inaktywację jednego ze składników ludzkiego dopełniacza, produktu rozpadu konwertazy C5, C5a [95, 196]. Uważa się, że wirulencja tego białka jest wynikiem zakłócenia rekrutacji neutrofilów, co w rezultacie prowadzi do zmniejszenia reakcji zapalnej wywoływanej w zakażanej tkance [75, 157]. Peptydaza C5a po raz pierwszy opisana została dla gatunku *Streptococcus pyogenes*, jednak dalsze badania wykazały obecność tego enzymu także u szczepów *Streptococcus agalactiae*. Analiza sekwencji obydwu białek wykazała ich aż 95% podobieństwo, co jest następstwem horyzontalnego transferu genów pomiędzy oboma gatunkami. Dlatego też, w celu ich rozróżnienia, stosowane jest następujące nazewnictwo: peptydaza C5a dla gatunku *Streptococcus pyogenes*, należącego do serologicznej grupy A, nosi nazwę ScpA, podczas gdy analogicznie dla *Streptococcus agalactiae* reprezentatywnego dla grupy B, białko to opisywane jest jako ScpB [19, 20, 31, 177, 196, 197]. Co ciekawe, gen *scpB* występuje w wszystkich „ludzkich” szczepach GBS, podczas gdy w puli szczepów pochodzących od krów obejmuje jedynie pojedyncze przypadki [39, 58]. Ponadto, proteazy otoczek komórkowych związanych z ScpB, charakteryzujące się wielodomenową strukturą, są wspólne także dla bakterii kwasu mlekowego [54, 169]. Rola peptydazy C5a w patogenezie została już dobrze opisana, co jest jednak warte podkreślenia, to fakt, że w przeciwieństwie do znanych skutków wywoływanych u ludzi, zjawisko hamowania rekrutacji neutrofilów w wyniku działania enzymu ScpB przez mysie C5a nie występowało. Ta nieoczywista obserwacja powinna zostać uwzględniona w doborze odpowiedniego modelu do badań nad szczepionką przeciwko GBS, której komponentem będzie peptydaza C5a [18, 21, 122]. Dodatkową funkcją peptydazy C5a jest wiązanie fibrynogenu, co może wspomagać adhezję bakterii do komórek nabłonkowych i śródbłonkowych [62, 122]. Jednakże, badania prowadzone na zmutowanych komórkach bakteryjnych pozbawionych ScpB wykazywały tylko częściowe obniżenie zdolności wiązania fibrynogenu w porównaniu z niezmutowanymi szczepami. Może to wynikać z faktu, że paciorkowce grupy B posiadają inne białka wykazujące zdolność wiązania fibrynogenu [184]. Ponadto, podobnie jak ScpA, ScpB wykazuje także silne właściwości immunogenne. Z uwagi na konserwatywność tego białka oraz jego lokalizację na powierzchni komórki bakteryjnej jest ono uważane za

dobrego kandydata do szczepionki. Co więcej, ze względu na duże sekwencyjne podobieństwo pomiędzy ScpA i ScpB szczepionka taka mogłaby jednocześnie chronić przed zakażeniami wywołanymi przez *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus agalactiae* [84]. Prace badawcze wykorzystujące hiperimmunizowaną surowicę króliczą wskazywały aktywność opsonizacyjną z mysimi makrofagami oraz pełną krwią ludzką [29]. Z kolei myszy immunizowane oczyszczonym białkiem ScpB, które następnie drogą przenosową zakażane były szczepami *Streptococcus agalactiae*, wykazywały wyższy klirens bakterii z płuc [30]. Sugeruje się także, że przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi ScpB mogą chronić przed zakażeniami poprzez zaburzanie wiązania fibrynogenu [29].

1. 6. 3. Białko β

Białko B, w literaturze występujące również pod nazwą białko β , jak już wcześniej wspomniano, wspólnie z białkiem α C należącym do rodziny Alp, stanowią elementy antygeny C. Białka te, mimo iż kodowane są przez geny zlokalizowane blisko siebie na chromosomie, nie są blisko spokrewnione [38, 104]. Ponadto, białko B wykazuje homologię z białkiem Alp3 [179]. Analiza sekwencji białka β wykazała, że składa się ono z 37-aminokwasowej sekwencji sygnałowej oraz kotwiczącego motywu LPXTG stanowiącego fragment odcinka C. Dodatkowo, na C-końcu znajduje się bogaty w prolinę unikatowy region XPZ, który różni się długością pomiędzy poszczególnymi szczepami [4]. Cechą wyróżniającą to białko na tle większości powierzchniowych białek reprezentatywnych dla Gram-dodatnich ziarniaków jest brak długich repetytywnych sekwencji tandemowych [14]. Ponadto białko β , w przeciwieństwie do Alpha C, jest wrażliwe na działanie trypsyny. Związane jest przede wszystkim z serotypem Ib, niemniej jednak, identyfikowane jest również na powierzchni izolatów *Streptococcus agalactiae* reprezentujących serotypy Ia, II i V [5, 99, 180, 182]. Co ciekawe, białko B często współwystępuje z białkiem A, podczas gdy A nierzadko występuje pojedynczo [122]. Mimo iż wirulencyjny charakter tego białka nie został jeszcze dokładnie opisany, hipotetyzuje się, że, ze względu na jego zdolność wiązania elementów ludzkiego układu odpornościowego, może być on także związany z wirulencją [137]. Ponadto, białko β wykazuje powinowactwo do dwóch składników ludzkiego układu immunologicznego: fragmentu Fc przeciwciał IgA oraz czynnika H regulującego alternatywną drogę aktywacji układu dopełniacza, przez co jego działanie

kierowane jest przeciwko zakażającemu patogenowi, a nie ludzkim komórkom czy tkankom. Fakt ten może sugerować istotną rolę tego białka w wywoływaniu odporności [122, 205]. W literaturze dostępne są dane wskazujące białko β jako dobrego kandydata na szczepionkę przeciwko GBS. W eksperymencie opartym na aktywnej immunizacji białkiem β ciężarnych myszy wykazano, że u osesków po kontakcie ze szczepami GBS posiadającymi białko β nie rozwinęła się infekcja [124]. Ponadto, wykazano, że przeciwciała anti- β klasy IgG mogą przechodzić przez łożysko, co może wskazywać na możliwość przekazania odporności z matki na dziecko, a tym samym zapewniać ochronę przed zakażeniem wywołanym przez GBS [56].

1. 6. 4. Białko Lmb

Białko wiążące lamininę (ang. *laminin-binding protein*, Lmb) jest, eksponowaną na powierzchni komórki większości szczepów *Streptococcus agalactiae*, lipoproteiną, uczestniczącą w kolonizacji i inwazji uszkodzonych komórek nabłonkowych [176]. Analiza sekwencji tego białka wyizolowanego z GBS wykazała bardzo bliskie pokrewieństwo z Lmb *Streptococcus pyogenes*, nie tylko pomiędzy gatunkami, ale i szczepami w obrębie danego gatunku [47, 176]. Z kolei gen *lmb* znajduje się na tym samym krótkim chromosomalnym odcinku co gen *scp*, kodujący peptydazę C5a. Mimo to, nie wykazują one homologii, co może świadczyć o fakcie przeniesienia tego fragmentu chromosomu obejmującego obydwie geny w wyniku horyzontalnego transferu genów [47, 58]. Ponadto, ze względu na swoją konserwatywność oraz lokalizację w obrębie komórki bakteryjnej, wykazuje potencjał immunogeny i może być rozpatrywane jako potencjalny element szczepionki [86, 191].

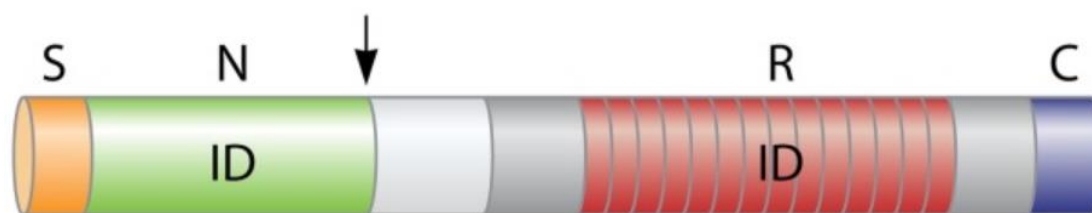
1. 6. 5. Białko Sip

Powierzchniowe immunogenne białko Sip (ang. *Surface immunogenic protein*) jest niewielką cząsteczką o masie ok. 45 kDa, która zidentyfikowana została w następstwie analizy immunologicznej biblioteki genomowej [22]. Białko to, reprezentowane przez każdy z dziewięciu serotypów, cechuje się wysoką konserwatywnością [22, 153]. Jego sekwencja składa się z 25-aminokwasowego peptydu sygnałowego znajdującego się na N-końcu białka. W odróżnieniu od pozostałych opisywanych w tym rozdziale protein, Sip nie posiada kotwiczącego motywu LPXTG [22]. Sip jest białkiem eksponowanym na powierzchni komórki,

jednak jego mechanizm kotwiczenia nie jest znany. Co prawda, jego rola nie została poznana, jednak przez wzgląd na swoją konserwatywność Sip rozpatrywane jest jako dobry kandydat w kontekście szczepionki [22, 130, 153].

1. 6. 6. Białko BibA

BibA jest immunogeniczną adhezyną bakteryjną charakterystyczną dla paciorkowców grupy B (ang. *group B Streptococcus immunogenic bacterial adhesin*), wykazującą antyfazocytarne właściwości. Strukturalnie białko składa się z N-końcowej domeny bogatej w liczne α -helisy, z regionu bogatego w prolinę oraz motywu LPXTG. BibA specyficznie wiąże się z jednym z regulatorów szlaku ludzkiego dopełniacza – białkiem wiążącym C4. Jak wynika z badań, delecja genu *bibA* przyczynia się do znacznego zmniejszenia przeżywalności *Streptococcus agalactiae* w ludzkiej krwi, jak również zmniejsza zdolność ochrony komórek bakteryjnych przez opsofagocytozę. Jak sama nazwa białka wskazuje, posiada ono zdolność adhezji do ludzkich komórek nabłonkowych szyjki macicy oraz płuc,. Zostało to udowodnione w badaniach opartych na zmutowanych szczepach z knockout'em genu *bibA*. Ponadto, ekspresja białka BibA przyczynia się do wzrostu wirulencji. BibA jest też silnym immunogenem, a przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko temu białku wykryto w surowicy ludzkiej pochodzącej od zdrowych osób [160]. Ze względu na konserwatywność białka BibA oraz jego immunogenność, naukowcy hipotetyzują, że podobnie jak opisane powyżej białka może być ono rozważane jako czynnik immunizujący, mogący chronić przed chorobami wywołanymi przez GBS.



Ryc. 3. Schemat budowy białek z rodziny Alp z uwzględnieniem jego poszczególnych odcinków. Legenda: S – cząsteczka sygnałowa, N – N-koniec białka, R – region repetytywny, C – C-koniec białka, ID – regiony immunodominujące, Strzałka – koniec N-końcowego regionu przejściowego w białkach Alp2 i Alp3 [125].

1. 7. Metody identyfikacji bakterii z gatunku *Streptococcus agalactiae*

1. 7. 1. Metody hodowlane

Podstawową i najbardziej klasyczną metodą stosowaną w identyfikacji *Streptococcus agalactiae* jest hodowla materiału, najczęściej zebranego w formie wymazu. Hodowlę prowadzi się nie tylko w celu bezpośredniego rozpoznania patogenu na podłożu, ale także, aby namnożyć materiał do dalszych, bardziej szczegółowych analiz, opierających się na metodach molekularnych czy spektrometrycznych.

Najbardziej podstawowym podłożem hodowlanym stosowanym w diagnostyce GBS są podłoża agarowe Colombia agar z dodatkiem krwi baraniej, jednakże, jak podają dane literaturowe, nawet 50% uzyskanych wyników badań przesiewowych ciężarnych kobiet w kierunku nosicielstwa GBS jest fałszywie ujemnych. Dlatego też, CDC zaleca stosowanie wzbogaconego podłoża Todd-Hewitta z dodatkiem antybiotyków w dwóch wariantach: (I) gentamycyny w stężeniu 8 µg/ml z kwasem nalidyksowym w stężeniu 15 µg/ml lub (II) lub kolistyny w stężeniu 10 µg/ml z kwasem nalidyksowym w stężeniu 15 µg/ml [53]. Niektóre dostępne na rynku podłoża przeznaczone do hodowli GBS nie zawierają w swoim składzie krwi, która przyczynia się do zwiększenia odzysku bakterii w badanym materiale, a tym samym minimalizuje ryzyko uzyskania fałszywie ujemnych wyników [202].

Do identyfikacji *S. agalactiae* stosowane są także wybiórczo-różnicujące podłoża wzbogacone w chromogenne substraty, które w wyniku reakcji biochemicznych specyficznie barwią kolonie paciorkowców β-hemolizujących (Ryc. 4).



Ryc. 4. Podłoże chromogenne chromID® Strepto B do hodowli i identyfikacji *Streptococcus agalactiae*. Źródło: www.biomerieux.pl

1. 7. 2. Metody molekularne

W ostatnich latach coraz większą popularnością w diagnostyce mikrobiologicznej cieszą się metody molekularne. Znajdują one zastosowanie nie tylko w identyfikacji gatunku, ale również pozwalają na charakterystykę profilu oporności oraz na badanie obecności poszczególnych czynników wirulencji.

Najbardziej klasyczną metodą stosowaną w badaniach molekularnych jest reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), która polega na tworzeniu wielu kopii fragmentu DNA, kodującego dany gen. Odcinek nici DNA determinowany jest przez parę starterów (primerów), a dzięki obecności polimerazy i mieszaniny nukleotydów: adeniny, guaniny, tyminy oraz cytozyny tworzona jest komplementarna do matrycy nić. Etapy denaturacji nici, hybrydyzacji starterów i elongacji powtarzają się cyklicznie – w rezultacie powstaje wiele par kopii badanego fragmentu genu. Przy 40 cyklach można uzyskać nawet 2^{40} produktu reakcji amplifikacji.

Następnie amplikon, czyli produkt reakcji PCR, pod wpływem działania napięcia elektrycznego, poddawany jest rozdzielowi elektroforetycznemu na żelu

agarozowym. Dodatek np. bromku etydyny do żelu pozwala na uwidocznienie prążków wyeksponowanych na działanie promieni UV, a tym samym umożliwia interpretację uzyskanych wyników.

W diagnostyce nosicielstwa i zakażeń GBS u kobiet ciężarnych także wykorzystuje się metody molekularne. CDC w swoich wytycznych z 2010 roku dopuszcza wykorzystywanie testów amplifikacji kwasu nukleinowego (ang. *nucleic acid amplification tests*, NAAT), jednak zwraca uwagę na ich różną i niezbyt wysoką czułość (62,5%-98,5%) czy specyficzność (64,5%-99,6%), wynikającą z bezpośredniego wykonania badania z pominięciem hodowli na wzbogaconym podłożu. Preinkubacja na wzbogaconym podłożu znacznie podnosi czułość późniejszej amplifikacji [17, 66, 202]. Wydłuża to wprawdzie czas całej procedury diagnostycznej, lecz dzięki temu uzyskiwany wynik jest bardziej wiarygodny.

1. 7. 3. Metody serologiczne

Alternatywą dla powyższych metod są techniki serologiczne. Opierają się one na zdolności do tworzenia specyficznych kompleksów pomiędzy przeciwciałami i antygenami. Ze względu na badany analit, metody serologiczne dzieli się na:

- 1) **Bezpośrednie**, dzięki którym przy użyciu zdefiniowanych i wysoce specyficznych przeciwciał identyfikuje się antygeny obecne w badanym materiale biologicznym. Zastosowanie tych metod jest zasadne szczególnie na początku zakażenia, kiedy stężenie antygenów w ustroju jest wysokie, a tym samym ryzyko uzyskania fałszywie ujemnego wyniku jest stosunkowo niskie.
- 2) **Pośrednie**, które poprzez zastosowanie znanych antygenów pozwalają na detekcję przeciwciał obecnych przede wszystkim we krwi, ale również występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym. Przeciwciała te rozpoznawane są przez znakowane drugorzędowe przeciwciała. W związku z tym, że przeciwciała pojawiają się w późniejszych etapach zakażenia, metody pośrednie wykorzystywane są dopiero po kilku dniach, a nawet tygodniach, od momentu zakażenia.

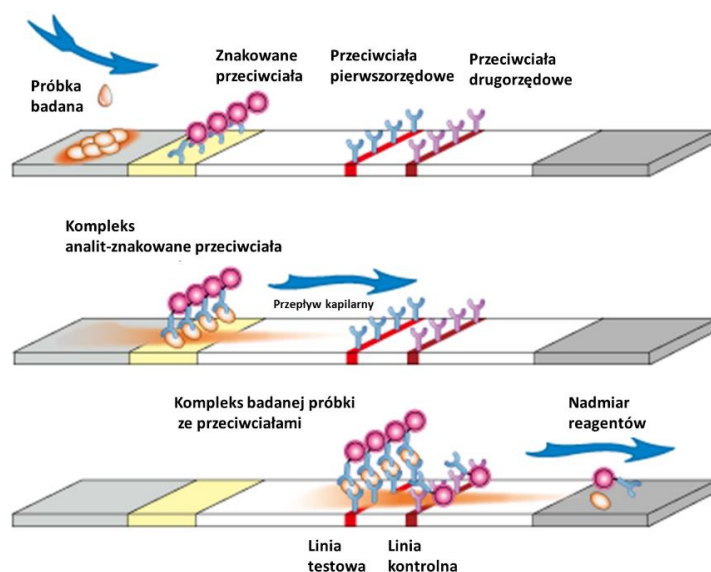
Wśród najczęściej stosowanych metod serologicznych wymienia się przede wszystkim:

- a) **Western blot (immunoblotting)** – jest to metoda służąca do wykrywania zarówno białek (antygenów), jak i przeciwciał. Procedura wykrywania białek składa się z czterech etapów:
- I) Izolacji białek, w trakcie której uwalniane są one z komórek, a następnie oczyszczane.
 - II) Elektroforezy na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem detergentu siarczanu dodecyłu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*, SDS, syn. *sodium lauryl sulfate*, SLS), mającego na celu nadanie ładunku cząsteczce białka, maskującego tym samym jej własny ładunek. Dzięki temu, homogenat białek komórkowych pod wpływem napięcia elektrycznego rozdziela się według mas cząsteczkowych poszczególnych protein.
 - III) Elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na nitrocelulozową lub poliwinylową (ang. *polyvinylidene fluoride*, PVDF) membranę w następstwie działania napięcia elektrycznego. Po zakończonym transferze sprawdza się jego wydajność, barwiąc membranę odpowiednim barwnikiem, na przykład kwasowym roztworem Ponceau S. Jest to reakcja odwracalna.
 - IV) Immunodetekcji, która poprzedzona jest blokowaniem wolnych miejsc wiążących na membranie. W tym celu stosuje się roztwory kazeiny, albuminy bydlęcej, żelatyny, a czasami samego detergentu Tween-20. Sam proces immunodetekcji polega na inkubacji białek immobilizowanych na membranie z przeciwciałami. Jeśli badane są białka, wykorzystuje się znane, znakowane, na przykład enzymatycznie, przeciwciała. Z kolei detekcja przeciwciał prowadzona jest przy zastosowaniu zdefiniowanych białek, specyficznie rozpoznawanych przez badane przeciwciała (przeciwciała pierwszorzędowe), do których przyłączają się drugorzędowe przeciwciała skoniugowane najczęściej z enzymami. Znakowanie przeciwciał, peroksydazą chrzanową lub alkaliczną fosfatazą, pozwala na stwierdzenie zajścia reakcji, a tym

samym na potwierdzenie lub wykluczenie obecności danych białek czy przeciwciał [148].

Western blot w komercyjnych testach diagnostycznych wykorzystywany jest również do wykrywania przeciwciał. W tej odmianie zdefiniowane, immobilizowane na membranie antygeny reprezentatywne dla danego patogenu inkubuje się z badaną surowicą. Jeśli w badanej próbce znajdują się przeciwciała, zwiążą się one z antygenami na membranie, a dodanie w kolejnym etapie przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z odpowiednim wskaźnikiem pozwoli na zwizualizowanie reakcji, a tym samym potwierdzi lub wykluczy zakażenie/nosicielstwo [148].

- b) Testy immunochromatograficzne** cieszą się coraz większą popularnością w diagnostyce, ponieważ w krótkim czasie dostarczają informacji z gotowym wynikiem. Ponadto, są proste w przeprowadzeniu, dlatego też mogą zostać wykonane nie tylko przez lekarza czy towarzyszący personel medyczny, ale również samodzielnie przez pacjenta. Najbardziej znanym testem tego rodzaju jest kasetkowy test ciąży, który pozwala na wykrywanie obecności ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (ang. *human chorionic gonadotropin*, hCG) w moczu lub w ślinie. Technologia tej metody oparta jest na przemieszczaniu się znakowanego analitu przez membranę opłaszczoną przeciwciałami. Po umieszczeniu na teście próbki badanej, antygeny łączą się ze specyficznymi przeciwciałami, znakowanymi na przykład koloidalnym złotem, i w wyniku działania sił kapilarnych przemieszczają się po membranie. Jeśli w badanej próbce znajdują się antygeny rozpoznawane przez przytwierdzone do fazy stałej przeciwciała pierwszorzędowe (linia testowa), powstaje trwały barwny kompleks. Niezwiązane z analitem znakowane przeciwciała wiążą się z przeciwciałami drugorzędowymi (linia kontrolna), również tworząc barwny kompleks, co tym samym potwierdza poprawne przeprowadzenie testu (brak paska na linii kontrolnej świadczy o błędnie wykonanym teście). Nadmiar reagentów (kompleks antygen-przeciwciało znakowane, przeciwciała znakowane bez antygeny) przemieszcza się do końca membrany (Ryc. 5) Za pomocą niniejszej metody można wykrywać zarówno antygeny, jak i przeciwciała.



Ryc. 5. Schemat działania testu immunochromatograficznego do wykrywania antygenów. Źródło: <http://imagesmy.com> zmodyfikowane przez autora.

c) **Testy immunofluorescencyjne (IF)**, podobnie jak wyżej opisane metody, pozwalają na wykrywanie zarówno przeciwciał, jak i antygenów, przy zastosowaniu przeciwciał pierwszo- lub drugorzędowych znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Efekt utworzenia się kompleksu, a tym samym uzyskanie potwierdzenia wyniku dodatniego, można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

d) **Testy immunoenzymatyczne (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA)**, są szeroko znanymi w diagnostyce testami, pozwalającymi na detekcję zarówno antygenów (np. białek), jak i przeciwciał. W najbardziej klasycznej odmianie tego testu metoda działania oparta jest na wiązaniu przeciwciał znajdujących się w badanej surowicy z immobilizowanymi w fazie stałej antygenami. Efekt wizualizowany jest poprzez reakcję odpowiedniego substratu z enzymem skoniugowanym z przeciwciałami. Fazę stałą stanowią dołki 96-dołkowej płytki polistyrenowej, która dzięki odpowiedniej modyfikacji przystosowana jest do tworzenia niekowalencyjnych wiązań z różnymi cząsteczkami. Efektem reakcji jest barwny roztwór, którego gęstość optyczna, wyrażana jako absorbancja, jest proporcjonalna do stężenia badanego analitu. Bezsporną zaletą testów ELISA jest to, że dają one możliwość rozróżnienia klas przeciwciał, przede wszystkim IgG od IgM, co jest niezwykle istotne

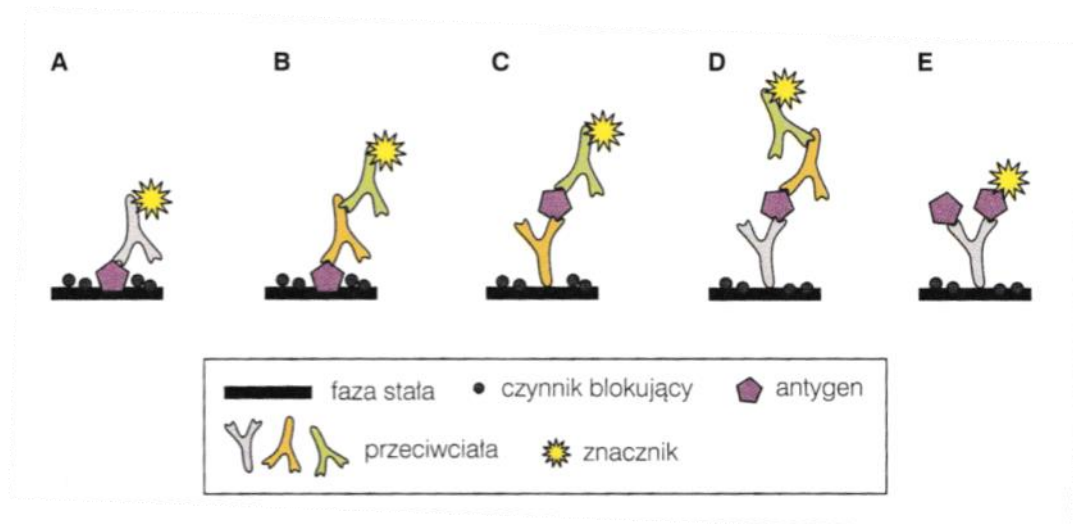
w przypadku diagnostyki na przykład toksoplazmozy czy różyczki u ciężarnych kobiet. Test ELISA dostępny jest w kilku odmianach:

- I. Test ELISA bezpośredni (ang. *direct ELISA*)** – jest najprostszą odmianą testów immunoenzymatycznych. Wykorzystuje się go do oznaczania stężenia białka w badanej próbce biologicznej. Jego mechanizm polega na przyłączaniu się znakowanych enzymatycznie przeciwciał do białek, które immobilizowane są uprzednio do fazy stałej (Ryc. 6A). Istotnym ograniczeniem tej metody jest jej niska czułość i specyficzność – w sytuacji, gdy w badanej próbce znajduje się mieszanina kilku białek, istnieje duże ryzyko uzyskania fałszywych wyników w następstwie zachodzenia reakcji krzyżowych.
- II. Test ELISA pośredni** – jest najbardziej powszechną odmianą testu ELISA (Ryc. 6B). Przy jej zastosowaniu można wykrywać zarówno przeciwciała, jak i antygeny. System detekcyjny w wykrywaniu antygenów stanowią dwa przeciwciała (pierwszorzędowe i drugorzędowe skoniugowane ze znacznikiem). Z kolei do wykrywania przeciwciał w badanej próbce stosuje się specyficzne, zdefiniowane i przytwierdzone do płytki antygeny oraz przeciwciała detekcyjne sprzężone z odpowiednim znacznikiem. Metoda ta jest zdecydowanie bardziej czuła w porównaniu z bezpośrednim testem ELISA.
- III. ELISA kanapkowa (ang. *sandwich ELISA*)** – czyli test podwójnego wiązania, co oznacza, że antygen wiązany jest przez dwa rodzaje przeciwciał: wychwytyjące i detekcyjne, które rozpoznają różne jego determinanty. Dzięki temu, czułość reakcji jest znacznie wyższa niż w przypadku testu bezpośredniego. Do specyficznego i zdefiniowanego przeciwciała wychwytyjącego, które przytwierdzone jest do fazy stałej (dołka płytki), przyłącza się badany antygen. Następnie, do powstałego kompleksu dołącza się kolejne przeciwciało – detekcyjne, znakowane odpowiednim enzymem (Ryc. 6C). Czasami, w celu jeszcze większego podniesienia czułości, stosuje się przeciwciała detekcyjne pozbawione znacznika, a ten skoniugowany jest z drugorzędowymi przeciwciałami,

które w kolejnym etapie wiążą się specyficznym z przeciwciałami pierwszorzędowymi (detekcyjnymi) (Ryc. 6D).

IV. Konkurencyjny test ELISA (syn. kompetywny test ELISA, ang. *competitive ELISA*, cELISA) – w tej odmianie testu można wykrywać zarówno przeciwciała, jak i antygeny. Jeżeli detekcja obejmuje przeciwciała, to fazę stałą stanowią specyficzne antygeny, natomiast czynnikiem detekcyjnym jest badana surowica zawierająca przeciwciała oraz roztwór przeciwciał znakowanych, które rywalizują o miejsce wiązania na antygenie. Z kolei w teście dedykowanym antygenom przeciwciało immobilizowane jest do fazy stałej, podczas gdy badany antygen konkuruje o miejsce wiążące przeciwciała ze znakowanym antygenem (Ryc. 6E). W kompetywnym teście ELISA, w przeciwieństwie do wymienionych powyżej metod, stężenie badanej próbki jest odwrotnie proporcjonalne do zmierzonej absorbancji [148].

e) **Odczyn lateksowy (syn. test aglutynacji lateksowej; ang. *latex agglutination*, LA)**, stosowany jest do oznaczania antygenów w badanej próbce. W metodzie tej wykorzystywane są kuleczki lateksowe opłaszczane monoklonalnymi przeciwciałami, specyficznymi rozpoznającymi badany antygen. Gdy przeciwciała rozpoznają antygen, tworzą się widoczne gołym okiem agregaty. Test ten wykorzystywany jest również w identyfikacji paciorkowców na podstawie ich grupy serologicznej [204].



Ryc. 6. Typy testów ELISA. Legenda: **A)** Test bezpośredni; **B)** Test pośredni; **C)** Test „kanapkowy” do detekcji antygenów przez dwa rodzaje przeciwciał (znakowanych detekcyjnych i wychwytyjących; **D)** Test „kanapkowy” wykrywający antygeny przez trzy rodzaje przeciwciała (wychwytyjące, detekcyjne, znakowane przeciwciała drugorzędowe); **E)** Kompetytywny test ELISA [148].

W diagnostyce nosicielstwa GBS dominują metody hodowlane, ponieważ charakteryzują się one wysoką czułością. Niemniej jednak, ich istotnym ograniczeniem jest długi czas oczekiwania na wyniki (ponad 48 godzin), co stanowi istotny problem, szczególnie w przypadku przedwczesnych porodów (przed 35-37 tygodniem ciąży), gdy wyniki badań przesiewowych są nieznane. Dlatego też, naukowcy prowadzą są liczne badania dążące do opracowania szybkiego, czułego i wysoce specyficznego testu diagnostycznego do identyfikacji zakażeń i nosicielstwa GBS. Obecnie najlepiej prognozującą alternatywą dla metod hodowlanych są testy immunoenzymatyczne, w których markery stanowią immunogenne białka bakteryjne i/lub ich epitopy. Wśród ich zalet należy wymienić krótszy czas oczekiwania na wyniki, łatwość w interpretacji oraz możliwość rozróżnienia trwającego zakażenia od nosicielstwa.

1. 8. Synteza peptydów

Dokładna charakterystyka immunogennych białek bakteryjnych, mogących znaleźć zastosowanie w wakcynologii lub jako markery zakażeń w innowacyjnych testach immunodiagnostycznych, wymaga zidentyfikowania i scharakteryzowania

wysoce specyficznych determinant antygenowych, czyli krótkich sekwencji aminokwasowych rozpoznawanych przez przeciwciała ochronne.

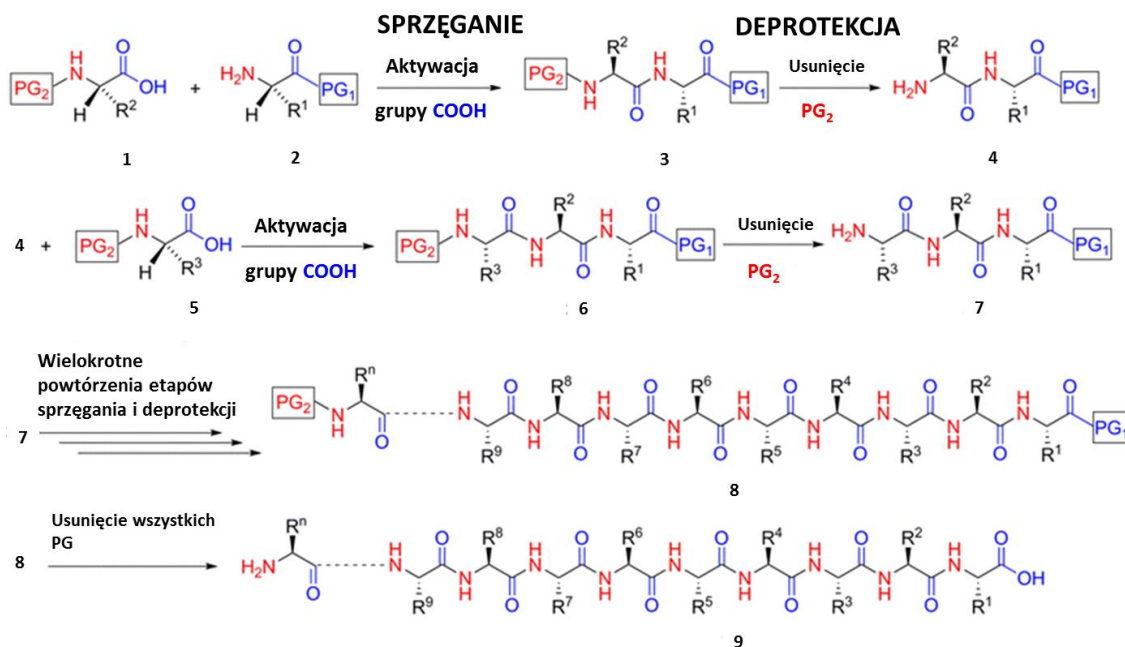
W tym celu wybrane białko poddawane jest analizie bioinformatycznej, która, wykorzystując odpowiednie narzędzia analityczne, pozwala na wytypowanie w obrębie białka najbardziej prawdopodobnych epitopów wiążących.

Zarówno białka, jak i peptydy, można uzyskać na drodze technik rekombinacji DNA, izolacji z ich naturalnego środowiska, chemicznej syntezy lub kombinacji tych metod [67, 94].

W naturze występuje dwadzieścia aminokwasów, które stanowią podstawowy element peptydów i białek. Chemiczną syntezę peptydów można prowadzić w dwojaki sposób. Pierwsza metoda opiera się na fazie stałej, drugi sposób wykorzystuje syntezę w roztworze. Niemniej jednak, obie metody opierają się na tych samych podstawowych zasadach [82]. Kluczowa różnica dotyczy natury grupy zabezpieczającej (ang. *protecting group*, PG) grupę karboksylową pierwszego aminokwasu. Jeśli grupę zabezpieczającą stanowi nierozpuszczalna żywica, metoda nosi nazwę syntezy peptydów w fazie stałej (ang. *solid phase peptides synthesis*, SPPS). Analogicznie, gdy grupa zabezpieczająca rozpuszczona jest w roztworze reakcyjnym, metoda definiowana jest jako synteza peptydów w roztworze (ang. *solution phase peptide synthesis*, SPS) [187]. Schemat chemicznej syntezy przedstawiono na Rycinie 7.

Pierwsze próby chemicznej syntezy podjęte zostały w 1982 roku przez Theodora Curtiusa, który jako pierwszy zsyntetyzował N-zabezpieczony dipeptyd, w wyniku reakcji soli srebra glicyny z chlorkiem benzoilu [36]. Dziewiętnaście lat później, w 1901 roku, Emil Fisher i Ernest Fourneau, w wyniku hydrolizy diketopiperazyny glicyny, stworzyli pierwszy tripeptyd [55], a rok później, na 14 spotkaniu niemieckich naukowców i lekarzy w Karlsbadzie, Fisher po raz pierwszy wprowadził termin 'peptyd' [65, 94, 181]. Pierwsza synteza peptydów w fazie stałej, którą stanowiła nitropolistyrenowa żywica chlorometylowana [133], przeprowadzona została w 1963 roku przez Roberta Bruce'a Merrifielda, za co z resztą prawie dwadzieścia lat później otrzymał nagrodę Nobla [82]. Kolejnym przełomem w historii syntezy peptydów było wprowadzenie w 1970 przez Hana i Carpino grupy 9-fluorenylometoksykarbonylowej (Fmoc) jako nowej labilnej zabezpieczającej grupy amin [28], która dzięki swojej

ortogonalności wobec wielu grup zabezpieczających przyczyniła się do upowszechnienia strategii syntezy Fmoc/tBu. Podejście to jest obecnie najczęściej wykorzystywane w syntezie w fazie stałej.



