

„Badania genetycznych i fenotypowych determinant specyficznej wobec gospodarza wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* z wykorzystaniem modeli *in vivo*.”

Bakterie gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) należą do oportunistycznych patogenów kolonizujących ludzi i zwierząt. Najnowsze doniesienia literaturowe potwierdzają genetyczną odrębność szczepów *S. aureus* ludzkich i zwierzęcych oraz sugerują, że za kolonizację i wirulencję szczepów wobec konkretnego gatunku gospodarza odpowiadają specyficzne czynniki wirulencji, które ułatwiają im efektywną kolonizację gospodarza oraz wywołanie infekcji. Do tej grupy zaliczyć należy zewnątrzkomórkowe proteazy, m.in.: metaloproteazę (aureolizynę), proteazy serynowe (V8, grupa sześciu proteaz Spl, toksyny epidermolityczne) oraz proteazy cysteinowe (stafopainy A, B i C). W badaniach *in vitro* została udokumentowana rola proteaz w wirulencji bakterii *S. aureus*. Jednak w badaniach *in vivo* rola proteaz gronkowcowych podczas zakażenia pozostaje wciąż niewyjaśniona, a zwłaszcza rola stafopainy C wyizolowanej ze szczepu Ch-91 powodującego atopowe zapalenie skóry u kur. Z drugiej strony, różnorodność zwierzęcych modeli dotyczących infekcji *S. aureus* pozwala identyfikować i charakteryzować poszczególne czynniki wirulencji odpowiedzialne za udaną kolonizację gospodarza i rozwój choroby. Niestety, ta spotykana w specjalistycznym piśmiennictwie różnorodność zwierzęcych modeli wirulencji przyczynia się do otrzymywania sprzecznych wyników eksperymentalnych, i często mylących wniosków, ponieważ wpływ poszczególnych czynników wirulencji różni się między modelami. Zatem odpowiedni wybór modelu badawczego ma diametralnie różne znaczenie na wynik doświadczenia biorąc pod uwagę fakt, że czynniki wirulencji są specyficzne wobec konkretnego gospodarza, a niekoniecznie uniwersalne.

W oparciu o powyższe doniesienia w niniejszej rozprawie doktorskiej podstawę badań stanowiły szczepy *S. aureus* pochodzenia drobiowego oraz od innych gospodarzy. Uruchomiono dwa modele *in vivo*: model zarodka kurzego *Gallus gallus* oraz model nicienia *Caenorhabditis elegans*. Model zarodka kurzego *G. gallus* stanowił model dedykowany dla szczepów izolowanych od drobiu. Natomiast model nicienia *C. elegans* był modelem referencyjnym pozwalającym zweryfikować czy obserwowane różnice w wirulencji w modelu zarodka kurzego wynikają rzeczywiście z działania specyficznych czynników wirulencji. Dyskryminująca siła powszechnie stosowanego uniwersalnego modelu nicienia *C. elegans* była niska, podkreślając jego ograniczoną przydatność do badania wirulencji wśród szczepów *S. aureus*. Z kolei model zarodka kurzego *G. gallus* konsekwentnie podzielił

analizowane szczepy pochodzenia drobiowego w grupy wirulentne, niewirulentne i o pośrednim poziomie wirulencji. Jednakże nie było jasne, czy grupowanie to odzwierciedliło nieodłączne różnice między szczepami czy było może losowym efektem grupy doświadczalnej. Aby to ocenić szukano korelacji między profilem fenotypowym oraz genotypowym analizowanych szczepów i ich wirulencją w modelu zarodka kurzego *G. gallus*. W tym celu szereg uznanych metod typowania użyto do scharakteryzowania analizowanych szczepów. Wyniki zastosowanych metod genotypowych potwierdziły, że korelacja wirulencji szczepów *S. aureus* pochodzenia drobiowego z ich genotypem wykluczyła możliwość przypadkowego efektu eksperymentalnego układu w stosowanych modelach, i tym samym odzwierciedliła nieodłączne różnice między szczepami, wskazując tym samym na potencjalne użycie tego modelu w badaniach szczepów ludzkich i ich kolonizacji oraz wirulencji. Dodatkowo okazało się, że wiele fenotypowych i genetycznych cech było związanych z wysokim poziomem wirulencji w modelu zarodka kurzego *G. gallus*. Między innymi, wszystkie wirulentne szczepy cechowały się wysoką aktywnością proteolityczną i posiadały plazmid pAvX, który koduje proteazę cysteinową odpowiedzialną za wysoce proteolityczny fenotyp. Stąd w kolejnych badaniach skupiono się na wpływie wybranego czynnika – stafopainy C poprzez suplementację szczepów laboratoryjnych i szczepów pochodzenia drobiowego konstruktami plazmidowymi pozwalającymi na ich ekspresję. Wykazano, że zachowany był trend spadkowy przeżywalności zarodka kurzego szczepów z uzyskaną aktywnością proteolityczną w stosunku do kontrolnych szczepów transformowanych samym plazmidem, ale nie były to statystycznie istotne różnice. Z kolei w przypadku szczepu pierwotnie wykazującego aktywność proteolityczną zwiększenie stopnia aktywności proteolitycznej spowodowało wzrost przeżywalności w porównaniu do szczepu transformowanego samym plazmidem.

Multidyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań pozwolił na zgromadzenie podstawowych informacji na temat specyficznej wobec gospodarza wirulencji szczepów *S. aureus* z wykorzystaniem modeli *in vivo*. Przeprowadzono charakterystykę fenotypową, genetyczną szczepów *S. aureus* oraz szczegółową analizę wirulencji tych szczepów w dwóch modelach *in vivo*. Określono przydatność modelu zarodka kurzego *G. gallus* i modelu nicienia *C. elegans* w badaniach patogenezy gronkowcowej oraz wykazano, że odpowiedni wybór modelu doświadczalnego może znacząco wpływać na wyniki doświadczenia. Ponadto pokazano, że stafopaina C stanowi specyficzny wobec gospodarza drobiowego czynnik wirulencji co przyczyni się w przyszłości do poznania mechanizmów determinujących specyficzną kolonizację i wirulencję szczepów *S. aureus*.