Ryc. 7. Schemat chemicznej syntezy peptydów. Legenda: (1) aminokwas z zabezpieczoną grupą aminową (N-końiec); (2) aminokwas z zabezpieczoną grupą karboksylową (C-końiec); (3) zabezpieczony dipeptyd powstały poprzez sprzęganie; (4) dipeptyd z usuniętą grupą zabezpieczającą na N-końcu (PG₂); (5) kolejny aminokwas z grupą zabezpieczającą na N-końcu; (6) zabezpieczony tripeptyd powstały poprzez sprzęganie dipeptydu i aminokwasu, który po deprotekcji, czyli reakcji usunięcia grup zabezpieczających; (7) tripeptyd pozbawiony grupy zabezpieczającej (PG₂); (8) pożądaný peptyd z zabezpieczonymi grupami; (9) pożądaný peptyd z usuniętymi grupami zabezpieczającymi Źródło: Jaradat i wsp. [82] zmodyfikowane przez autora.

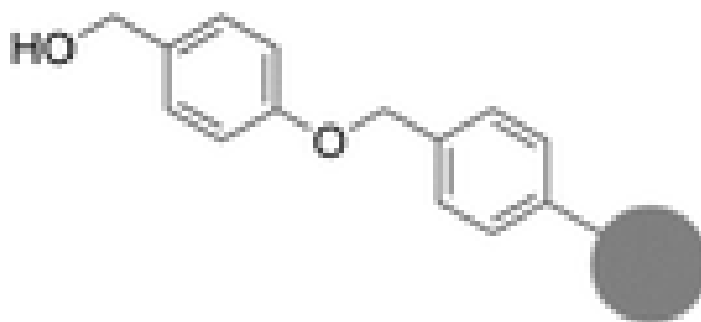
1. 8. 1. Synteza na żywicy metodą Fmoc

Synteza na nośniku stałym (STTS) prowadzona od C-końca do N-końca jest szeroko stosowaną techniką w chemii i biochemii. Proces może być prowadzony automatycznie w syntetyzatorze peptydowym lub manualnie, choć przy mniejszej wydajności. Automatyzacja procesu pozwala na wyprodukowanie oligopeptydów, a nawet niewielkich białek. Metoda ta wymaga jednak przytwierdzenia pierwszego aminokwasu poprzez grupę karboksylową do stałego nośnika, czyli żywicy.

W strategii Fmoc najczęściej wykorzystywaną żywicą jest żywica Wanga (Ryc. 8). Niemniej jednak, w literaturze wymieniane są także, między innymi, żywica SASRIN (ang. *super acid sensitive resin*), żywica HMBA (ang. *4-Hydroxymethyl-benzoylaminomethyl resin*), żywica HMPA (ang. *2-(4-Hydroxymethyl-phenoxy)-acetylaminomethyl resin*), żywica HAL (ang. *hypersensitive acid-labile resin*) czy żywica fenylohydrazynowa.

Kiedy pierwszy aminokwas przyłączy się do żywicy, kolejne aminokwasy, w sposób zaprezentowany na Rycinie 7, są dobudowywane, a łańcuch peptydów wydłuża się od C-końca do N-końca, aż do momentu uzyskania pożądanego produktu. Po zakończeniu procesu gotowy peptyd odłączany jest od żywicy poprzez dodanie wysoko stężonego kwasu trifluorooctowego (TFA), a następnie analizowany przy zastosowaniu na przykład metod chromatografii mas [6].

Strategia syntezy SPPS od N-końca, wymagająca związania się aminokwasu z żywicą poprzez grupę aminową jest także stosowana w biochemii. Po raz pierwszy opisana została w latach sześćdziesiątych przez Roberta Lewisa Letsingera [115, 116] i często występuje pod nazwą odwrotnej syntezy w fazie stałej (ang. *reverse/inverse solid phase peptide synthesis*) [82]. Niemniej jednak, nie cieszy się ona taką popularnością jak synteza od C-końca, co może wynikać z jej ograniczeń, wśród których wymienia się przede wszystkim potencjalne ryzyko racemizacji, czyli tworzenia się enancjomerów oraz możliwość powstania diketopiperazyny na każdym z etapów reakcji [76].



Ryc. 8. Schemat chemicznej struktury żywicy Wanga [82].

1. 8. 2. Synteza na polietylenowych pinach metodą Pepsan

Inną odmianą syntezy peptydów związanych z fazą stałą jest metoda Pepsan (ang. *multiple peptides synthesis*) opracowana przez Mario Geysena w 1984 roku [61]. Od metod opisanych powyżej różni się ona przede wszystkim tym, że peptydy syntetyzowane są na polietylenowych pinach, do których są one permanentnie przytwierdzone (Ryc. 9). Technika ta znajduje swoje zastosowanie szczególnie w mapowaniu epitopów w obrębie limfocytów B, na przykład w teście ELISA [136]. Początkowo metoda pozwalała na syntetyzowanie krótkich, poniżej dziesięcioaminokwasowych peptydów, obecnie można generować produkty składające się nawet z 20 cząsteczek [200].

Technika Pepsan umożliwia jednoczesną syntezę wielu krótkich peptydów jednocześnie, co nie tylko redukuje koszty, ale także pozwala zaoszczędzić czas. Ponadto, przeprowadzenie procedury syntezy nie wymaga kosztownego sprzętu (syntetyzatorów), który niezbędny jest w pozostałych metodach, a opiera się jedynie na aparaturze dostępnej w większości laboratoriów.

Synteza od kilku do kilkudziesięciu peptydów jednocześnie prowadzona jest na pinach umieszczonych w osobnych dołkach płytki 96-dołkowej. W celu uniknięcia polimeryzacji i reakcji ubocznych w reakcji wykorzystuje się aminokwasy z zabezpieczonymi grupami bocznymi, przy czym przed każdym sprzęganiem należy odbezpieczyć aminową grupę funkcyjną, aby umożliwić przyłączenie się kolejnych aminokwasów. Najczęściej grupę zabezpieczającą stanowi Fmoc (ang. *9-fluorenylmethyloxycarbonyl protecting group*) oraz *t*-Boc (ang. *t-butoxycarbonyl*) [154].



Ryc. 9. Polietylenowe piny stosowane do syntezy peptydów metodą Pepsan przytwierdzone do płytki.

1. 9. Immunoprofilaktyka zakażeń

W związku z rosnącym w ostatnich dekadach globalnym problemem, jakim jest oporność bakterii na antybiotyki, przed naukowcami stoi ogromne wyzwanie: opracowanie alternatywnej metody walki z GBS, na skutek której odsetek nosicielstwa i zakażeń o etiologii tego paciorkowca zostanie zredukowany albo wręcz zostaną one wyeliminowane. Szansy na skuteczną walkę z GBS upatruje się w rozwoju innowacyjnych szczepionek składających się z immunogennych białek lub peptydów (epitopów) bakteryjnych.

Pierwsza szczepionka opracowana została w 1798 roku przez Edwarda Jennera, który zauważył, że wirus krowianki posiada zdolność eradykacji ospy u ludzi [83, 124]. Od tamtej pory opracowano wiele szczepionek, dzięki którym zmniejszyła się częstość występowania epidemii, które w przeszłości dziesiątkowały populacje na całym świecie. Obowiązek szczepień narzucony przez Ministerstwa Zdrowia w wielu krajach przyczynił się do znacznego spadku częstości występowania takich chorób jak: błonica, tężec, polio, odra, świnka czy różyczka. Szacuje się, że spadek ten w Stanach Zjednoczonych i Europie Zachodniej wynosi nawet 99% [68, 175].

Wśród rodzajów szczepionek wymienia się między innymi:

- Szczepionki polisacharydowe składające się z immunogennych wielocukrów,
- Szczepionki atenuowane składające się z całych komórek bakteryjnych pozbawionych zjadliwości,
- Szczepionek peptydowych składających się z immunogennych białek,
- Szczepionek podjednostkowych (peptydowych) składających się z samych determinant antygenowych.

Pierwsze badania nad polisacharydową szczepionką przeciwko GBS podjęte zostały już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku [9], kiedy to Baker i Kasper wykazali, że stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko serotypowi III jest dużo niższe u matek, u których dzieci wystąpiło zakażenie o wczesnym bądź późnym początku w porównaniu do kobiet, których dzieci urodziły się zdrowe. Badania te doszły do pierwszej fazy badań klinicznych, jednakże w toku dalszych prac nie potwierdzono ich wysokiej immunogenności. Jest to istotne ograniczenie szczepionek polisacharydowych. Dodatkowo, szczepionki polisacharydowe charakteryzują się serotypową zależnością, a co za tym idzie, nie są uniwersalne.

Rozwiązanie dla niniejszych ograniczeń mogłaby stanowić szczepionka peptydowa składająca się z immunogennych białek GBS. Komponenty białkowe takiej szczepionki powinny charakteryzować się wysoką specyficznością i konserwatywnością [139]. Dlatego też, naukowcy na całym świecie prowadzą liczne badania mające na celu identyfikację immunogennych białek *S. agalactiae* wraz z ich epitopami, które mogłyby stanowić komponent rekombinowanej podjednostkowej szczepionki przeciwko temu patogenowi.

Wprowadzenie okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej wśród kobiet ciężarnych przyczyniło się wprawdzie do obniżenia częstości zakażeń perinatalnych, ale nie wyeliminowało całkowicie tego zjawiska. Ma to znaczenie szczególnie w kontekście zakażeń o późnym początku [139]. Ponadto, powszechne stosowanie antybiotyków skutkuje pogłębianiem się ogólnoswiatowego problemu, jakim jest sukcesywny wzrost oporności bakterii na działanie leków, co w rezultacie prowadzi do

obniżenia skuteczności prowadzonej terapii. Dodatkowo, nie rozwiązuje to problemu w krajach rozwijających się. Wynika to przede wszystkim z utrudnionego dostępu ciężarnych do przesiewowych badań w kierunku nosicielstwa GBS, ograniczonego dostępu do antybiotyków, a także wysokiego odsetka kobiet rodzących w domu [13].

Istotną rolę w wakcynologii odegrał w ostatnich dekadach rozwój technik molekularnych, a także dokładne poznanie genomu bakteryjnego. Przyczyniło się to do rozwoju tak zwanej wakcynologii opartej na genomie (ang. *genome-based vaccinology*), która umożliwiła identyfikację potencjalnych kandydatów do białkowej szczepionki przeciwko GBS. W oparciu o niniejszą metodologię wytypowano konserwatywne sekwencje kodujące elementy powierzchniowych białek pili. Zidentyfikowane geny znajdują się na dwóch wyspach, a ich rolą jest kodowanie motywu LPXTG, białka szkieletowego (ang. *backbone protein*, BP), czyli głównej podjednostki pili, białek pomocniczych AP1 i AP2 (ang. *ancillary protein*, AP) oraz synteza genów sortazy odpowiadającej za budowanie pili. W toku badań prowadzonych na modelu mysim obserwowano, że BP i AP1 wykazują zdolność inicjowania syntezy przeciwciał, które w wyniku aktywnej immunizacji matki chronią jej potomstwo przed zakażeniami GBS [96, 129]. Badania nad białkami pili znajdują się obecnie na tak zaawansowanym poziomie, że weszły do fazy badań przedklinicznych [71].

Badania nad szczepionką składającą się z połączonych konserwatywnych i chimerycznych białek Alfa C i Rib należących do rodziny Alp (GBS-NN) dotarły do pierwszej fazy badań klinicznych, a co za tym idzie, rozpatrywane są jako poważni kandydaci do potencjalnej szczepionki [122]. Szczepionka ta, z uwagi na dużą częstość występowania tych dwóch białek w populacji może indukować ochronę przed 95% izolatów GBS [96]. Wśród pozostałych opisywanych w literaturze immunogennych białek GBS, jako potencjalnych kandydatów do szczepionki, można wymienić: adhezynę BibA, białko wiążące fibrynogen FsbA, immunogenne białko powierzchniowe Sip, białko wiążące lamininę Lmb, peptydazę C5a [37, 44, 86, 151, 161, 166]. Ponadto, w wyniku badań prowadzonych przez Katedrę Mikrobiologii UJ CM we współpracy naukowej z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu zidentyfikowano cztery immunogenne białka GBS, a wśród nich enolazę (47,4 kDa), dehydrogenazę aldehydową (50,6 kDa) oraz dwa nieopisywane wcześniej w kontekście immunogenności *Streptococcus agalactiae* trigger factor (47 kDa) oraz

czynnik elongacji Tu (44 kDa) [23]. Wyniki tych badań zainicjowały ideę dalszych prac, których część wyników opisana została w niniejszej rozprawie.

Obecnie coraz więcej badań wakcynologicznych skupia się na detekcji ściśle zdefiniowanych komponentów. Antygenami wchodzącymi w skład tego typu szczepionek są najczęściej bakteryjne immunogenne białka, ich krótkie peptydy zawierające determinanty antygenowe (epitopy), czyli fragmenty białka rozpoznawane przez antygeny, oraz receptory mogące indukować odpowiedź immunologiczną.

2. CEL PRACY

Celem głównym niniejszej pracy była identyfikacja, charakterystyka oraz chemiczna synteza epitopów wybranych immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* (GBS) rozpoznawanych przez ludzkie przeciwciała ochronne obecne we krwi pępowinowej, które w przyszłości mogłyby stanowić komponent szczepionki lub znaleźć zastosowanie jako marker zakażeń i/lub nosicielstwa GBS w innowacyjnych testach immunodiagnostycznych.

Cele szczegółowe niniejszej pracy zakładały:

1. Detekcję immunoreaktywnych białek GBS z wykorzystaniem przeciwciał surowicy krwi pępowinowej metodą immunoblottingu oraz określenie ich masy cząsteczkowej.
2. Identyfikację białek immunoreaktywnych oraz bioinformatyczną analizę potencjalnych epitopów wiążących przeciwciała.
3. Chemiczną syntezę peptydów z wykorzystaniem techniki Pepsan (ang. *multipin peptides synthesis*), w tym:
 - a) Syntezę wszystkich peptydów wytypowanych w analizie bioinformatycznej jako potencjalne determinanty antygenowe w celu wyodrębnienia tych, które wysoce specyficznie wiążą się z przeciwciałami krwi pępowinowej.
 - b) Modyfikację poprzez skracanie i podstawianie.
4. Określenie specyficzności zsyntetyzowanych epitopów przy pomocy testu immunoenzymatycznego z przeciwciałami obecnymi w surowicy krwi pępowinowej.
5. Syntezę epitopów na żywicach oraz określenie ich specyficzności wobec surowic krwi pępowinowej i żywej pochodzącej od nosicielek GBS, pacjentów z infekcją o etiologii GBS, pacjentów niebędących nosicielami GBS.
6. Ocenę reaktywności pojedynczych epitopów w porównaniu do rekombinowanego białka na przykładzie czynnika elongacji Tu.

3. MATERIAŁY

Niniejsze badania prowadzone były w ramach projektu badawczego OPUS „Charakterystyka immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* wraz z identyfikacją epitopu rozpoznawanego przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr UMO-2013/09/B/NZ6/00801), realizowanego pod kierownictwem dr hab. Moniki Brzychczy-Włoch. Projekt prowadzony był w ramach współpracy naukowej z zespołem badawczym Prof. Andrzeja Gamiana z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu w oparciu o umowę nr DO/UJ/UIP/10/2014. Niniejszy projekt badawczy uzyskał zgodę Szpitala Uniwersyteckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (nr umowy DN-0710-8-79/13) oraz Komisji Bioetycznej (KBET/153/B/2012) na prowadzenie badań.

Badania te były kontynuacją dwóch wcześniejszych projektów. Pierwszy, finansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (3PO5E 08425), pt. „Znaczenie kolonizacji paciorkowcem grupy B (paciorkowiec bezmleczności, *Streptococcus agalactiae*) jako czynnika ryzyka zakażeń matek i noworodków” realizowany był w latach 2003-2006 pod kierownictwem dr hab. Doroty Pawlik. W toku prowadzonych prac zebrano i scharakteryzowano szczepy GBS pochodzące z zakażeń i nosicielstwa. Drugi grant, o tytule „Charakterystyka izolatów *Streptococcus agalactiae* pochodzących z inwazyjnych zakażeń i od nosicieli oraz analiza immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na ich powierzchni” (nr NN401042337) finansowany był ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2009-2012 i zrealizowany został we współpracy z zespołem badawczym Prof. Andrzeja Gamiana z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod kierownictwem dr hab. Moniki Brzychczy-Włoch. W ramach tego projektu spośród 60 zróżnicowanych genetycznie szczepów GBS wytypowano 4 konserwatywne immunogenne białka, które specyficznie reagowały z surowicami krwi żylnych pochodzących od pacjentów z zakażeniem o etiologii GBS oraz od kobiet ciężarnych będących nosicielkami *Streptococcus agalactiae*, a wśród nich: enolazę (47,4 kDa), dehydrogenazę aldehydową (50,6 kDa), trigger factor (47 kDa) oraz czynnik elongacji Tu (44 kDa) [23]. Natomiast na bazie projektu OPUS (nr UMO-2013/09/B/NZ6/00801), stanowiącego podstawę niniejszej rozprawy, w toku badań

prowadzonych na poszerzonej puli szczepów (n=180) zidentyfikowano dwa dodatkowe białka: dehydrogenazę 5'-monofosforanu inozyny i chaperon GroEL, które wraz z enolazą i czynnikiem elongacji Tu, wytypowanymi w ramach projektu nr NN401042337, wybrano do dalszych badań mających na celu detekcję specyficznych epitopów. W niniejszej pracy opisano dehydrogenazę 5'-monofosforanu inozyny, chaperon GroEL oraz enolazę, natomiast wyniki badań obejmujących detekcję epitopów czynnika elongacji Tu stanowiły podstawę pracy magisterskiej Marceliny Pyclik z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pt. „Identyfikacja epitopu czynnika elongacji Tu izolowanego ze *Streptococcus agalactiae* z wykorzystaniem ludzkich przeciwciał krwi pępowinowej.”.

W ramach projektu nr UMO-2013/09/B/NZ6/00801, stanowiącego podstawę niniejszej rozprawy, powstały dwie publikacje „Epitope Mapping of *Streptococcus agalactiae* Elongation Factor Tu Protein Recognized by Human Sera.” autorstwa Marceliny Pyclik, Sabiny Górskiej, Ewy Brzozowskiej, Anny Dobrut, Jarosława Ciekota, Andrzeja Gamiana i Moniki Brzychczy-Włoch (Front Microbiol. 2018 Feb 6;9:125. doi: 10.3389/fmicb.2018.00125. eCollection 2018.) oraz „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL.” autorstwa Anny Dobrut, Ewy Brzozowskiej, Sabiny Górskiej, Marceliny Pyclik, Andrzeja Gamiana, Małgorzaty Bulandy, Elżbiety Majewskiej oraz Moniki Brzychczy-Włoch (Front Cell Infect Microbiol. 2018 Oct 2;8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349. eCollection 2018), w których opisano wyniki badań obejmujących mapowanie i charakterystykę czterech immunogennych białek GBS, a wśród nich czynnika elongacji Tu, enolazy, dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny oraz chaperonu GroEL. Wyniki przedstawione w publikacji „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL.” stanowią część wyników opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, a zgody współautorów na wykorzystanie wyników załączono na końcu pracy.

Ponadto, wyniki badań podstawowych uzyskane w ramach powyższych projektów stanowią podstawę kolejnego, wdrożeniowego projektu „Innowacyjny test diagnostyczny do wykrywania zakażeń *Streptococcus agalactiae* i nosicielstwa wśród

ciężarnych” (DZP/TANGO2/395/2016) kierowanego przez dr. hab. Monikę Brzychczy-Włoch, który uzyskał finansowanie z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu TANGO2.

Uzyskane wyniki objęte zostały dwoma zgłoszeniami patentowymi: krajowym „Test diagnostyczny do wykrywania zakażeń i/lub nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* wykorzystujący wyselekcjonowane markery polipeptydowe.” (P. 424214) autorstwa dr hab. Moniki Brzychczy-Włoch (UJ CM), dr hab., prof. PAN Sabiny Górskiej (IITD PAN), dr hab. Ewy Brzozowskiej (IITD PAN), prof. dr hab. Andrzeja Gamiana (IITD PAN) oraz mgr Anny Dobrut (UJ CM) i europejskim pt. „Diagnostic test” (PCT/PL2019/050002) autorstwa dr hab. Moniki Brzychczy-Włoch (UJ CM), dr hab., prof. PAN Sabiny Górskiej (IITD PAN), dr hab. Ewy Brzozowskiej (IITD PAN), prof. dr hab. Andrzeja Gamiana (IITD PAN) oraz mgr Anny Dobrut (UJ CM).

3. 1. Grupa badana

Badaniem objęto 34 pacjentki (Tabela 3) Oddziału Klinicznego Położnictwa i Perinatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie będące w fizjologicznej ciąży, które zakwalifikowano do dwóch grup:

- A. Grupa badana – kobiety ze zdiagnozowaną kolonizacją *S. agalactiae* pochwy i/lub odbytu (n=20)
- B. Grupa kontrolna – kobiety nieskolonizowane *S. agalactiae* (n=14)

Kryteria włączenia:

- kobiety w trzecim trymestrze ciąży
- wiek powyżej 18 lat i poniżej 40 lat
- ciąża fizjologiczna
- pisemna zgoda na udział w badaniu

Kryteria wyłączenia:

- wiek poniżej 18 roku życia
- wiek powyżej 40 roku życia
- ciąża zagrożona
- przedwczesny poród
- obniżona odporność

- brak pisemnej zgody na udział w badaniu

Wymazy z przedsionka pochwy i odbytnicy (po pokonaniu oporu zwieracza odbytu) pobierano przy użyciu dwóch jałowych wymazówek, które na podłożu transportowym Amies dostarczano do Katedry Mikrobiologii UJ CM. Zebrany materiał umieszczano w 2 ml wzbogaconego, płynnego podłoża hodowlanego Todd-Hewitta (Oxoid), a następnie preinkubowano w 37°C w warunkach tlenowych przez 18 godzin. Po tym czasie 100 µl hodowli przenoszono na podłoże Colombia Blood Agar z 5% dodatkiem krwi baraniej (Oxoid) i hodowano w 37°C w warunkach tlenowych przez 18 godzin. Kolonie o morfologii *S. agalactiae* poddawano identyfikacji z wykorzystaniem testu lateksowego Slidex (BioMérieux), potwierdzającego przynależność do grupy B, oraz szeregów biochemicznych takich jak API Strep® (BioMérieux).

34 próbki krwi pępowinowych (ok. 50 ml) pobierano od ciężarnych po zakończeniu porodu. Próbki krwi trzymano przez noc w lodówce do momentu wytworzenia się skrzepu. Następnie, surowicę odciągano do sterylnych probówek przy pomocy szklanej pipety i wirowano przez 5 minut celem odzielenia pozostałych w próbce erytrocytów. Klarowny nadsącz porozdzielano do sterylnych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -70°C. Kwalifikacji surowic na GBS-dodatnie (surowice badane) i GBS-ujemne (surowice kontrolne) dokonano w oparciu o wyniki posiewu oraz o wyniki immunoblottingu prowadzonego w obecności immunogennych białek GBS (Tabela 3).

Ponadto, w badaniach wykorzystano także próbki krwi żyłnej pobranej od pacjentek z nosicielstwem GBS oraz od noworodków z sepsą o etiologii GBS, które zebrane zostały w ramach wcześniejszego projektu (nr NN401042337) (Tabela 4).

Tabela 3 Zestawienie surowic 34 krwi pępowinowych pochodzących od pacjentek będących nosicielkami GBS i niebędących nosicielkami GBS.

Surowice GBS-dodatnie							
Lp	Nazwa surowicy	Ciąża	Poród	CC/PSN	Tydzień	Antybiotyki	Choroby towarzyszące
1	1/KP	I	I	b.d.	41	ampicylina 2g, wankomycyna	-
2	2/KP	II	II	CC	38+5		podejrzenie makrosomii
3	3/KP	I	I	b.d.	40+5		cukrzyca G/B leczona dietą i insuliną
4	4/KP	I	I	PSN	38	tarfazolin 2g	infekcja dróg moczowych,
5	5/KP	II	I	b.d.	38+3	ampicylina 1g	hypotropfia płodu, anemia, cholestaza ciążowa
6	6/KP	I	I	PSN	37+3	ampicylina 1g i wankomycyna	-
7	8/KP	II	II	CC	36+6	tarfazolin 2g	astma oskrzelowa
8	10/KP	II	II	CC	39+2	tarfazolin 2g	-
9	14/KP	I	I	b.d.	37+5	ampicylina 2g	-
10	15/KP	IV	II	PSN	38+4	ampicylina 2g	Hashimoto
11	16/KP	II	I	PSN	37+2	ampicylina 2g	-
12	18/KP	I	I		40+5	amoxiclar 1,2 g	-
13	19/KP	II	II	CC	39	biofazolin 1 g	-
14	20/KP	II	II	b.d.	39		podejrzenie i. różyczkowej, niedoczynność tarczycy, nadciśnienie w ciąży
15	21/KP	II	I	b.d.	39+2	ampicylina 2g	-
16	22/KP	III	III	CC	39+6	klindamycyna 600 mg	niedoczynność tarczycy
17	25/KP	I	I	b.d.	38	ampicylina 2g	-
18	26/KP	II	II	b.d.	41+1	ampicylina 2g	-
19	27/KP	II	I	b.d.	39+6	ampicylina 2g	cukrzyca G/B, na diecie
20	30/KP	I	I	CC	39+1	wymaz pobrany przed podaniem antybiotyku	-
Surowice GBS-ujemne							
Lp	Nazwa surowicy	Ciąża	Poród	CC/PSN	Tydzień	Antybiotyki	Choroby towarzyszące
1	7/KP	I	I	PSN	40	Brak	-
2	9/KP	II	II	CC	38+4	tarfazolin 2g	-
3	11/KP	II	II	CC	35	tarfazolin 2g	HPV dodatnia
4	12/KP	I	I	PSN	40+3	ampicylina 2g	-
5	13/KP	I	I	CC	39	tarfazolin 1g	cholestaza ciążowa
6	17/KP	III	II	PSN	38+4	Brak	cukrzyca G/A, Hashimoto
7	23/KP	I	I	CC	38+3	tarfazolin 2g	niedomykalność zastawki aortalnej u matki
8	24/KP	III	II	b.d.	38+2	tarfazolin 2g	-
9	28/KP	II	II	b.d.	39	Brak	-
10	29/KP	II	II	b.d.	39	Brak	zastój w lewej nerce płodu
11	31/KP	II	II	b.d.	39+5	Brak	ch.von Villebranda typ 2B
12	32/KP	I	I	b.d.	40	ampicylina 2g	-
13	33/KP	I	I	b.d.	41	biofazolin 2g	cukrzyca G/A, na diecie
14	34/KP	III	I	b.d.	41	Brak	

Legenda: KP – krew pępowinowa; CC – cesarskie cięcie; PSN - poród siłami natury;
b.d. – brak danych.

Tabela 4 Zestawienie surowic krwi żylnych wykorzystanych w teście immunoenzymatycznym.

Lp	Nazwa szczepu	Nosicielstwo GBS I trymestr	Nosicielstwo GBS II trymestr	Nosicielstwo GBS III trymestr	Połów Nosicielstwo GBS	Zakażenie/nosicielstwo GBS
1	GBS 2a	ND	ND	ND	ND	zakażenie
2	42/p	+	+	+	+	nosicielstwo
3	23/3	-	-	+	b.d.	nosicielstwo
4	9/3	+	+	-	b.d.	nosicielstwo
5	16/3	-	-	-	b.d.	brak

Legenda: ND – nie dotyczy; b.d. – brak danych.

4. METODY

4.1. Izolacja immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*

Wyboru silnie immunogennych białek GBS dokonano przy użyciu techniki immunoblottingu. 180 izolatów klinicznych *Streptococcus agalactiae*, zróżnicowanych genetycznie, reprezentujących różne serotypy i geny kodujące białka Alp, a także pochodzące z różnych typów zakażeń, hodowano na podłożu BHI [ang. *brain-heart infusion broth*; (Biocorp)] przez 24 godziny w 37°C w warunkach tlenowych. Po zakończeniu inkubacji stężenie bakterii doprowadzano do gęstości optycznej $A_{600}=1,0$ i wirowano przez 20 minut z prędkością 3312 g na minutę. Następnie, nadsącz usuwano, a osad zawieszono w 0,1 M Tris-HCl (Merck) zawierającym różne stężenia siarczanu dodecyl sodu [ang. *sodium dodecyl sulfate*, SDS; (Sigma-Aldrich)] (1-2%) lub bezpośrednio w buforze do elektroforezy, zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą Heilmanna [74]. Modyfikacja polegała na pominięciu etapu gotowania, co miało na celu zachowanie natywnej struktury badanych białek. W kolejnym etapie próbki poddawano trzykrotnej sonifikacji przez 5 minut i wirowano w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem [ang. *phosphate buffered saline*, PBS; (Thermo Fisher)] z prędkością 13 248 g na minutę.

Precypitację białek prowadzono przy użyciu 3 objętości 95% roztworu alkoholu etylowego (POCH) i inkubowano przez noc w 4°C. Po zakończeniu inkubacji zawiesinę białek wirowano przez 1 minutę z prędkością 12 000 rpm, a osad zawieszono w wodzie. Stężenie mierzono na podstawie oznaczenia BCA (ang. *bicinchoninic acid assay*) [174]. Ta barwna reakcja biuretowa oparta była na kwasie bicinchoninowym, który w środowisku alkalicznym tworzy stabilny kompleks z jonami miedzi. Stężenie intensywnie purpurowego barwnika było proporcjonalne do stężenia białka w badanej próbce [174].

4.2. Elektroforetyczny rozdział białek

10 µg homogenatu białek наносzono na poliakrylamidowy żel o gradientowym stężeniu: 5%, 7,5%, 10%, 12,5% [23, 107]. Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono w aparacie Prep Cell Model 491 (Bio-Rad). Skuteczność reakcji oceniano poprzez

wybarwienie barwnikiem Coomassie Brilliant Blue (Serva). Następnie białka poddawano transferowi na membranę Immobilon-P (Merck Milipore) i prowadzono reakcję immunoblottingu.

4. 3. Immunoblotting

Oceny zdolności białek *Streptococcus agalactiae* do specyficznego wiązania przeciwciał GBS-dodatnich dokonano przy zastosowaniu metody immunoblottingu.

W pierwszym etapie, przy użyciu 1% roztworu albuminy surowicy bydlęcej BSA [ang. *bovine serum albumin* (Thermo Fisher Scientific)] rozcieńczonej w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (Thermo Fisher), przez 1 godzinę blokowano wolne miejsca wiążące na membranie. Niezwiązane cząsteczki odpłukiwano trzykrotnie w buforze płuczającym PBS z dodatkiem 0,25% Tween-20 [PBS-T (Sigma-Aldrich)]. Następnie, przez 2 godziny inkubowano związane z membraną białka z surowicami, zarówno GBS-dodatnimi, jak i GBS-ujemnymi, w stężeniu 1:300 w 37°C. Po tym czasie trzykrotnie płukano membrany w buforze PBS-T. Inkubacja z drugorzędowymi kozimi anty-ludzkimi przeciwciałami IgG skoniugowanymi z alkaliczną fosfatazą (Sigma-Aldrich) w stężeniu 1:5000 prowadzona była przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym odpłukaniu w PBS-T niezwiązanych przeciwciał, reakcję wizualizowano poprzez umieszczenie membrany na 5 sekund w roztworze składającym się z błękitu nitrotetrazolowego [ang. *nitroblue tetrazolium*, NBT (Roth)], fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu [ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate*, BCIP (Roth)], oraz MgCl₂ (POCh) [23, 40].

Prążki, które silnie reagowały z surowicą GBS-dodatnią, a ich reaktywność z surowicą GBS-ujemną była znikoma, a także charakteryzowały się wysoką konserwatywnością, wycinano z żelu i poddawano proteolitycznemu trawieniu trypsyną (Roche). Uzyskana w ten sposób mieszanina peptydów rozdzielana była przy pomocy chromatografii cieczowej (ang. *liquid chromatography*, LC), a masy poszczególnych sekwencji mierzone były przy wykorzystaniu techniki spektrometrii mas (spektrometr LC-MS/MS Orbitrap; Thermo). Identyfikacji białek dokonano na podstawie porównawczej analizy ich mas (NCBI, UniProt databases) w opraciu o bazę MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) i analizy statystyczne.

4. 4. Analiza bioinformatyczna

Do analizy bioinformatycznej wybrano 3 szczepy kliniczne *Streptococcus agalactiae*, które różniły się pomiędzy sobą zarówno genetycznie (prezentowały różne serotypy, posiadały różne geny kodujące białka Alp, prezentowały różne typy sekwencyjne), jak i pod kątem pochodzenia (Tabela 4). Co jednak było najistotniejsze, to fakt, że każdy z nich reprezentował konserwatywne i uniwersalne dla gatunku białka, które miały zostać objęte analizą.

Analiza bioinformatyczna wykonana została przez firmę Vita In Silica sp. z o. o. i obejmowała przewidywanie drugorzędowej struktury białek, regionów pętli (ang. *loop regions*), zagrzebienia aminokwasów w wyniku ich hydrofobowości oraz ich nieuporządkowania przy użyciu metaserwera Genesilico (<https://genesilico.pl/meta2>). Trójwymiarowe modele białek opracowane zostały na podstawie struktur krystalicznych białek wzorcowych, a nałożenie na nie regionów z pętlami wraz z uwzględnieniem nieuporządkowania aminokwasów umożliwiło wskazanie najbardziej prawdopodobnej lokalizacji potencjalnych epitopów. Ponadto, identyfikacja ich umiejscowienia na białku dokonana została przy pomocy serwera Antibody Epitope Prediction (<http://tools.immuneepitope.org/>).

Przewidywanie sekwencji potencjalnych epitopów w obrębie poszczególnych białek przeprowadzone zostało w oparciu o następujące narzędzia predykcyjne:

1) Przewidywanie dostępności powierzchniowej Eminiego (ang. *Emini Surface Accessibility Prediction*) [48].

Metodyka ta oparta jest na założeniu, zgodnie z którym aminokwasy o powierzchni powyżej 20 Å, wyeksponowanej w stronę rozpuszczalnika, są kwalifikowane jako powierzchniowo dostępne, a predykcja obejmuje sekwencje ≥ 6 aminokwasowe.

2) Antygenowość Kolaskara i Tongaonkara (ang. *Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity*) [97].

Metoda ta wykorzystuje właściwości fizykochemiczne, zgodnie z którymi hydrofobowe aminokwasy, takie jak leucyna, cysteina i walina, znajdujące się

na powierzchni białka, z dużym prawdopodobieństwem wchodzi w skład sekwencji antygenowej.

3) Przewidywanie liniowych epitopów metodą BepiPred Larsena (ang. *Bepipred Linear Epitope Prediction*) [112].

Metoda ta oparta jest na połączeniu ukrytego modelu Markowa (ang. *Hidden Markov Models*, HMM) i metodzie skali skłonności Parkera oparta na zależności pomiędzy hydrofobowością a antygenowością.

4) Przewidywanie epitopów na limfocytach B metodą BCPREDS [2] (ang. *B-cell epitopes prediction*).

Serwer BCPREDS oparty jest na systemie tzw. jąder łańcuchowych (ang. *string kernels*), który w oparciu o analizę sekwencji aminokwasów stanowiących bogatą bazę danych przewiduje najbardziej prawdopodobne 20-aminokwasowe epitopy.

Sekwencje aminokwasowe składające się z co najmniej 6 aminokwasów, które wytypowane zostały przez co najmniej dwie metody przewidywania, wybrano do dalszej analizy.

Tabela 4 Charakterystyka szczepów GBS wybranych do analizy bioinformatycznej mającej na celu wytypowanie potencjalnych epitopów w obrębie ich białek.

Numer szczepu	Serotyp	Gen Alp	Fenotyp oporności	Typ sekwencyjny	Pacjent
D-129	III	<i>rib</i>	brak	ST 170	dorosły z UTI*
1736/08	V	<i>alp2</i>	kMLS _B	ST 1	noworodek z UTI*
13793/08	V	<i>alp3</i>	kMLS _B	ST 1	noworodek z UTI*

Legenda: *UTI – zakażenia układu moczowego (ang. *urinary tracts infection*).

4. 5. Synteza peptydów na polietylenowych pinach metodą Pepscan

Synteza peptydów wytypowanych w oparciu o analizę bioinformatyczną jako potencjalne epitopy, prowadzona była według zmodyfikowanej procedury Geysena [40, 61, 148].

W metodzie wykorzystano polietylenowe piny [NCP Block of 96 hydroxy propyl methacrylate pins (MIMOTOPES)]. Na pojedynczym pinie prowadzona była synteza jednego peptydu poprzez przyłączanie kolejnych aminokwasów od C-końca do N-końca. Stężenia poszczególnych aminokwasów przedstawione zostały w Tabeli 5.

Przyłączenie każdego z aminokwasów poprzedzone było deprotekcją pinów w 20% roztworze piperydyny (Merck) rozcieńczonej w N,N'-dimetyloformamidzie (DMF) (Merck KGaA)], prowadzoną w szalce Petriego przez 1 godzinę. Po tym czasie piny odpłukiwano przez 2 minuty w DMF i czterokrotnie przez 2 minuty metanolu (Krak-Chem sp. z o. o.), a następnie suszono 30 minut pod wyciągiem.

Sprzęganie, czyli acylacja aminokwasów, poprzedzane było zanurzeniem pinów na 5 minut w 150 μ l/dołek w DMF. Następnie piny przekładano do nowych dołków wypełnionych mieszaniną reakcyjną, w skład której wchodziły:

- 65 mM 1-hydroksy-7-azabenzotriazolu [HOAt (Sigma-Aldrich)],
- 60 mM diisopropylcarbodiimidu [DIC (Merck KGaA)],
- 10 mM bromofenolu blue (Sigma-Aldrich),
- 60 mM aminokwasów rozcieńczonych w 50 μ l DMF.

Reakcja prowadzona była w szczelnie zamkniętym naczyniu w temperaturze pokojowej (ok. 22°C) w dwóch wariantach: dziennym przez 6 godzin lub nocnym.

Po zakończonym etapie aminoacylacji piny płukano. Jeśli synteza była kontynuowana, piny zanurzano w alkoholu etylowym na 5 minut, a następnie suszono i zanurzano na 5 minut w DMF, po czym rozpoczynano etap syntezy kolejnego aminokwasów poprzez godzinną deprotekcję w PIP. Po jej zakończeniu piny płukano trzykrotnie w metanolu, następnie w przez 2 minuty w DMF, ponownie 4 razy przez 3 minuty w alkoholu metylowym, suszono przez 30 minut pod wyciągiem i rozpoczynano sprzęganie kolejnego aminokwasu. Natomiast, gdy syntezę przerywano w związku z uzyskaniem pożądanego peptydu, piny płukano przez 5 minut w metanolu,

suszono przez 5 minut, następnie zanurzano na 5 minut w DMF, a na koniec dwukrotnie przez 2 minuty płukano w metanolu. Wszystkie płukania prowadzone były na szalkach Petriego.

Ostatnim etapem syntezy była N-acylacja gotowego produktu. Piny płukano przez 5 minut w alkoholu metylowym w szalce Petriego, suszono je przez 5 minut, a następnie płukano przez 5 minut w DMF i umieszczano w 2,5 ml mieszaninie acylującej składającej się z:

- 3 µl/dołek 3% bezwodnika octowego (Chempur),
- 0,5 µl/dołek 0,5% N,N-diizopropylloetyloamina (Sigma-Aldrich),
- 96,5 µl/dołek N,N'-dimetyloformamidu.

Do każdego z dołków polietylenowej płytki dodawano po 100 µl mieszaniny, następnie umieszczano w nich piny i inkubowano przez 90 minut, płukano przez 10 minut w alkoholu metylowym i suszono pod wyciągiem przez 15 minut.

W kolejnym etapie przygotowywano roztwór, którego rolą było odblokowanie grup bocznych łańcuchów. W tym celu przyrządzono 30 ml mieszaniny o następującym składzie:

- 750 µl 2,5% anizolu (Sigma-Aldrich),
- 750 µl 2,5% 1,2-ditioetanu (Sigma-Aldrich),
- 28 500 µl kwasu trifluorooctowego (Sigma-Adrich).

Mieszaninę przygotowywano godzinę przed rozpoczęciem reakcji, przy zachowaniu szczególnej ostrożności, w trzech parach rękawiczek. Inkubacja trwała 3 godziny. Po tym czasie piny odpłukiwano w metanolu przez 10 minut i przez 1 godzinę inkubowano w 30 ml roztworu kwasu octowego, w skład którego wchodziło:

- 150 µl 0,5% kwasu octowego (Poch),
- 14925 µl alkoholu metylowego,
- 14925 µl wody MiliQ.

Na koniec piny płukano dwukrotnie przez 2 minuty w alkoholu metylowym i suszono przez noc pod wyciągiem. Następnego dnia piny umieszczano w buforze do dysrupcji o pH=7,2, składającym się z 1% siarczanu dodecyłu sodu (Sigma-Aldrich), 2% 2-merkaptioetanolu (Thermo Fisher) i 0,1 M Na₂PO₄ dwunastokrotnie uwodnionego.

Bufor o temperaturze 60°C wraz z pinami umieszczano w sonifikatorze (Branson 2210 DTH Ultrasonic Cleaner) i sonifikowano przez 10 minut. Następnie piny płukano przez 2 minuty w wodzie MiliQ o temperaturze 60°C i, na koniec, przez 5 minut płukano w metanolu o takiej samej temperaturze. Po zakończeniu dysrupcji piny wykorzystywano do dalszych eksperymentów. Po zakończonych eksperymentach piny przechowywano w 4°C w szczelnie zamkniętych pojemnikach z żelem krzemionkowym (ang. *silica gel*).

Zmapowane epitopy poddawano modyfikacjom polegającym na:

- a) skracaniu od N-końca i C-końca w celu zidentyfikowania najkrótszej wysoce immunogennej sekwencji aminokwasowej,
- b) podstawianiu kolejnych aminokwasów w sekwencji alaniną lub glicyną w celu zbadania wpływu poszczególnych aminokwasów na reaktywność peptydu,
- c) podstawianie kolejnych aminokwasów w sekwencji aminokwasem, który w poprzedniej modyfikacji (podpunkt b) wykazywał istotny wpływ na zmianę reaktywności w danym peptydzie.

Tabela 5 Wykaz aminokwasów użytych do syntezy peptydów metodą Pepsan.

Nazwa	Skrót	Forma aminokwasu	Masa molowa [g/mol]	Masa jednej porcji aminokwasu [mg]
Alanina	A	Fmoc-Ala-OH	311,3	1,8678
Cysteina	C	Fmoc-Cys(Pbf)-OH	585,7	3,5142
Kwas asparginowy	D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411,5	2,469
Kwas glutaminowy	E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425,5	2,553
Fenylalanina	F	Fmoc-Phe-OH	387,4	2,3244
Glicyna	G	Fmoc-Gly-OH	297,3	1,7838
Histydyna	H	Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	3,7182
Izoleucyna	I	Fmoc-Ile-OH	353,4	2,1204
Lizyna	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	2,811
Leucyna	L	Fmoc-Leu-OH	353,4	2,1204
Metionina	M	Fmoc-Met-OH	371,5	2,229

Aspargina	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7	3,5802
Prolina	P	Fmoc-Pro-OH	337,4	2,0244
Glutamina	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7	3,6642
Arginina	R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	3,8928
Seryna	S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,4	2,3004
Treonina	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	397,5	2,385
Walina	V	Fmoc-Val-OH	339,4	2,0364
Tryptofan	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6	3,1596
Tyrozyna	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459,5	2,757

Legenda: Fmoc – grupa fluorenylmetryloksycarbonylowa; Pbf – grupa 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonylowa; OtBu – ester 5-tert-butylu; Trt – grupa trytylowa; Boc – grupa tert-butyloksycarbonylowa; tBu – grupa tetrabutylowa.

4. 6. Test immunoenzymatyczny do charakterystyki peptydów immobilizowanych na pinach

Wszystkie zsyntetyzowane peptydy badano w teście immunoenzymatycznym w celu detekcji epitopów wiążących przeciwciała. Test prowadzony był na polistyrenowych płytkach (Thermo Fisher), a wszystkie wykorzystywane odczynniki doprowadzane były do temperatury pokojowej, celem uniknięcia szoku termicznego.

Procedurę rozpoczynano równoważeniem pinów w buforze TBS-T (ang. *tris buffered saline*-Tween 20) na kołysce (BioSan). Następnie, przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej blokowano wolne miejsca wiążące na pinach 1% roztworem BSA w TBS-T w objętości 200 µl/dołek. Inkubację ze 150 µl/dołek surowicy krwi pępowinowej rozcieńczonej w buforze TBS-T w stosunku 1:1000 prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie niezwiązane przeciwciała odpłukiwano trzykrotnie po 5 minut w buforze TBS-T na kołysce. Inkubacja ze 150 µl/dołek drugorzędowymi anty-ludzkimi kozimi przeciwciałami IgG, skoniugowanymi z alkaliczną fosfatazą (Sigma-Aldrich), rozcieńczonymi w buforze TBS-T w stosunku 1:10 000, prowadzona była przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Niezwiązany koniugat usuwano poprzez trzykrotne płukanie przez 5 minut na kołysce w buforze TBS-T. W ostatnim etapie do każdego z dołków dodawano po 200 µl substratu pNPP

[p-Nitrophenyl Phosphate AP Yellow (Sigma-Aldrich)] i inkubowano przez 30 minut. Odczyt absorbancji przy długości fali światła równej 405 nm prowadzono w programie gene5 na aparacie PowerWave XS (BioTek).

Po zakończonym odczycie gęstości optycznej każdego z roztworów, piny poddawano dysrupcji celem oczyszczenia ich ze wszystkich reagentów, które związały się w danym teście. Pozwoliło to na ich powtórne wykorzystanie w kolejnych testach.

4. 7. Synteza peptydów na żywicy metodą Fmoc

Wytypowane przy zastosowaniu metody Pepsan epitopy syntetyzowano na żywicy Wanga metodą Fmoc. Pozwoliło to na uzyskanie dużych ilości peptydów, którymi można było opłaszczyc dołki płytki 96-dołkowej i wykorzystać jako antygen rozpoznający przeciwciała anty-GBS w diagnostyce zakażeń i/lub nosicielstwa *Streptococcus agalactiae*.

Synteza prowadzona była w plastikowych strzykawkach wypełnionych żywicą (Merck Millipore), połączonych z gumową rurką z plastikowym zaworem (Becton Dickinson), przez którą zlewano niezwiązane reagenty (Ryc. 10).

Aminokwasy Fmoc, wykorzystane w syntezie na żywicy, były takie same jak w przypadku syntezy na pinach.

Pierwszym etapem reakcji była godzinna inkubacja 200 miligramów żywicy Wanga w 2 mililitrach 5,5'-dimetyloformamidu na kołysce (BioSan). Po tym czasie DMF zlewano i przyłączano pierwszy aminokwas (0,5 mmol, 5 eq.), który rozpuszczono w mieszaninie reakcyjnej składającej się z:

- 62,4 µl diisopropylcarbodiimidu,
- 60,7 µl 1-hydroksy-7-azabenzotriazolu,
- 69,6 µl N,N-diizopropylloetyloaminy [DIPEA (Sigma-Aldrich)],
- 1807 µl N,N'-dimetyloformamidu.

Mieszanina preinkubowana była przez 2 minuty, a następnie наносzono ją na żywicę Wanga i trzymano przez 3 godziny na kołysce. Następnie, niezwiązane reagenty odpłukiwano czterokrotnie 2 mililitrami DMF i cztery razy 2 mililitrami dichlorometanu [DCM (Sigma-Aldrich)]. Wydajność reakcji oceniano przy

zastosowaniu testu Kaisera indykującego dostępność wolnych grup aminowych. Kroplę żywicy umieszczano w probówce typu Eppendorf i dodawano dwie krople roztworu podgrzanego do 100°C, w skład którego wchodziły następujące odczynniki:

- fenol (Sigma-Aldrich) rozcieńczony w butanolu (Sigma-Aldrich),
- ninhydryna (Sigma-Aldrich) rozcieńczona w butanolu,
- cyjanek potasu [KCN(Sigma-Aldrich)] rozcieńczony w piperydynie (Merck).

Brunatne zabarwienie roztworu wskazywało na brak wolnych grup aminowych, co świadczyło o całkowitym wysyceniu cząsteczek żywicy aminokwasem.

Kolejny etap syntezy polegał na deprotekcji pierwszego aminokwasu (Fmoc-AA₁) poprzez inkubację żywicy z 2 mililitrami 20% roztworu piperydyny rozcieńczonej w DMF przez 5 minut. Następnie żywicę płukano dwukrotnie dwoma mililitrami DMF, i całą procedurę deprotekcji powtarzano jeszcze raz. Skuteczność deprotekcji grup aminowych oceniano w teście Kaisera, jednakże w tym przypadku kolor niebieski stanowił wynik pozytywny, gdyż świadczył o całkowitym uwolnieniu grup aminowych. Pozwoliło to na syntezę kolejnych aminokwasów Fmoc, rozcieńczonych w mieszaninie o składzie identycznym jak podczas przyłączania pierwszego aminokwasu. W celu podniesienia wydajności syntezy testowano także mieszaninę składającą się z:

- 76,765 mg hydroksybenzotriazolu [HOBt (Sigma-Aldrich)],
- 185,83 mg heksafluorofosforanu 2-(-1-benzotriazolo) 1,1,3,3-tetrametylo-uronianu [HBTU (Sigma-Aldrich)],
- 174 µl (10 eq) N,N-diizopropylouetyloamina [DIPEA (Sigma-Aldrich)],

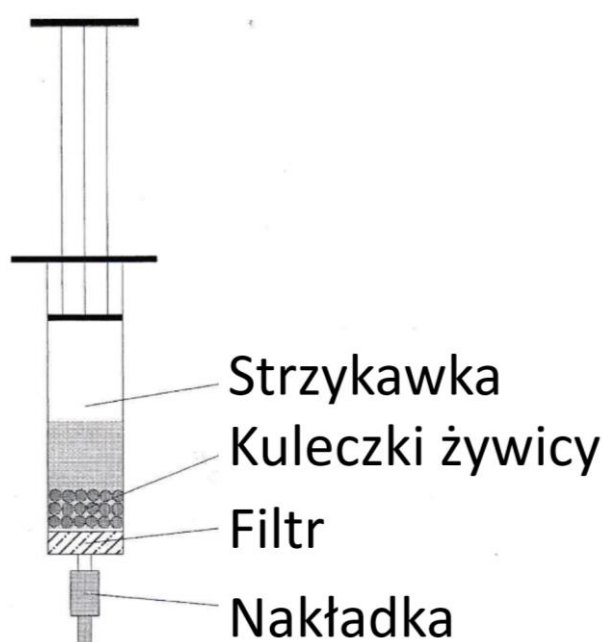
rozcieńczonych w 2 mililitrach DMF.

Syntezę poszczególnych aminokwasów prowadzono od 6 do 36 godzin, w zależności od ich właściwości. Po każdym etapie sprzęgania wydajność reakcji oceniano w teście Kaisera. Brązowe zabarwienie roztworu świadczyło o związaniu wszystkich grup aminowych, a tym samym o wysokiej wydajności reakcji.

Po zsyntetyzowaniu pożądanego peptydu był on odłączany od nośnika. Procedura odcięcia opierała się na: dwugodzinnej inkubacji w 1,5 ml roztworu kwasu trifluorooctowego w wodzie w stosunku 95:5 (przy jednoczesnej kontroli zabarwienia żywicy), zlania mieszaniny i ponownej inkubacji w roztworze kwasu TFA/H₂O (95:5) przez 2 godziny. Po ponownym zlaniu roztworu wytrącano peptydy w zimnym eterze

dietylowym [Et₂O (Sigma-Aldrich)]. Precypitacja prowadzona była w lodówce do 24 godzin. Po wytrąceniu się kłaczków roztwór wirowano w 4°C przez 30 minut przy prędkości 4000 obrotów na minutę w wirówce MPW. Pelet zbierano i zawieszano w wodzie MiliQ. W razie potrzeby wirowanie powtarzano.

Zsyntetyzowane peptydy suszono w wyparce rotacyjnej (Rotavapor) zrównoważonej roztworem zasady aż do całkowitego wysuszenia peptydu, następnie liofilizowano (Labconco) i przechowywano w temperaturze -20°C.



Ryc. 10. Model strzykawki wykorzystany w prowadzeniu manualnej syntezy SPPS z użyciem żywicy Wanga.

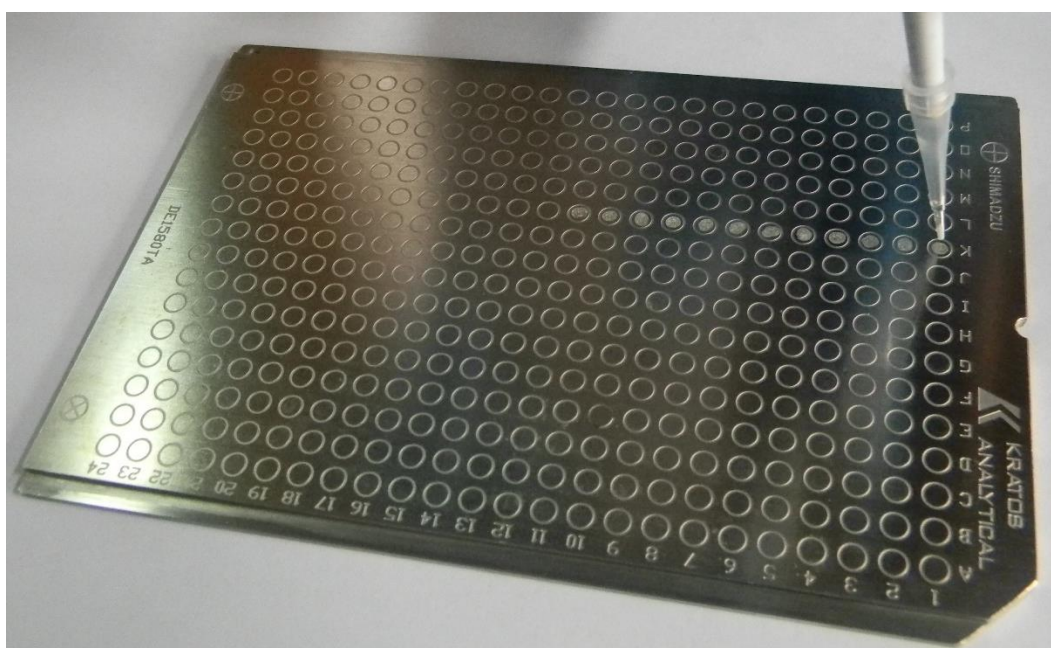
4. 8. Desorpcja laserowa i jonizacja wspomagana matrycą i analizatorem czasu przelotu

Masę zsyntetyzowanych peptydów określano przy pomocy spektrometrii mas metodą desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganej matrycą i analizatorem czasu przelotu, czyli MALDI-ToF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*).

W tym celu na godzinę przed testem przygotowywano matrycę, w skład której w przeliczeniu na 1 mililitr wchodziło:

- 10 mg/ml kwasu cynamonowego (Sigma-Aldrich),
- 800 μ l acetonitrylu [ACN (Sigma-Aldrich)],
- 10 μ l kwasu trifluorooctowego (Sigma-Aldrich),
- 190 μ l wody MiliQ.

Na płytkę nanoszono 10 μ l mieszaniny peptydów z matrycą w stosunku 1:1, przy czym minimalne stężenie peptydu wynosiło 1 ng/ml. Mieszaninę nakładano po 1 μ l i czekano, aż wyschnie. Czynność powtarzano aż do nałożenia całej próbki (Rycina 11). Płytkę umieszczano w aparacie MALDI Biotyper System (Bruker), a wynik w postaci pików analizowano w programie flexControl.



Ryc. 11. Płytkę z matrycą do analizy metodą MALDI-ToF. Źródło: <http://pe-iitb.vlabs.ac.in>

4. 9. Biotynylacja peptydów

W celu umożliwienia lepszego wiązania peptydów do dna płytki titracyjnej poddawano je reakcji biotynylacji. Powstały kompleks wiązał się następnie ze streptawidyną (Thermo Fisher).

Zliofilizowane peptydy rozpuszczano w 1 mililitrze PBS (Thermo Fisher). 10 mM roztwór biotyny [Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher)] uzyskano w następstwie

rozpuszczenia 6 miligramów białka w 1 mililitrze dejonizowanej wody. Następnie, do każdego z peptydów dodano biotynę w ilości wyliczonej według wzoru zamieszczonego w procedurze producenta:

$$\text{mL peptydu} \times \frac{\text{mg peptydu}}{\text{mL peptydu}} \times \frac{\text{mmol peptydu}}{\text{mg peptydu}} \times \frac{20\text{mmol biotyny}}{\text{mmol peptydu}} = \text{mmol biotyny}$$

Na podstawie uzyskanego wyniku liczono, jaką objętość 10 mM Sulfo-NHS-SS-Biotyny należało dodać do reakcji. Wartość tę obliczono według wzoru:

$$\text{mmol biotyny} \times \frac{607\text{mg}}{\text{mmol biotyny}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{6.0\text{mg}} = \mu\text{L biotyny}$$

W powyższym równaniu 607 mg oznacza masę molową biotyny, 1000 μL odzwierciedla objętość wody, w której zawieszono 6,0 mg Sulfo-NHS-SS-Biotyny celem uzyskania 10 mM roztworu.

Stężenia peptydów określono poprzez pomiar absorbancji w aparacie NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Inkubację z biotyną prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej (ok. 22°C), po czym płukano trzykrotnie zimnym PBS (Thermo Fisher) o pH=8,0 w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek biotyny. Skuteczność biotynyłacji oceniano poprzez pomiar mas techniką MALDI-ToF.

4. 10. Test immunoenzymatyczny z użyciem biotynyłowanych peptydów syntetyzowanych na żywicy

Badanie immunoreaktywności biotynyłowanych peptydów, które syntetyzowane były w fazie stałej, prowadzone było w teście immunoenzymatycznym na 96-dołkowej płytce Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher). Dno płytki opłaszczano 100 μl /dołek streptawidyny (Thermo Fisher), rozcieńczonej w buforze węglanowym (Sigma-Aldrich) o pH=9,6 w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, przez 1 godzinę z wytrząsaniem w aparacie StatFax-2200 (Awareness Technologu Inc.) w temperaturze 37°C. Niezwiązane białko odpłukiwano trzykrotnie 300 μl /dołek buforu płuczającego PBS-T [sól fizjologiczna buforowana fosforanem z Tween 20 (Sigma-Aldrich)]. Inkubację ze 100 μl /dołek biotynyłowanych

peptydów o stężeniu 1 µg/ml rozcieńczonych w buforze węglanowym prowadzono przez 30 minut na wytrząsarce w temperaturze pokojowej, po czym płytkę trzykrotnie płukano 300 µl/dołek PBS-T. Wolne miejsca wiążące na płytce blokowano 300 µl/dołek 1% surowicy bydlęcej BSA rozcieńczonej w PBS-T przez godziną inkubację w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Po tym czasie roztwór usuwano, a w dołkach umieszczano po 100 µl badanej surowicy ludzkiej rozcieńczonej w buforze PBS-T w stosunku 1:100 i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano trzykrotnie 300 µl/dołek buforem płuczącym PBS-T. Następnie, do każdego z dołków dodano po 100 µl kozich antyludzkich przeciwciał IgG skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (Bio-Rad) rozcieńczonych w PBS-T w stosunku 1:10 000 i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po 30 minutach przygotowano roztwór substratu dla peroksydazy chrzanowej – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny [TMB (Becton Dickinson)] poprzez wymieszanie w proporcjach 1:1 reagentów A i B, które przez pół godziny preinkubowano w ciemności. Po zakończeniu inkubacji niezwiązane drugorzędowe przeciwciała odpłukiwano pięciokrotnie 300 µl buforu płuczącego PBS-T. Następnie dodawano 200 µl/dołek TMB i przez 30 minut inkubowano w ciemności. Na koniec, w celu zatrzymania reakcji, dodawano 50 µl/dołek roztworu Stop Solution (Sigma-Aldrich) i odczytywano wynik eksperymentu poprzez pomiar absorbancji mierzonej przy długości fali równej 450 nm w aparacie Sunrise (Tecan). Kontrolę ujemną stanowił dołek bez peptydów (K1) oraz bez surowicy badanej (K2).

4. 11. Analiza statystyczna

W celu określenia istotnych różnic w reaktywności pomiędzy spulowanymi surowicami GBS-dodatnimi i spulowanymi surowicami GBS-ujemnymi, potwierdzających specyficzność wytypowanych epitopów, wykonano: test *t* Studenta dla prób niezależnych, test wielokrotnych porównań Dunnetta oraz jednoczynnikową analizę wariancji w schemacie międzygrupowym. Oceny specyficzności wytypowanych epitopów wobec pojedynczych surowic GBS-dodatnich i GBS-ujemnych dokonano przy użyciu testu U Manna-Whitney'a. Wybiórczość epitopów wobec surowic krwi żylnych pochodzących z zakażeń, nosicielstwa i od kobiet ciężarnych niebędących nosicielkami oceniono przy zastosowaniu testu ANOVA oraz testów *post-hoc* Tamhane'a i Browna-Forsytha. Istotność różnic w reaktywności pomiędzy białkiem EF-

Tu a jego epitopem oceniono przy zastosowaniu testu U Manna-Whitneya. Poziom istotności statystycznej wynosił $\alpha=0,05$.

Ponadto, efektywność modyfikacji peptydów na pinach wyrażono w postaci procentowego wzrostu reaktywności, gdzie absorbancja sekwencji wyjściowej traktowana była jako 100%, a odsetek wzrostu wyliczono według wzoru:

$$x = \frac{A_2}{A_1} \times 100\%$$

Legenda: x – wzrost absorbancji po modyfikacji, A_2 – absorbancja zmodyfikowanego peptydu, A_1 – absorbancja wyjściowego peptydu.

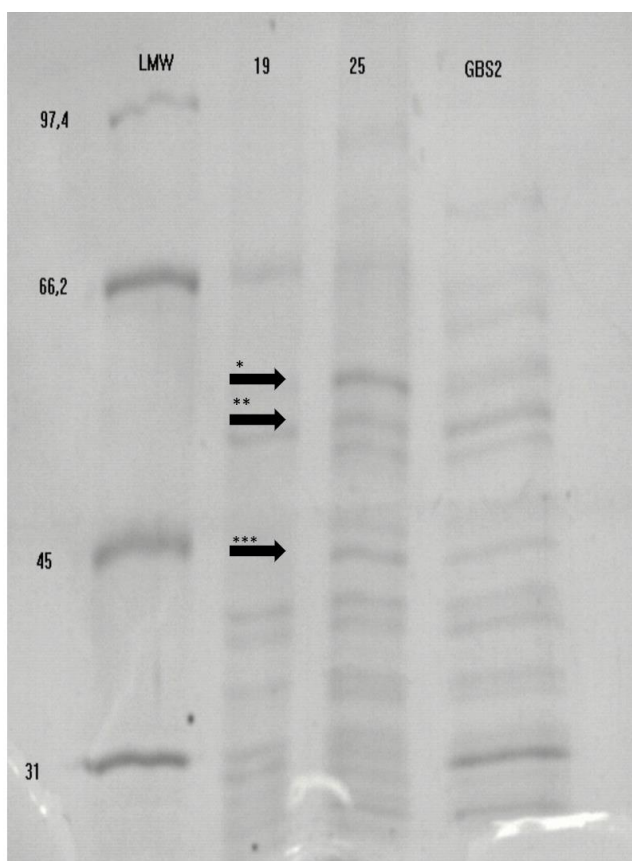
Ostateczny wynik (x') wyliczono zgodnie ze wzorem:

$$x' = x - 1$$

5. WYNIKI

5.1. Wyniki detekcji immunogennych białek GBS przy zastosowaniu immunoblottingu.

Dzięki zastosowaniu metody Heilmanna wytypowano przynajmniej sześć immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* specyficznie reagujących z przeciwciałami anti-GBS. Występowały one u większości badanych izolatów, co świadczyło o konserwatywności tych białek, a ich masy cząsteczkowe mieściły się w granicach 45-57 kDa [23, 149]. Trzy z nich: enolaza (47,5 kDa), dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny (ang. *inosine 5'-monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) (53 kDa), białko opiekuńcze GroEL (ang. *molecular chaperone* GroEL) (57 kDa) opisane zostały w niniejszej pracy [40]. Przykładowy wynik detekcji immunogennych białek przedstawiono na Ryc. 12.



Ryc. 12. Przykładowy wynik detekcji trzech immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*: enolazy o masie 45 kDa (***) , dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny o masie 53 kDa (**) oraz chaperonu GroEL o masie cząsteczkowej 57 kDa (*)

rozdzielonych metodą SDS-PAGE, a następnie identyfikowanej w bazie Mascot. Legenda: LMW – marker do identyfikacji białek o małych masach cząsteczkowych [ang. *low molecular masses*, LMW (GE Healthcare Life Sciences)]; 19 – izolat GBS 2337/08 wyizolowany od noworodka z wymazu z jamy ustnej; 25 – izolat GBS CM/47 wyizolowany z krwi od noworodka z sepsą (EOD); GBS 2 – izolat GBS wyizolowany z wymazu z pochwy od kobiety w trzecim trymestrze ciąży.

Wybrane i wstępnie scharakteryzowane białka trzech reprezentatywnych szczepów poddane zostały analizie bioinformatycznej.

5.2. Wyniki analizy bioinformatycznej

W ramach prowadzonej analizy bioinformatycznej mającej na celu predykcję sekwencji aminokwasowych potencjalnych epitopów oraz ich lokalizację w obrębie poszczególnych białek wytypowano 32 peptydy w obrębie enolazy (Tabela 11), 36 sekwencji dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny (Tabela 12) oraz 41 najbardziej prawdopodobnych epitopów dla białka opiekuńczego GroEL (Tabela 13).

Peptydy te, poza metodami predykcyjnymi opisanymi w metodyce, wybrane zostały w oparciu o przewidywanie struktury 3D analizowanych białek, regionów pętli oraz hydrofobowości aminokwasów w ich obrębie.

Enolaza

Pierwszym z wybranych do analizy immunogennych białek GBS była enolaza o masie cząsteczkowej 45 kDa składająca się z 432 aminokwasów, których sekwencję przedstawiono na Ryc. 13 (numer identyfikacyjny w bazie NCBI Blast dla białek: gi|77173617). Dla niniejszego białka określono także strukturę II-rzędową (Ryc. 14) oraz hydrofobowość poszczególnych aminokwasów (Ryc. 15).

1	ITDVYAREVL	DSRGNPTLEV	EVYTESGAFG	RGMVXSGAST	GEHEAVELRD	GDKSRYGGLG
61	TQKAVDNVNN	VIAEAIIGYD	VRDQQAIDRA	MIALDGTPNK	GKLGANAILG	VSIAVARAAA
121	DYLEVPLYSY	LGGFNTKVLV	TPMMNIINGG	SHSDAPIAFQ	EFMIMPVGAP	TFKEALRWGA
181	EVFHALKKIL	KERGLETAGV	DEGGFAPKFE	GTEDGVETIL	KAIEAAGYEA	GENGIMIGFD
241	CASSEFYDAE	RKVYDYSKFE	GEGGAVRTAA	EQIDYLEELV	NKYPIITIED	GMDENDWDG
301	WKALTERLGG	RVQLVGDDFF	VTNTDYLARG	IKEEAANSILI	KVNQIGTLTE	TFEAIEMAKE

361 AGYTAVVSHR SGETEDSTIA DIAVATNAGQ IKTGSLSRD RIAKYNQLLR IEDQLGEVAQ
 421 YKGIKSFYNL KK

Ryc. 13. Sekwencja aminokwasowa białka enolaza dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

```

ITDVYAREVLDSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVELRDGDKSRYGGLGTQKAVDNVNNVIAEAIIGYDVRDQQA
--EEEEEEEE-----EEEEEEEE---E-EEEE-----EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHH
IDRAMIALDGTPNKGLGANAILGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNTKVLPTPMMNIINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAPTFK
HHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHH-----EEEE-----EEEE-----HH
EALRWGAEVFHALKKILKERGLETAVGDEGGFAPKFEGTEDGVETILKAIEAAGYEAGENGIMIGFDCASSEFYDAERKVDYDYSKFE
HHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEE--HHHHH---EEE-----
GEGGAVRTAAEQIDYLEELVNKYPIITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLARGIKEEAANSILIKVNQIGT
-----HHHHHHHHHHHHHH---EEEE-----HHHHHHHHHHHH---EEEE--EE--HHHHHHHHHHHH---EEEEEE-----
LTETFEAIEMAKEAGYTAVVSHRSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSRTRIAKYNQLLRIEDQLGEVAQYKGIKSFYNLKK
HHHHHHHHHHHHHH---EEEE-----HHHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHH---HHHH-----

```

Ryc. 14. Struktura drugorzędowa enolazy GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej. Legenda: „E” – β -harmonijki, „H” – α -helisy, „-” – pętle.

```

ITDVYAREVLDSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVELRDGDKSRYGGLGTQKAVDNVNNVIAEAIIGYDVRDQQAID
--B-BBBBBBBB-BBBBBBBBBBBB---BBBBBBB-----BB-B-----BBB-BBB-BB--B---BB--B--B-----B-
RAMIALDGTPNKGLGANAILGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNTKVLPTPMMNIINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAPTFKEAL
-BBB-B-----BBB-BBBBBBBBBBBB-BBB--B-B-BB-BB--B-B--B-BBBBBBBB-----BB--B-B--BBBBBBB-B--B-BB
RWGAEVFHALKKILKERGLETAVGDEGGFAPKFEGTEDGVETILKAIEAAGYEAGENGIMIGFDCASSEFYDAERKVDYDYSKFEGEGG
-BBB-BB-BB--BB---B---BB---BBB--B-----BB-BBB-BB--B-B-----BBBBBBBBBBB--BB---B-B-B-----
AVRTAAEQIDYLEELVNKYPIITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLARGIKEEAANSILIKVNQIGTLTETF
--B---BB-BB--BB--B-BB-B---B---B-BB--BB--B---B-BBB--BBBB-B--B--BB---BB-BBBB-B--B--B--BB
EAIEMAKEAGYTAVVSHRSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSRTRIAKYNQLLRIEDQLGEVAQYKGIKSFYNLKK
-BB-BB---BBBBBBB-----B-BBBB-BBB-B-B---B-----B--B--BB-B---B---B-B--BB--B--

```

Ryc. 15. Wyniki analizy hydrofobowości poszczególnych aminokwasów w sekwencji białka enolaza GBS. Legenda: „B” – aminokwasy, których reszty skierowane są do wnętrza białka (ang. *buried* – zagrzebany); „-” – aminokwasy, których reszty wystawione są na zewnątrz białka, w stronę rozpuszczalnika.

W oparciu o narzędzia predykcyjne Eminiego, Kolaskara i Tongaonkara, Larsena oraz serwera BCPREDS, jako potencjalne epitopy enolazy wytypowano kolejno 9 peptydów (Tabela 6), 18 peptydów (Tabela 7), 21 sekwencji (Tabela 8) i 7 peptydów (Tabela 9).

Tabela 6 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy w oparciu o metodę predykcji Eminiego.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	48	54	RDGDKSR	7
2	79	86	DVRDQQAI	8
3	95	100	GTPNKG	6
4	206	211	PKFEGT	6
5	243	259	SEFYDAERKVDYDYSKFE	17
6	290	297	GMDENDWD	8
7	328	333	GIKEEA	6
8	369	376	RSGETEDS	8
9	393	406	GSLSRTDRIAKYNQ	14

Tabela 7 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy w oparciu o metodę predykcji Kolaskara i Tongaonkara.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	4	12	VYAREVLDS	9
2	17	25	TLEVEVYTE	9
3	64	83	VDNVNNVIAEAIIGYDVRDQ	20
4	104	131	ANAILGVSI AVARAAADYLEVP LYSYLG	28
5	135	140	TKVLPT	6
6	153	160	DAPIAFQE	8
7	163	169	IMPVGAP	7
8	178	188	GAEV FHALKKI	11
9	216	222	ETILKAI	7
10	237	245	GFDCASSEF	9
11	249	256	ERKVYDYS	8
12	271	286	QIDYLEELVNKYPIIT	16

13	308	317	GRVQLVGDDF	10
14	335	344	NSILIKVNQI	10
15	362	369	YTAVVSHR	8
16	378	386	IADIAVATN	9
17	404	411	YNQLLRIE	8
18	414	424	LGEVAQYKGIK	11

Tabela 8 Sekwencje aminokwasowe enolazy wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	10	18	LDSRGNPTL	9
2	23	29	YTESGAF	7
3	34	65	VSGASTGEHEAVELRDGDKSR YGGGLGTQKAVD	32
4	80	85	VRDQQA	6
5	94	102	DGTPNKGKL	9
6	137	138	VL	2
7	148	156	GGSHSDAPI	9
8	168	171	APTF	4
9	194	215	LETAVGDEGGFAPKFEGTEDG V	22
10	224	231	AAGYEAGE	8
11	243	243	S	1
12	245	247	FYD	3
13	250	253	RKVY	4
14	257	270	KFEGEGGAVRTAAE	14
15	289	299	DGMDENDWDGW	11
16	301	301	A	1
17	330	333	KEEA	4
18	359	361	EAG	3

19	368	378	HRSGETEDSTI	11
20	386	397	NAGQIKTGSLSR	12
21	415	416	GE	2

Tabela 9 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS.

Pozycja	Peptyd	Wynik
11	DSRGNPTLEVEVYTESGAFG	0.961
36	SGASTGEHEAVELRDGDKSR	0.932
88	DRAMIALDGTTPNKGKLGANA	0.822
157	IAFQEFMIMPVGAPTFKEAL	0.966
196	ETAVGDEGGFAPKFEGTEDG	0.97
249	AERKVYDYSKFEGEGGAVRT	0.968
285	IITIEDGMDENDWDGWKALT	0.882

1 ITDVYAREVLD~~SRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVEL~~~~RDGDKSR~~YGGGLGTQKAVDNNVNVIAEAIIGY~~DVRDQQA~~
2 ITD~~VYAREVLD~~~~SRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVELRDGDKSR~~YGGGLGTQKA~~V~~~~DNNVNVIAEAIIGYD~~~~VRDQQA~~
3 ITDVYAREV~~L~~~~DSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVELRDGDKSR~~YGGGLGTQKAVDNNVNVIAEAIIGYD~~VRDQQA~~
4 ITDVYAREVL~~DSRGNPTLEVEVYTESGAFGRGMVXSGASTGEHEAVELRDGDKSR~~YGGGLGTQKAVDNNVNVIAEAIIGYD~~VRDQQA~~

1 ~~I~~DRAMIALD~~GTPNKGK~~LGANA~~I~~LGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNTKVLPTPMMNIINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAPTF
2 IDRAMIALDGTTPNKGKLGANA~~I~~LGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNT~~KVLPTPMMNIINGGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAPTF~~
3 IDRAMIAL~~DGTTPNKGK~~LGANA~~I~~LGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNTKVLPTPMMNIIN~~GGSHSDAPIAFQEFMIMPVGAPTF~~
4 I~~DRAMIALDGTTPNKGK~~LGANA~~I~~LGVSIAVARAAADYLEVPLYSYLGGFNTKVLPTPMMNIINGGSHSDAP~~IAFQEFMIMPVGAPTF~~

1 KEALRWGAEV~~FHALKKILKERGLE~~TAVGDEGGFA~~PKFEGTEDGVETILKAIEAAGYEAGENGIMIGFDCAS~~~~SEFYDAERKVYDYSK~~
2 KEALRW~~GAEV~~~~FHALKKILKERGLE~~TAVGDEGGFAPKFEGTEDGV~~ETILKAIEAAGYEAGENGIMI~~~~GFD~~~~CASSEFYDAERKVYDYSK~~
3 KEALRWGAEV~~FHALKKILKERGLE~~TAVGDEGGFAPKFEGTEDGVETILKAIEAAGYEAGENGIMIGFDCASSEFYDAE~~ERKVYDYSK~~
4 ~~KEALRWGAEV~~~~FHALKKILKERGLE~~TAVGDEGGFAPKFEGTEDGV~~ETILKAIEAAGYEAGENGIMIGFDCASSEFYDAERKVYDYSK~~

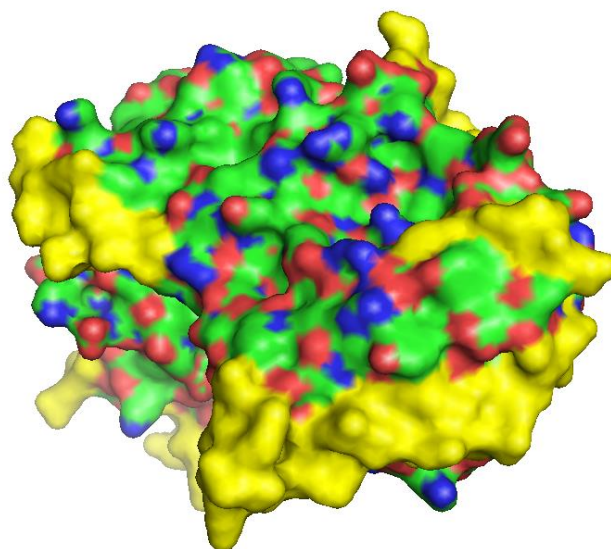
1 ~~FE~~GEGGAVRTAAEQIDYLEELVNKYP~~IITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLAR~~~~GIKEEAANSILIKVNO~~
2 FE~~GEGGAVRTAAEQIDYLEELVNKYP~~~~IITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLAR~~~~GIKEEAANSILIKVNO~~
3 ~~FE~~GEGGAVRTAAEQIDYLEELVNKYP~~IITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLAR~~~~GIKEEAANSILIKVNO~~
4 ~~FE~~GEGGAVRTAAEQIDYLEELVNKYP~~IITIEDGMDENDWDGWKALTERLGGRVQLVGDDFFVTNTDYLAR~~~~GIKEEAANSILIKVNO~~

1 IGTLTETFEAIEAKEAGYTAVVSH~~RSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSR~~TDRIAKYNQLLR~~IEDQLGEVAQYKGIKSFYNL~~
2 ~~I~~GTLTETFEAIEAKEAGYTAVVSH~~RSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSR~~TDRIAKYNQLLR~~IEDQLGEVAQYKGIKSFYNL~~
3 IGTLTETFEAIEAKEAGYTAVVSH~~RSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSR~~TDRIAKYNQLLR~~IEDQLGEVAQYKGIKSFYNL~~
4 IGTLTETFEAIEAKEAGYTAVVSH~~RSGETEDSTIADIAVATNAGQIKTGSLSR~~TDRIAKYNQLLR~~IEDQLGEVAQYKGIKSFYNL~~

- 1 KK
- 2 KK
- 3 KK
- 4 KK

Ryc. 16. Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla enolazy GBS. Legenda: Kolorem liliowym (1) oznaczono potencjalne epitopy wytypowane według procedury Eminiego [48], kolorem czerwonym (2) możliwe determinanty antygenowe przewidziane według metodyki Kolaskara i Tongaonkara [97], na zielono (3) zaznaczono immunogenne sekwencje wytypowane przez Larsena [112], z kolei kolorem żółtym (4) oznaczono najbardziej prawdopodobne epitopy przewidziane za pośrednictwem serwera BCPERDS [2].

Dodatkowo, wykonano model białka 3D na podstawie struktury krystalicznej 1w6t oktamerycznej enolazy *Streptococcus pneumoniae*. Na Rycinie 17 kolorem żółtym oznaczono potencjalne epitopy.



Ryc. 17. Model 3D białka enolaza dla *Streptococcus pneumoniae* z zaznaczonymi na żółto potencjalnymi epitopami wiążącymi.

Analiza wyników zestawionych na Ryc. 16 umożliwiła wybranie 32 peptydów o sekwencjach od sześciu do szesnastu aminokwasów, które wytypowane zostały przez co najmniej dwie techniki predykcyjne i wymienione zostały w Tabeli 10.

Tabela 10 Lista wszystkich 32 sekwencji aminokwasowych dla białka enolaza poddanych syntezie na pinach metodą PepsScan, które wybrane zostały w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej.

Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa	Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa
1	⁴ VYAREVLDSRGNPT ¹⁷	17	²³⁷ GFDCASSEFYD ²⁴⁵
2	¹⁷ TLEVEVYTESGAFG ³⁰	18	²⁴³ SEFYDAERKVYDYS ²⁵⁶
3	³⁴ VSGASTGEHEAVELR ⁴⁸	19	²⁵⁷ KFEGEGGAVRTAAE ²⁷⁰
4	⁴⁸ RDGDKSRYGGLGTQ ⁶¹	20	²⁷¹ QIDYLEELVNKYP ²⁸³
5	⁶¹ QKAVDNVNNVIAEA ⁷⁴	21	²⁸⁴ IITIEDGMDENDWD ²⁹⁷
6	⁷⁵ IIGYDVRDQQAI ⁸⁶	22	²⁹⁸ GWKALT ³⁰⁵
7	⁸⁸ DRAMIALDGTPNKG ¹⁰¹	23	³⁰⁸ GRVQLVGDDF ³¹⁷
8	¹⁰² KLGANAILGVSIAVA ¹¹⁶	24	³²⁸ GIKEEAA ³³⁴
9	¹¹⁷ RAAADYLEVPLYSYLG ¹³¹	25	³³⁴ ANSILIKVNQI ³⁴⁴
10	¹³⁵ TKVLPT ¹⁴⁰	26	³⁵⁹ EAGYTAVVSHR ³⁶⁹
11	¹⁴⁸ GSHSDAPIAFQEF ¹⁶¹	27	³⁶⁸ HRSGETEDSTI ³⁷⁸
12	¹⁶² MIMPVGAPTFKEAL ¹⁷⁵	28	³⁷⁸ IADIAVATN ³⁸⁶
13	¹⁷⁸ AEVFHALKKI ¹⁸⁸	29	³⁸⁶ NAGQIKTGSLSR ³⁹⁷
14	¹⁹⁴ LETAVGDEGGFAPK ²⁰⁷	30	³⁹³ GSLSRTDRIAKYNQ ⁴⁰⁶
15	²⁰⁸ FEGTEDGVETILKAI ²²²	31	⁴⁰⁴ YNQLLRIE ⁴¹¹
16	²²⁴ AAGYEAGE ²³¹	32	⁴¹⁴ LGEVAQYKGIK ⁴²⁴

Dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny

Kolejnym immunogennym białkiem *Streptococcus agalactiae* wybranych do analizy bioinformatycznej w kierunku detekcji potencjalnych epitopów immunogennych białek GBS była **dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny (IMPDH)** o masie cząsteczkowej 53 kDa, składająca się z 493 aminokwasów, których sekwencję przedstawiono na Rycinie 18 (numer identyfikacyjny w bazie NCBI Blast dla białek: gi|445995589). Dla niniejszego białka określono także strukturę II-rzędową (Ryc. 19) oraz hydrofobowość poszczególnych aminokwasów (Ryc. 20).

1	MSNWDTKFLK	KGFTFDDVLL	IPAESHVLPN	EVDMNTKLAD	NLTNIPIT	AAMDTVTDISK
61	MAIAIARAGG	LGIHKNSI	VDQAEVRKV	KRSENGVIID	PFFLTPDNTV	SEAEELMQNY
121	RISGVPIVET	IENRKLVGII	TNRDMRFISD	YKQLISEHMT	SQNLVTAPIG	TDLETAERIL
181	HEHRIEKLPL	VDDEGRLSGL	ITKDIEKVI	EFPKAAKDEF	GRLLVAGAVG	VTSDTFERA
241	ALFEAGADAI	VIDTAHGSA	GVLRKIAEIR	AHFPNRTLIA	GNIATAEGAR	ALYDAGVDVV
301	KVGIGPGSIC	TTRVVAGVGV	PQITAIYDAA	AVAREYGKTI	IADGGIKYSG	DIVKALAAGG
361	NAVMLGSMFA	GTDEAPGETE	IFQGRKFKTY	RGMGSIAAMK	KGSSDRYFQG	SVNEANKLVP
421	EGIEGRVAYK	GSVADIVFQM	LGGIRSGMGY	VGAANIKELH	DNAQFVEMSG	AGLKESHPHD
481	VQITNEAPNY	SVH				

Ryc. 18. Sekwencja aminokwasowa białka IMPDH dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

```

MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLIPAESHVLPNEVDMNTKLADNLTNIPITAAAMDTVTDISKMAIAIARAGGLGIHKNSIVDQAEVR
-----HHHHH-----EEEE-----EEEE---EEE---EEE-----HHHHHHHHHHH---EEEE---HHHHHHHHH
KVKRSENGVIIDPFFLTPDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKLVGIIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTDLETA
HHH-----EE---E-----HHHHHHHHHH-----EEEE-----EEEEEEE-----HHH-----EEE-----HHHH
ERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIIEFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTSDFERAALFEAGADAIVIDTAHGHSAGVLR
HHHHHHH-----EEE-----EEEEEEHHHHHHHHH-----EEEEEEE-----HHHHHHHHHHH-----EEEE-----HHHHH
KIAEIRAHPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVIGPGSICTTRVVAGVGVGPQITAIYDAAAVAREYGKTIADGGIKYSGDI
HHHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHH-----EEEE-----EEE-----HHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE-----HH
VKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYKGSVADIVFQM
HHHHHH-----EEEE---HH-----EEEE---EEE-----HHHHH-----H-----HHHHHHHH
LGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH
H--HH-----HHHHHH---EEEE-----EEEE-----

```

Ryc. 19. Struktura drugorzędowa IMPDH GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej. Legenda: „E” – β -harmonijki, „H” – α -helisy, „-” – pętle.

```

MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLIPAESHVLPNEVDMNTKLADNLTNIPITAAAMDTVTDISKMAIAIARAGGLGIHKNSIV
DQAEVR
--B--BB--BBBBBBBBBB--B--BBB--B--B--BB--B--BBBBBBBBBBBBBBBB--BBBBBB--BBBBBB--B--B--BB--B--
KVKRSENGVIIDPFFLTPDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKLVGIIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTDLETA
-B--BB--BBB--BBB--B--B--B--BB--B--BBBBBBB-----BBBBBB--BBBBB-----B--BBB--BBBB--B--B--B--
ERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIIEFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTSDFERAALFEAGADAIVIDTAHGHSAGVLR
--BB--B--B--BBBBB-----B--BBBBB--BB--B--BB--BB--B--BBBBBBBBBBBBBB--B--BB--BBB--B--BBBBBBBBBBBBBB--BB-
KIAEIRAHPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVIGPGSICTTRVVAGVGVGPQITAIYDAAAVAREYGKTIADGGIKYSGDI
BB--BB--B--B--BBBBBBBBBB--BB--BBB--BBB--BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB--BB--BBB--BBBBB
VKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYKGSVADIVFQM
BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB--BBB--B--BBE-----BBBBBBB--BB--B--BBBBB-----BBBBB--BBBBBBB--B--BB--BBBBB
LGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH
BBBBBBBBBBBBBB--B--B--B--BBBBB--B--B--BBB--B--BB--BBBBB--

```

Ryc. 20. Wyniki analizy hydrofobowości poszczególnych aminokwasów w sekwencji białka IMPDH GBS. Legenda: „-” zaznaczono aminokwasy, których reszty wystawione

są na zewnętrzną część białka; „B” – aminokwasy zakopane (ang. *buried*), czyli takie, których reszty skierowane są do wnętrza białka.

W oparciu o narzędzia predykcyjne Eminiego, Kolaskara i Tongaonkara, Larsena oraz serwera BCPREDS, jako potencjalne epitopy IMPDH wytypowano kolejno 12 peptydów (Tabela 11), 20 peptydów (Tabela 12), 24 sekwencji (Tabela 13) i 7 peptydów (Tabela 14).

Tabela 11 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Eminiego.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	30	39	NEVDMNTKLA	10
2	83	94	QAEEVRKVKRSE	12
3	105	121	TPDNTVSEAEELMQNYR	17
4	130	135	TLENRK	6
5	148	154	ISDYKQL	7
6	213	220	PKAAKDEF	8
7	234	239	DTFERA	6
8	372	378	TDEAPGE	7
9	383	392	QGRKFKTYRG	10
10	399	408	MKKGSSDRYF	10
11	457	462	KELHDN	6
12	473	479	LKESHPH	7

Tabela 12 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Kolaskara i Tongaonkara.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	15	31	FDDVLLIPAESHVLPNE	17
2	44	51	LNIPITA	8
3	96	105	GVIIDPFFLT	10
4	122	130	ISGVPIVET	9
5	149	157	SDYKQLISE	9
6	162	168	QNLVTAP	7
7	178	183	RILHEH	6
8	185	192	IEKLPLVD	8
9	198	204	SGLITIK	7
10	206	213	IEKVIEFP	8
11	221	234	GRLLVAGAVGVTSD	14
12	239	245	AEALFEA	7
13	248	255	DAIVIDTA	8
14	257	266	GHSAGVLRKI	10
15	289	335	ARALYDAGVDVVKVGIGPGSIC TTRVVAGVGVQPITAIYDAAAV ARE	47
16	349	357	SGDIVKALA	9
17	415	422	ANKLVPEG	8
18	425	441	GRVAYKGSVADIVFQML	17
19	448	454	MGYVGAA	7
20	462	468	NAQFVEM	7

Tabela 13 Sekwencje aminokwasowe dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	1	3	MSN	3
2	26	29	HVLP	4
3	32	34	VDM	3
4	37	37	K	1
5	54	58	DTVTD	5
6	85	93	EEVRKVKRS	9
7	104	104	L	1
8	107	113	DNTVSEA	7
9	115	115	E	1
10	168	174	PIGTDLE	7
11	190	196	LVDDEGR	7
12	214	218	KAAKD	5
13	230	237	GVTSDTFE	8
14	256	258	HGH	3
15	284	291	ATAEGARA	8
16	304	309	IGPGSI	6
17	320	321	VP	2
18	332	335	VARE	4
19	341	341	I	1
20	345	348	GIKY	4
21	358	358	A	1
22	370	382	AGTDEAPGETEIF	13
23	400	426	KKGSSDRYFQGSVNEANKLV PEGIEGR	27
24	428	429	AY	2

Tabela 14 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS.

Pozycja	Peptyd	Wynik
69	GGLGIIHKNMSIVDQAEVR	0.987
100	DPFFLTPDNTVSEAEELMQN	0.91
297	VDVVKVGIGPGSICTTRVVA	0.983
370	AGTDEAPGETEIFQGRKFKT	0.835
410	GSVNEANKLVPEGIEGRVAY	0.988
436	IVFQMLGGIRSGMGYVGAAN	0.848
474	KESHPHDVQITNEAPNYSVH	0.787

1 MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLI PAESHVLPNEVDMNTKLDNLT LNIP I I TAAMD TVTDSKMAIAIARAGGLGI IHKNMSIVDQAEV

2 MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLI PAESHVLPNEVDMNTKLDNLT LNIP I I TAAMD TVTDSKMAIAIARAGGLGI IHKNMSIVDQAEV

3 MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLI PAESHVLPNEVDMNTKLDNLT LNIP I I TAAMD TVTDSKMAIAIARAGGLGI IHKNMSIVDQAEV

4 MSNWDTKFLKKGFTFDDVLLI PAESHVLPNEVDMNTKLDNLT LNIP I I TAAMD TVTDSKMAIAIARAGGLGI IHKNMSIVDQAEV

1 VRKVKRSENGVIIDPFFLT PDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKL VGIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTD

2 VRKVKRSENGVIIDPFFLT PDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKL VGIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTD

3 VRKVKRSENGVIIDPFFLT PDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKL VGIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTD

4 VRKVKRSENGVIIDPFFLT PDNTVSEAEELMQNYRISGVPIVETLENRKL VGIITNRDMRFISDYKQLISEHMTSQNLVTAPIGTD

1 LETAERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIFFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTS DTFERAALFEAGADAIVIDTAHGH

2 LETAERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIFFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTS DTFERAALFEAGADAIVIDTAHGH

3 LETAERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIFFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTS DTFERAALFEAGADAIVIDTAHGH

4 LETAERILHEHRIEKLPLVDDEGRLSGLITIKDIEKVIFFPKAAKDEFGRLLVAGAVGVTS DTFERAALFEAGADAIVIDTAHGH

1 SAGVLRKIAEIRAHFPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVGIGPGSICTTRVVAGVGVQPITAIYDAAAVAREYGKTIADG

2 SAGVLRKIAEIRAHFPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVGIGPGSICTTRVVAGVGVQPITAIYDAAAVAREYGKTIADG

3 SAGVLRKIAEIRAHFPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVGIGPGSICTTRVVAGVGVQPITAIYDAAAVAREYGKTIADG

4 SAGVLRKIAEIRAHFPNRTLIAGNIATAEGARALYDAGVDVVKVGIGPGSICTTRVVAGVGVQPITAIYDAAAVAREYGKTIADG

1 GIKYSGDIVKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYK

2 GIKYSGDIVKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYK

3 GIKYSGDIVKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYK

4 GIKYSGDIVKALAAGGNAVMLGSMFAGTDEAPGETEIFQGRKFKTYRGMGSIAMKKGSSDRYFQGSVNEANKLVPEGIEGRVAYK

1 GSVADIVFQMLGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH

2 GSVADIVFQMLGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH

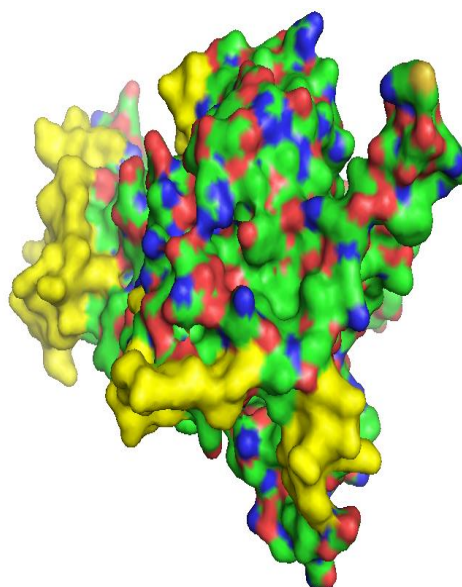
3 GSVADIVFQMLGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH

4 GSVADIVFQMLGGIRSGMGYVGAANIKELHDNAQFVEMSGAGLKESHPHDVQITNEAPNYSVH

Ryc. 21. Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny GBS. Legenda: Kolorem liliowym (1) oznaczono potencjalne epitopy wytypowane według procedury Eminiego [48], kolorem

czerwonym (2) możliwe determinanty antygenowe przewidziane według metodyki Kolaskara i Tongaonkara [97], na zielono (3) zaznaczono immunogenne sekwencje wytypowane przez Larsena [112], z kolei kolorem żółtym (4) oznaczono najbardziej prawdopodobne epitopy przewidziane za pośrednictwem serwera BCPERDS [2].

Ponadto, na podstawie modelu 3D dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyiny 1ZFJ dla *Streptococcus pyogenes* (EC 1.1.1.205) dokonano predykcji epitopów powierzchniowych tego białka, które na Rycinie 22. zaznaczono kolorem żółtym.



Ryc. 22. Model 3D dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyiny dla *Streptococcus pyogenes* z zaznaczonymi kolorem żółtym prawdopodobnymi epitopami powierzchniowymi.

Analiza wyników zestawionych na Ryc. 21 umożliwiła wybranie 36 peptydów o sekwencjach od sześciu do szesnastu aminokwasów, które wytypowane zostały przez co najmniej dwie techniki predykcyjne (Tabela 15).

Tabela 15 Lista wszystkich 36 sekwencji aminokwasowych dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny poddanych syntezie na pinach metodą Pepscan, które wybrane zostały w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej.

Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa	Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa
1	¹ MSNWDTKFLKKGFT ¹⁴	19	²³⁹ AEALFEA ²⁴⁵
2	¹⁵ FDDVLLIPAESHVLP ²⁹	20	²⁴⁸ DAIVIDTA ²⁵⁵
3	³⁰ NEVDMNTKLA ³⁹	21	²⁵⁶ HGHSAGVLRKI ²⁶⁶
4	⁴⁴ LNIPITAAMDTVTD ⁵⁸	22	²⁸⁴ ATAEGARALYDAGVD ²⁹⁸
5	⁶⁹ GGLGIIHKNMSIVD ⁸²	23	²⁹⁹ VVKVGIGPGSICTTR ³¹³
6	⁸³ QAEEVRKVKRSEN ⁹⁵	24	³¹⁴ VVAGVGVQPITAIYD ³²⁸
7	⁹⁶ GVIIDPFFLT ¹⁰⁵	25	³²⁹ AAAVAREYGKTI ³⁴¹
8	¹⁰⁴ LTPDNTVSEAEELMQ ¹¹⁸	26	³⁴⁵ GIKYSGDIVKALAA ³⁵⁷
9	¹¹⁹ NYRISGVPIVET ¹³⁰	27	³⁷⁰ AGTDEAPGETEIF ³⁸²
10	¹³⁰ TLENRK ¹³⁵	28	³⁸² QGRKFKTYRG ³⁹²
11	¹⁴⁸ ISDYKQLISE ¹⁵⁷	29	³⁹⁹ MKKGSSDRYFQGSVN ⁴¹³
12	¹⁶² QNLVTAPIGTDLE ¹⁶⁸	30	⁴¹⁴ EANKLVPEGIE ⁴²⁴
13	¹⁷⁸ RILHEH ¹⁸³	31	⁴²⁵ GRVAYKGSVAD ⁴³⁵
14	¹⁸⁵ IEKLPLVDDEGR ¹⁹⁶	32	⁴³⁶ VFQMLGGIR ⁴⁴⁵
15	¹⁹⁸ SGLITIK ²⁰⁴	33	⁴⁴⁶ SGMGYVGAAN ⁴⁵⁵
16	²⁰⁶ IEKVIEFPKAAKDEF ²¹³	34	⁴⁵⁷ KELHDNAQFVEM ⁴⁶⁸
17	²²¹ GRLLVAGAVG ²²⁹	35	⁴⁷³ LKESHPHDVQIT ⁴⁸⁴
18	²³⁰ GVTSDTFERA ²³⁹	36	⁴⁸⁵ NEAPNYSVH ⁴⁹³

Chaperon GroEL

Trzecim immunogennym białkiem GBS opisywanym w niniejszej pracy jest 540-aminokwasowe białko opiekuńcze GroEL (ang. *molecular chaperone* GroEL), którego masa cząsteczkowa wynosi 57 kDa (gi|446952722). Analiza bioinformatyczna umożliwiła, poza określeniem sekwencji poszczególnych aminokwasów w białku (Ryc.

23), charakterystykę struktury drugorzędowej (Ryc. 24) oraz hydrofobowości poszczególnych aminokwasów (Ryc. 25).

1	MAKD	IKFSAD	ARSAMVRGVD	ILADTVKVTL	GPKGRNVVLE	KAFGSPLITN	DGVTIAKEIE
61	LEDHFENMGA	KLVSEVASKT	NDIAGDGTTT	ATVLTQAIVR	EGLKNVTAGA	NPIGIRRGIE	
121	TAVSAAIEEL	KEIAQPVSGK	EAIQVAAVS	SRSEKVG EYI	SEAMERVGND	GVITIEESRG	
181	METELEVVEG	MQFDRGYLSQ	YMVTDNEK MV	SELENPYILI	TDKKISNIQE	ILPLLEEV LK	
241	TNRPLLIAD	DVDGEALPTL	VLNKIRGT FN	VVAVKAPGFG	DRRKAMLEDI	AILTGGTVVT	
301	EDLGLDLKDA	TMQVLGQSAK	VTVDK DSTVI	VEGAGDSSAI	ANRVAIKSQ	MEATTSDFDR	
361	EKLQERLAKL	AGGVAVIKVG	AATETELKEM	KLRIEDALNA	TRAAVEEGIV	SGGGTALVNV	
421	IEKVAALKLN	GDEETGRNIV	LRALEEPVRQ	IAYNAGYEGS	VIIERLKQSE	IGTGFNAANG	
481	EWVDMVTTGI	IDPVKVTRSA	LQNAASVASL	ILTTEAVVAN	KPEPEAPTAP	AMDPSMMGGF	

Ryc. 23. Sekwencja aminokwasowa białka opiekuńczego GroEL dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

```

MAKDIKFSADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSPLITNDGVTIAKEIELEDHFENMGA
KLVSEVASKTNDIAGDGTTTATVLTQAIVRREGLKNVTAGANPIGIRRGIE
TAVSAAVEELKEIAQPVSGKEIAQVAAVSSRSEKVG EYISEAMERVGNDGVITIE
ESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEV LK
TNRPLLIADVDGEALPTLVLNKIRGT FNVVAVKAPGFGDRRKAMLEDI
AILTGGTVVTEDLGLDLKDATMQVLGQSAKVTVDKDSTVIVEGAGDSSAI
ANRVAIKSQMEHATTSDFDREKLERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKEM
KLRIEDALNATRAAVEEGIVSGGGTALVNVIEKVAALKLNGDEETGRNIV
LRALEEPVRQIAYNAGYEGSVIIERLKQSEIGTGFNAANG
EWVDMVTTGIIDPVKVTRSA LQNAASVASLILTTEAVVANKPEPEAPT
AMDPSMMGGF

```

Ryc. 24. Struktura drugorzędowa białka opiekuńczego GroEL GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej. Legenda: „E” – β-harmonijki, „H” – α-helisy, „-” – pętle.

```

MAKDIKFSADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSPLITNDGVTIAKEIELEDHFENMGA
KLVSEVASKTNDIAGDGTTTATVLTQAIVRREGLKNVTAGANPIGIRRGIE
TAVSAAVEELKEIAQPVSGKEIAQVAAVSSRSEKVG EYISEAMERVGNDGVITIE
ESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEV LK
TNRPLLIADVDGEALPTLVLNK

```


Tabela 17 Peptydy chaperonu GroEL wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Kolaskara i Tongaonkara.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	16	31	VRGVDILADTVKVTLG	16
2	35	42	RNVVLEKA	8
3	70	77	AKLVSEVA	8
4	91	101	ATVLTQAIVRE	11
5	120	130	ETAVSAAVEEL	11
6	132	140	EIAQPVSGK	9
7	143	153	IAQVAAVSSRS	11
8	185	190	LEVVEG	6
9	195	202	RGYLSQYM	8
10	215	222	NPYILITD	8
11	228	238	IQEILPLLEEV	11
12	241	251	TNRPLLIADD	11
13	257	264	LPTLVLNK	8
14	268	277	TFNVVAVKAP	10
15	288	302	EDIAILTGGTVVTED	15
16	312	324	MQVLGQSAKVTVD	13
17	326	333	DSTVIVEG	8
18	341	348	ANRVAIK	8
19	364	382	QERLAKLAGGVAVIKVGA A	19
20	415	429	TALVNVIEKVAALKL	15
21	438	454	NIVLRALEEPVRQIAYN	17
22	458	466	EGSVIERL	9
23	491	499	IDPVKVTRS	9
24	501	521	LQNAASVASLILTTEAVVA NK	21

Tabela 18 Sekwencje aminokwasowe chaperonu GroEL wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Nr	Pozycja początkowa	Pozycja końcowa	Peptyd	Liczba aminokwasów
1	8	8	S	1
2	10	10	D	1
3	29	35	TLGPKGR	7
4	47	50	LITN	4
5	53	54	VT	2
6	77	91	ASKTNDIAGDGTTTA	15
7	105	114	NVTAGANPIG	10
8	124	124	S	1
9	134	142	AQPVSGKEA	9
10	149	158	VSSRSEKVGE	10
11	165	170	ERVGND	6
12	172	173	VI	2
13	178	182	SRGME	5
14	208	210	KMV	3
15	251	256	DVDGEA	6
16	276	282	APGFGDR	7
17	298	300	VVT	3
18	320	326	KVTVDKD	7
19	328	330	TVI	3
20	332	340	EGAGDSSAI	9
21	351	361	MEATTSDFDRE	11
22	381	387	AATETEL	7
23	399	399	N	1
24	403	405	AAV	3
25	408	415	GIVSGGGT	8
26	430	436	NGDEETG	7
27	449	449	R	1
28	454	458	NAGYE	5

29	469	481	SEIGTGFNAANGE	13
30	495	496	KV	2
31	502	502	Q	1
32	517	537	VVANKPEPEAPTAPAMDP SMM	21

Tabela 19 Peptydy chaperonu GroEL wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS.

Pozycja	Peptyd	Wynik
27	KVTLGPKGRNVVLEKAFGSP	0.911
73	VSEVASKTNDIAGDGTTTAT	0.998
105	NVTAGANPIGIRRGIEAVS	0.797
178	SRGMETELEVVEGMQFDRGY	0.993
199	SQYMVTDNEKMOVSELENPYI	0.739
267	GTFNVVAVKAPGFGDRRKAM	0.999
320	KVTVDKSTVIVEGAGDSSA	0.884
351	MEATTSDFDREKLQERLAKL	0.99
443	ALEPVRQIAYNAGYEGSVI	0.751
464	ERLKQSEIGTGFNAANGWV	0.982
485	MVTTGIIDPVKVTRSALQNA	0.848
516	AVVANKPEPEAPTAPAMDPS	1

Zestawienie powyżej przedstawionych wyników analiz (Ryc. 26) stanowiło podstawę do wybrania 41 peptydów (Tabela 20) o długościach 6-16 aminokwasów wytypowanych przez co najmniej dwie metody predykcyjne, które wykazywały cechy antygenowości i z dużym prawdopodobieństwem mogły stanowić epitopy wiążące ludzkie przeciwciała anti-GBS.

- MAKDIF SADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSP LITNDGVTIAKEIELEDHFENMGAKLVSEVASKTNDIAGD
 - MAKDIF SADARSAMVRGVDILADTVRVTLC PKGRNVVLEKAFGSP LITNDGVTIAKEIELEDHFENMGAKLVSEVASKTNDIAGD
 - MAKDIF SADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSP LITNDGVTIAKEIELEDHFENMGAKLVSEVASKTNDIAGD
 - MAKDIF SADARSAMVRGVDILADTVKVTLGPKGRNVVLEKAFGSP LITNDGVTIAKEIELEDHFENMGAKLVSEVASKTNDIAGD
-
- GTTTATVLTQAI VREGLK NVTAGANPIGIRRGIEAVSAAVEELKEIAQPVS GKEAIAQVAAVS SRSEKVG EYI SEAMERV GNDGV
 - GTTTATVLTQAI VREGLK NVTAGANPIGIRRGIEAVSAAVEELKEIAQPVS GKEAIAQVAAVS SRSEKVG EYI SEAMERV GNDGV
 - GTTTATVLTQAI VREGLK NVTAGANPIGIRRGIEAVSAAVEELKEIAQPVS GKEAIAQVAAVS SRSEKVG EYI SEAMERV GNDGV

4 GTTTAVLTQAIVREGLKNVTAGANPIGIRRGIIETAVSAAVEELKEIAQPVSGKEAIAQVAAVSSRSEKVG EYI SEAMERVGN DGV

1 ITIEESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMVTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEVLKTNRPLLI IADDVDGEALP
2 ITIEESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMVTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEV LKTNRPLLIADVDGEALP
3 ITIEESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMVTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEV LKTNRPLLIADVDGEALP
4 ITIEESRGMETELEVVEGMQFDRGYLSQYMVTDNEK MVSELENPYILITDKKISNIQEILPLLEEV LKTNRPLLI IADDVDGEALP

1 TLVLNKIRGTFNVVAVKAPGFGDRRKAMLEDIAILTGTVVTE DLGLDLKD ATMQVLGQS AKVTVDK DSTVIVEGAGDSSAI ANRV
2 TLVLNKIRGTFNVVAVKAPGFGDRRKAMLEDIAILTGTVVTE DLGLDLKD ATMQVLGQS AKVTVDK DSTVIVEGAGDSSAI ANRV
3 TLVLNKIRGTFNVVAVKAPGFGDRRKAMLEDIAILTGTVVTE DLGLDLKD ATMQVLGQS AKVTVDK DSTVIVEGAGDSSAI ANRV
4 TLVLNKIRGTFNVVAVKAPGFGDRRKAMLEDIAILTGTVVTE DLGLDLKD ATMQVLGQS AKVTVDK DSTVIVEGAGDSSAI ANRV

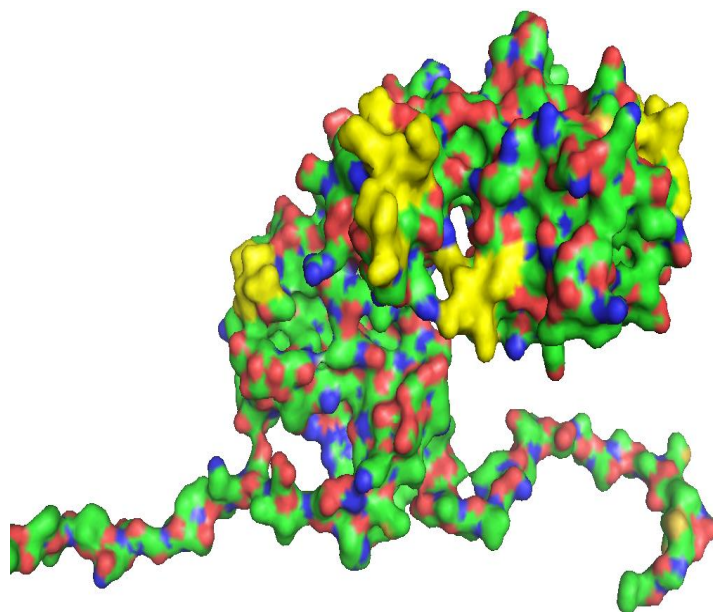
1 AIKKSQMEATTSDFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKEMKLRIEDALNATRAAVEEGIVSGG TALVNVIEKVAALKLN
2 AIKKSQMEATTSDFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKEMKLRIEDALNATRAAVEEGIVSGG TALVNVIEKVAALKLN
3 AIKKSQMEATTSDFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKEMKLRIEDALNATRAAVEEGIVSGG TALVNVIEKVAALKLN
4 AIKKSQMEATTSDFDREKLQERLAKLAGGVAVIKVGAATETELKEMKLRIEDALNATRAAVEEGIVSGG TALVNVIEKVAALKLN

1 GDEETGRNIVLRALEEPVRQIAYNAGYEGSVI IERLKQSEIGTGFNAANG EWVDMVTTGIIDPVKVTR SALQNAASVASLIL TTEA
2 GDEETGRNIVLRALEEPVRQIAYNAGYEGSVI IERLKQSEIGTGFNAANG EWVDMVTTGIIDPVKVTR SALQNAASVASLIL TTEA
3 GDEETGRNIVLRALEEPVRQIAYNAGYEGSVI IERLKQSEIGTGFNAANG EWVDMVTTGIIDPVKVTR SALQNAASVASLIL TTEA
4 GDEETGRNIVLRALEEPVRQIAYNAGYEGSVI IERLKQSEIGTGFNAANG EWVDMVTTGIIDPVKVTR SALQNAASVASLIL TTEA

1 VVANKPEPEAPTAPAMDPSMMGGF
2 VVANKPEPEAPTAPAMDPSMMGGF
3 VVANKPEPEAPTAPAMDPSMMGGF
4 VVANKPEPEAPTAPAMDPSMMGGF

Ryc. 26. Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla białka opiekuńczego GBS. Legenda: Kolorem liliowym (1) oznaczono potencjalne epitopy wytypowane według procedury Eminiego [48], kolorem czerwonym (2) możliwe determinanty antygenowe przewidziane według metodyki Kolaskara i Tongaonkara [97], na zielono (3) zaznaczono immunogenne sekwencje wytypowane przez Larsena [112], z kolei kolorem żółtym (4) oznaczono najbardziej prawdopodobne epitopy przewidziane za pośrednictwem serwera BCPERDS [2].

Rozmieszczenie epitopów prognozowano także w oparciu o trójwymiarowy model białka GroEL (Ryc. 27), który stworzono na podstawie struktury krystalicznej 3RTK opracowanej dla *Mycobacterium tuberculosis*.



Ryc. 27. Trójwymiarowy model białka opiekuńczego GroEL dla *Mycobacterium tuberculosis* z zaznaczonymi na żółto potencjalnymi epitopami wiążącymi przeciwciała.

Tabela 20 Lista wszystkich 41 sekwencji aminokwasowych białka opiekuńczego GroEL poddanych syntezy na pinach metodą Pepscan, które wybrane zostały w oparciu o wynik analizy bioinformatycznej.

Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa	Numer peptydu	Sekwencja aminokwasowa
1	¹⁶ VRGVDILADTVKV ²⁸	22	²⁸⁸ EDIAILTGGTVVTE ³⁰²
2	²⁹ TLGPKGRNVLEKA ⁴²	23	³¹² MQVLGQSAKVTVDKD ³²⁶
3	⁴¹ KAFGSPLITN ⁵⁰	24	³²⁶ DSTVIVEGAGDSSAI ³⁴⁰
4	⁵³ VTIAKEIELEDHF ⁶⁵	25	³⁴¹ ANRVAIIK ³⁴⁸
5	⁷⁰ AKLVSEVASKTN ⁸¹	26	³⁴⁹ SQMEATTSDFDRE ³⁶¹
6	⁸² DIAGDGTTTAT ⁹²	27	³⁶² KLQERLAKLA ³⁷¹
7	⁹¹ ATVLTQAI ¹⁰¹ RE ¹⁰¹	28	³⁷¹ AGGVAVIKVGAA ³⁸²
8	¹⁰⁵ NVTAGANPIGI ¹¹⁵	29	³⁸¹ AATETELKEMKLR ³⁹³
9	¹¹⁶ RRGIETAVSAAVEEL ¹³⁰	30	⁴⁰³ AAVEEGIVSGGGT ⁴¹⁵
10	¹³² EIAQPVSGKEA ¹⁴²	31	⁴¹⁵ TALVNVIEKVAALKL ⁴²⁹
11	¹⁴³ IAQVA ¹⁵⁸ AVSSRSEKVGE ¹⁵⁸	32	⁴³⁰ NGDEETG ⁴³⁶
12	¹⁶⁵ ERVGND ¹⁷⁰	33	⁴³⁸ NIVLRALEEPVRQIA ⁴⁵²

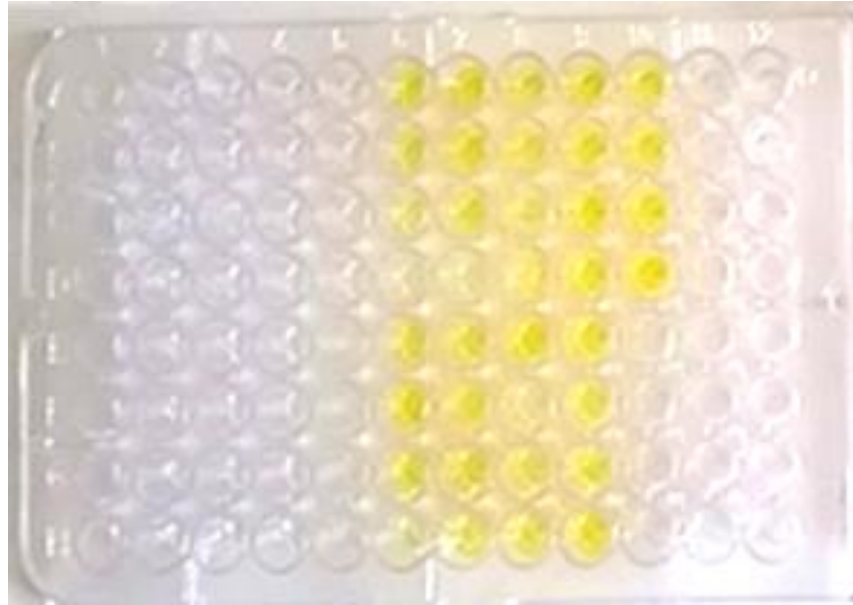
13	¹⁷² VITIEESRGME ¹⁸²	34	⁴⁵² AYNAGYEGSVIIERL ⁴⁶⁶
14	¹⁸³ TELEVVEGMQFDRGY ¹⁹⁷	35	⁴⁶⁴ ERLKQSE ⁴⁷⁰
15	¹⁹⁸ LSQYMVTDNEKMOV ²¹⁰	36	⁴⁶⁹ SEIGTGFNAANGWEV ⁴⁸³
16	²¹¹ SELENPYILTD ²²²	37	⁴⁸⁵ MVTTGIIDPVKV ⁴⁹⁶
17	²²⁸ IQEILPLLEEV ²³⁸	38	⁴⁹⁵ KVTRSALQNA ⁵⁰⁴
18	²³⁸ VLKTRPLLIADD ²⁵¹	39	⁵⁰¹ LQNAASVASLITTE ⁵¹⁵
19	²⁵¹ DVDGEALPTLVLNK ²⁶⁴	40	⁵¹⁶ AVVANKPEPEAP ⁵²⁷
20	²⁶⁷ GTFNVVAVKAPG ²⁷⁸	41	⁴²⁷ PTAPAMDPSMM ⁵³⁷
21	²⁷⁶ APGFGDRRKAM ²⁸⁶		

5. 3. Wyniki mapowania epitopów

- **Enolaza**

W wyniku detekcji epitopów, prowadzonej dzięki zastosowaniu metody Pepscan, oraz prowadzonych w jej następstwie testów immunoenzymatycznych (Ryc. 28) z zastosowaniem spulowanych próbek surowic krwi pępowinowej: 6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP i 16/KP, wybrano najbardziej reaktywne peptydy. Wybór mieszaniny kilku surowic GBS-dodatnich do mapowania epitopów w obrębie danego białka podyktowany został przez fakt ograniczeń, jakie niosą za sobą peptydy immobilizowane na polietylenowych pinach. Jak wynika z wytycznych producenta, liczba testów ELISA wykonanych dla jednego pina nie powinna przekraczać 10 reakcji. Dlatego też, aby przebadać jak największą ilość surowic, na podstawie których możliwe było wiarygodne wytypowanie potencjalnych epitopów, surowice zostały spulowane.

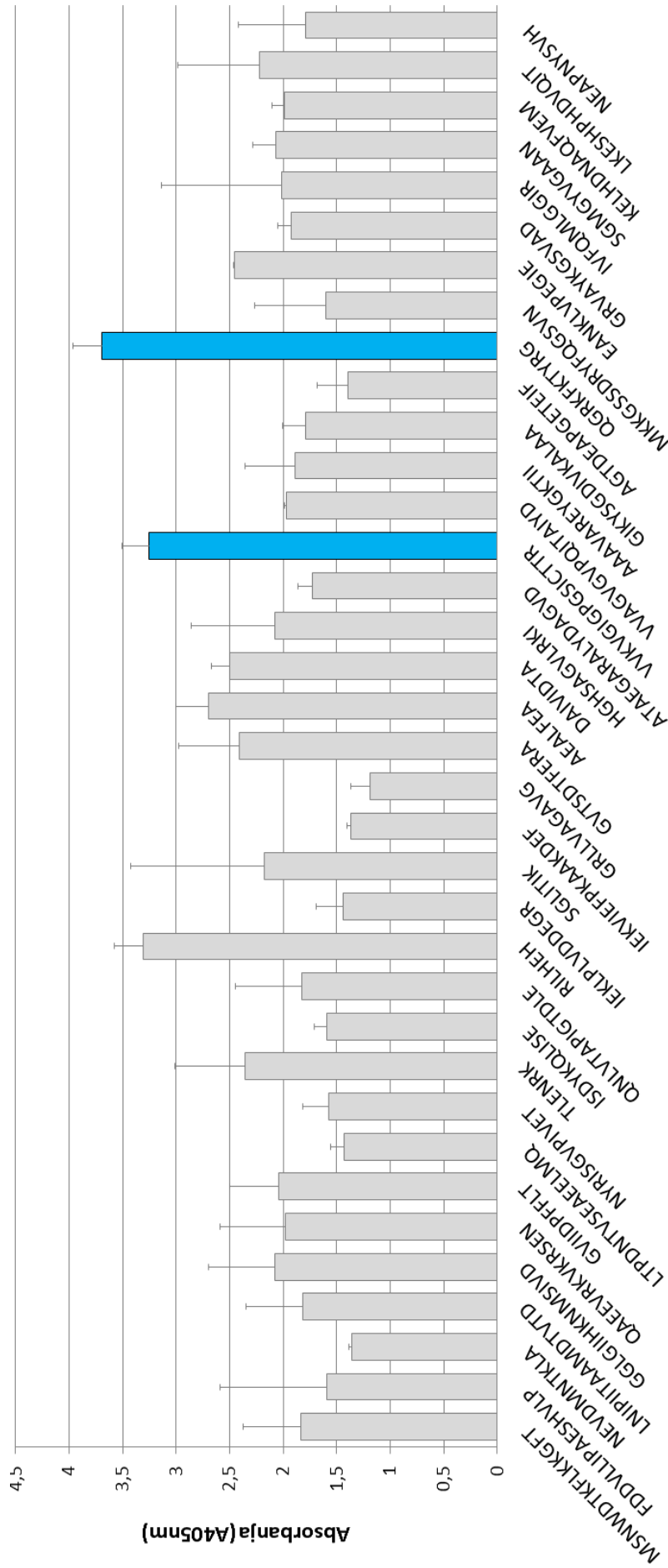
2 spośród 32 badanych sekwencji: ⁸⁸DRAMIALDGTPNKG¹⁰¹ (peptyd 7) i ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ (peptyd 9) wykazywały najwyższą absorbancję, a w trzykrotnym powtórzeniu charakteryzowały się małym odchyleniem standardowym, w przeciwieństwie do silnie reagującego peptydu 1 o sekwencji ⁴VYAREVLDSRGNPT¹⁷, którego odchylenie standardowe było tak duże, że podjęto decyzję o nieuwzględnieniu go w dalszych analizach. Wyniki mapowania epitopów wytypowanych w ramach analizy bioinformatycznej dla enolazy przedstawiono na Ryc. 29.



Ryc. 28. Przykładowe zdjęcie 96-dołkowej płytki, w której prowadzono immunoenzymatyczną detekcję immunogennych epitopów wśród 36 peptydów enolazy na pinach z użyciem koniugatu antyludzkich przeciwciał skoniugowanych z peroksydazą chrzanową.

- **Dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny**

Synteza 36 peptydów, które wybrane zostały w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej jako potencjalne epitopy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny, pozwoliła na wybranie dwóch najbardziej prawdopodobnych epitopów. Pierwszym z nich był peptyd 23 o sekwencji $^{299}\text{VVKVGIGPGSICTTR}^{313}$, drugim z kolei – peptyd 28, którego sekwencja była następująca: $^{382}\text{QGRKFKTYRG}^{392}$. Decyzja o odrzuceniu z dalszych analiz peptydu 13 ($^{178}\text{RILHEH}^{183}$) podyktowana została faktem, iż jest on najkrótszy spośród tych trzech najbardziej immunogennych sekwencji aminokwasowych. Reaktywności poszczególnych peptydów w obrębia białka IMPDH przedstawiona została na Ryc. 30.



Potencjalne epitopy dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny

Ryc. 30. Wykres przedstawiający immunoreaktywność wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP) 36 peptydów dehydrogenazy 5-monofosforanu inozyny dla gatunku *Streptococcus agalactiae*, która oceniona została w teście immunoenzymatycznym.

▪ Białko opiekuńcze GroEL

41 peptydów wytypowanych na podstawie analizy bioinformatycznej jako potencjalne epitopy syntetyzowano na pinach metodą Pepsan, a ich reaktywność, tak jak w przypadku pozostałych białek, oceniano w teście immunoenzymatycznym z wykorzystaniem surowicy krwi pępowinowej. Uzyskane wyniki były mniej oczywiste w porównaniu z tymi, które otrzymano dla enolazy i IMPDH, gdyż według przyjętego kryterium kwalifikacji, jakim była wartość absorbancji $\geq 2,0$, aż 9 peptydów powinno zostać wybranych do dalszych badań. Dlatego też, w wyborze najbardziej prawdopodobnych epitopów nałożono na siebie wyniki analiz bioinformatycznych i uzyskane w testach ELISA dane empiryczne. W rezultacie wybrano siedem: peptyd 3 o sekwencji ⁴¹KAFGSPLITN⁵⁰, peptyd 27 o sekwencji ³⁶²KLQERLAKLA³⁷¹, peptyd 28 o sekwencji ³⁷¹AGGVAVIKVGAA³⁸², peptyd 29 o sekwencji ³⁸¹AATETELKEMKLR³⁹³, peptyd 37 (⁴⁸⁵MVTTGIIDPVKV⁴⁹⁶), peptyd 38 (⁴⁹⁵KVTRSALQNA⁵⁰⁴) oraz peptyd 39 składający się z następujących ⁵⁰¹LQNAASVASLILTTE⁵¹⁵, z czego w dwóch przypadkach kryterium wyboru trzech znajdujących się obok siebie peptydów wynikało z faktu pokrywania się poszczególnych epitopów. Elementem łączącym peptyd 27 i peptyd 28 była alanina w pozycji 371, z kolei peptydy 28 i 29 łączyły dwie alaniny w pozycjach 381 i 382. Peptyd 29, mimo relatywnie niskiej reaktywności, został wybrany do dalszych badań, gdyż założono, że istnieje możliwość, iż determinanta antygenowa obejmuje obie te sekwencje. Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku obszaru białka obejmującego sekwencje aminokwasowe w pozycjach od 485 do 515, w obrębie których znajdowały się: peptyd 37, peptyd 38 oraz peptyd 39. Nakładały się one kolejno aminokwasami: lizyną i waliną w pozycjach 495-496 oraz odcinkiem Leu-Gln-Asn-Ala w pozycjach 501-504. Jak się okazało w dalszych analizach, z wyjątkiem epitopu będącego pochodną peptydu 29, który dwoma alaninami obejmował fragment wspólny z peptydem 28, założenie to nie znalazło pokrycia w wynikach uzyskanych w efekcie prowadzonych eksperymentów. Z kolei peptydy 21 i 22 nie zostały wybrane ze względu na duże odchylenie standardowe i stanowiły alternatywę w przypadku, gdyby spośród tej, i tak dużej, puli potencjalnych epitopów nie udało się wybrać przynajmniej jednego, specyficznym reagującego z pojedynczymi surowicami. Wtedy to one zostałyby włączone do dalszych badań. Absorbancje wszystkich 41 peptydów przedstawione zostały na Rycinie 31.

5. 4. Modyfikacja peptydów poprzez skracanie

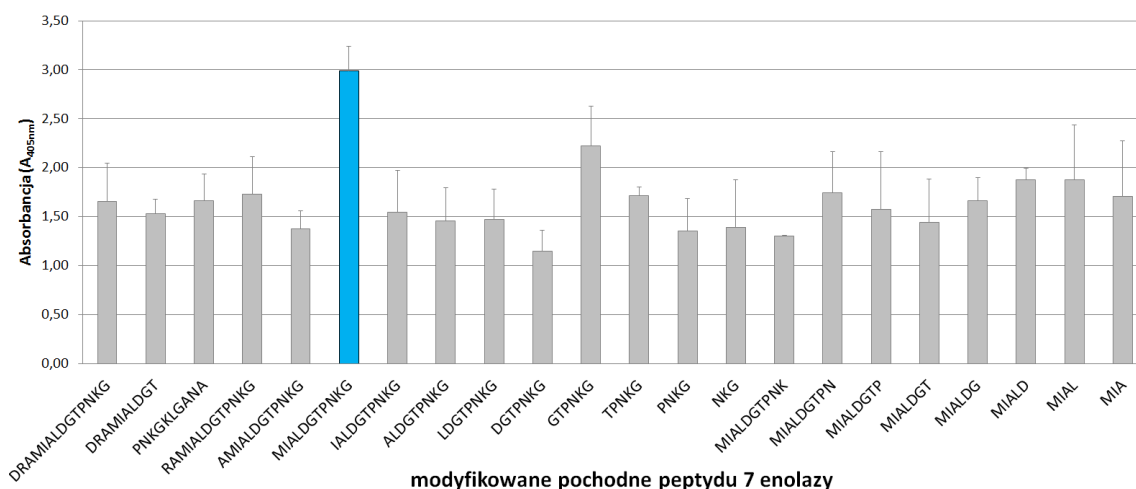
11 najbardziej immunogennych peptydów reprezentatywnych dla trzech badanych białek, wybranych w toku mapowania epitopów przy zastosowaniu metody Pepscan, poddano zmodyfikowanej syntezie, polegającej na odcinaniu kolejnych aminokwasów zarówno z N-końca, jak i C-końca. Celem tej modyfikacji była identyfikacja najkrótszej sekwencji aminokwasowej wysoce reagującej z surowicą ludzką, w której obecne są przeciwciała anti-GBS. Etap ten realizowany był także na pinach, a uzyskane wyniki opisane zostały poniżej.

▪ Enolaza

Na podstawie analizy wyników uzyskanych w efekcie skracania peptydu numer 7 o sekwencji $^{88}\text{DRAMIALDGTPNKG}^{101}$ zaobserwowano, że jego pochodna pozbawiona kwasu asparginowego (Asp, D), argininy (Arg, R) i alaniny (Ala, A) od C-końca wykazała 87% wzrost immunoreaktywności w porównaniu z sekwencją wyjściową.

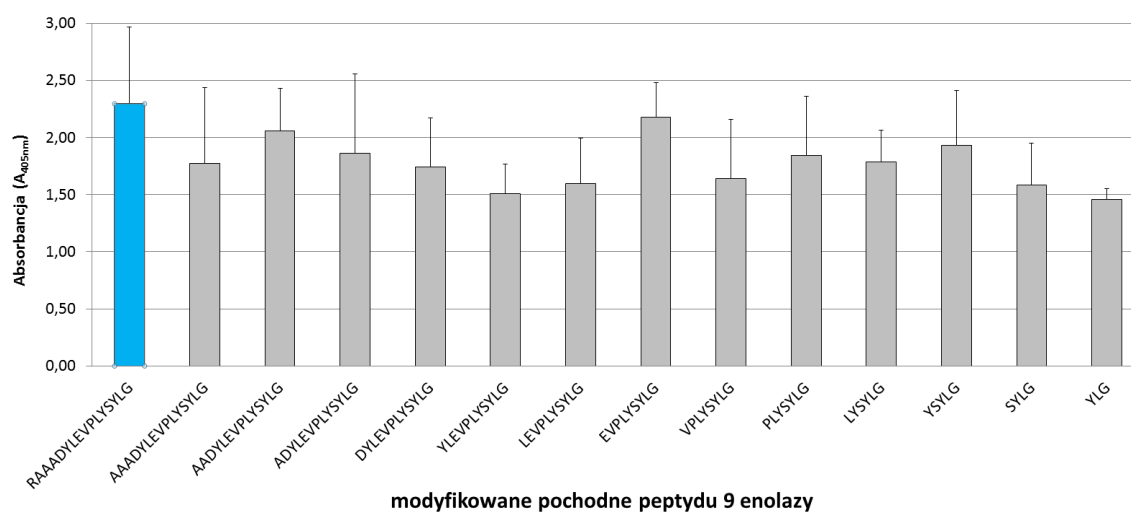
Z kolei skracanie peptydu 9 ($^{117}\text{RAAADYLEVPLYSYLG}^{131}$) nie wpłynęło na wzrost immunoreaktywności, dlatego niezmodyfikowany peptyd uznano za drugi najbardziej prawdopodobny epitop wiążący białko enolazę GBS.

Absorbancje poszczególnych skracanych peptydów wraz z odchyleniami standardowymi przedstawiono na Rycinie 32 i Rycinie 33.



Ryc. 32. Immunoreaktywność pochodnych peptydu $^{88}\text{DRAMIALDGTPNKG}^{101}$ (peptyd 7) enolazy *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych

aminokwasów od N-końca i C-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



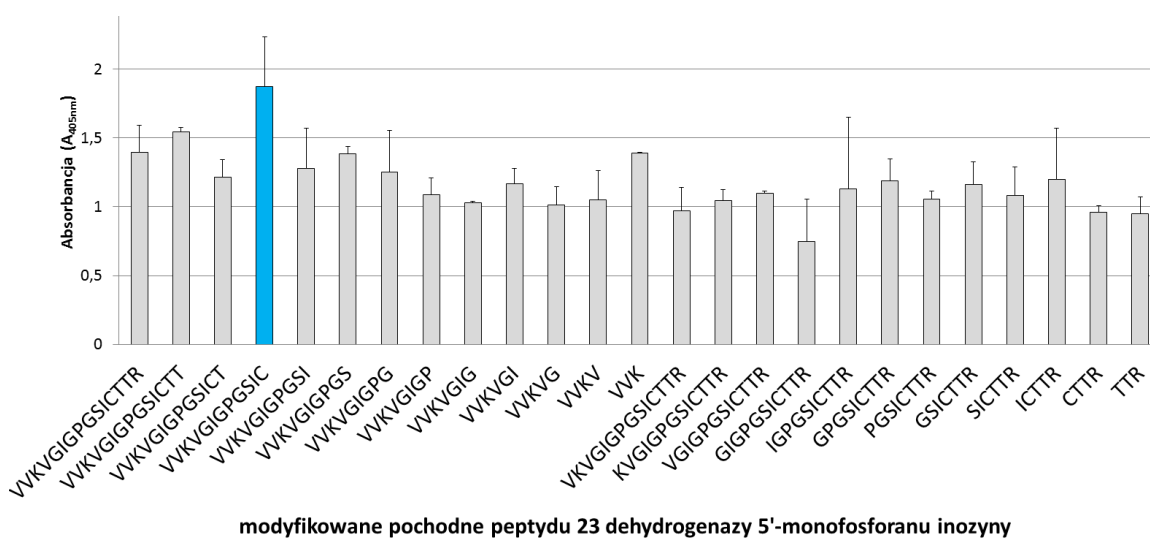
Ryc. 33. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 117 RAAADYLEVPLYSYLG 131 enolazy *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

▪ Dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny

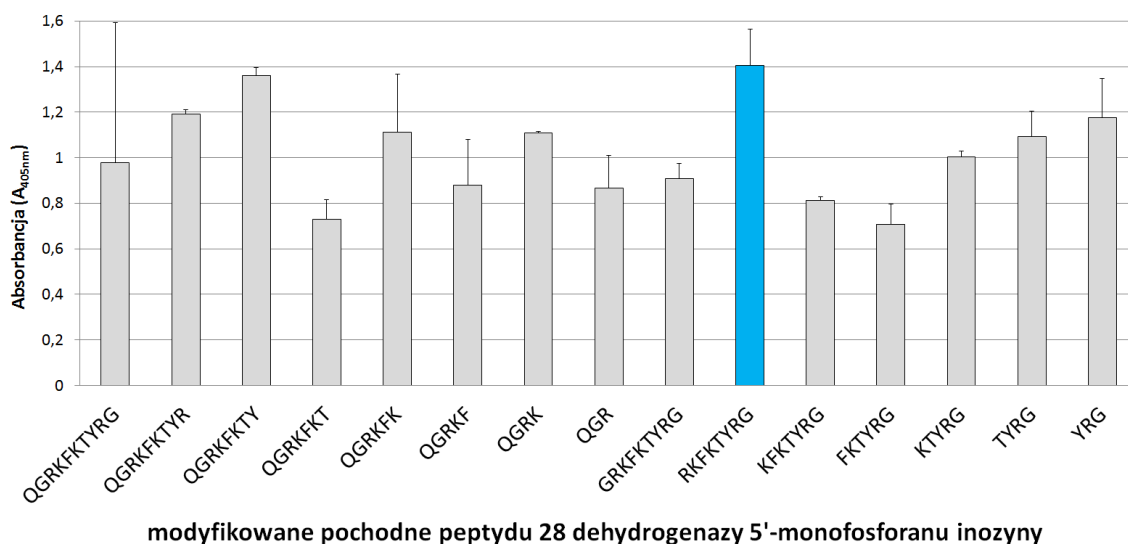
Analiza wyników uzyskanych w następstwie skracania peptydu 23 białka IMPDH o sekwencji 299 VVKVGIGPGSICTTR 313 wykazała wzrost immunoreaktywności jego pochodnej, skróconej o dwie treoniny (Thr, T) i arginę (Arg, R) na N-końcu o 29%, dlatego też została ona wybrana jako pierwsza najbardziej prawdopodobna determinanta antygenowa dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Streptococcus agalactiae*.

Z kolei modyfikacja drugiego potencjalnego epitopu dla IMPDH, peptydu 28, o sekwencji 382 QGRKFKTYRG 392 oparta na odcięciu glutaminy (Gln, Q) i glicyny (Gly, G) przyczyniła się do wzrostu immunoreaktywności wobec badanych surowic aż o 47%, dlatego też ta sekwencja została wybrana do dalszych badań.

Reaktywność wszystkich pochodnych peptydu 23 (n=24) i peptydu 28 (n=14) przedstawiona została w formie wartości absorbancji wraz z odchyleniami standardowymi na Rycinie 34 i Rycinie 35.



Ryc. 34. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ²⁹⁹VVKVIGIGPGSIC³¹³ dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



Ryc. 35. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ³⁸²QGRKFKTYRG³⁹² dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

▪ Chaperon GroEL

W wyniku odcinania kolejnych aminokwasów z peptydu 3 o sekwencji ⁴¹KAFGSPLITN⁵⁰ wykazano, że usunięcie z C-końca lizyny (Lys, K) oraz alaniny (Ala, A) przyczyniło się do 45% wzrostu reaktywności wobec surowic GBS-dodatnich, dlatego też pochodna ta została uznana za najbardziej prawdopodobny epitop, dzięki czemu uwzględniono ją w dalszych badaniach (Ryc. 36).

Z kolei skrócenie peptydu 27 (³⁶²KLQERLAKLA³⁷¹) o sekwencję Arg-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala spowodowało wzrost reaktywności pochodnej tego peptydu o 35% w porównaniu z sekwencją wyjściową, toteż została ona uznana za najbardziej prawdopodobną determinantę antygenową, a tym samym uwzględniona w kolejnych etapach projektu. Immunoreaktywność wszystkich pochodnych peptydu 27 wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich z próbek krwi pępowinowych przedstawiona została na Rycinie 37.

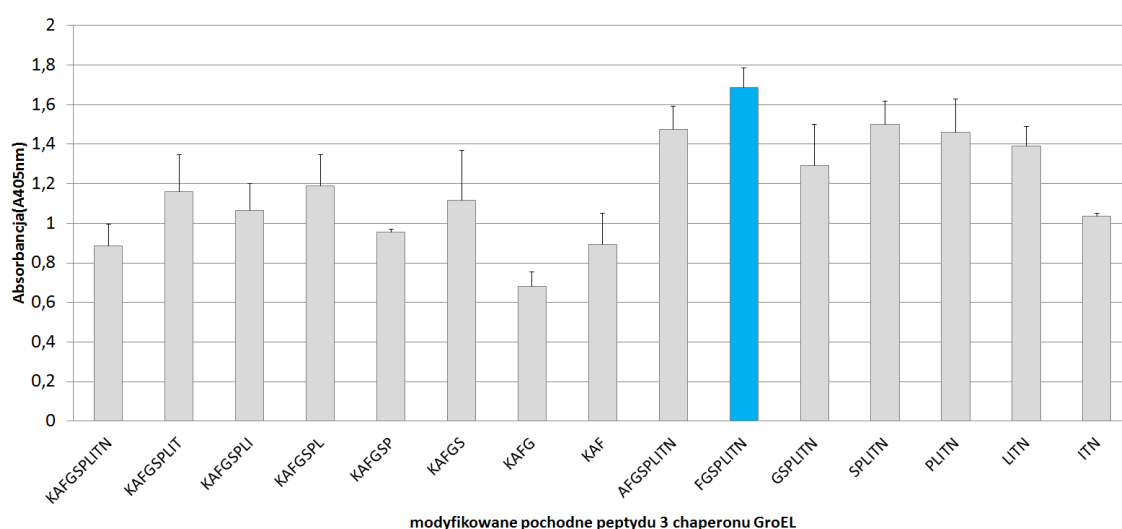
Analiza modyfikacji wprowadzonych w peptydzie 28 (³⁷¹AGGVAVIKVGAA³⁸²) wykazała, że eliminacja sekwencji Val-Ile-Lys-Val-Gly-Ala-Ala wpłynęła na aż 52% wzrost immunoreaktywności wobec przeciwciał krwi pępowinowej w porównaniu z dłuższym potencjalnym epitopem wyjściowym. Stąd też to właśnie on został wybrany do dalszych badań jako najsilniej wiążąca sekwencja. Wartości absorbancji wszystkich pochodnych w obrębie peptydy 28 przedstawione zostały na Rycinie 38.

W przypadku kolejnego potencjalnego epitopu, czyli peptydu 29 o sekwencji ³⁸¹AATETELKEMKLR³⁹³, który również został poddany modyfikacji poprzez skracanie, wykazano, że odłączenie od niego szeregu aminokwasów Glu-Leu-Lys-Glu-Met-Lys-Leu-Arg zaowocowało wzrostem immunoreaktywności o 45% w porównaniu do cząsteczki wyjściowej. Dzięki temu, że lepiej spełniał swoje cele, został wybrany do dalszych badań (Ryc. 39).

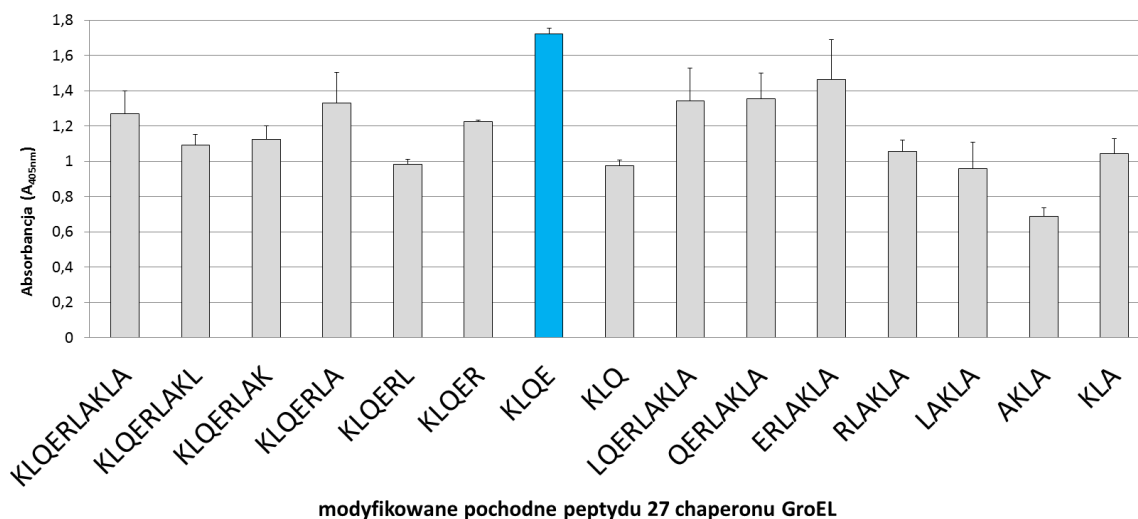
Z kolei w przypadku peptydu 37 o sekwencji ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVKV⁴⁹⁶ usunięcie tylko jednego aminokwasu, jakim była walina (Val, V) na N-końcu spowodowało aż 90% wzrost immunoreaktywności (Ryc. 40), co też wpłynęło na wytypowanie właśnie tej pochodnej jako najbardziej prawdopodobnego wariantu tego epitopu wiążącego.

Podobną prawidłowość odnotowano w przypadku kolejnego badanego peptydu, czyli $^{495}\text{KVTRSALQNA}^{504}$ (peptyd 38). Mimo iż wzrost immunoreaktywności w stosunku do peptydu wyjściowego był zdecydowanie niższy niż w przypadku peptydu 37, gdyż wyniósł on 30%, to usunięcie jednego aminokwasu – lizyny na C-końcu – spowodowało największy wzrost absorbancji w porównaniu zarówno z sekwencją wyjściową, jak i jej pochodnymi (Ryc. 41).

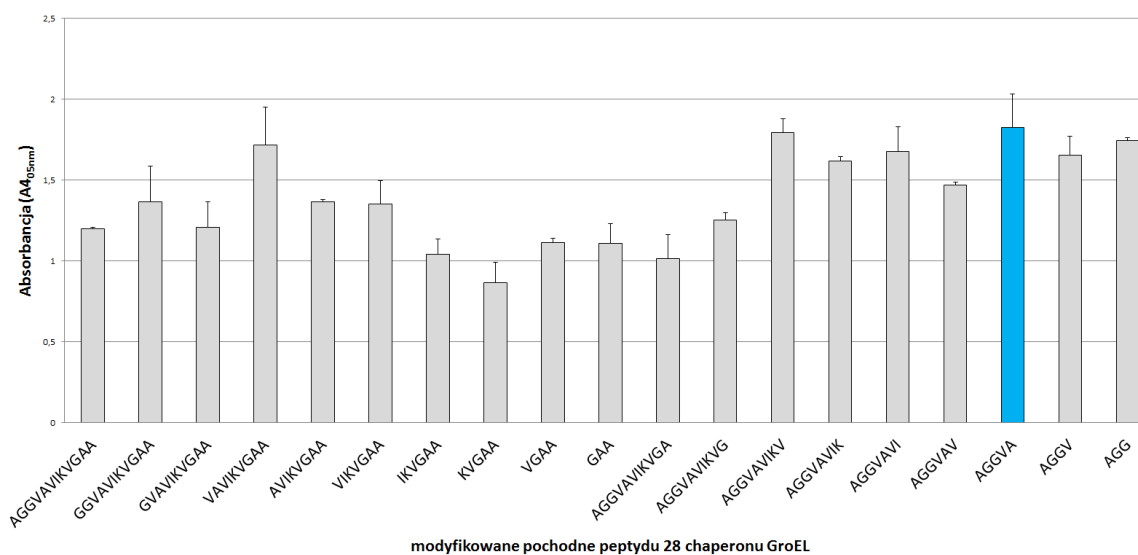
Natomiast analiza modyfikacji wprowadzonych w peptydzie 39 wykazała, że odcięcie od wyjściowej sekwencji $^{501}\text{LQNAASVASLILTE}^{515}$ fragmentu białka składającego się z leucyny, glutaminy, asparaginy oraz dwóch alanin od C-końca przyczyniło się do podniesienia immunoreaktywności o ponad 1/5 w stosunku do sekwencji wyjściowej. To podyktowało decyzję o wyborze tej pochodnej do dalszych badań (Ryc. 42).



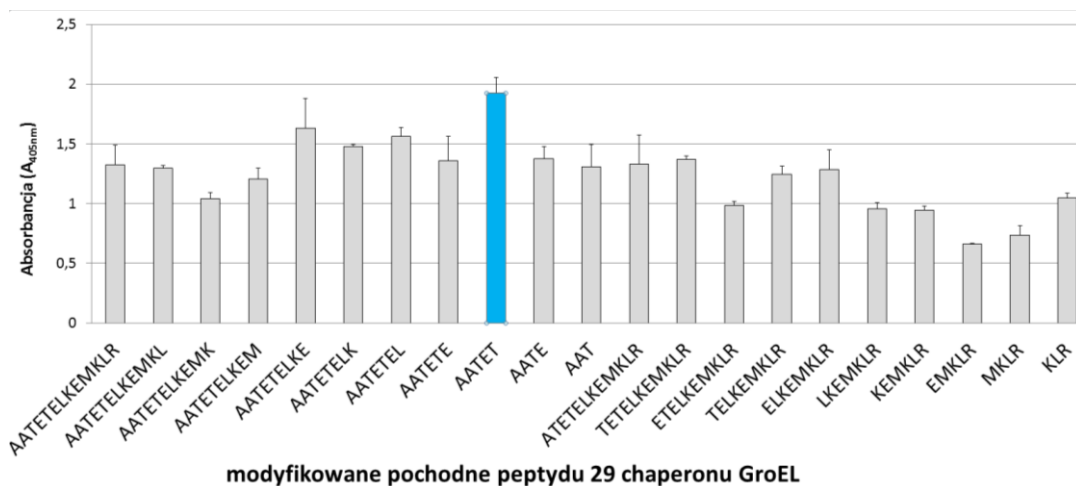
Ryc. 36. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 3 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji $^{41}\text{KAFGSPLITN}^{50}$ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



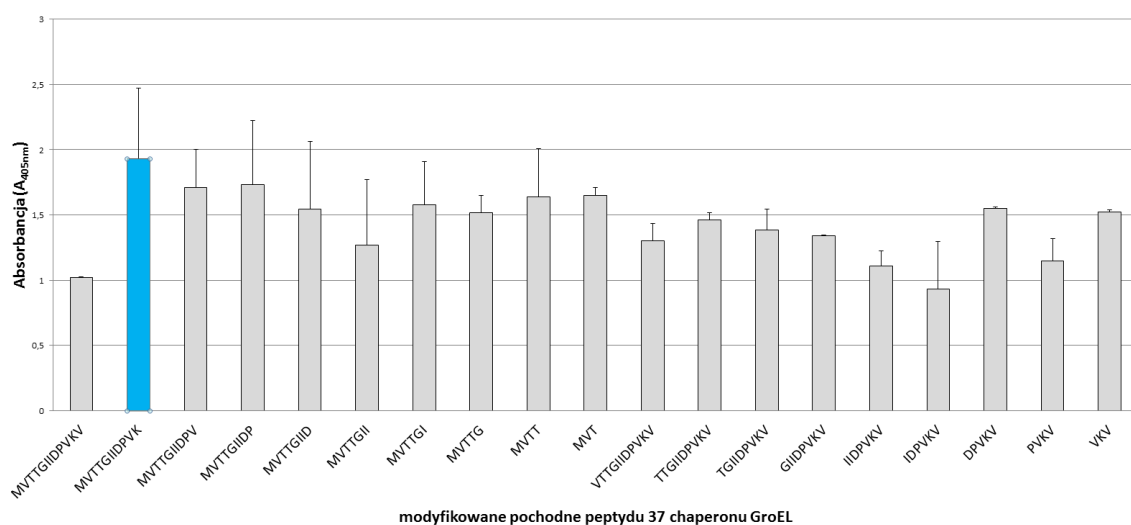
Ryc. 37. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 27 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁶²KLQERLAKLA³⁷¹ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec splowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



Ryc. 38. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 28 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁷¹AGGVAVIKVGAA³⁸² uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec splowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



Ryc. 39. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 29 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁸¹AATETELKEMKLR³⁹³ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spluwanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).



Ryc. 40. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 37 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁴⁸⁵MVTTGIDPVKV⁴⁹⁶ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spluwanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

analizowanych peptydów. Wyniki średnich wartości absorbancji wobec surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP) oraz GBS-ujemnych (12/KP, 13/KP, 24/KP, 28/KP, 29/KP) wraz z odchyleniem standardowym i istotnością statystyczną dla każdego z epitopów przedstawione zostały w Tabeli 21.

Tabela 21 Badanie specyficzności epitopów enolazy, dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny oraz chaperonu GroEL *Streptococcus agalactiae*.

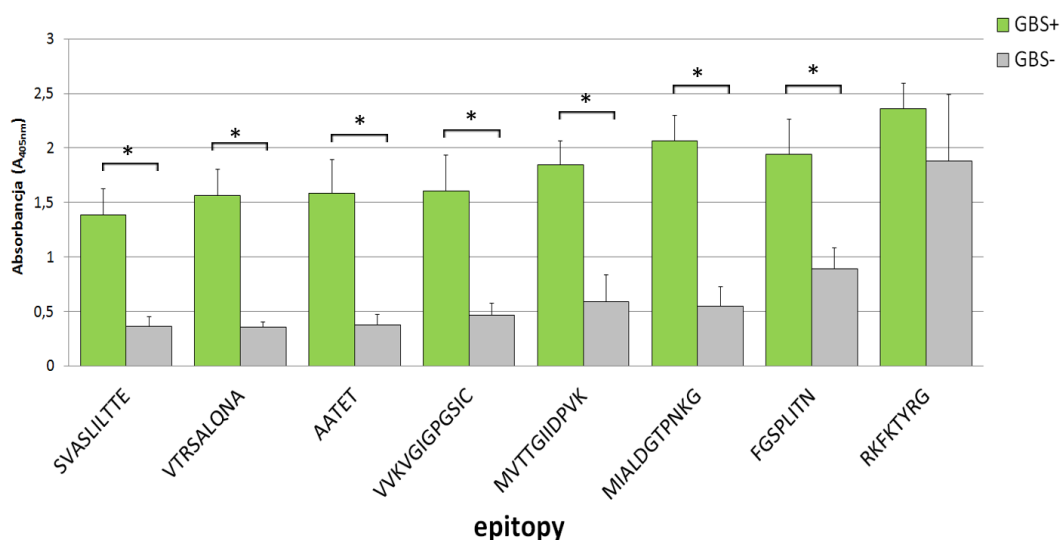
Białko	Peptyd	A405nm (GBS+) [M±SD]	A405nm (GBS-) [M±SD]	Wartość <i>p</i>
Enolaza	MIALDGTPNKG	2,05 ± 0,50	0,54 ± 0,49	0,002
	RAAADYLEVPLYSYLG	1,81 ± 0,41	0,05 ± 0,05	0,103
IMPDH	VVKVGIGPGSIC	1,87 ± 0,30	0,54 ± 0,36	0,001
	RKFKTYRG	1,40 ± 0,04	2,42 ± 0,16	0,004
Chaperon GroEL	SVASLILTTE	1,50 ± 0,01	0,32 ± 0,10	0,001
	FGSPLITN	1,69 ± 0,12	0,83 ± 0,50	0,110
	MVTTGIIDPVK	1,93 ± 0,30	0,65 ± 0,54	0,004
	AGGVA	1,82 ± 0,11	0,78 ± 0,21	0,024
	KLQE	1,72 ± 0,05	0,66 ± 0,03	0,002
	AATET	1,92 ± 0,28	0,31 ± 0,13	<0,001
	VTRSALQNA	1,63 ± 0,26	0,33 ± 0,06	0,080

Legenda: A405nm (GBS+) [M±SD] – średnia wartość absorbancji dla surowic GBS-dodatnich; A405nm (GBS-) [M±SD] – średnia wartość absorbancji dla surowic GBS-ujemnych; *p* – istotność statystyczna wyliczona przy użyciu testu *t* studenta.

5. 5. Wyniki oceny specyficzności wybranych epitopów

Wybranych 8 epitopów reprezentatywnych dla trzech immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*, które zidentyfikowane zostały w immunoenzymatycznym teście w obecności wcześniej opisanych spulowanych surowic krwi pępowinowej GBS-dodatnich, poddano weryfikacji ich specyficzności. Dokonano jej dzięki badaniu reaktywności każdego z peptydów przy użyciu dziesięciu pojedynczych próbek surowic krwi pępowinowych pozyskanych od kobiet będących nosicielkami GBS (GBS-

dotadnich), a więc: 1/KP, 2/KP, 3/KP, 4/KP, 5/KP, 6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, oraz pięciu próbek GBS-ujemnych: 12/KP, 13/KP, 24/KP, 28/KP, 29/KP, które stanowiły kontrolę negatywną, potwierdzającą specyficzną badanych sekwencji. Wykazano, że poza peptydem RKFKTYRG wszystkie badane epitopy wykazywały istotną specyficzną ($p < 0,001$), rozumianą jako wysoka reaktywność wobec surowic GBS-dodatnich przy jednoczesnej niskiej reaktywności wobec próbek kontrolnych GBS-ujemnych (Ryc. 43).

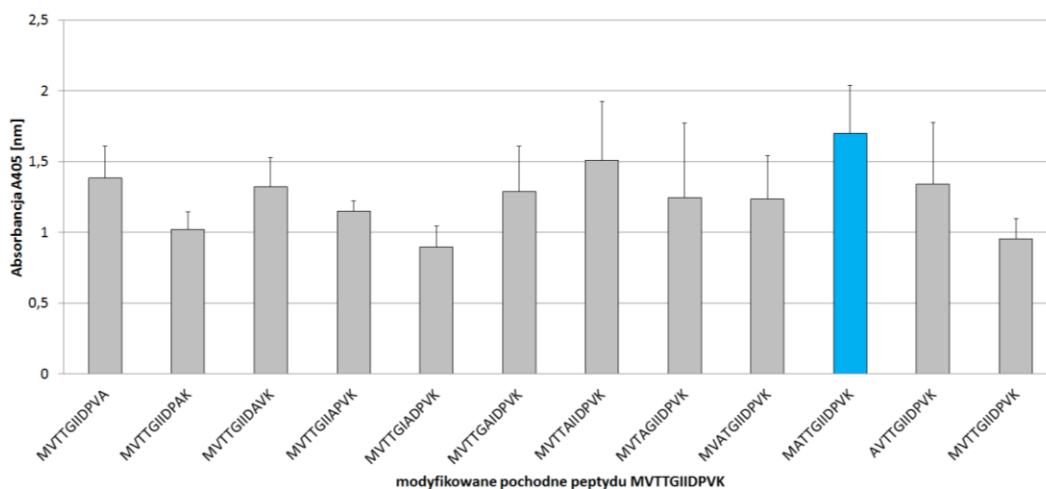


Ryc. 43. Selektywność wybranych epitopów określana w obecności pojedynczych surowic GBS+ (n=10) i GBS- (n=5) krwi pępowinowej wyrażona jako średnia absorbancja z trzech pomiarów dla wszystkich badanych surowic GBS+ i GBS- wraz z odchyleniami standardowymi. Legenda: * – istotność statystyczna $p > 0,001$ obliczona przy użyciu testy *t*-studenta.

5. 6. Modyfikacja peptydów poprzez podstawianie aminokwasów alaniną i/lub glicyną

Kolejną wprowadzoną modyfikacją było podstawianie aminokwasów w sekwencji wybranych epitopów alaniną lub glicyną ze względu na ich niewielkie rozmiary. Jako zasadę podstawiania przyjęto, że jeżeli w skład danego peptydu wchodzi alanina, wszystkie aminokwasy zamieniane są kolejno na glicynę. Jeśli peptyd składał się z glicyny, wszystkie aminokwasy podstawiano alaniną. Miało to na celu wykazanie istotności każdego aminokwasu stanowiącego epitop w reaktywności z przeciwciałami anty-GBS. W wyniku analizy uzyskanych wyników wykazano, że tylko modyfikacja

jednego z epitopów chaperonu GroEL $^{485}\text{MVT TGIIDPVK}^{495}$, pochodnej peptydu 37, polegająca na zamianie waliny w pozycji 486 na alaninę, wpływała na 84% wzrost immunoreaktywności wobec surowic GBS-dodatnich (Ryc. 44).



Ryc. 44. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 37 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji $^{485}\text{MVT TGIIDPVK}^{495}$ uzyskanych w wyniku modyfikacji, polegających na podstawianiu kolejnych aminokwasów alaniną wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich.

5. 7. Wykorzystanie epitopów immunogennych białek GBS jako markerów zakażeń i/lub nosicielstwa w teście immunoenzymatycznym

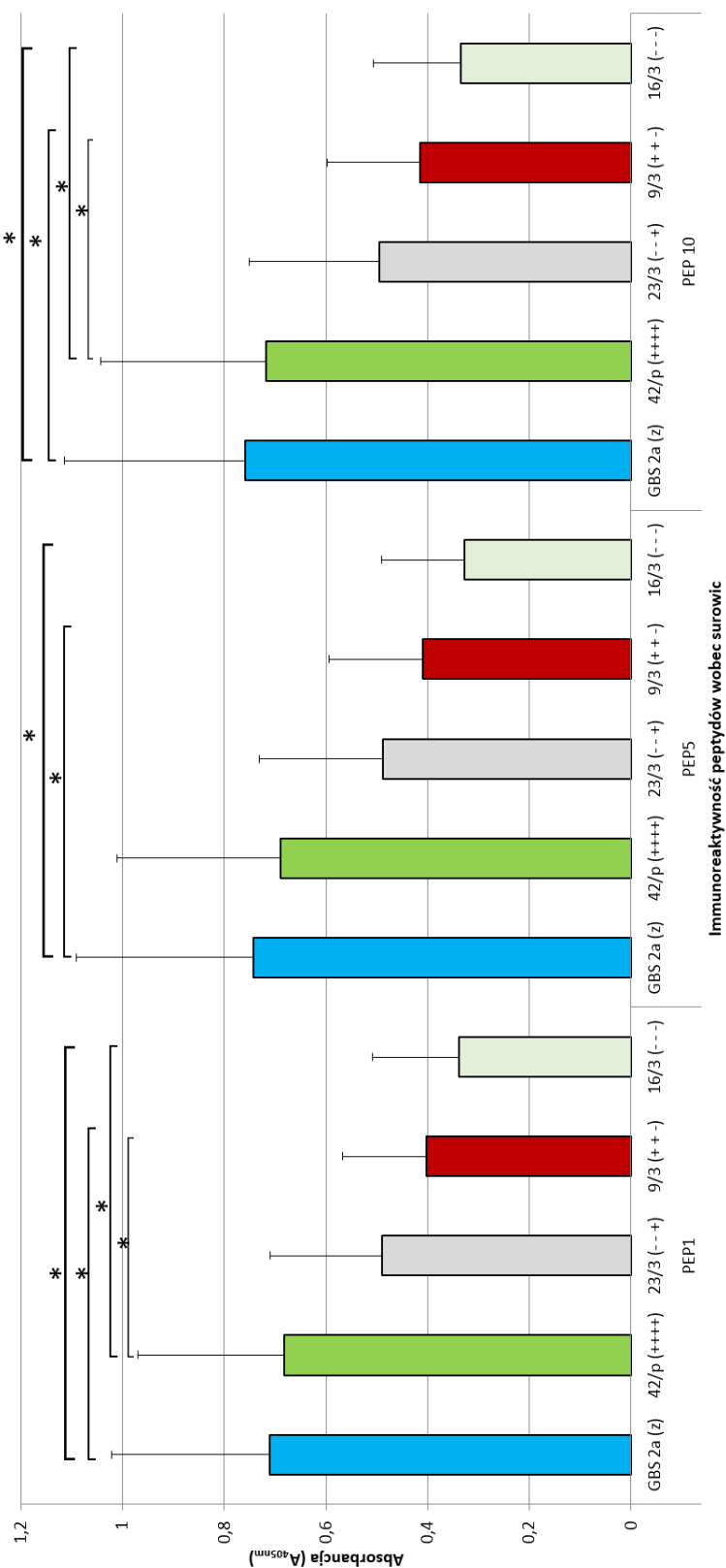
Wybrane i scharakteryzowane epitopy wiążące przeciwciała anty-GBS, które syntetyzowane były na pinach, syntetyzowano następnie na żywicach. Miało to na celu pozyskanie dużych ilości wolnych peptydów mogących znaleźć zastosowanie w dalszych analizach i modyfikacjach, np. ich biotynylowaniu. Możliwości tej nie dawały peptydy permanentnie immobilizowane do polietylenowego nośnika. Ponadto, mimo iż metoda Pepscan jest dobrą metodą pozwalającą na mapowanie epitopów w puli wielu peptydów, jej istotnym ograniczeniem jest maksymalna liczba eksperymentów opartych na teście ELISA, która zgodnie z wytycznymi producenta, nie powinna przekraczać dziesięciu reakcji dla jednego pina.

Pierwsze próby syntezy peptydów na żywicach metodą Fmoc podjęto w warunkach laboratoryjnych. W związku z tym, że czystość produktu oceniana przy

zastosowaniu techniki MALDI-ToF nie była zadowalająca, co miałyby przełożenie na czasochłonność i kosztochłonność podjęto decyzję o zleceniu syntezy firmie Novazym Polska. Dodatkowo, w celu podniesienia reaktywności epitopów i powtarzalności wyników peptydy biotynylowano, a wydajność koniugacji oceniano przy użyciu metody MALDI-ToF.

Wybrane epitopy: FGSPLITN (chaperon GroEL), VVKVGIGPGSIC (IMPDH) oraz MIALDGTPNKG (enolaza) wykorzystano w teście immunoenzymatycznym, mającym na celu wykazanie różnic w reaktywności wobec surowic krwi żylnych pobranych od pacjentów o znanym stanie klinicznym. Wśród pobranego materiału znajdowała się surowica uzyskana od pacjentki z trwającym zapaleniem powięzi o etiologii *Streptococcus agalactiae* (GBS 2a), pacjentki będącej nosicielką GBS przez cały okres trwania ciąży i w połogu (42/p), pacjentki skolonizowanej *Streptococcus agalactiae* w trzecim trymestrze ciąży (23/3), pacjentki z wykrytą obecnością GBS w pierwszym i drugim trymestrze ciąży (9/3) a także od kobiety niebędącej nosicielką przez cały okres trwania ciąży (16/3).

Jak przedstawiono na Rycinie 45, największą reaktywność dla wszystkich badanych peptydów odnotowano w przypadku pacjentki z trwającym zakażeniem [GBS 2a (z)], a także u nosicielki skolonizowanej *Streptococcus agalactiae* przez cały okres ciąży i w połogu [42/p (++++)]. Ponadto, wykazano, że w porównaniu z próbką pobraną od ciężarnej będącej nosicielką przez pierwszy dwa trymestry 9/3 [(++-)], większe stężenie przeciwciał występowało w surowicy kobiety skolonizowanej w trzecim trymestrze [(23/3 (--+)], chociaż różnice te nie były znaczące. Najslabiej reagowała natomiast surowica pobrana od pacjentki niebędącej nosicielką GBS [16/3 (- - -)]. Istotne statystycznie różnice w reaktywności odnotowano pomiędzy surowicami: GBS 2a (pochodzącą z zakażenia) i 16/3 (brak nosicielstwa) oraz między surowicą 42/p (pochodzącą od pacjentki skolonizowanej GBS przez całą ciążę i w połogu) a surowicą 16/3 (pochodzącą od ciężarnej niebędącej nosicielką). Ponadto, dla peptydów FGSPLITN i MIALDGTPNKG istotne statystycznie różnice występowały pomiędzy surowicami z zakażenia i nosicielstwa przez cały okres ciąży a surowicą 9/3, pochodzącą od pacjentki skolonizowanej GBS przez pierwsze dwa trymestry ciąży.

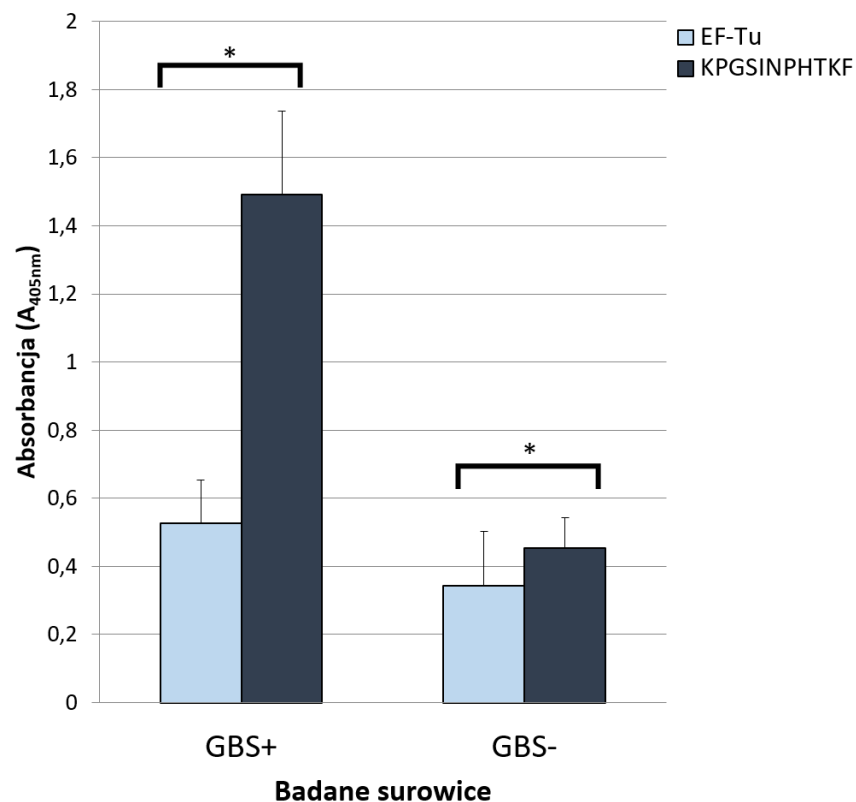


Ryc. 45. Średnie wartości absorbancji dla surowic krwi żylnych pobranych od kobiet ciężarnych będących nosicielkami GBS, pacjentek z trwającym zakażeniem GBS oraz kobiet zdrowych określone w teście immunoenzymatycznym. Legenda: GBS 2a (z) – surowica GBS 2a pochodząca od pacjentki z trwającym zakażeniem o etiologii *Streptococcus agalactiae*, 42/p (+++++) – surowica pobrana w położu od kobiety będącej nosicielką GBS przez cały okres trwania ciąży, 23/3 (- - -) – surowica pobrana od ciężarnej skolonizowanej *Streptococcus agalactiae* w trzecim trymestrze ciąży, 9/3 (+ + -) – surowica pobrana od kobiety nieskolonizowanej *Streptococcus agalactiae* przez cały okres trwania ciąży, 16/3 (- - -) – surowica pobrana od ciężarnej skolonizowanej *Streptococcus agalactiae* w pierwszym i drugim trymestrze ciąży. * – istotność statystyczna $p \leq 0,001$ określona przy użyciu testu ANOVA.

5. 8. Porównanie reaktywności białka czynnik elongacji Tu i jego epitopów

W projekcie badawczym stanowiącym podstawę niniejszej pracy badawczej badano także epitopy immunogenne białka zidentyfikowanego jako czynnik elongacji Tu (ang. *elongation factor* Tu, EF-Tu) [149]. W ramach tej rozprawy porównywano immunoreaktywność zidentyfikowanych, scharakteryzowanych i chemicznie zsyntetyzowanych, przy użyciu analogicznych do opisanych w niniejszej pracy metod, trzech epitopów czynnika elongacji Tu z całym, rekombinowanym białkiem, które zsyntetyzowane zostało przez firmę PureBiologics.

Jak pokazano na Rycinie 46, immunoreaktywność epitopu białka EF-Tu o sekwencji jest KPGSINPHTKF wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich była istotnie wyższa ($p=0,000$). Wzrost ten wyniósł aż 183%. Dla pozostałych dwóch epitopów o sekwencjach TVLARRLP i HTKF reaktywność również była wyższa niż w przypadku białka, jednak różnice te były mniejsze.



Ryc. 46. Wykres porównujący immunoreaktywność czynnika elongacji Tu (EF-Tu) *Streptococcus agalactiae* z reaktywnością jednego z jego epitopów (KPGSINPHTKF) w obecności mieszaniny surowic krwi pępowinowych GBS+ (6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP) i GBS- (12/KP, 13/KP, 24/KP, 28/KP, 29/KP) oceniana w teście immunoenzymatycznym. Legenda: * – istotność statystyczna ($p > 0,05$).

6. DYSKUSJA

Paciorkowce należące do serologicznej grupy B wciąż stanowią istotny problem neonatologiczny, mimo korzystnego efektu wynikającego z wprowadzenia okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej na zmniejszenie zachorowalności i śmiertelności wśród niemowląt. Problem szczególnie dotyczy zakażeń o późnym początku. Ponadto, powszechne stosowanie antybiotyków bezpośrednio przyczynia się do rozwoju niekorzystnego, globalnego zjawiska, jakim jest wzrost oporności bakterii na antybiotyki [119]. Brak skutecznej antybiotykoterapii indukuje problem przede wszystkim w grupie osób dorosłych, a w szczególności pacjentów z niedoborami odporności czy osób po 65 roku, u których częstość zakażeń wywołanych przez *Streptococcus agalactiae* jest wysoka [45].

Celem niniejszych badań była identyfikacja, charakterystyka i chemiczna synteza epitopów immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanych przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.

Pierwszym ze zidentyfikowanych immunogennych białek była dimeryczna enolaza o masie cząsteczkowej 45 kDa. Białko to jest glikolitycznym enzymem katalizującym przedostatni etap glikolizy, czyli reakcję dehydratacji 2-fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu [205]. Enolaza występuje u wielu gatunków bakterii i odgrywa istotną rolę w patogenezie wiążąc plazminogen na powierzchni komórki gospodarza [142]. Ponadto, białko to w literaturze opisywane jest również w kontekście swojej immunogenności [84, 132, 150], co zostało wykazane w niniejszej rozprawie. Niemniej jednak, do tej pory niewiele wiadomo na temat jego determinant antygenowych.

W oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej, której głównym założeniem było wytypowanie potencjalnych epitopów wiążących ludzkie przeciwciała anty-GBS, wybrano 32 peptydy, składające się z 6-16 aminokwasów, które następnie syntetyzowano metodą Pepscan. Ich reaktywność badano w teście immunoenzymatycznym – najpierw z wykorzystaniem spulowanych surowic krwi pępowinowej, a następnie wybrane epitopy poddawano reakcji z pojedynczymi surowicami, zarówno GBS-dodatnimi, jak i GBS-ujemnymi, co pozwoliło na wykazanie ich specyficzności.

Spośród wszystkich 57 potencjalnych epitopów dwa wykazywały najwyższą reaktywność wobec surowic GBS-dodatnich, przy jednocześnie niskiej absorbancji odnotowywanej w obecności surowic GBS-ujemnych. Były nimi: peptyd 7 o sekwencji ⁹¹MIALDGTPNKG¹⁰¹ oraz peptyd 9 ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ i to właśnie one zostały zakwalifikowane jako epitopy reprezentatywne dla tego białka.

Jak wynika z dostępnych danych literaturowych, epitopy te zostały opisane po raz pierwszy – nie tylko w kontekście gatunku *Streptococcus agalactiae*. Badania nad epitopami dwóch homologów ludzkiej enolazy, α i β , prowadzone przez Pietkiewicz i współpracowników przy wykorzystaniu metody syntezy na pinach wykazały obecność dwóch epitopów o następujących sekwencjach: ²⁶²PDDPSRYISPDQ²⁷³ oraz ¹⁹³VIKEYGKDATN²⁰⁵, z czego pierwszy epitop reagował z surowicą anti- α -enolaza, natomiast drugi z surowicą zawierającą przeciwciała skierowane przeciwko β -enolazie [145]. Z kolei Arz i współpracownicy, opierając się o technikę *phage display*, wykazali silne powinowactwo epitopu ludzkiej enolazy ²⁵⁷DLDFKSPDDPSRYISP²⁷² zlokalizowanej na zewnętrznej pętli białka do monoklonalnych przeciwciał 9C12 [188], zaś zespół badawczy pod kierownictwem Kolberga opisał w 2006 roku epitop wiążący przeciwciała skierowane przeciwko enolazie *Streptococcus pneumoniae* o sekwencji ⁵⁵DKSRYGGLG⁶³ [98]. Zespół chińskich badaczy pod kierownictwem Wanga zidentyfikował aż 10 epitopów enolazy dla przywry z gatunku *Clonorchis sinensis* [192]. Wyniki eksperymentów polegających na immunizacji myszy epitopem ¹⁰⁴EWGWS¹⁰⁸ enolazy *Plasmodium falciparum* prowadzonych przez Dutta i współpracowników zaowocowały wnioskiem o zakwalifikowaniu go jako dobrego kandydata do szczepionki [43]. Ochronną rolę enolazy, stanowiącej komponent szczepionki podawanej rybom z gatunku *Nile tilapia* przeciwko zakażeniom wywołanym przez *Streptococcus iniae*, wykazał także zespół amerykańskich badaczy pod kierownictwem LaFrenza [108]. Obiecujące są również wyniki badań, prowadzonych przez hinduskich badaczy pod przewodnictwem Joshiego, nad epitopami sześciu immunogennych białek *Leishmania*, w tym też enolazy, zarówno na modelu zwierzęcym (chomik), jak i na populacji ludzkiej. Wykazano w nich istotną rolę sekwencji ¹²⁸LYRYIAGLAGTKDIR¹⁴² w stymulowaniu układu immunologicznego w ochronie przed śmiertelną chorobą, jaką jest leiszmanioza trzewna wywołana przez *Leishmania donovani* [87].

Mimo wnikliwie prowadzonego przeglądu dostępnej literatury, nie znaleziono podobnych badań do tych opisywanych w tej rozprawie, a tym samym epitopów enolazy *Streptococcus agalactiae* o takiej samej sekwencji, co świadczy o unikatowości i innowacyjności prowadzonych badań.

Drugim opisywanym w niniejszej pracy białkiem była dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny (IMPDH, dehydrogenaza IMP), będąca tetramerem purynowym o masie cząsteczkowej 53 kDa. Białko to występuje u wszystkich organizmów i pełni kluczową rolę w syntezie *de novo* nukleotydów guaninowych – jest zatem prekursorem w tworzeniu zarówno DNA, jak i RNA [34, 73], a przez to, że uczestniczy w proliferacji komórek, stanowi cel wielu leków o charakterze antybakteryjnym czy antywirusowym. IMPDH znajduje także zastosowanie w terapiach antynowotworowych, jak również w leczeniu chorób autoimmunologicznych [73, 88, 152, 168]. Białko to jest również zaangażowane w syntezę glikoprotein, transfer energii, transdukcję sygnału w komórkach oraz katalizę NAD-zależnej (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*) oksydacji monofosforanu inozyny (IMP) do monofosforanu ksantozyny (XMP). Jest przy tym silnie immunogenne, co zostało wykazane także w niniejszej pracy.

W oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej wybrano 36 potencjalnych epitopów dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny, w skład których wchodziły sekwencje składające się od 6 do 15 aminokwasów. Mapowanie najbardziej reaktywnych peptydów wykonano w oparciu o syntezę metodą Pepscan i test ELISA z wykorzystaniem spulowanych próbek surowic krwi pępowinowych, w efekcie czego wytypowano dwa potencjalne epitopy: ²⁹⁹VVKVGIGPGSICTTR³¹³ (peptyd 23) oraz ³⁸²QGRKFKTYRG³⁹² (peptyd 28). W toku prowadzonych analiz, obejmujących modyfikacje poprzez skracanie i podstawianie oraz badanie specyficzności, wykazano, że pochodna peptydu 28 o sekwencji RKFKTYRG reagowała równie wysoko w obecności zarówno surowic dodatnich, jak i ujemnych, co stwarzało ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich, zatem podjęto decyzję o wykluczeniu jej z dalszych badań. W związku z tym, dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny spośród przebadanych łącznie 88 sekwencji aminokwasowych wybrano tylko jeden epitop VVKVGIGPGSIC. Co więcej, analiza tego peptydu w bazie NCBI BLAST

wykazała, że sekwencja VVKVGIGPGSIC była reprezentatywna tylko dla jednego białka i było nim właśnie IMPDH.

Mimo iż w literaturze dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny opisywana jest przez badaczy bardzo często, to o jej immunogenności wciąż niewiele wiadomo. Badania nad immunogennością tego białka dla *Candida albicans* prowadził zespół hiszpańskich badaczy pod kierownictwem Pitarch. Celem tych badań było wytypowanie immunogennych białek *Candida albicans*, których detekcję prowadzono w następstwie zainfekowania myszy drożdżakiem. W rezultacie wykryto 31 immunogennych białek, z czego jednym z nich była dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny wraz z jej epitopem wiążącym o sekwencji ³FETSKATS¹⁰ i, co ciekawe, większość z tych białek, włącznie z IMPDH, wykryto również w obecności surowicy ludzkiej pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowaną kandydozą [146]. Antygenowość dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Candida albicans* została wykazana po raz pierwszy w 1997 w wyniku molekularnych badań nad ekspresją genu kodującego dehydrogenazę IMP przez Köhlera i jego współpracowników [101]. Niemiecki zespół badawczy pod kierownictwem Seeliga, który analizą objął pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C, skupił swoje badania na detekcji przeciwciał anti-IMPDH. Wykorzystanie metody immunofluorescencji (ang. *indirect immunofluorescence*, IIFT) pośredniej pozwoliło badaczom na wykrycie zależności pomiędzy stężeniem przeciwciał anti-IMPDH a nosicielstwem RNA-HCV [165]. Z kolei Duan i współpracownicy prowadzili badania nad immunogennością dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny dla gatunku *Streptococcus suis* reprezentującego serotyp II poprzez immunizację świń, a uzyskane wyniki potwierdziły ich hipotezę, że cecha ta charakteryzuje IMPDH [41]. Niewielka ilość publikacji związanych z antygenowym charakterem tego konserwatywnego białka oraz brak prac dedykowanych gatunkowi *Streptococcus agalactiae* w kontekście jego immunogenności świadczy o innowacyjności odkrycia opisanego w niniejszej rozprawie. Co więcej, analiza wykrytego epitopu w bazie NCBI Blast wykazała, że był on komplementarny tylko dla jednego białka: dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny. Fakt ten eliminuje, przynajmniej na poziomie badań *in silico*, ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych, co jest niezwykle istotne w kontekście potencjalnego testu immunodiagnostycznego.

Trzecim białkiem, które dzięki zastosowaniu metody immunoblottingu zidentyfikowane zostało jako silnie immunogenne, było białko opiekuńcze GroEL. Białko to, jako przedstawiciel rodziny chaperonin, należy do grupy białek szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, Hsp). Stanowi ono zatem kluczowy element w fałdowaniu się innych białek, a co za tym idzie – jest wspólne dla wszystkich bakterii [159]. GroEL ma strukturę tetradekameru o podwójnym pierścieniu, składającym się z siedmiu podjednostek występujących zarówno w konfiguracji *cis*, jak i *trans*, co umożliwia formowanie beczkowatych struktur z hydrofilowymi wgłębieniami. Białko to bardzo często występuje w kompleksie z innym chaperonem – GroES. Ponadto, ze względu na pełnioną przez GroEL w komórkach bakteryjnych rolę, wykazuje ono duże podobieństwo do ludzkiego Hsp60 – zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne [79], a co za tym idzie, podobnie jak białka szoku cieplnego, wykazuje cechy immunogenności [89, 170]. Niemniej jednak, tak jak w przypadku dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny, chaperon GroEL nie był do tej pory opisywany w literaturze w kontekście immunogennego białka reprezentatywnego dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

W toku prowadzonych prac badawczych wykazano, że paciorkowcowy chaperon GroEL reagował specyficznie z surowicami GBS-dodatnimi pochodzącymi zarówno od pacjentek z trwającym zakażeniem, jak i od nosicielek. W wyniku analizy bioinformatycznej, obejmującej przede wszystkim predykcję potencjalnych epitopów przy wykorzystaniu metodyki Eminiego [48], Kolaskara i Tongaonkara [97], Larsena [112] oraz bazy BCPREDS [2], wytypowano 41 potencjalnych epitopów składających się z sekwencji 6-16 aminokwasowych. Epitopy mapowano poprzez syntezę na pinach metodą Pepscan, a rezultaty oceniano w teście ELISA z użyciem spulowanych surowic GBS-dodatnich pochodzących od ciężarnych nosicielek z potwierdzoną kolonizacją paciorkowcem pochwy i/lub odbytu pod koniec trzeciego trymestru ciąży. Wybór najsilniej reagujących peptydów nie był tak prosty i jednoznaczny jak w przypadku dwóch pozostałych białek, lecz ostatecznie, spośród 194 przebadanych sekwencji wybrano 7 epitopów, które najsilniej reagowały w obecności surowic zawierających przeciwciała anti-GBS, i które jednocześnie wykazywały istotnie niższą ($p > 0,05$) immunoreaktywność wobec surowic GBS-ujemnych pochodzących od pacjentek niebędących nosicielkami *Streptococcus agalactiae* w trzecim trymestrze ciąży. Wyjątek stanowiły epitopy FGSPLITN i VTRSALQNA, dla których wartości p wynosiły kolejno 0,110 i 0,08, a które mimo to nie zostały odrzucone z powodu

wysokiej immunoreaktywności wobec przeciwciał anti-GBS. Najdłuższy epitop (MVTTGIIDPVK) składał się z 11 aminokwasów, natomiast najkrótszy, KLQE, zawierał w swojej sekwencji tylko 4 cząsteczki. Wprawdzie, zgodnie z danymi literaturowymi, aby uznać peptyd za epitop, powinien on składać się przynajmniej z 5 aminokwasów [10], jednakże ze względu na wysoką immunoreaktywność i specyficzność także ta sekwencja została uwzględniona w dalszych badaniach.

Jak wynika z analizy danych literaturowych, do tej pory nie były prowadzone badania nad epitopami chaperonu GroEL w kontekście gatunku *Streptococcus agalactiae*. Dostępne są natomiast prace dedykowane innym gatunkom. Jednym z przykładów są badania malezyjskiej grupy badawczej, która skupiła się na detekcji determinant antygenowych białka opiekuńczego GroEL dla *Salmonelli typhi*. W toku prowadzonych prac, opartych także na syntezie peptydów na polietylenowych pinach, wykryła ona trzy epitopy o sekwencjach EGQDRGYSY, YSYNKETGE i GKGTEEKEK. Detekcja niniejszych epitopów prowadzona była zarówno w obecności przeciwciał monoklonalnych, jak i surowic pochodzących od pacjentów z dudem brzuszny [141]. Z kolei w pracy Valentino i współpracowników opisano detekcję epitopów immunogennych białek *Francisella tularensis*, w tym też chaperonu GroEL o sekwencji SVVVNQVKANQGNYG, dla której wykazano silne właściwości immunogenne. Antygenowość chaperonu GroEL wykazana została także w pracy naukowej autorstwa grupy badawczej Eylesa, która za cel obrała detekcję antygenów reprezentatywnych dla *Francisella tularensis* [52]. Zespół japońskich badaczy pod kierownictwem Hiroshiego Maedy skupił swoje badania na detekcji epitopów reprezentatywnych dla chaperonu GroEL bakterii należącej do gatunku *Porphyromonas gingivalis*, stanowiącej istotny problem w chorobach przyzębia. Spośród 84 syntetycznych peptydów wybrane zostały epitopy, które charakteryzowały się wysokim potencjałem do krzyżowych reakcji z ludzkim białkiem szoku cieplnego Hsp60 [126]. W badaniach Sekhavatiego i współpracowników, obejmujących predykcję i detekcję determinant antygenowych reprezentatywnych dla bakterii z gatunku *Brucella melitensis*, stanowiących istotny czynnik ryzyka poważnych chorób zwierząt domowych, spośród 18 potencjalnych epitopów zidentyfikowano 4 silnie immunogenne sekwencje aminokwasowe: ¹⁵⁰ISANSDETVGK¹⁶⁰, ⁷⁰IVKVAAVKAPGFGDRR²⁸⁵, ³⁵¹QQIEDSTSDYD³⁶¹ oraz ³⁸⁵TEVEMKEKRAR³⁹⁵ [167]. W kontekście immunogenności białka chaperon GroEL *Streptococcus pneumoniae* obiecujące są

wyniki przedstawione w pracy Khana i współpracowników, którzy immunizowali myszy roztworem zawierającym niniejsze białko. Rezultaty te pozwalają na rozważanie chaperonu GroEL, wraz z jego epitopami, jako potencjalnego komponentu szczepionki przeciwko zakażeniom bakteryjnym [91]. Podobne wnioski wyciągnęli członkowie brazylijskiego zespołu badawczego pracującego nad immunoreaktywnością białek szoku cieplnego w obecności surowic pochodzących od pacjentów z zakażeniami o etiologii *Streptococcus pyogenes*. W pracy autorstwa Lemosy i współpracowników wysnuto wniosek, że białko indukuje odpowiedź immunologiczną wobec zakażeń paciorkowcowych [114]. Z kolei badania nad immunogennością rekombinowanego białka GroEL *Streptococcus sanguinis* i jego epitopów wobec przeciwciał klasy IgA, prowadzone na grupie 100 pacjentów z chorobą Behçeta, związaną z układem krwionośnym, wykazały 77% skuteczność w detekcji przeciwciał skierowanych przeciwko badanemu paciorkowcowi. Co ciekawe, w grupie kontrolnej przeciwciała te wykryto aż u 30% [32]. Udowodniona immunoreaktywność białka opiekuńczego GroEL oraz różnorodność wytypowanych epitopów, wskazują na ich selektywność gatunkową. Analiza specyficzności gatunkowej zidentyfikowanych w niniejszych badaniach epitopów w bazie NCBI BLAST wykazała, że wszystkie peptydy, poza peptydem 28, który zidentyfikowany został także w obrębie liazy adenilobursztynianowej, reprezentowały tylko białko opiekuńcze GroEL. To uprawnia do rozpatrywania ich jako dobrych kandydatów do gatunkowo specyficznych testów diagnostycznych bez ryzyka uzyskania wyników fałszywie dodatnich.

Przeprowadzone modyfikacje peptydów oparte na podstawianiu kolejnych aminokwasów w sekwencjach alaniną i/lub glicyną przyczyniły się do wzrostu absorbancji tylko w przypadku zamiany waliny w pozycji 486 na alaninę w obrębie epitopu ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVKV⁴⁹⁶. W pozostałych przypadkach absorbancja nie uległa istotnej zmianie. Wynik ten nie był oczywisty, gdyż przewidywano, że podstawienie kolejnych aminokwasów alaniny lub glicyny spowoduje spadek absorbancji, tak jak w przypadku badań prowadzonych przez Pietkiewicz i współpracowników, w których to zamiana kwasu glutaminowego na alaninę w sekwencji ¹⁹³VIKEKYGKDATN²⁰⁵ przyczyniła się do całkowitego spadku immunoreaktywności [145].

W teście immunoenzymatycznym z wykorzystaniem wybranych epitopów badano także ich reaktywność wobec surowic krwi żylnych. Znając status każdej

z uwzględnionych surowic badanych pochodzących zarówno z zakażeń, jak i nosicielstwa, oraz próbek kontrolnych, mających na celu wykazanie specyficzności epitopów (surowice GBS-ujemne), uzyskane wyniki były zgodne z założeniami. Ponadto, wykazano, że surowice pochodzące od pacjentek skolonizowanych *Streptococcus agalactiae* tylko w trzecim trymestrze wykazywały niższą reaktywność niż u kobiet będących nosicielkami w pierwszych dwóch trymestrach. Obserwacja ta, potwierdzona na większej ilości próbek może dostarczyć cennych informacji związanych z dynamiką utrzymywania się przeciwciał IgG w krwi. Opisane powyżej wyniki, przy uwzględnieniu faktu zaobserwowania wyższej absorbancji epitopów niż całego badanego białka, sugerują, że wytypowane epitopy mogą znaleźć zastosowanie jako markery w innowacyjnych testach diagnostycznych do wykrywania zakażeń i/lub nosicielstwa *Streptococcus agalactiae*. Obecnie brakuje metody serologicznej, która skróciłaby obowiązującą procedurę diagnostyczną opartą na klasycznych metodach hodowlanych, a w rezultacie umożliwiłaby lekarzom na szybsze podejmowanie decyzji odnośnie wdrożenia okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej tylko w sytuacjach, gdy jest to konieczne. Na rynku dostępne są wprawdzie szybkie kasetkowe testy immunochromatograficzne, jednak ich czułość nie pozwala na wykrycie nosicielstwa, gdyż wykrycie paciorkowców w wymazach z pochwy i odbytu możliwe jest przy liczebności bakterii powyżej 1×10^5 CFU/ml. Szybki i czuły test immunodiagnostyczny nie tylko przyczyniłby się do zmniejszenia z ryzyka zakażeń perinatalnych, ale również zminimalizowałby prawdopodobieństwo podania antybiotyku w sytuacji, gdy nie jest on potrzebny. To z kolei stanowiłoby czynnik zaradczy w minimalizowaniu rozpowszechniania się niekorzystnego zjawiska, jakim jest rosnąca oporność na antybiotyki.

Ponadto, wytypowane epitopy mogłyby w przyszłości zostać wykorzystane w badaniach nad innowacyjną szczepionką podjednostkową, która chroniłaby przed zakażeniami *Streptococcus agalactiae* i mogłaby być podawana osobom stanowiącym tak zwaną grupę ryzyka, obejmującą kobiety w ciąży, osoby starsze czy pacjentów z niedoborami odporności. Szczepionka ta mogłaby przyczynić się do zmniejszenia nosicielstwa GBS w populacji, a być może także do całkowitego wyeliminowania tej bakterii. Niemniej jednak, nie ulega wątpliwości, że dalsze badania, zarówno w kontekście testu diagnostycznego, jak i szczepionki, muszą zostać podjęte.

7. PODSUMOWANIE

W niniejszych badaniach za cel postawiono identyfikację, charakterystykę oraz chemiczną syntezę epitopów 4 immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* specyficznie rozpoznawanych przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej. Spośród 266 sekwencji aminokwasowych 10 peptydów wykazywało największą immunogenność i specyficzność, dlatego też zostały zakwalifikowane jako epitopy. Mogą one znaleźć zastosowanie jako antygenowe markery zakażeń o etiologii GBS lub jako komponenty innowacyjnej szczepionki przeciwko tej bakterii.

Szybka detekcja nosicielstwa i zakażeń o etiologii *Streptococcus agalactiae*, oparta na czułych, specyficznych i powszechnie dostępnych metodach, mogłaby poprawić jakość diagnostyki bakteriologicznej i korzystnie wpłynąć na sytuację epidemiologiczną związaną z tym patogenem. Obecnie w badaniach przesiewowych kobiet ciężarnych w kierunku GBS wykorzystywane są metody hodowlane, które charakteryzują się wysoką czułością i powtarzalnością. Jednakże, ze względu na długi czas oczekiwania na wynik, niejednokrotnie istnieje potrzeba wdrożenia okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej przed uzyskaniem właściwej diagnozy. Sytuacja taka ma miejsce najczęściej w przypadku przedwczesnego porodu, zanim kobieta objęta zostanie badaniem przesiewowym w kierunku nosicielstwa GBS, co niesie za sobą ryzyko przyjęcia przez nią antybiotyku, który w rzeczywistości jest niepotrzebny. Odpowiedź na powyższy problem mogłaby stanowić szybki, czuły i specyficzny test, którego wykonanie nie wymagałoby użycia kosztownej aparatury, będącej poza zasięgiem większości placówek diagnostycznych w kraju. Uzyskany dzięki niemu wynik umożliwiłby lekarzowi szybsze podjęcie właściwej diagnozy.

Mając na uwadze ciągłą „walkę zbrojeń” pomiędzy bakteriami i ludzkością reprezentowaną w tym przypadku przez naukowców, w której to patogeny w chwili obecnej znajdują się na zdecydowanej dominującej pozycji, uważa się, że doskonałą alternatywę dla leków przeciwbakteryjnych mogłaby stanowić profilaktyka przy zastosowaniu szczepionki przeciwko zakażeniom *Streptococcus agalactiae*. Podanie jej kobietom planującym ciążę mogłoby zapewnić ochronę zarówno matce, jak i jej dziecku. Badania nad komponentami szczepionki przeciwko GBS trwają już od prawie pięćdziesięciu lat. W tym czasie przebadano liczne immunizujące polisacharydy

otoczkowe, koniugaty czy białka, jednakże każde z nich posiada szereg ograniczeń, przez co nie są one jeszcze powszechnie dostępne na rynku farmaceutycznym. Ostatnie trendy w badaniach wakcynologicznych wskazują na coraz większy potencjał szczepionek podjednostkowych, składających się z samych determinant antygenowych, czyli epitopów.

Zidentyfikowane i scharakteryzowane w niniejszych badaniach epitopy immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* mogłyby znaleźć dwojakie zastosowanie: zarówno jako markery zakażeń i/lub nosicielstwa GBS w innowacyjnych testach immunodiagnostycznych, takich jak na przykład test ELISA, jak również mogłyby stanowić komponent innowacyjnej szczepionki skierowanej przeciwko temu paciorkowcowi.

8. WNIOSKI

1. Spośród 32 potencjalnych epitopów enolazy *Streptococcus agalactiae* 2 peptydy: peptyd 7 o sekwencji ⁹¹MIALDGTPNKG¹⁰¹ oraz peptyd 9 o sekwencji ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ charakteryzowały się największą specyficnością wobec surowicy krwi pępowinowej.
2. Spośród 36 wytypowanych w wyniku analizy bioinformatycznej potencjalnych epitopów dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny dla *Streptococcus agalactiae* peptyd 23 o sekwencji ²⁹⁹VVKVGIGPGSIC³¹⁰ charakteryzował się najwyższą immunoreaktywnością i specyficnością wobec surowicy krwi pępowinowej.
3. Spośród 41 najbardziej prawdopodobnych epitopów białka opiekuńczego GroEL zidentyfikowano 7 silnie immunoreaktywnych peptydów o sekwencjach specyficznie reagujących z przeciwciałami krwi pępowinowej ⁴³FGSPLITN⁵⁰ (peptyd 3), ³⁶²KLQE³⁶⁵ (peptyd 27), ³⁷¹AGGVA³⁷⁵ (peptyd 28), ³⁸¹AATET³⁸⁵ (peptyd 29), ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁵ (peptyd 37), ⁴⁹⁶VTRSALQNA⁵⁰⁴ (peptyd 38) i ⁵⁰⁵SVASLILTE⁵¹⁵ (peptyd 38)
4. Substytucja waliny alaniną w pozycji 486 w obrębie epitopu ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁵ chaperonu GroEL przyczyniła się do wzrostu jego reaktywności wobec surowicy krwi pępowinowej.
5. Epitopy reprezentatywne dla czynnika elongacji Tu reagowały z surowicą krwi pępowinowej silniej niż całe białko.

9. STRESZCZENIE

Streptococcus agalactiae (ang. group B Streptococci, GBS) jest oportunistycznym patogenem kolonizujących przewód pokarmowy i drogi rodne kobiet. Bakteria ta może jednak wywoływać zagrażające życiu zakażenia u noworodków. Wprowadzone w latach sześćdziesiątych XX wieku badania przesiewowe w kierunku GBS, którym poddawane są ciężarne kobiety będące w 35-37 tygodniu ciąży przyczyniły się wprawdzie do obniżenia śmiertelności wśród niemowląt, jednakże problem zakażeń o późnym początku, jak również u osób dorosłych wciąż istnieje. Ponadto, okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa będąca następstwem badań przesiewowych przyczynia się do ekspansji niekorzystnego zjawiska, jakim jest oporność bakterii na antybiotyki. Dlatego też, przed naukowcami stoi ogromne wyzwanie, jakim jest opracowanie alternatywnej metody walki z tym drobnoustrojem, a za taką uważa się innowacyjną szczepionkę opartą na immunogennych białkach i/lub ich epitopach.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja, charakterystyka oraz chemiczna synteza epitopów wybranych immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* (GBS) rozpoznawanych przez ludzkie przeciwciała ochronne obecne w krwi.

Badaniem objęto trzy konserwatywne, specyficzne i immunogenne białka GBS: enolazę, dehydrogenazę 5'-monofosforanu inozyny oraz białko opiekuńcze GroEL, które wybrane zostały przy zastosowaniu immunoblottingu w obecności surowic GBS-dodatnich i GBS-ujemnych. W wyniku analizy bioinformatycznej obejmującej predykcję najbardziej prawdopodobnych epitopów dla każdego z białek wytypowano kolejno: 32 sekwencje dla enolazy, 36 sekwencje dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny i 41 sekwencji dla chaperonu GroEL. Peptydy te syntetyzowano na polietylenowych pinach przy zastosowaniu metody Pepscan, a ich reaktywność i specyficzność oceniano w teście immunoenzymatycznych w obecności surowic krwi pępowinowych pochodzących zarówno od nosicielek, jak i kobiet niebędących nosicielkami. Następnie wybrane epitopy poddawano modyfikacjom poprzez skracanie i podstawianie alaniną i/lub glicyną, co miało na celu detekcję najkrótszej i najsilniej reagującej determinanty antygenowej. Wybrane epitopy syntetyzowano także na żywicy metodą Fmoc. Epitopy te badane były w obecności surowic krwi żylnych pochodzących od pacjentek z trwającym zakażeniem o etiologii GBS, nosicielek GBS oraz ciężarnych

niebędących nosicielkami tej bakterii. Ponadto, w niniejszej pracy porównywano także reaktywność immunogennego białka GBS, jakim był czynnik elongacji Tu i jego epitopów.

W rezultacie zidentyfikowano dziesięć wysoce specyficznych epitopów, z czego dwa: ⁹¹MIALDGTPNKG¹⁰¹ i ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ reprezentatywne były dla enolazy, jeden epitop ²⁹⁹VVKVGIGPGSIC³¹⁰ wytypowany został dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny, podczas gdy dla chaperonu GroEL zidentyfikowano aż 7 epitopów, a ich sekwencje były następujące: ⁴³FGSPLITN⁵⁰, ³⁶²KLQE³⁶⁵, ³⁷¹AGGVA³⁷⁵, ³⁸¹AATET³⁸⁵, ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁵, ⁴⁹⁶VTRSALQNA⁵⁰⁴ oraz ⁵⁰⁵SVASLILTTE⁵¹⁵. Ponadto, wykazano, że epitopy reagowały z przeciwciałami silniej niż całe białko, a także umożliwiały różnicowanie zakażenia wywołanego przez GBS od nosicielstwa tej bakterii, co wskazuje, że w przyszłości będą mogły znaleźć zastosowanie jako antygenowe markery w teście immunodiagnostycznym. Co więcej, ze względu na swoje właściwości immunogenne mogą być rozważane jako komponent innowacyjnej szczepionki przeciwko temu drobnoustrojowi, przyczyniając się tym samym do profilaktyki zakażeń GBS w populacji, co bez wątpienia wymaga dalszych szczegółowych badań.

10. SUMMARY

Streptococcus agalactiae (group B Streptococci, GBS) is an opportunistic pathogen that colonizes the gastrointestinal tract and genital tract in women. However, this bacteria may cause life-threatening infections in newborns. Introduced in the 1960s, the screening for GBS, which is performed on pregnant women in the 35-37th week of pregnancy has indeed led to a reduction in mortality among infants, however, the problem of late-onset infections, as well as infections in adults, still exists. In addition, perinatal antibiotic prophylaxis following screening tests contributes to the expansion of the adverse phenomenon of bacterial resistance to antibiotics. Therefore, scientists face a huge challenge of developing alternative methods aimed at reducing the percentage of this microorganism in the population, and the development of an innovative vaccine based on immunogenic proteins and / or their epitopes can be considered such a method.

The aim of this study was the identification, characterization and chemical synthesis of epitopes of selected immunogenic *Streptococcus agalactiae* proteins recognized by human protective antibodies present in the blood. The study involved three conservative, specific and immunogenic GBS proteins: enolase, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the GroEL chaperone protein, which were selected using immunoblotting in the presence of GBS-positive and GBS-negative sera. As a result of the bioinformatic analysis, including the prediction of the most probable epitopes for each of the proteins, the following sequences were selected: 32 sequences for enolase, 36 sequences for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and 41 sequences for the GroEL chaperone. These peptides were synthesized on polyethylene pins using the Pepscan method, and their reactivity and specificity were evaluated in the enzyme immunoassay in the presence of umbilical cord blood serum from both carriers and non-carriers. The selected epitopes were then modified by shortening and substitution with alanine and/or glycine to detect the shortest and most responsive antigenic determinant. The selected epitopes were also synthesized on the resin using the Fmoc method. These epitopes were examined in the presence of venous blood from patients with an ongoing infection with GBS etiology, GBS carriers and non-carriers. In addition, the present study compared the reactivity of the immunogenic GBS protein, which was the factor of elongation of Tu and its epitopes.

As a result, 10 highly specific epitopes were identified, of which two: ⁹¹MIALDGTPNKG¹⁰¹ and ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ were representative of enolase, one ²⁹⁹VVKVGIGPGSIC³¹⁰ epitope was selected for inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, whereas up to 7 epitopes were identified for the GroEL chaperone. Their sequences were as follows: ⁴³FGSPLITN⁵⁰, ³⁶²KLQE³⁶⁵, ³⁷¹AGGVA³⁷⁵, ³⁸¹AATET³⁸⁵, ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁵, ⁴⁹⁶VTRSALQNA⁵⁰⁴, and ⁵⁰⁵SVASLILTTE⁵¹⁵. In addition, it was shown that the epitopes reacted with the antibodies more strongly to the whole protein, and also allowed to differentiate the infection caused by GBS from the carrier of this bacteria, indicating that in the future, they may be used as antigenic markers in the immunodiagnostic test. Moreover, because of their immunogenic properties, they may be considered as a component of an innovative vaccine against this microorganism, thus contributing to the reduction of GBS infections in the population, which undoubtedly requires further detailed studies.

11. SPIS RYCIN

- Ryc. 1.** Kolejne etapy kolonizacji noworodka *S. agalactiae*.
- Ryc. 2.** Schemat przezłożyskowego transferu przeciwciał IgG.
- Ryc. 3.** Schemat budowy białek z rodziny Alp z uwzględnieniem jego poszczególnych odcinków.
- Ryc. 4.** Podłoże chromogenne chromID® Strepto B do hodowli i identyfikacji *Streptococcus agalactiae*.
- Ryc. 5.** Schemat działania testu immunochromatograficznego do wykrywania antygenów.
- Ryc. 6.** Typy testów ELISA.
- Ryc. 7.** Schemat chemicznej syntezy peptydów.
- Ryc. 8.** Schemat chemicznej struktury żywicy Wanga.
- Ryc. 9.** Polietylenowe piny stosowane do syntezy peptydów metodą Pepsan przytwierdzone do płytki.
- Ryc. 10.** Model strzykawki wykorzystany w prowadzeniu manualnej syntezy SPPS z użyciem żywicy Wanga.
- Ryc. 11.** Płytkę z matrycą do analizy metodą MALDI-ToF.
- Ryc. 12.** Przykładowy wynik detekcji trzech immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*: enolazy o masie 45 kDa (***) , dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny o masie 53 kDa (**) oraz chaperonu GroEL o masie cząsteczkowej 57 kDa (*) rozdzielonych metodą SDS-PAGE, a następnie identyfikowanej w bazie Mascot.
- Ryc. 13.** Sekwencja aminokwasowa białka enolaza dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.
- Ryc. 14.** Struktura drugorzędowa enolazy GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej.
- Ryc. 15.** Wyniki analizy hydrofobowości poszczególnych aminokwasów w sekwencji białka enolaza GBS.
- Ryc. 16.** Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla enolazy GBS.
- Ryc. 17.** Model 3D białka enolaza dla *Streptococcus pneumoniae* z zaznaczonymi na żółto potencjalnymi epitopami wiążącymi.
- Ryc. 18.** Sekwencja aminokwasowa białka IMPDH dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

Ryc. 19. Struktura drugorzędowa IMPDH GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej.

Ryc. 20. Wyniki analizy hydrofobowości poszczególnych aminokwasów w sekwencji białka IMPDH GBS.

Ryc. 21. Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny GBS

Ryc. 22. Model 3D dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny dla *Streptococcus pyogenes* z zaznaczonymi kolorem żółtym prawdopodobnymi epitopami powierzchniowymi.

Ryc. 23. Sekwencja aminokwasowa białka opiekuńczego GroEL dla gatunku *Streptococcus agalactiae*.

Ryc. 24. Struktura drugorzędowa białka opiekuńczego GroEL GBS przewidziana na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej.

Ryc. 25. Wyniki analizy hydrofobowości poszczególnych aminokwasów w sekwencji białka opiekuńczego GroEL.

Ryc. 26. Zbiorcze wyniki predykcji w potencjalnych epitopów dla białka opiekuńczego GBS.

Ryc. 27. Trójwymiarowy model białka opiekuńczego GroEL dla *Mycobacterium tuberculosis* z zaznaczonymi na żółto potencjalnymi epitopami wiążącymi przeciwciała.

Ryc. 28. Przykładowe zdjęcie płytki 96-dołkowej płytki w której prowadzono immunoenzymatyczną detekcję immunogennych epitopów wśród 36 peptydów enolazy na pinach z użyciem koniugatu antyludzkich przeciwciał skoniugowanych z peroksydazą chrzanową.

Ryc. 29. Wykres przedstawiający mapowanie epitopów w obrębie białka enolazy *Streptococcus agalactiae*. 32 peptydy zsyntetyzowane zostały na pinach metodą Pepscan, a ich reaktywność oceniona została w teście immunoenzymatycznym z użyciem spulowanych surowic GBS-dodatnich 6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP.

Ryc. 30. Wykres przedstawiający immunoreaktywność wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP) 36 peptydów dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny dla gatunku *Streptococcus agalactiae*, która oceniona została w teście immunoenzymatycznym.

Ryc. 31. Immunoreaktywność 41 peptydów chaperonu GroEL *Streptococcus agalactiae* wytypowanych w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej, która oceniona została w

teście immunoenzymatycznym z użyciem spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 32. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ⁸⁸DRAMIALDGTPNKG¹⁰¹ (peptyd 7) enolazy *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów on N-końca i C-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 33. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ¹¹⁷RAAADYLEVPLYSYLG¹³¹ enolazy *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 34. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ²⁹⁹VVKVGIGPGSICTTR³¹³ dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 35. Immunoreaktywność pochodnych peptydu ³⁸²QGRKFKTYRG³⁹² dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny *Streptococcus agalactiae* modyfikowanych poprzez odcinanie kolejnych aminokwasów z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 36. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 3 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁴¹KAFGSPLITN⁵⁰ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 37. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 27 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁶²KLQERLAKLA³⁷¹ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 38. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 28 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁷¹AGGVAVIKVGAA³⁸² uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 39. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 29 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ³⁸¹AATETELKEMKLR³⁹³ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 40. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 37 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁶ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 41. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 38 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁴⁹⁵KVTRSALQNA⁵⁰⁴ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 42. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 39 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁵⁰¹LQNAASVASLILTTE⁵¹⁵ uzyskanych w wyniku skracania peptydu o kolejne aminokwasy z C-końca i N-końca wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich (6/KP, 8/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP).

Ryc. 43. Selektywność wybranych epitopów określana w obecności pojedynczych surowic GBS+ (n=10) i GBS- (n=5) krwi pępowinowej wyrażona jako średnia absorbancja z trzech pomiarów dla wszystkich badanych surowic GBS+ i GBS- wraz z odchyleniami standardowymi.

Ryc. 44. Immunoreaktywność pochodnych peptydu 37 białka opiekuńczego GroEL *Streptococcus agalactiae* o sekwencji ⁴⁸⁵MVTTGIIDPVK⁴⁹⁵ uzyskanych w wyniku modyfikowacji polegających na podstawianiu kolejnych aminokwasów analiną wobec spulowanych surowic GBS-dodatnich.

Ryc. 45. Średnie wartości absorbancji dla surowic krwi żylnych pobranych od kobiet ciężarnych będących nosicielkami GBS, pacjentek z trwającym zakażeniem GBS oraz kobiet zdrowych określone w teście immunoenzymatycznym.

Ryc. 46. Wykres porównujący immunoreaktywność czynnika elongacji Tu (EF-Tu) *Streptococcus agalactiae* z reaktywnością jednego z jego epitopów (KPGSINPHTKF) w obecności mieszaniny surowic krwi pępowinowych GBS+ (6/KP, 8/KP, 10/KP, 14/KP, 15/KP, 16/KP) i GBS- (12/KP, 13/KP, 24/KP, 28/KP, 29/KP) oceniana w teście immunoenzymatycznym

12. SPIS TABEL

Tabela 1 Typy hemolizy występujące u paciorkowców obserwowane na agarowym podłożu z 5% dodatkiem krwi baraniej.

Tabela 2 Najważniejsze czynniki wirulencji *Streptococcus agalactiae* wraz z opisem sposobu ich patogenego działania.

Tabela 3 Zestawienie surowic 34 krwi pępowinowych pochodzących od pacjentek będących nosicielkami GBS i niebędących nosicielkami GBS.

Tabela 4 Charakterystyka szczepów GBS wybranych do analizy bioinformatycznej mającej na celu wytypowanie potencjalnych epitopów w obrębie ich białek.

Tabela 5 Wykaz aminokwasów użytych do syntezy peptydów metodą Pepscan.

Tabela 6 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy w oparciu o metodę predykcji Emini'ego.

Tabela 7 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy w oparciu o metodę predykcji Kolaskar'a i Tongaonkar'a.

Tabela 8 Sekwencje aminokwasowe enolazy wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Tabela 9 Peptydy enolazy wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS.

Tabela 10 Lista wszystkich 32 sekwencji aminokwasowych dla białka enolaza poddanych syntezie na pinach metodą Pepscan, które wybrane zostały w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej.

Tabela 11 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Emini'ego.

Tabela 12 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Kolaskar'a i Tongaonkar'a.

Tabela 13 Sekwencje aminokwasowe dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Tabela 14 Peptydy dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS.

Tabela 15 Lista wszystkich 36 sekwencji aminokwasowych dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny poddanych syntezie na pinach metodą Pepscan, które wybrane zostały w oparciu o wyniki analizy bioinformatycznej.

Tabela 16 Peptydy chaperonu GroEL wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Emini’ego.

Tabela 17 Peptydy chaperonu GroEL wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu metody predykcji Kolaskar’a i Tongaonkar’a.

Tabela 18 Sekwencje aminokwasowe chaperonu GroEL wytypowane przy użyciu metody Bepipred.

Tabela 19 Peptydy chaperonu GroEL wytypowane jako potencjalne epitopy przy użyciu serwera BCPREDS

Tabela 20 Lista wszystkich 41 sekwencji aminokwasowych białka opiekuńczego GroEL poddanych syntezie na pinach metodą Pepscan, które wybrane zostały w oparciu o wynik analizy bioinformatycznej.

Tabela 21 Badanie specyficzności epitopów enolazy, dehydrogenazy 5’-monofosforanu inozyny oraz chaperonu GroEL *Streptococcus agalactiae*

13. BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Raya B, Kollmann TR, Marchant A, i wsp. „The Immune System of HIV-Exposed Uninfected Infants.” *Front Immunol.* 2016; 7: 383.
2. <http://ailab.ist.psu.edu/>
3. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice. „ACOG Committee Opinion No. 485: Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns.” *Obstet Gynecol.* 2011; 117: 1019-27. doi: 10.1097/AOG.0b013e318219229b.
4. Areschoug T, Linse S, Stålhammar-Carlemalm M, i wsp. „A proline-rich region with a highly periodic sequence in Streptococcal beta protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface.” *J Bacteriol.* 2002; 184: 6376-83.
5. Areschoug T, Stålhammar-Carlemalm M, Larsson C, i wsp. „Group B streptococcal surface proteins as targets for protective antibodies: identification of two novel proteins in strains of serotype V.” *Infect Immun.* 1999; 67: 6350-7.
6. Atherton E., Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 1989 (86/VK 8560 A868)
7. Baker CJ, Barrett FF. „Group B streptococcal infections in infants. The importance of the various serotypes.” *JAMA* 1974; 230: 1158-60.
8. Baker CJ, Carey VJ, Rench MA, i wsp. „Maternal antibody at delivery protects neonates from early onset group B streptococcal disease.” *J Infect Dis.* 2014; 209: 781-8. doi: 10.1093/infdis/jit549.
9. Baker CJ, Kasper DL. „Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection.” *N Engl J Med* 1976; 294: 753–6.

10. Benjamini E, Fong S, Erickson C, et al. „Immunity to lymphoid tumors in syngeneic mice by immunization with mitomycin C-treated cells.” *J Immunol.* 1977; 118: 685-93.
11. Berardi A, Rossi C, Lugli L, et al. „Group B streptococcus late-onset disease: 2003-2010.” *Pediatrics.* 2013; 131(2): e361-8. doi: 10.1542/peds.2012-1231.
12. Baron MJ, Bolduc GR, Goldberg MB, et al. „Alpha C protein of group B *Streptococcus* binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism.” *J Biol Chem.* 2004; 279: 24714-23.
13. Bergseng H, Rygg M, Bevanger L, et al. „Invasive group B streptococcus (GBS) disease in Norway 1996–2006.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 1193–9. doi: 10.1007/s10096-008-0565-8.
14. Berner R, Ruess M, Bereswill S, et al. „Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein beta-antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences.” *Pediatr Res.* 2002; 51: 106-11.
15. Bevanger L, Naess AI. „Mouse-protective antibodies against the Ibc proteins of group B streptococci.” *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.* 1985; 93: 121-4.
16. Bhengsi S, Gregory C, Thamthitiwat S, et al. „Oral abstract 64. Invasive bacterial infections in Thailand: finding from population-based surveillance in two provinces, 2010–2013.” Konferencja IDWeek 2015, San Diego, USA
17. Block T, Munson E, Culver A, et al. „Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of *Streptococcus agalactiae* in prenatal vaginal/anorectal specimens.” *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3615-20. doi: 10.1128/JCM.01262-08.
18. Bohnsack JF, Chang JK, Hill HR. „Restricted ability of group B streptococcal C5a-ase to inactivate C5a prepared from different animal species.” *Infect Immun.* 1993; 61: 1421-6.

19. Bohnsack JF, Mollison KW, Buko AM, i wsp. „Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus.” *Biochem J.* 1991; 273: 635-40.
20. Bohnsack JF, Takahashi S, Hammitt L, i wsp. „Genetic polymorphisms of group B streptococcus scpB alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a.” *Infect Immun.* 2000; 68: 5018-25.
21. Bohnsack JF, Widjaja K, Ghazizadeh S, i wsp. „A role for C5 and C5a-ase in the acute neutrophil response to group B streptococcal infections.” *J Infect Dis.* 1997; 175: 847-55.
22. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, i wsp. „Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity.” *Infect Immun.* 2000; 68: 5610-8.
23. Brzywczy-Włoch M, Gorska S, Brzozowska E, i wsp. „Identification of high immunoreactive proteins from *Streptococcus agalactiae* isolates recognized by human serum antibodies.” *FEMS Microbiol Lett.* 2013; 349: 61-70. doi: 10.1111/1574-6968.12292.
24. Brzywczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska-Lubas M, i wsp. „Molecular characterization of capsular polysaccharides and surface protein genes in relation to genetic similarity of group B streptococci isolated from Polish pregnant women.” *Epidemiol Infect.* 2012; 140: 329-36. doi: 10.1017/S0950268811000616.
25. Brzywczy-Włoch M, Gosiewski T, Bodaszewska M, i wsp., Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance.” *J Med Microbiol* 2010; 59: 780-86.
26. Brzywczy-Włoch M, Ochońska D, Bulanda M. „Carriage of group B streptococci in pregnant women from the region of Krakow and their antibiotic resistance in the years 2008-2012.” *Pol J Microbiol.* 2013; 62: 427-33.

27. Brzychczy-Wloch M, Wojkowska-Mach J, Helwich E, i wsp. „Incidence of maternal GBS colonization and neonatal GBS disease among very low birth weight Polish neonates.” *Med Sci Monit.* 2013; 19: 34-9.
28. Carpino LA, Han GY. „The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group.” *J Am Chem Soc* 1970; 92: 5748–9.
29. Cheng Q, Carlson B, Pillai S, i wsp. „Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci.” *Infect Immun.* 2001; 69: 2302-8.
30. Cheng Q, Debol S, Lam H, i wsp. „Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B Streptococci from lungs of infected mice.” *Infect Immun.* 2002; 70: 6409-15.
31. Cheng Q, Stafslie D, Purushothaman SS, i wsp. „The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin.” *Infect Immun.* 2002; 70: 2408-13.
32. Cho SB, Zheng Z, Ahn KJ, i wsp. „Serum IgA reactivity against GroEL of *Streptococcus sanguinis* and human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in patients with Behçet disease.” *Br J Dermatol.* 2013; 168: 977-83. doi: 10.1111/bjd.12128.
33. Cieslewicz MJ, Chaffin D, Glusman G, i wsp. „Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides.” *Infect Immun.* 2005; 73: 3096-103.
34. Cohen MB, Sadee W. „Contributions of the depletions of guanine and adenine nucleotides to the toxicity of purine starvation in the mouse T lymphoma cell line.” *Cancer Res.* 1983; 43: 1587-91.
35. Creti R, Fabretti F, Orefici G, i wsp. „Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes.” *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 1326–29.

36. Curtius T. „Ueber einige neue der Hippursäure analog constituirte, synthetisch dargestellte Amidosäuren.” J Prakt Chemie 1882; 26: 145–208.
37. Diaz-Dinamarca DA, Soto DA, Leyton YY, i wsp. „Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization in a mouse model.” Mol Immunol. 2018; 103: 63-70. doi: 10.1016/j.molimm.2018.08.028.
38. Dmitriev A, Hu YY, Shen AD, i wsp. „Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains; bac gene-positive strains are genetically homogenous.” FEMS Microbiol Lett. 2002; 208: 93-8.
39. Dmitriev A, Tkáčiková L, Suvorov A, i wsp. „Comparative genetic study of group B streptococcal strains of human and bovine origin.” Folia Microbiol (Praha). 1999; 44: 449-53.
40. Dobrut A, Brzozowska E, Górska S, i wsp. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL.” Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8 :349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349
41. Duan ZT, He KW, Zhang XH i wsp. „Cloning and characterization of the gene encoding IMPDH of *Streptococcus suis* serotype 2.” Wei Sheng Wu Xue Bao. 2006; 46: 730-3.
42. Dudek CJ, Shah C, Zayas J, i wsp. „The Many Faces of Late Onset Group B Streptococcus Infection.” J Pediatric Infect Dis. 2016; 1: 2. doi: 10.21767/2573-0282.100014
43. Dutta S, DasSarma P, DasSarma S, i wsp. „Immunogenicity and protective potential of a *Plasmodium* spp. enolase peptide displayed on archaeal gas vesicle nanoparticles.” Malar J. 2015; 14: 406. doi: 10.1186/s12936-015-0914-x.
44. Dzanibe S, Adrian PV, Kimaro Mlacha SZ, i wsp. „Natural acquired group B Streptococcus capsular polysaccharide and surface protein antibodies in HIV-infected and HIV-uninfected children.” Vaccine. 2016; 34: 5217-24.

45. Edwards MS, Baker CJ. „Group B streptococcal infections in elderly adults.” *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 839-47.
46. Edwards MS, Kasper DL, Jennings HJ, i wsp. „Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci.” *J Immunol.* 1982; 128: 1278-83.
47. Elsner A, Kreikemeyer B, Braun-Kiewnick A, i wsp. „Involvement of Lsp, a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization.” *Infect Immun.* 2002; 70: 4859-69.
48. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, i wsp. „Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide.” *J. Virol.* 1985; 55: 836–9.
49. Erener-Ercan T, Aslan M, Vural M, i wsp. „Tetanus and diphtheria immunity among term and preterm infant-mother pairs in Turkey, a country where maternal and neonatal tetanus have recently been eliminated.” *Eur J Pediatr.* 2015; 174: 339-44. doi: 10.1007/s00431-014-2400-9.
50. Estimates developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. United Nations Children’s Fund, W. H. O., World Bank and United Nations. New York (NY): United Nations Children’s Fund; 2015. Levels & Trends in Child Mortality. Report 2015.
51. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, i wsp. „Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray.” *Proteomics.* 2007; 7: 2172-83.
52. Farley MM. „Group B streptococcal disease in nonpregnant adults.” *Clin Infect Dis.* 2001 Aug 15; 33: 556-61.
53. Fenton LJ, Harper MH. „Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci.” *J Clin Microbiol* 1979; 9: 167-9.

54. Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V, i wsp. „*Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization.” *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 4772-8.
55. Fischer E, Fourneau E. „Ueber einige Derivate des Glykocolls.” *Ber Dtsch Chem Bunsenges* 1901; 34: 2868–77.
56. Flores AE, Nelson JA, Wu XY, i wsp. „Antibody profiles to the group B streptococcal β antigen in maternal and infant paired sera” *APMIS.* 2003; 101: 41-9.
57. Fouda GG, Martinez DR, Swamy GK i wsp. „The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity.” *Immunohorizons.* 2018; 2: 14-25. doi: 10.4049/immunohorizons.1700057.
58. Franken C, Haase G, Brandt C, i wsp. „Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*.” *Mol Microbiol.* 2001; 41: 925-35.
59. Fry RM. „Fatal infections by hemolytic streptococcus group B.” *Lancet.* 1938; 231: 199–201. 10.1016/S0140-6736(00)93202-1.
60. Gabrielsen C, Mæland JA, Lyng RV, i wsp. „Molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* strains deficient in alpha-like protein encoding genes.” *J Med Microbiol.* 2017; 66: 26-33. doi: 10.1099/jmm.0.000412.
61. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG. „Strategies for epitope analysis using peptide synthesis” *J. Immunol. Methods.* 1987; 102: 257–274.
62. Gibson RL, Lee MK, Soderland C, i wsp. „Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion.” *Infect Immun.* 1993; 61: 478-85.
63. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, i wsp. „Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease.” *Mol. Microbiol.* 2002; 45: 1499-513.

64. Gonzalez-Estrada A, Radojicic C. „Penicillin allergy: A practical guide for clinicians.” *Cleve Clin J Med*. 2015; 82: 295-300. doi: 10.3949/ccjm.82a.14111.
65. Goodman M, Cai W, Smith N. „The bold legacy of Emil Fischer.” *J Pept Sci* 2003; 9: 594–603.
66. Goodrich JS, Miller MB. „Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B *Streptococcus* during antepartum screening.” *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59: 17-22.
67. Hackenberger CPR, Bode JW, Schwarzer D. „Chemoselective peptide ligation: a privileged tool for protein synthesis.” w „Hughes AB: Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry” Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim 2011; 3: 445–93.
68. Hansson M, Nygren PA, Ståhl S. „Design and production of recombinant subunit vaccines.” *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 32: 95-107.
69. Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, i wsp. „Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants.” *J Clin Microbiol* 2004; 42: 83-9.
70. Häyrynen J, Bitter-Suermann D, Finne J. „Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding.” *Mol Immunol*. 1989; 26: 523-9.
71. Heath PT. „Status of vaccine research and development of vaccines for GBS.” *Vaccine*. 2016; 34: 2876-2879. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.072.
72. Hedén LO, Frithz E, Lindahl G. „Molecular characterization of an IgA receptor from group B streptococci: sequence of the gene, identification of a proline-rich region with unique structure and isolation of N-terminal fragments with IgA-binding capacity.” *Eur. J. Immunol*. 1991; 21: 1481-90.
73. Hedstrom L. „IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition.” *Chem Rev*. 2009; 109: 2903-28. doi: 10.1021/cr900021w.

74. Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, i wsp. „Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation.” *Infect. Immun.* 1996; 64: 277-82.
75. Hemming VG, McCloskey DW, Hill HR. „Pneumonia in the neonate associated with group B streptococcal septicemia.” *Am J Dis Child.* 1976; 130: 1231-3.
76. Henkel B, Zhang L, Bayer E. „Investigations on solid-phase peptide synthesis in N-to-C direction (inverse synthesis).” *Eur J Org Chem* 1997; 10: 2161–8.
77. Hood M, Janney A, Dameron G. „Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period.” *Am J Obstet Gynecol.* 1961; 82: 809-18.
78. Hoogkamp-Korstanje JA, Gerards LJ, Cats BP. „Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci.” *J Infect Dis* 1982; 145: 800-3.
79. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, i wsp. „Two families of chaperonin: physiology and mechanism.” *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:115-45.
80. Howard CJ, Glynn AA. „The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement.” *Immunology.* 1971; 20: 767-77.
81. Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, i wsp. „Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn.” *Immunology.* 1996; 89: 573-8.
82. Jaradat DMM. „Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation.” *Amino Acids.* 2018; 50: 39-68. doi: 10.1007/s00726-017-2516-0.
83. Jarzab A, Skowicki M, Witkowska D. „Szczepionki podjednostkowe – antygeny, nośniki, metody koniugacji i rola adiuwantów.” *Postepy Hig Med Dosw,* 2013; 67: 1128-43.

84. Ji Y, Carlson B, Kondagunta A, i wsp. „Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*.” *Infect Immun*. 1997; 65: 2080-7.
85. Jiang W, Xue JX, Liu YC, i wsp. „Identification and characterization of an immunogenic antigen, enolase 2, among excretory/secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*.” *Protein Expr Purif*. 2016; 127: 88-97. doi: 10.1016/j.pep.2016.07.011.
86. Johri AK, Paoletti LC, Glaser P, i wsp. „Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development.” *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4: 932-42.
87. Joshi S, Yadav NK, Rawat K, i wsp. „Immunogenicity and Protective Efficacy of T-Cell Epitopes Derived From Potential Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania (Leishmania) donovani*.” *Front Immunol*. 2019; 10: 288. doi: 10.3389/fimmu.2019.00288.
88. Juda P, Smigová J, Kováčik L. „Ultrastructure of cytoplasmic and nuclear inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 "rods and rings" inclusions.” *J Histochem Cytochem*. 2014; 62: 739-50. doi: 10.1369/0022155414543853.
89. Kaufmann SH. „Heat shock proteins and the immune response.” *Immunol Today*. 1990; 11: 129-36.
90. Keefe GP. „*Streptococcus agalactiae* mastitis: a review.” *Can Vet J*. 1997; 38: 429-37.
91. Khan MN, Shukla D, Bansal A, i wsp. „Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of *Streptococcus pneumoniae* against lethal infection in mice.” *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 56: 56-62.
92. Kohler PF, Farr RS. „Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport.” *Nature*. 1966; 210: 1070-1.
93. Kim KS, Kang JH, Cross AS. „The role of capsular antigens in serum resistance and in vivo virulence of *Escherichia coli*.” *FEMS Microbiol. Lett*. 1986; 35: 275-8.

94. Kimmerlin T, Seebach D. „100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies.” J Pept Res. 2005; 65: 229-60.
95. Klaska I, Nowak JZ. „Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii.” Postepy Hig Med Dosw, 2007; 61:167-77.
96. Kobayashi M, Vekemans J, Baker CJ, i wsp. „Group B Streptococcus vaccine development: present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries.” F1000Res. 2016 22;5:2355.
97. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. „A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens.” FEBS Lett. 1990; 276: 172–4. 10.1016/0014-5793(90)80535-Q.
98. Kolberg J, Aase A, Bergmann S, i wsp. „*Streptococcus pneumoniae* enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface.” Microbiology. 2006; 152: 1307-17.
99. Kong F, Gowan S, Martin D, i wsp. „Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes.” J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 620-6.
100. Kotarski J, Heczko PB, Lauterbach R, i wsp. „Ginekologicznego dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom noworodków.” Ginekol Pol. 2008, 79, 221-3.
101. Köhler GA, White TC, Agabian N. „Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid.” J Bacteriol. 1997; 179: 2331–8.
102. Kristoffersen EK. „Placental Fc receptors and the transfer of maternal IgG.” Transfus Med Rev. 2000; 14 :234-43.
103. Kvam AI, Mavenyengwa RT, Radtke A, i wsp. „*Streptococcus agalactiae* alpha-like protein 1 possesses both cross-reacting and Alp1-specific epitopes.” Clin Vaccine Immunol. 2011; 18: 1365-70. doi: 10.1128/CVI.05005-11.

104. Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, i wsp. „Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci.” *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9630–5.
105. Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, i wsp. „Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women.” *J. Infect. Dis.* 1999; 179: 1030-3.
106. Lachenauer CS, Madoff LC. „A protective surface protein from type V group B streptococci shares N-terminal sequence homology with the alpha C protein.” *Infect Immun.* 1996; 64: 4255-60.
107. Laemmli UK. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature.* 1970; 227: 680-5.
108. LaFrentz BR, Shoemaker CA, Klesius PH. „Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine.” *Vet Microbiol.* 2011; 152: 346-52. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.033.
109. Lamagni TL, Keshishian C, Efstratiou A, i wsp. „Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991–2010.” *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 682–8. 10.1093/cid/cit337
110. Lancefield RC. „Two serological types of group B hemolytic Streptococci with related, but not identical, type-specific substances.” *J Exp Med.* 1938; 67: 25-40.
111. Lancefield RC, Perlmann GE. „Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A, type 28 and in certain streptococci of other serological groups.” *J Exp Med.* 1952; 96: 83-97.
112. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. „Improved method for predicting linear B-cell epitopes.” *Immunome. Res.* 2006; 24: 2 10.1186/1745-7580-2-2
113. Leach L, Eaton BM, Firth JA, i wsp. „Immunocytochemical and labelled tracer approaches to uptake and intracellular routing of immunoglobulin-G (IgG) in the human placenta.” *Histochem J.* 1991; 23: 444-9.

114. Lemos JA, Giambiagi-Demarval M, Castro AC. „Expression of heat-shock proteins in *Streptococcus pyogenes* and their immunoreactivity with sera from patients with streptococcal diseases.” J Med Microbiol. 1998; 47: 711-5.
115. Letsinger RL, Kornet MJ. „Popcorn polymer as a support in multistep syntheses.” J Am Chem Soc 1963; 85: 3045–6.
116. Letsinger RL, Kornet MJ, Mahadevan V, Jerina DM. „Reactions on polymer supports.” J Am Chem Soc 1964; 86 :5163–5.
117. Lewin EB, Amstey MS. „Natural history of group B *Streptococcus* colonization and its therapy during pregnancy.” Am J Obstet Gynecol 1981; 139: 512-5.
118. Li J, Kasper DL, Ausubel FM, i wsp. „Inactivation of the alpha C protein antigen gene, bca, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*.” Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 13251-6.
119. Libster R, Edwards KM, Levent F, i wsp. „Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis.” Pediatrics. 2012; 130: e8-15. doi: 10.1542/peds.2011-3453.
120. Lin CT. „Immunoelectron microscopy localization of immunoglobulin G in human placenta.” J Histochem Cytochem. 1980; 28: 339-46.
121. Lin FY, Clemens JD, Azimi PH, i wsp. „Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection.” J Infect Dis 1998; 177: 790-92.
122. Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. (2003).”Surface proteins of *Streptococcus Agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens., Clin. Microbiol. Rev. 2003; 18: 102–27. 10.1128/CMR.18.1.102-127.2005
123. Lydyard PM. „Immunologia krótkie wykłady” drugie wydanie. Wydawnictwo PWN, Warszawa 2009: 199-200.

124. Madoff LC, Michel JL, Gong EW, i wsp. „Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein.” *Infect Immun.* 1992; 60: 4989-94.
125. Maeland JA, Afset JE, Lyng RV, i wsp. „Survey of immunological features of the alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*.” *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22: 153–9.
126. Maeda H, Miyamoto M, Koikeguchi S, i wsp. „Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyrromonas gingivalis*.” *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 28: 219-24.
127. Malek A. „Role of IgG antibodies in association with placental function and immunologic diseases in human pregnancy.” *Expert Rev Clin Immunol.* 2013; 9: 235-49. doi: 10.1586/eci.12.99.
128. Malek A, Sager R, Kuhn P, i wsp. „Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy.” *Am J Reprod Immunol.* 1996; 36: 248-55.
129. Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL, i wsp. „Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm.” *J Infect Dis.* 2009; 199: 108-15. doi: 10.1086/595564.
130. Martin D, Rioux S, Gagnon E, i wsp. „Protection from group B streptococcal infection in neonatal mice by maternal immunization with recombinant Sip protein.” *Infect Immun.* 2002; 70: 4897-901.
131. Matsubara K, Yamamoto G. „Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan.” *Int J Infect Dis.* 2009; 13: 679-84. doi: 10.1016/j.ijid.2008.10.007
132. McNeely TB, Cope L, Smith S, i wsp. „Enolase peptide conjugate vaccines against *Staphylococcus aureus*.” nr patentu: US9447403B2
133. Merrifield RB. „Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide.” *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149–54.

134. Michel JL, Madoff LC, Kling DE, i wsp. „Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity.” *Infect Immun.* 1991; 59: 2023-8.
135. Michel JL, Madoff LC, Olson K, i wsp. „Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, bca, of group B streptococci.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 10060-4.
136. Miles MA, Wallace GR, Clarke JL. „Multiple peptide synthesis (Pepscan method) for the systematic analysis of B- and T-cell epitopes: Application to parasite proteins.” *Parasitol Today.* 1989; 5: 397-400.
137. Nagano N, Nagano Y, Taguchi F. „High expression of a C protein beta antigen gene among invasive strains from certain clonally related groups of type Ia and Ib group B streptococci.” *Infect Immun.* 2002; 70: 4643-9.
138. Nicoara C, Zäch K, Trachsel D, i wsp. „Decay of passively acquired maternal antibodies against measles, mumps, and rubella viruses.” *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 868-71.
139. Nuccitelli A, Rinaudo CD, Maione D. „Group B Streptococcus vaccine: state of the art.” *Ther Adv Vaccines.* 2015; 3: 76-90. doi: 10.1177/2051013615579869.
140. Oddie S, Embleton ND. „Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study.” *BMJ.* 2002; 325: 308.
141. Panchanathan V, Naidu BR, Devi S, i wsp. „Immunogenic epitopes of *Salmonella typhi* GroEL heat shock protein reactive with both monoclonal antibody and patients sera.” *Immunol Lett.* 1998; 62: 105–9. 10.1016/S0165-2478(98)00028-5
142. Pancholi V, Fischetti VA. „ α -Enolase, a Novel Strong Plasmin(ogen) Binding Protein on the Surface of Pathogenic Streptococci.” *J Biol Chem.* 1998; 273:14503-15.

143. Persson E, Berg S, Trollfors B, i wsp. „Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001.” *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 791-96.
144. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, i wsp. „Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005.” *JAMA* 2008 ;299: 2056-65.
145. Pietkiewicz J, Danielewicz R, Bednarz-Misa IS, i wsp. „Experimental and bioinformatic approach to identifying antigenic epitopes in human α - and β -enolases.” *Biochem Biophys Rep.* 2018; 15: 25–32.
146. Pitarch A, Díez-Orejas R, Molero G, i wsp. „Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model.” *Proteomics.* 2001; 1: 550-9.
147. Poyart C, Tazi A, Réglie-Poupet H, et al, „Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci.” *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1985-88.
148. Prasowska-Kątnik I. „Immunochemia w biologii medycznej. Metody laboratoryjne” Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2009: 127-35.
149. Pyclik M, Górska S, Brzozowska E, i wsp. „Epitope Mapping of *Streptococcus agalactiae* Elongation Factor Tu Protein Recognized by Human Sera.” *Front Microbiol.* 2018; 9:125.
150. Rahi A, Matta SK, Dhiman A, i wsp. „Enolase of *Mycobacterium tuberculosis* is a surface exposed plasminogen binding protein.” *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017; 20171861: 3355-64. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.08.018
151. Rajagopal L. „Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors.” *Future Microbiol.* 2009; 4: 201-21. doi: 10.2217/17460913.4.2.201.

152. Ratcliffe AJ. „Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases.” *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006; 9: 595-605.
153. Rioux S, Martin D, Ackermann HW i wsp. „Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus.” *Infect. Immun.* 2001; 69: 5162-5.
154. Rodda SJ. „Synthesis of multiple peptides on plastic pins.” *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 9:Unit 9.7. doi: 10.1002/0471142735.im0907s22.
155. Rodriguez-Granger J, Alvargonzalez JC, Berardi A, i wsp. „Prevention of group B streptococcal neonatal disease revisited. The DEVANI European project.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 2097-104.
156. Roopenian DC, Akilesh S. „FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age.” *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 715-25.
157. Rubens CE, Raff HV, Jackson JC, i wsp. „Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion.” *J Infect Dis.* 1991; 164: 320-30.
158. Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, i wsp. „Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses.” *Clin Infect Dis.* 2017; 65: S100-11. doi: 10.1093/cid/cix658.
159. Ryabova NA, Marchenkov VV, Marchenkova SY, i wsp. „Molecular chaperone GroEL/ES: unfolding and refolding processes.” *Biochemistry (Mosc).* 2013; 78: 1405-14. doi: 10.1134/S0006297913130038.
160. Santi I, Scarselli M, Mariani M, i wsp. „BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood.” *Mol Microbiol.* 2007; 63: 754-67.

161. Santillan DA, Rai KK, Santillan MK, i wsp. „Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model.” *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205: 249.e1-8.
162. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, i wsp. „Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC.” *MMWR Recomm Rep.* 2002 ;51: 1-22.
163. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, i wsp. „Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis.” *N Engl J Med* 2000; 342: 15-20.
164. Schuchat A, Zywicki SS, Dinsmoor MJ, i wsp. „Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study.” *Pediatrics.* 2000; 105: 21-6.
165. Seelig HP, Appelhans H, Bauer O, i wsp. „Autoantibodies against inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2-characteristics and prevalence in patients with HCV-infection.” *Clin Lab.* 2011; 57: 753-65.
166. Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, i wsp. „Characterization of a novel leucin rich repeat protein antigen from Group B streptococci that elicit protective immunity.” *Infect Immun.* 2003; 73: 1671–83.
167. Sekhavati MH, Heravi RM, Tahmoorespur M, i wsp. „Cloning, molecular analysis and epitopes prediction of a new chaperone GroEL *Brucella melitensis* antigen.” *Iran J Basic Med Sci.* 2015; 18: 499-505.
168. Shah CP, Kharkar PS. „Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors as antimicrobial agents: recent progress and future perspectives.” *Future Med Chem.* 2015; 7: 1415-29. doi: 10.4155/fmc.15.72.
169. Siezen RJ. „Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria.” *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999; 76: 139-55.
170. Shinnick TM. „Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens.” *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991; 167: 145-60.

171. Simister NE. „Placental transport of immunoglobulin G.” *Vaccine*. 2003; 21: 3365-9.
172. Simister NE, Mostov KE. „An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens.” *Nature*. 1989; 337: 184-7.
173. Skoff TH, Farley MM, Petit S, i wsp. „Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007.” *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 85–92. 10.1086/599369
174. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, i wsp. „Measurement of protein using bicinchoninic acid.” *Anal Biochem*. 1985; 150: 76-85.
175. Sow SO, Tapia MD, Diallo S, i wsp. „Haemophilus influenzae type B conjugate vaccine introduction in Mali: impact on disease burden and serologic correlate of protection.” *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 1033-8.
176. Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, i wsp. „Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin.” *Infect Immun*. 1999; 67: 871-8.
177. Stafslien DK, Cleary PP. „Characterization of the streptococcal C5a peptidase using a C5a-green fluorescent protein fusion protein substrate.” *J Bacteriol*. 2000; 182: 3254-8.
178. Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, i wsp. „Cross-protection between group A and group B streptococci due to cross-reacting surface proteins.” *J Infect Dis* 2000; 182: 142–9.
179. Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, i wsp. „The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells.” *Mol Microbiol*. 1999; 33: 208-19.
180. Stålhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G. „Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is

- expressed by most strains causing invasive infections.” J Exp Med. 1993; 177: 1593-603.
181. Suresh Babu VV. „One hundred years of peptide chemistry.” Resonance 2001; 6: 68–75.
182. Suvorov A, Dmitriev A, Ustinovitch I, i wsp. „Molecular analysis of clinical group B streptococcal strains by use of alpha and beta gene probes.” FEMS Immunol Med Microbiol. 1997; 17: 149-54.
183. Szewczyk EM. „Diagnostyka bakteriologiczna”. Wydawnictwo naukowe PWN SA. 2016; Wydanie 2 zmienione: 30-40.
184. Tamura GS, Rubens CE. „Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase.” Mol Microbiol. 1995; 15: 581-9.
185. Tatra G, Placheta P. „IgG levels in maternal and umbilical cord serum after vaginal delivery and after elective Caesarean section.” Arch Gynecol. 1979; 227: 135-40.
186. Techasena W, Sriprasert P, Pattamadilok S, i wsp. „Measles antibody in mothers and infants 0-2 years and response to measles vaccine at the age of 9 and 18 months.” J Med Assoc Thai. 2007; 90: 106-12.
187. Tsuda Y, Okada Y. „Solution-phase peptide synthesis.” w „Hughes AB: Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry” vol 3. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim 2011;3:203–51.
188. <https://www.uniprot.org/citations/9308760>
189. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q02192>
190. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FD45>
191. Wahid RM, Yoshinaga M, Nishi J, i wsp. „Immune response to a laminin-binding protein (Lmb) in group A streptococcal infection.” Pediatr Int. 2005; 47: 196-202.

192. Wang X, Chen W, Tian Y, i wsp. „Surface display of *Clonorchis sinensis* enolase on *Bacillus subtilis* spores potentializes an oral vaccine candidate.” *Vaccine*. 2014; 32: 1338-45.
193. Wang Y, Zhao S. „Vascular Biology of the Placenta.” Morgan & Claypool Life Sciences 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences; San Rafael (CA): 2010. Integrated Systems Physiology: from Molecules to Function to Disease.
194. Wästfelt M, Stålhammar-Carlemalm M, Delisse AM, i wsp. „Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure.” *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 18892-7.
195. Wessels MR, Kasper DL. „Group B Streptococcus, in Infectious Diseases.” Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1998; Wydanie 2: 1731–5.
196. Wexler DE, Chenoweth DE, Cleary PP. „Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 8144-8.
197. Wexler DE, Nelson RD, Cleary PP. „Human neutrophil chemotactic response to group A streptococci: bacteria-mediated interference with complement-derived chemotactic factors.” *Infect Immun.* 1983; 39: 239-46.
198. Wilkinson HW, Eagon RG. „Type-specific antigens of group B type Ic streptococci.” *Infect Immun.* 1971; 4: 596-604.
199. Wyle FA, Artenstein MS, Brandt BL, i wsp. „Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines.” *J Infect Dis.* 1972; 126: 514-21.
200. Valerio RM, Bray AM, Campbell RA. „Multipin peptide synthesis at the micromole scale using 2-hydroxyethyl methacrylate grafted polyethylene supports.” *Int J Pept Protein Res.* 1993; 42: 1-9.
201. Van Savage J, Decker MD, Edwards KM, i wsp. „Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response.” *J Infect Dis.* 1990; 161: 487-92.

202. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. „Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC, 2010 Recommendations and Reports.” 2010; 19, 59 (RR10).
203. Yang HH, Mascuch SJ, Madoff LC, i wsp. „Recombinant group B Streptococcus alpha-like protein 3 is an effective immunogen and carrier protein.” Clin Vaccine Immunol. 2008; 15: 1035-41. doi: 10.1128/CVI.00030-08
204. Zaremba ML. „Mikrobiologia lekarska: podręcznik dla studentów medycyny.” Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 1997:94-5.
205. Zhang E, Brewer JM, Minor W, i wsp. „Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution.” Biochemistry. 1997; 36:1 2526-34.
206. Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, i wsp. „Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases.” Biochem Soc Trans. 2002; 30: 971-8.

14. ZAŁĄCZNIKI

Kraków, dn. 25.06.2019 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wydział Lekarski

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection microbiology* pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

dr hab. Ewa Bnarczko

ul. Czysła 18
PL 31-121 Kraków
tel. +48(12) 633 25 67
fax +48(12) 423 39 24
www.km.cm-uj.krakow.pl

Kraków, dn. 25.06.2019 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wydział Lekarski

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection microbiology* pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

Katedra Mikrobiologii

Silwona Górska

ul. Czysła 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl

Kraków, dn. 25.06.2019 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection microbiology* pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Pyclt M.

ul. Crysta 18
PL 31-121 Kraków
tel. +48(12) 633 25 67
fax +48(12) 423 39 24
www.km.cm-uj.krakow.pl

Kraków, dn. 15.07.2019 r.



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wydział Lekarski

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection microbiology* pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych


Prof. dr hab. Andrzej Gamian

ul. Czysza 18
PL 31-121 Kraków
tel. +48(12) 633 25 67
fax +48(12) 423 39 24
www.km.cm-uj.krakow.pl

Kraków, dn. 25.06.2019 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników Wydział Lekarski
badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection*
microbiology pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus* Katedra Mikrobiologii
Agalactiae: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular
Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii
pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*
rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

Elżbieta Majewska

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

Kraków, dn. 15.07.2019 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników Wydział Lekarski
badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection*
microbiology pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus* Katedra Mikrobiologii
Agalactiae: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular
Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii
pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae*
rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

Katedra Mikrobiologii UJ CM

M. Pulcova
prof. dr hab. Małgorzata Bułanda
Kierownik

ul. Czysa 18
PL 31-121 Kraków
tel. +48(12) 633 25 67
fax +48(12) 423 39 24
www.km.cm-uj.krakow.pl

Kraków, dn. 25.06.2019 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ZGODA NA WYKORZYSTANIE WYNIKÓW

Wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Panią mgr Annę Dobrut wyników badań opublikowanych w czasopiśmie *Frontiers in cellular and infection microbiology* pt. „Epitopes of Immunoreactive Proteins of *Streptococcus Agalactiae*: Enolase, Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase and Molecular Chaperone GroEL” (2018; 8:349. doi: 10.3389/fcimb.2018.00349) w jej monografii pt. „Badania nad epitopami immunogennych białek *Streptococcus agalactiae* rozpoznawanymi przez przeciwciała ochronne krwi pępowinowej.”

Wydział Lekarski

Katedra Mikrobiologii

Dr hab.n.med
adiunkt
Monika Bzyszczy-Włoch

ul. Czysta 18

PL 31-121 Kraków

tel. +48(12) 633 25 67

fax +48(12) 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl