Załącznik 3

AUTOREFERAT

Dr BENEDYKT WŁADYKA

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI

KRAKÓW, 2015

1. ***Imię i Nazwisko.***

Benedykt Władyka

2. ***Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.***

- Dyplom magistra biotechnologii; specjalność biologia molekularna; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskany w roku 2002
- Dyplom doktora nauk biologicznych; specjalność biochemia; Wydział Biofizyki, Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskany w roku 2007, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Operon stafopainy C, analiza i charakterystyka kodowanych białek", wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej (promotor: prof. dr hab. Adam Dubin)

3. ***Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.***

10-2008 – nadal	adiunkt, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
02-2008 – 09-2008	samodzielny biolog, WBBiB UJ
01-2008	umowa zlecenie, WBBIB UJ
11-2006 – 12-2007	samodzielny biolog ½ etatu, WBBiB UJ
10-2006 – 09-2007	asystent ½ etatu; WBBiB UJ

4. ***Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):***

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Osiągnięciem jest cykl pięciu oryginalnych publikacji naukowych pod tytułem „Biochemiczne, genetyczne i molekularne aspekty wirulencji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*".

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

Prace oryginalne

1. **Władyka, B.*#**, Bista, M.#, Sabat, A.J., Bonar, E., Grzeszczuk, S., Hryniewicz, W., Dubin, A. (2008) A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. Acta Biochimica Polonica, 55 (3), pp. 525-536.
IF (2008) = 1,448
MNiSW = 15

2. **Władyka, B.***, Kozik, A.J., Bukowski, M., Rojowska, A., Kantyka, T., Dubin, G., Dubin, A. (2011) α1-Antichymotrypsin inactivates staphylococcal cysteine protease in cross-class inhibition. Biochimie, 93 (5), pp. 948-953.
IF (2011) = 3,022
MNiSW = 30

3. Polakowska, K., Lis, M.W., Helbin, W.M., Dubin, G., Dubin, A., Niedziółka, J.W., Międzobrodzki, J., **Władyka, B.*** (2012) The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. Microbes and Infection, 14 (14), pp. 1352-1362.
IF (2012) = 2,920
MNiSW = 25

4. Bukowski, M.#, Łyżen, R., Helbin, W.M., Bonar, E., Szalewska-Pałasz, A., Węgrzyn, G., Dubin, G., Dubin, A., **Władyka, B.*#** (2013) A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system $PemIK_{Sa}$. Nature Communications, 4, art. no. 2012.
IF (2013) = 10,742
MNiSW = 45

5. **Władyka, B.,** Wielebska, K., Włoka, M., Bocheńska, O., Dubin, G., Dubin, A., Mak, P*. (2013) Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain CH-91. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (16), pp. 7229-7239.
IF (2013) = 3,811
MNiSW = 35

* autor korespondencyjny

równy udział autorów

Sumaryczny IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 21,943

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: 150

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Cykl publikacji powiązanych tematycznie, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego pt. „**Biochemiczne, genetyczne i molekularne aspekty wirulencji bakterii z rodzaju *Staphylococcus***” w przeważającej części powstał w wyniku realizacji kierowanego przeze mnie projektu badawczego MNiSW pt. „Identyfikacja i charakterystyka czynników zaangażowanych w specyficzną wobec gospodarza kolonizację i wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus*” (N N303 813340). Cykl obejmuje pięć publikacji doświadczalnych. We wszystkich pracach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego jestem autorem wiodącym lub korespondencyjnym. Współautorzy prac, których część stanowią pracujący pod moją opieką doktoranci i studenci, przedstawili swój udział w tych pracach w oświadczeniach stanowiących osobny załącznik.

Prace stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego obejmują:

(1) klonowanie genu oraz biochemiczną charakterystykę metaloproteazy z bakterii gatunku *S. pseudintermedius*, izolowanych ze zmian chorobowych u psów;

(2) biochemiczną analizę inhibicji proteazy cysteinowej przez alfa-1-antychymotrypsynę z osocza krwi ludzkiej i implikacje tego oddziaływania na wirulencję szczepów *S. aureus* pochodzenia drobiowego;

(3) charakterystykę genetyczną i biochemiczną szczepów bakterii *S. aureus* i wykazanie, że wirulencja szczepów w modelu zarodka kurzego koreluje z ich genotypem;

(4) charakterystykę układu toksyna-antytoksyna, $PemIK_{Sa}$, wraz z wykazaniem jego zaangażowania w regulację ekspresji genów mogących mieć wpływ na wirulencję *S. aureus*;

(5) izolację, biochemiczną charakterystykę oraz klonowanie genu kodującego bakteriocynę z wirulentnego dla drobiu szczepu bakterii gronkowca złocistego;

Cel naukowy prowadzonych badań.

Bakterie gronkowca są ważnym składnikiem prawidłowej mikroflory skóry ludzi i zwierząt. Z drugiej strony mikroorganizmy te odpowiedzialne są za rozliczne zakażenia i choroby wywoływane u swoich gospodarzy pozwalające zaklasyfikować je jako oportunistycznie patogenne. Pośród gronkowców szczególna uwaga skupia się na gronkowcu złocistym *Staphylococcus aureus*, którego cechuje stosunkowo najwyższa wirulencja i rosnąca lekooporność. Ponadto, o ile inne gatunki gronkowców wykazują wąskie spektrum gospodarzy (*S. epidermidis* – ludzie, *S. pseudintermedius* – psy, *S. hyicus* – świnie), o tyle bakterie gronkowca złocistego izolowane są ze stosunkowo szerokiej gamy gospodarzy (ludzie, bydło, konie, drób). Szczepy *S. aureus* pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego różnią się jednak pod wieloma względami [Sung et al., 2008; Smyth et al., 2009]. Rosnąca oporność gronkowca złocistego na klinicznie stosowane antybiotyki czyni z tego groźnego, ludzkiego i zwierzęcego oportunistycznego patogenu jedno z istotnych zagrożeń bakteriologicznych XXI wieku. Ponadto, uwagę badaczy przyciągają coraz częściej inne gatunki gronkowców, między innymi *S. pseudintermedius*, będące groźnymi oportunistycznymi patogenami zwierząt domowych i hodowlanych. Wykazano bowiem nie tylko ich rosnącą lekooporność lecz także przypadki transmisji na człowieka [Ruscher et al., 2009; Van Hoovels et al., 2010; Savini et al., 2013]. Podnosi to koszty leczenia i ochrony sanitarnej w hodowli zwierząt oraz stwarza istotne zagrożenie epidemiologiczne w związku ze zwiększoną mobilnością zwierząt. Sytuacja taka wymusza konieczność poszukiwania i projektowania nowych metod terapii antygronkowcowych, a racjonalne podejście do tego zagadnienia wymaga z kolei szczegółowej wiedzy o fizjologii gronkowców, molekularnych podstawach patogenezy chorób wywoływanych przez te bakterie oraz o czynnikach odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki i drogach jej przenoszenia.

Oddziaływanie patogennych bakterii na organizm gospodarza zachodzi przez tak zwane czynniki wirulencji, których sekwencje kodujące często zlokalizowane są na specyficznych ruchomych elementach genetycznych jak plazmidy czy wyspy patogenności. Taka organizacja genów czynników wirulencji sprawia, że mogą one podlegać skoordynowanej ekspresji jak również być przenoszone pomiędzy szczepami i gatunkami bakterii w wyniku rekombinacji materiału genetycznego czy horyzontalnego transferu genów. Ponadto różne gatunki i szczepy gronkowca konkurują ze sobą oraz z innymi bakteriami o tę samą niszę ekologiczną, którą jest organizm gospodarza. Wytwarzane przez te bakterie peptydowe czynniki antybakteryjne wpływają nie tylko na efektywną kolonizację gospodarza przez

patogen ale również poprzez interakcje z innymi mikroorganizmami pośrednio na wirulencję i zdolność do kolonizacji określonego gospodarza.

W przypadku większości infekcji i chorób wywoływanych przez gronkowce patogeneza jest wieloczynnikowa, tak więc trudno określić precyzyjnie rolę poszczególnych czynników wirulencji. Jednak w świetle odrębności szczepów ludzkich i zwierzęcych zdolność do efektywnej kolonizacji i wirulencja szczepów *S. aureus* jest związana z ekspresją czynników, które mogą być specyficzne wobec gospodarza a niekoniecznie „uniwersalne". Stawia to w nowym świetle badania nad czynnikami wirulencji tych bakterii. W szczególności odpowiedni wybór modelu doświadczalnego może znacząco wpłynąć na wyniki eksperymentów.

Rola proteaz w wirulencji gronkowców i preferencji w kolonizacji gospodarza.

Zewnątrzwydzielniczne proteazy stanowią poważną komponentę arsenału czynników wirulencji gronkowców. Ich rola została wykazana w wielu doświadczeniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, jednak otrzymywane rezultaty badań powyższymi metodami bywają niespójne lub prowadzą do nie w pełni jednoznacznych konkluzji. Wynika to z trudności w odtworzeniu parametrów infekcji w warunkach *in vitro* jak i możliwości zastosowania odpowiedniego modelu zwierzęcego. Nie można zatem jednoznacznie wykazać, że tylko i wyłącznie intensywność proteolityczna szczepu będzie miała bezpośrednie przełożenie na jego wirulencję [Kolar et al., 2013].

Sekrecyjne proteazy gronkowcowe i ich inhibitory od lat stanowiły przedmiot zainteresowań w Zakładzie Biochemii Analitycznej WBBiB UJ. W ramach prowadzonych badań zidentyfikowano operon kodujący proteazę cysteinową, stafopainę C (StpC), oraz jej specyficzny inhibitor, stafostatynę C [Dubin et al., 2007]. Enzym ten produkowany jest w stosunkowo dużych ilościach przez szczep *Staphylococcus aureus* CH91 izolowany ze zmian skórnych u drobiu [Władyka et al., 2011a]; jednak nie jest produkowany przez szczepy izolowane od ludzi. Postawiono zatem hipotezę, że stafopaina C może być przykładem czynnika wirulencji szczepów gronkowcowych zasocjowanych z gospodarzem drobiowym. Poszukiwano więc innych przykładów aby zweryfikować powyższą hipotezę. W tym celu pozyskano kolekcję szczepów gronkowców wykazujących ponadprzeciętną aktywność proteolityczną izolowanych ze zmian chorobowych u psów. Początkowo szczepy przy użyciu rutynowych testów mikrobiologicznych i biochemicznych zostały zaklasyfikowane do gatunku *S. aureus*. Jednak dogłębne badania molekularne wykazały jednoznacznie, że

szczepy te należą do gatunku *S. pseudintermedius*, w tym czasie stosunkowo nowego, wskazując istotność badań molekularnych w identyfikacji gronkowców pochodzenia zwierzęcego [Władyka et al., 2008]. Badane szczepy wykazywały wysoką aktywność proteolityczną podczas hodowli na podłożu stałym (Tryptic Soy Agar, TSA) z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka. Zaskakująco, w przypadku hodowli w podłożu płynnym (Tryptic Soy Broth, TSB) nie wykrywano aktywności proteolitycznej w płynie pohodowlanym. Jednak po wzbogaceniu podłoża w 5% mleko zaobserwowano taką aktywność pochodzącą od proteazy o masie cząsteczkowej około 32 kDa, co stwierdzono za pomocą zymografii. W toku dalszych badań wykazano, że czynnikiem indukującym obecność proteazy w płynie pohodowlanym są jony wapnia (Ca^{2+}) a nie kazeina lub inne składniki mleka. Po ustaleniu warunków hodowli gronkowców skutkujących produkcją proteazy oraz opracowaniu metody jej oczyszczania przystąpiono do biochemicznej charakterystyki enzymu. Sekwencjonowanie N-końca przy użyciu techniki degradacji Edmana ujawniło sekwencję o wysokim stopniu identyczności do metaloproteazy (aureolizyny) ze *S. aureus* [Sabat et al., 2000]. Ponadto aktywność enzymu hamowana była przez klasyczne inhibitory metaloproteaz takie jak EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) i 1,10-phenantroline, natomiast enzym zachowywał aktywność w obecności inhibitorów proteaz serynowych i cysteinowych (odpowiednio PMSF i E-64). Badania z wykorzystaniem metody „inverse-PCR" pozwoliły na uzyskanie sekwencji genu (*pst*) kodującego nowego przedstawiciela metaloproteaz, oraz sekwencji flankujących *pst*, które zostały zdeponowane w bazie danych. Wykorzystując technikę elektroforezy dwuwymiarowej (2D) wykazano silny modulujący wpływ metaloproteazy na proteom zewnątrzwydzielniczy szczepów *S. pseudintermedius*. Spośród ponad dwustu plamek białkowych zidentyfikowanych na żelach po rozdziale płynów pohodowlanych bakterii rosnących w TSB oraz w podłożu z dodatkiem 5 mM $CaCl_2$ wyróżniono 118 plamek białkowych różnicujących. Należy podkreślić, że wówczas identyfikacja różnicujących białek nie była możliwa z powodu braku dostępności sekwencji genomu *S. pseudintermedius*. Wykazano natomiast, że ekspresja genu metaloproteazy (*pst*) regulowana jest posttranskrypcyjnie, gdyż poziom transktyptu *pst* nie zmienia się niezależnie od obecności jonów Ca^{2+} w środowisku. Poziom jonów wapnia prawdopodobnie wpływa na stabilność struktury trzeciorzędowej proteazy i tym samym jej podatność na (auto)degradację. Taki wniosek można wyciągnąć z modelowania fragmentu cząsteczki wiążącej jony Ca^{2+}. Zatem wytwarzanie Pst zachodzi tylko w określonych warunkach w obecności jonów wapnia, co sugeruje, że dostępność Ca^{2+} moduluje aktywność proteolityczną szczepów *S. pseudintermedius* a tym samym reguluje związaną z tym wirulencję.

Podsumowując, w ramach prowadzonych badań:

- wykazano ponadprzeciętną aktywność proteolityczną szczepów gronkowców z gatunku *S. pseudintermedius* izolowanych ze zmian chorobowych u psów;

- wskazano potrzebę stosowania metod genetycznych do wiarygodnej identyfikacji szczepów gronkowca pochodzenia zwierzęcego, zwłaszcza charakteryzujących się nietypowym fenotypem;

- zidentyfikowano enzym odpowiedzialny za aktywność proteolityczną szczepów *S. pseudintermedius* jako metaloproteazę (Pst) oraz opracowano metodą jej oczyszczania i dokonano jej biochemicznej charakterystyki;

- sklonowano gen kodujący proteazę Pst oraz zbadano jego ekspresję;

- wykazano, że metaloproteaza silnie wpływa na egzoproteom *S. pseudintermedius*;

- wykazano ścisłą zależność zdolności produkcji proteazy Pst od obecności jonów Ca^{2+} w środowisku co wraz z modulacyjnym wpływem na proteom sugeruje jej zaangażowanie w interakcję gospodarz-patogen.

Równolegle do przedstawionych powyżej badań kontynuowano pracę nad biochemiczną charakterystyką stafopainy C oraz jej potencjalnym zaangażowaniem w wirulencję *S. aureus*. W szczególności skupiono się na nietypowej interakcji stafopainy C (StpC) z alfa-1-antychymotrypsyną (ATCH) z krwi ludzkiej. Wykazano bowiem, że StpC będąc proteazą cysteinową jest hamowana przez ACHT, serpinę - typowy inhibitor proteaz serynowych [Władyka et al., 2011b]. To rzadkie zjawisko nosi nazwę inhibicji międzyklasowej (ang. cross-class inhibition). Należy wspomnieć, że dwie pozostałe proteazy cysteinowe, stafopainy A i B, produkowane przez szczepy *S. aureus* izolowane od ludzi zachowują pełną aktywność w osoczu krwi ludzkiej i wraz z innymi zewnątrzwydzielniczymi proteazami gronkowcowymi mają zdolność do inaktywacji serpin i generacji kinin [Potempa et al., 1986; 1991; Imamura et al., 2002]. Może to w konsekwencji prowadzić do zaburzenia równowagi aktywności proteolitycznej gospodarza, szczególnie w miejscu infekcji, co jest z korzyścią dla patogenu [Maeda i Yamamoto, 1996; Armstrong, 2006].

Serpiny należą do ciekawej grupy inhibitorów charakteryzującym się tak zwanym samobójczym mechanizmem hamowania proteaz serynowych. Podczas hydrolizy wiązania peptydowego w obrębie pętli reaktywnej inhibitora następuje zmiana konformacyjna serpiny

skutkująca uwięzieniem proteazy w kowalencyjnym kompleksie z inhibitorem, z jednoczesnym uwolnieniem C-końcowej części serpiny [Gettings, 2002]. Wiele proteaz, w tym proteazy bakteryjnych patogenów, potrafią jednak uniknąć takiego związania z serpinami hydrolizując wiązanie peptydowe w obrębie pętli, co prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji inhibitora. W toku badań wykazano, że stafopaina C hamowana jest przez ACHT w stosunku molowym 1:2 co wskazywało na równoległy przebieg zarówno procesu inhibicji jak i degradacji serpiny. Rzeczywiście, sekwencjonowanie uwolnionego C-końcowego fragmentu wykazało dwa równocenne miejsca hydrolizy (L383-S384 i S384-A385) w obrębie pętli reaktywnej inhibitora. Miejsca te odpowiadają kolejno pozycjom P1-P1' oraz P1'-P2' (numeracja zgodna z konwencją Schechter i Berger, 1967) dla katepsyny G, docelowej proteazy hamowanej przez ACHT oraz specyficzności substratowej StpC preferującej reszty leucyny i izolecyny (L i I) w pozycji P2 (co odpowiada L382 i L383 dla hydrolizowanych wiązań L383-S384 i S384-A385). Postulowano, że hydroliza jednego z wiązań peptydowych skutkuje inhibicją StpC, natomiast drugiego bezproduktywną inaktywacją ACHT. W celu udowodnienia tego postulatu przygotowano dwa warianty rekombinowanej serpiny (ACHT L382A i ACHT L383A), w których jedną z reszt leucyny zamieniono na alaninę. Następnie wyznaczono stechiometrię inhibicji (SI) dla obu wariantów ACHT oraz miejsce hydrolizy w obrębie pętli reaktywnej. Mutant ACHT L383A wydajnie hamował StpC z wartością SI bliskiej jeden, natomiast wariant ACHT L382A okazał się praktycznie nieaktywny (SI = 12). Dla obu mutantów wykazano pojedyncze miejsce trawienia pętli. Wynik oddziaływania StpC z ACHT zależy zatem od wyboru miejsca początkowej interakcji w obrębie pętli reaktywnej. Cięcie L383-S384 skutkuje wytworzeniem kompleksu i inhibicją StpC podczas hydroliza S384-A385 prowadzi do inaktywacji ACHT. Aby zbadać fizjologiczne znaczenie inhibicji stafopainy C przez ACHT zastosowano opracowany wcześniej test koekspersji wykorzystany do wydajnej produkcji stafopainy A [Władyka et al., 2005]. Podobnie jak w przypadku stafopainy A, produkcja rekombinowanej StpC w komórkach *Eschericha coli* możliwa jest jedynie po zahamowaniu jej enzymatycznej aktywności przez dedykowany inhibitor białkowy, np. stafostatynę C [Dubin et al., 2007; Władyka et al., 2011]. W przypadku koekspresji StpC z ACHT oraz mutantem ACHT L383A otrzymano wydajną produkcję rekombinowanej stafopainy C, natomiast nie obserwowano jej produkcji w przypadku koekspresji z wariantem ACHT L382A. Potwierdzono zatem rolę reszt leucyny w inhibicji stafopainy C przez ACHT oraz wykazano, że proces ten zachodzi wydajnie nie tylko *in vitro* ale również w modelu *in vivo* odzwierciedlającym warunki podczas próby potencjalnej infekcji człowieka przez szczepy *S. aureus* zaadaptowane do drobiu. Wykazano ponadto, że

StpC jest wydajnie hamowana w osoczu krwi ludzkiej a czynnikiem odpowiedzialnym za inhibicję jest właśnie ACHT co potwierdzono za pomocą techniki Western blot wykrywając kowalencyjne kompleksy StpC-ACHT. Stafopaina C zachowuje natomiast pełną aktywność w osoczu krwi kurzej co wskazuje, że krew kurza nie zawiera inhibitorów mogących w sposób porównywalny do krwi ludzkiej zahamować aktywności StpC. Wyniki te mocno sugerują, że stafopaina C może być traktowana jako potencjalny czynnik wirulencji związany z szczepami *S. aureus* zasocjowanymi z gospodarzem drobiowym. Inhibicja StpC przez ACHT wyjaśniać też może dlaczego produkcji tej proteazy nie obserwowano nigdy u szczepów izolowanych od ludzi mimo, że gen *stpC* znajduje na plazmidzie i mógłby ulegać ułatwionemu rozprzestrzenianiu wśród szczepów gronkowcowych jeśli jego obecność byłaby korzystna dla bakterii. Wiele wskazuje jednak na to, że StpC lub/i inne białka kodowane na plazmidzie pCH91 (opisanego w ramach prac nad StpC oraz równolegle opisanego przez innych badaczy jako pAvX [Lowder et al., 2009]) mogą mieć znaczenie dla preferencyjnej kolonizacji/wirulencji wobec gospodarza drobiowego. Grupa badaczy pod kierunkiem prof. R. Fitzgerald'a na łamach PNAS wykazała, że niedawna zmiana preferencji pewnych szczepów *S. aureus* wobec gospodarza z ludzi na drób związana była z nabyciem pewnej puli genów w tym plazmidu pAvX oraz utratą (pseudogenizacją, ang. pseudogenisation) genów, których produkty są zbędne w przypadku kolonizacji drobiu, np. genu białka A wiążącego ludzkie IgG ale nie przeciwciała wytwarzane przez drób) [Lowder et al., 2009].

Podsumowując, w ramach charakterystyki stafopiany C:

- wykazano, że proteaza ta jest wydajnie hamowana w osoczu krwi ludzkiej oraz wskazano alfa-1-antychymotrypsynę jako czynnik odpowiedzialny za obserwowaną inhibicję;

- zidentyfikowano miejsca interakcji StpC z ACHT i z użyciem rekombinowanych inhibitorów wykazano hydrolizę wiązania L383-A384 jako skutkującego inhibicją proteazy;

- za pomocą testu koekspresji udowodniono występowanie inhibicji w modelu *in vivo*;

- zidentyfikowano, że gen kodujący stafopainę C (*stpC*) kodowany jest na plazmidzie;

- wskazano inhibicję StpC przez ACHT jako możliwy powód braku występowania tej proteazy w szczepach *S. aureus* izolowanych od ludzi i innych zwierząt poza drobiem;

- wykazano, że StpC zachowuje aktywność w osoczu krwi kurzej co może odzwierciedlać rozpowszechnienie proteazy wśród szczepów izolowanych od drobiu i wskazuje na potencjalną rolę w preferencji kolonizacji/wirulencji wobec gospodarza.

Genetyczna charakterystyka szczepów gronkowcowych w korelacji z ich wirulencją.

Po wykazaniu, że stafopaina C może być czynnikiem promującym drobiowo-specyficzną kolonizację gospodarza przez szczepy *S. aureus* ją produkujące poszukiwano innych czynników mogących spełniać podobną rolę. W tym celu należało zastosować odpowiedni model oceny wirulencji szczepów gronkowcowych. Wybór modelu doświadczalnego miał szczególne znaczenie w kontekście doniesień literaturowych pokazujących, że przeżywalności bakterii *S. aureus* izolowanych ze zmian chorobowych u drobiu i ludzi w odpowiednio drobiowych i ludzkich komórkach układu immunologicznego wykazuje większą przeżywalność tych pierwszych jedynie w komórkach drobiowych [Lowder et al. 2009]. Zatem zastosowanie „uniwersalnych" modeli oceny wirulencji szczepów gronkowcowych (myszy, nicień *Caenorhabditis elegans*) [Reed et al. 2001; Sifri et al. 2003] może prowadzić do fałszywie pozytywnych lub/i negatywnych wyników. Przyjęto założenie, że do badania wirulencji szczepów pochodzących od drobiu modelem poprawnie odzwierciedlającym interakcje specyficzny gospodarz – specyficznie zaadaptowany patogen będzie model zarodka kury domowej (*Gallus gallus*). Natomiast jako model referencyjny wybrano nicienia *C. elegans*, w którym zakładana wirulencja szczepów gronkowcowych będzie wynikała z działania „uniwersalnych" czynników wirulencji bez preferencji wobec konkretnego gospodarza. Aby zweryfikować powyższe założenia zbadano wirulencję 43 szczepów gronkowcowych (uzyskanych z kolekcji prof. Jacka Międzobrodzkiego z WBBiB UJ oraz prof. Ross'a Fitzgerald'a z The Roslin Institute and Centre for Infectious Diseases, Royal School of Veterinary Studies, Edynburg, Szkocja) w obu modelach doświadczalnych. Badania wirulencji w modelu zarodka kurzego wykonano na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie w ramach nawiązanej współpracy z dr. Marcinem Lisem (kierownik Katerdy prof. Jerzy Niedzółka). Natomiast badania z wykorzystaniem nicieni wykonano na WBBiB UJ. Wśród testowanych bakterii znajdowało się 39 szczepów *S. aureus* (21 szczepów pochodzących od drobiu, 9 szczepów izolowanych od innych zwierząt, 6 szczepów izolowanych od ludzi oraz 3 szczepy laboratoryjne), 3 szczepy *S. xylosus* izolowane od zdrowego drobiu oraz szczep *S. epidermidis* (izolat kliniczny ATCC 35547). Wirulencja szczepów (definiowana jako zdolność do uśmiercenia zarodka lub nicienia po 7 dniach od kontaktu z badanym szczepem) w obu modelach różniła się zdecydowanie. W

modelu zarodka kurzego rozrzut wirulencji wśród szczepów był szeroki (śmiertelność w granicach od 10% do 100%). Ponadto, szczepy pochodzenia drobiowego wykazywały wyższą zjadliwość (mediana śmiertelności około 60%) niż szczepy izolowane od innych zwierząt i ludzi (mediana śmiertelności około 30%). Obserwacje te pozwoliły podzielić szczepy pochodzące od drobiu na wirulentne (śmiertelność zarodków powyżej 92,5%), niewirulentne (śmiertelność poniżej 35%) oraz o pośredniej zjadliwości. Natomiast w modelu nicienia rozrzut wirulencji był zdecydowanie niższy (śmiertelność w granicach od 60% do 85%) niezależnie od pochodzenia szczepów. Co istotne, użyty jako kontrola szczep kliniczny *S. epidermidis* ATCC 35547 był zupełnie nieszkodliwy dla nicieni, natomiast najwyższą zjadliwością (około 90% śmiertelność) charakteryzowały się szczepy *S. xylosus*, które znalazły się wśród najmniej wirulentnych (śmiertelność poniżej 30%) w modelu zarodka kurzego. Wynik ten pokazuje z jaką ostrożnością należy podchodzić do oznaczeń wirulencji w modelach *in vivo*. Wskazuje to ponadto użyteczność modelu zarodka kurzego do oznaczania wirulencji szczepów gronkowcowych pochodzenia drobiowego, gdyż w myśl założeń nieszkodliwy komensal drobiowy, jakim jest *S. xylosus* [Kloos et al., 1976], nie powinien charakteryzować się zjadliwością w modelu doświadczalnym do oznaczania wirulencji.

Równolegle do badań wirulencji szczepów gronkowcowych z użyciem dwóch różnych modeli *in vivo* dokonano szczegółowej genetycznej charakterystyki szczepów *S. aureus* pochodzących od drobiu. Uzyskane wyniki skorelowano z poziomem wirulencji szczepów w modelu zarodka kurzego. Okazało się, że szczepy wirulentne i niewirulentne różnią się od siebie pod względem genetycznym. W szczególności wszystkie szczepy wirulentne (8) posiadają plazmid pAvX kodujący między innymi proteazę cysteinową stafopainę C. Wśród szczepów niewirulentnych (6) tylko dwa posiadają ten plazmid. Wszystkie szczepy wirulentne należą do typu drugiego *agr*, natomiast niewirulentne do typu I lub III. Ponadto wzór restrykcyjny oznaczony metodą RFLP dla genu *trap* jest identyczny dla wszystkich szczepów wirulentnych i inny niż ten oznaczony dla szczepów niewirulentnych. Typowanie metodą MLST także wykazało korelację z wirulencją. Wszystkie szczepy wykazujące wysoką wirulencję w modelu zarodka kurzego należały do typu ST5 lub bardzo zbliżonego typu ST1346, podczas gdy szczepy niewirulentne należały do typów ST1, ST692 oraz ST1347. Ponadto, dendrogramy sporządzone na podstawie innych metod typowania genetycznego (PFGE, RAPD, Eric2, MLVF i triplex PCR) również lokowały szczepy wirulentne na odrębnej gałęzi niż szczepy niewirulentne [Polakowska et al., 2012].

Podsumowując,

- dokonano oznaczenia wirulencji szczepów gronkowcowych w dwóch modelach doświadczalnych *in vivo*, modelu zarodka kurzego *G. gallus* i modelu nicienia *C. elegans*;

- model zarodka kurzego charakteryzuje się wysoką siłą różnicującą, co pozwoliło podzielić badane szczepy gronkowcowe na grupy o wysokiej, pośredniej i niskiej zjadliwości;

- wykazano, że model nicienia ma ograniczoną siłę różnicującą i może generować fałszywie pozytywne wyniki (wysoka zjadliwość komensalnych dla drobiu szczepów *S. xylosus*);

- dokonano szczegółowej charakterystyki szczepów gronkowcowych z wykorzystaniem szeregu metod typowania genetycznego;

- wykazano, że wirulencja szczepów gronkowcowych koreluje z ich genotypem w modelu zarodka kurzego wskazując na stabilne genetyczne różnice pomiędzy szczepami wirulentnymi i niewirulentnymi, których podłoże oraz molekularne i proteomiczne konsekwencje są przedmiotem dalszych badań.

Układ toksyna-antytoksyna i jego regulacyjna rola w wirulencji gronkowców.

Po wykazaniu, że stafopaina C, o potencjalnej roli w wirulencji i preferencji do kolonizacji drobiu szczepami produkującymi ten enzym, kodowana jest na plazmidzie pCH91 (w szczepie *S. aureus* CH91, w innych szczepach izolowanych od drobiu plazmid nosi nazwę pAvX) podjęto próbę szczegółowej charakterystyki tego plazmidu. W tym celu uzyskano sekwencję plazmidu metodą „primer walking" oraz dokonano analizy bioinformatycznej. W jej wyniku wykryto potencjalny system toksyna-antytoksyna.

Układy toksyna-antytoksyna (TA) występują powszechnie u bakterii a ich liczba jest zmienna w zależności od gatunku a nawet szczepu (u gronkowców od 1 do 8). Składają się one z „toksyny", która często jest specyficzną wobec danej sekwencji endorybonukleazą i z „antytoksyny" będącej dedykowanym inhibitorem „toksyny". Komponenty układu kodowane są w operonie, w którym gen antytoksyny poprzedza gen toksyny. Układ TA występuje w komórce w postaci nieaktywnego kompleksu. Aktywacja systemu następuje na skutek zaburzenia równowagi w ilości składowych kompleksu, często w wyniku proteolitycznej degradacji stosunkowo labilnej antytoksyny. Pozwala to na uwolnienie aktywności enzymatycznej toksyny, co w konsekwencji powoduje tak zwane zatrucie komórki prowadzące do zahamowania jej wzrostu lub nawet śmierci. Początkowo postulowano, że rolą

układów TA jest pomoc w utrzymywaniu ruchomych elementów genetycznych (przede wszystkim plazmidów) w populacji bakteryjnej poprzez eliminację komórek, które utraciły plazmid kodujący między innymi układ TA. Niedawne odkrycie, że systemy te kodowane są również w puli chromosomalnego materiału genetycznego wymusiły korektę pierwotnie postulowanej funkcji. Obecnie rola systemów TA w fizjologii bakterii jest przedmiotem burzliwej dyskusji. Między innymi uważa się, że systemy TA pomagają przetrwać bakteriom lub przygotować je na niekorzystne warunki środowiskowe. Odbywa się to poprzez zahamowanie wzrostu i podziałów komórki w wyniku szeregu zmian na poziomie transkryptomu i proteomu. Skutkuje to wytworzeniem fenotypu typu „persister" (między innymi przejściowo opornego na działanie antybiotyków), do czasu zmian warunków środowiska na korzystne do dalszego wzrostu [Bukowski et al., 2011; Maisonneuve et al., 2011].

Aby zweryfikować funkcjonalność systemu TA wykrytego na plazmidzie pCH91, któremu nadano nazwę PemIK, wykorzystano uznaną metodę polegającą na koekspresji obu komponentów systemu w gospodarzu heterologicznym, w komórkach *Escherichia coli*. W tym celu przygotowano konstrukty plazmidowe pozwalające na ekspresję antytoksyny (pACYCDuet-pemI) i toksyny (pETDuet-pemK) pod kontrolą promotora T7 indukowanego za pomocą IPTG (izopropylo-1-tio-β-D-galaktopiranozyd). Po indukcji bakterie transformowane plazmidem pACYCDuet-pemI produkowały rekombinowaną antytoksynę w obfitych ilościach, jak wykazano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Nie zaobserwowano natomiast produkcji toksyny w oparciu o plazmid pETDuet-pemK. Co więcej indukcja ekspresji za pomocą IPTG skutkowała zahamowaniem wzrostu bakterii co w sposób jednoznaczny wskazywało na toksyczność produktu dla gospodarza. Co istotne, jednoczesna koekspresja w oparciu o oba plazmidy skutkowała produkcją obu białek rekombinowanych wskazując na neutralizującą rolę antytoksyny eliminującą toksyczność PemK dla gospodarza i tym samym potwierdzając funkcjonalność obu komponentów układu TA. Wykazano ponadto, że toksyna i antytoksyna oddziałują ze sobą w komórce, gdyż w wyniku oczyszczania znakowanej metką histydynową toksyny z wykorzystaniem kolumny z immobilizowanymi jonami niklu odzyskano kompleks TA. W badaniach *in vitro* za pomocą filtracji żelowej udowodniono, że komponenty układu tworzą heterodimer, w którym PemI hamuje aktywność enzymatyczną PemK.

Komponenty układu PemIK kodowane są na plazmidzie. Zatem, naturalną rolą tego systemu wydaje się być stabilizacja plazmidu pCH91 (pAvX) kodującego czynniki potencjalnie

zaangażowane w preferencje w kolonizacji/wirulencji szczepów *S. aureus* wobec gospodarza drobiowego. Próby „wyleczenia" szczepu *S. aureus* CH91 z plazmidu, monitorowane za pomocą badania utraty aktywności proteolitycznej pochodzącej od stafopainy C, nie powiodły się. Pośrednio sugeruje to wewnętrzną presje selekcyjną pochodzącą od układu PemIK. Aby w sposób jednoznaczny wykazać rolę systemu w stabilizacji plazmidu wykonano dwa doświadczenia. W pierwszym z nich, bakterie *E. coli* kotransformowano dwoma plazmidami pACYCDuet-pemI i pETDuet-pemK a stabilność pACYCDuet-pemI w populacji bakteryjnej monitorowana była w obecności antybiotykowej presji selekcyjnej w stosunku do plazmidu kodującego toksynę (pETDuet-pemK). Zakładano że, jeżeli PemI jest rzeczywiście potrzebna do neutralizacji toksycznego efektu PemK wtedy pACYCDuet-pemI powinien być utrzymywany w populacji bez potrzeby zewnętrznej presji selekcyjnej. Okazało się, że plazmid ten był stabilnie utrzymywany przez okres eksperymentu (23 dni) podczas gdy ten sam plazmid w obecności plazmidu kontrolnego (pETDuet) w przeważającej części został utracony przez komórki *E. coli*. W drugim eksperymencie zastosowano gospodarza homologicznego (*S. aureus* RN4220), którego stransformowano plazmidem pozwalającym na konstytutywną ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP), do którego wprowadzono kasetę kodującą układ PemIK pod kontrolą jego własnego promotora. Po transformacji komórki hodowane były bez antybiotykowej presji selekcyjnej a obecność plazmidu była monitorowana bezpośrednio za pomocą oznaczania fluorescencji kolonii bakteryjnych. W tych warunkach plazmid (pALCP2G-pemIK) był stabilnie utrzymywany (6 dni), podczas gdy plazmid kontrolny (pALCP2G) w dużej części został utracony przez bakterie. Dane te pokazują jednoznacznie, że PemIK pełni decydującą rolę w stabilizacji plazmidu u *S. aureus*.

Po wykazaniu roli układu PemIK w stabilizacji plazmidu skupiono się nad badaniem mechanizmu toksyczności PemK. Doniesienia literaturowe wskazywały, że toksyny z podobnych układów posiadają aktywność rybonukleolityczną [Zhu et al., 2009; Maisonneuve et al., 2011]. Rzeczywiście, inkubacja PemK z RNA pochodzącym z faga MS2 wykazała, że toksyna ta jest rybonukleazą. Co istotne, w wyniku trawienia RNA powstawał wyraźny wzór prążkowy co sugerowało, że PemK może wykazywać specyficzność wobec sekwencji (lub struktur drugorzędowych). Aby zidentyfikować miejsca hydrolizy, we współpracy z grupą prof. Grzegorza Węgrzyna (Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański), zastosowano mapowanie w oparciu o metodę „primer extension". W wyniku doświadczenia wyznaczono jednoznaczną czteronukleotydową sekwencję (U↓AUU, gdzie strzałka oznacza miejsce hydrolizy) rozpoznawaną przez toksynę PemK. Specyficzność

toksyny, jak również przeprowadzone, w oparciu o dostępne dane genomowe, analizy bioinformatyczne (wskazujące, że systemy homologiczne do *pemIK* kodowane są w puli chromosomowego materiału genetycznego) pozwoliły postawić hipotezę, że stabilizacja plazmidu nie jest jedyną rolą systemu PemIK. Mając na uwadze specyficzność PemK atrakcyjna wydaje się być hipoteza o jej roli jako globalnego regulatora degradującego tylko wybraną pulę transkryptów, pod warunkiem, że dystrybucja rozpoznawanej sekwencji w transkryptomie będzie nieprzypadkowa (nierównomierna). Aby zweryfikować to założenie przeprowadzono analizy bioinformatyczne w oparciu o skrypty stworzone przez dr. Michała Bukowskiego (w tym czasie doktoranta pracującego pod moją bezpośrednią opieką). Statystycznie w genomie *S. aureus* ED98 (szczep izolowany od drobiu posiadający plazmid pAvX, którego genom był dostępny w czasie prowadzenia analiz [Lowder et al., 2009]) sekwencja UAUU rozpoznawana przez PemK powinna występować raz na 77 zasad, więc teoretycznie powinna występować przynajmniej raz w każdym genie. Analizy bioinformatyczne wykazały jednak, że w obrębie 2869 otwartych ramek odczytu (ORF) sekwencja ta nie występuje w 56 ORF a w kolejnych 65 jest statystycznie istotnie niedoreprezentowana. Co interesujące okazało się, że grupy te reprezentują nieprzypadkowe transkrypty, wśród których znajdują się takie kodujące białka jak: regulator transkrypcji Fur, hemolizyna delta, zewnątrzkomórkowe enzymy takie jak metaloproteaza – aureolizyna i lipaza, koagulaza, białka wiążące białka gospodarza takie jak czynnik zlepiający A (clumping factor A), białko wiążące czynnik von Willebrant'a, oraz białko wiążące fibronektynę o udowodnionej roli w wirulencji gronkowców. Ponadto zidentyfikowano 214 ORF, w których sekwencja rozpoznawana przez PemK była statystycznie istotnie nadreprezentowana. Co ciekawe, w tej grupie przeważały transkrypty kodujące transportery transbłonowe. Zatem nierównomierna dystrybucja sekwencji rozpoznawanej przez toksynę w transkryptomie gronkowcowym wskazuje na regulatorową rolę PemK.

Wyniki analiz bioinformatycznych sugerujących rolę toksyny PemK w regulacji ekspresji genów należało jednak potwierdzić eksperymentalnie. W tym celu stosując zarówno podejście *in vitro* jak i *in vivo* zweryfikowano podatność wybranych transkryptów genów o niedo- i nadreprezentacji sekwencji rozpoznawanej przez PemK na ich degradację przez toksynę. *In vitro* stabilność transkryptów monitorowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Tak jak zakładano, zaobserwowano proporcjonalną do liczby rozpoznawanych sekwencji prędkość degradacji transkryptów. Dodatkowo, aby potwierdzić tę zależność i skorelować ją ze specyficznością toksyny wykorzystano transkrypty syntetycznych genów, w których w

pierwszym przypadku usunięto wszystkie osiem sekwencji rozpoznawanych przez PemK a w drugim wprowadzono dziewięć takich sekwencji (nie zmieniając sekwencji kodowanego białka). W obu przypadkach zaobserwowano odwrócenie podatności transkryptów na degradację przez toksynę. Aby zweryfikować działanie PemK *in vivo*, zbadano stabilność wybranych transkryptów gronkowcowych genów wprowadzonych do komórek *E. coli* podczas indukowanej ekspresji rekombinowanej toksyny. Tu również obserwowano (za pomocą metody „reverse transcriptase PCR") odwrotną zależność między stabilnością transkryptów a liczbą sekwencji rozpoznawanych przez PemK. Taką samą zależność wykazano w drugim eksperymencie *in vivo*, w którym do komórek *S. aureus* RN4220 wprowadzono plazmid (pCN51-pemK) z genem toksyny pod kontrolą promotora indukowanego jonami kadmu. Powyższe dane wskazują zatem, że toksyna PemK może selektywnie wpływać na poziom wybranych transkryptów w puli całkowitego mRNA. Tak więc toksyna ta może działać jako globalny regulator ekspresji genów u *S. aureus*, w przypadku aktywacji układu toksyna-antytoksyna, obniżając ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm podstawowy i transport transbłonowy oraz relatywnie podnosząc (lub pozostawiając na tym samym poziomie) ekspresję genów wybranych czynników wirulencji.

Niemniej jednak aby proponowana regulacyjna rola układu PemIK mogła być spełniona potrzebny jest zarówno mechanizm aktywujący układ (prowadzący do uwolnienia aktywności rybonukleazowej toksyny PemK) jak i sposób dezaktywacji systemu (prowadzący do ponownego związania toksyny z antytoksyną PemI). O ile mechanizmy aktywacji systemów TA są znane (jak wspomniano często polegają na proteolitycznej degradacji labilnej antytoksyny) to pytanie o mechanizm powrotu układu do stanu równowagi pozostawało dotychczas bez odpowiedzi. W ramach prowadzonych prac po raz pierwszy zaproponowano sposób dezaktywacji systemu przedstawiając dowody eksperymentalne na potwierdzenie postulowanego mechanizmu. Powrót zaktywowanego systemu do stanu równowagi możliwy jest dzięki odporności transkryptów komponentów układu (szczególnie transkrytpu genu antytoksyny *pemI*) na działanie toksyny co potwierdzono w eksperymentach *in vitro* oraz *in vivo*. Co równie istotne, w układzie pozwalającym na sekwencyjną indukcję ekspresji toksyny i antytoksyny w komórkach *E. coli* wykazano również, że produkcja rekombinowanej antytoksyny PemI w komórce możliwa jest również w obecności zaktywowanej toksyny PemK. Zatem, w warunkach homeostazy układ TA pozostaje nieaktywny, gdyż cała pula toksyny związana jest przez antytoksynę. W wyniku działania czynnika aktywującego

(którego natura w przypadku systemu PemIK nie jest znana i pozostaje przedmiotem dalszych badań) ubywa antytoksyny, co przekłada się na uwolnienie aktywności rybonukleazowej toksyny, która dzięki specyficzności substratowej może modulować ilość transkryptu różnych genów, tym samym spełniając rolę regulatorową. Jednak zarówno mRNA dla antytoksyny jak również aparat biosyntezy białka pozostają niewrażliwe na działanie toksyny. Powoduje to, że gdy tylko działanie zaburzające równowagę układu ustanie, system spontanicznie wróci do stanu równowagi poprzez odtworzenie puli brakującej antytoksyny [Bukowski et al., 2013].

Podsumowując:

- wykryto i scharakteryzowano system toksyna-antytoksyna (PemIK) kodowany na plazmidzie pCH91 charakterystycznym dla szczepów *S. aureus* pochodzących od drobiu;

- wykazano funkcjonalność systemu PemIK w układzie heterologicznym i wzajemne oddziaływanie komponentów systemu w badaniach *in vitro*;

- udowodniono rolę systemu PemIK w stabilizacji plazmidów;

- wykazano, że toksyna PemK ma aktywność rybonukleazy i wyznaczono jej specyficzność substratową wobec sekwencji U↓AUU;

- w badaniach bioinformatycznych wykazano nierównomierną dystrybucję sekwencji rozpoznawanej przez PemK w transkryptomie *S. aureus*;

- wykazano regulacyjną rolę toksyny PemK w modulacji poziomu ekspresji genów u gronkowców;

- przedstawiono mechanizm odwracalnej aktywacji systemów toksyna-antytoksyna oparty na odporności transkryptu antytoksyny na degradację przez toksynę.

Bakteriocyna BacCH91 i jej związek z preferencją szczepów *S. aureus* wobec gospodarza.

Bakteriocyny to bioaktywne cząsteczki o charakterze peptydowym produkowane przez szereg różnych bakterii. Generalnie uważa się, że pozwalają one produkującym je szczepom zwiększyć konkurencyjność poprzez eliminację lub spowolnienie wzrostu innych mikroorganizmów w danej niszy ekologicznej. Niektóre szczepy gronkowców również wytwarzają bakteriocyny co może przekładać się na ich sukces w kolonizacji gospodarza i w konsekwencji, poprzez zaburzenie równowagi flory bakteryjnej, do skutecznego rozwoju i

wywołania infekcji. Biochemiczna i funkcjonalna charakterystyka bakteriocyn wpisuje się zatem w nurt badań nad czynnikami zaangażowanymi w interakcje gospodarz-patogen. Ponadto, należy wspomnieć również o aspekcie aplikacyjnym, bakteriocyny bowiem stosowane są coraz częściej w przemyśle spożywczym do zabezpieczania żywności, rośnie też ich potencjał jako alternatywa dla antybiotyków, zwłaszcza w kontekście rosnącej lekooporności szczepów bakterii, w tym gronkowców.

Podczas charakterystyki szczepu *S. aureus* CH91, produkującego stafopainę C, zaobserwowano jego zdolność do inhibicji wzrostu innych szczepów gronkowca na podłożu stałym. Czynnik hamujący miał charakter peptydowy, co wykazały badania wstępne. Postanowiono zatem dokonać jego identyfikacji i charakterystyki. W tym celu opracowano metodę oczyszczania czynnika, nazwanego BacCH91, składającą się z precypitacji podłoża pohodowlanego za pomocą siarczanu amonu, ekstrakcji precypitatu z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych (mieszanina metanolu i chloroformu) oraz chromatografii wysokosprawnej z użyciem kolumny C8 w układzie odwróconych faz. Po oczyszczeniu wyznaczono masę BacCH91 (2074,9 Da) za pomocą spektrometrii masowej. Bezpośrednie sekwencjonowanie z wykorzystaniem metody degradacji Edmana pozwoliło na uzyskanie jedynie fragmentarycznych danych co sugerowało modyfikacje potranslacyjne, typowe dla lantybiotyków. Dopiero chemiczne upochodnienie cząsteczki za pomocą etanetiolu (ang. ethanethiol) pozwoliło na uzyskanie pełnej sekwencji tego 21-aminokwasowego peptydu. Badania aktywności przeciwbakteryjnej wykazały, że wszystkie użyte w badaniach do testów bakterie gram-ujemne oraz *Lactococcus lactis* były oporne na działanie bakteriocyny (do najwyższego testowanego stężenia, 100 μM). Największą wrażliwością charakteryzował się szczep *Micrococcus luteus* DSMZ 20030 (minimalne stężenie hamujące, MIC, 2,5 nM), natomiast badane szczepy gronkowców wykazywały MIC w granicach stężeń mikromolowych. W badaniach dotyczących wpływu pH na aktywność BacCH91 wykazano, że po kilkugodzinnej inkubacji w buforach o pH 3-6 bakteriocyna zachowywała pełną aktywność, natomiast w buforach o pH 7 i wyżej stopniowo ją traciła. Inkubacja w buforze o pH 11 skutkowała całkowitą utratą aktywności biologicznej. BacCH91 zachowuje aktywność po godzinnej inkubacji w temperaturze do 80 °C, powyżej tej wartości następuję jednak gwałtowna utrata właściwości. Polipeptyd ten jest odporny na działanie proteaz, w tym zewnątrzwydzielniczych enzymów gronkowcowych takich jak aureolizyna, stafopainy A i B oraz proteaza V8. Nie dezaktywują jej również enzymy trawienne (pepsyna, trypsyna i chymotrypsyna) oraz proteazy produkowane przez komórki układu odpornościowego

(elastaza i katepsyna G z neutrofili). Ze względu na to, że BacCH91 wydzielana jest na zewnątrz komórki wraz ze znaczącymi ilościami stafopainy C sprawdzono również wpływ tej proteazy na ewentualny jej udział w obróbce potranslacyjnej i stabilności bakteriocyny. W tym celu bakterie szczepu *S. aureus* CH91 hodowano w podłożu z dodatkiem inhibitora proteaz cysteinowych (E-64). Jak wykazano za pomocą analiz HPLC podłoża hodowlanego, poziom bakteriocyny nie zmieniał się niezależnie od stężenia inhibitora i był taki sam jak dla próby kontrolnej (podłoże bez dodatku E-64). Potwierdzono tym samym, że stafopaina C nie bierze udziału w dojrzewaniu BacCH91 oraz nie wpływa na jej stabilność.

Badania z wykorzystaniem metod bioinformatycznych oraz biologii molekularnej dostarczyły ciekawych wyników dotyczących genu kodującego bakteriocynę, jego otoczenia i rozpowszechnienia w szczepach *S. aureus*. Przeszukiwanie sekwencyjnych baz danych z wykorzystaniem algorytmu BLASTp ujawniło, że identyczne sekwencje kodowane są tylko w kilku genomach szczepów *S. aureus* izolowanych od zwierząt. Natomiast sekwencje homologiczne, różniące się kilkoma aminokwasami znajdują się wśród otwartych ramek odczytu szczepów pochodzenia ludzkiego jak i zwierzęcego. Nie zidentyfikowano natomiast sekwencji BacCH91 w obrębie szczepu *S. aureus* ED98 izolowanego od drobiu. Wskazuje to, że gen bakteriocyny występuję tylko w niektórych szczepach gronkowca złocistego, ponadto w dwóch postaciach (*bac1* i *bac2*) będących najprawdopodobniej skutkiem wcześniejszej duplikacji genu. Analiza sekwencji flankującej gen *bacch91* wykazała również unikalną jej organizację. Niezależnie od szczepu posiadającego gen(y) kodujące bakteriocynę, znajduje się on(e) poniżej genu kodującego leukotoksynę D, co wskazuje na asocjację z pulą materiału genetycznego kodującego czynniki wirulencji gronkowców. Jednak w przypadku szczepu *S. aureus* CH91 nie wykazano duplikacji genu bakteriocyny (*bacch91* jest odpowiednikiem *bac2*). Natomiast w miejscu pierwszego genu kodującego bakteriocynę (*bac1*) znajduje się pula materiału genetycznego o unikalnej sekwencji oraz otwarta ramka odczytu (*hyp*) kodująca hipotetyczne białko o długości 86 aminokwasów. Powyżej hyp oraz poniżej bacch91 znajdują się kilkunastonukleotydowe odwrócone sekwencje powtórzone (IR). W przypadku innych szczepów, gdzie występują dwa geny (*bac1* i *bac2*) IR znajdują się poniżej każdego z nich. Analizy dostępnych sekwencji genomowych wykazały, że *bac2* (homolog *bacch91*) występuje w dwóch konserwatywnych wariantach, różniących się między innymi obecnością sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny *BcuI*, co umożliwiło zastosowanie metody RFLP do rozróżnienia obu alleli. Przebadano zatem 58 szczepów gatunku *S. aureus* (21 pochodzących od ludzi i 37 izolowanych od zwierząt) pod kątem

występowania genu bakteriocyny (*bac2*) i jego wariantu allelicznego. W wyniku reakcji PCR otrzymano amplikony genu dla 23 szczepów (odpowiednio, 11 i 12 od ludzi i zwierząt). Typ restrykcyjny charakterystyczny dla szczepu CH91 wyznaczono dla 8 szczepów izolowanych od zwierząt ale dla żadnego szczepu pochodzenia ludzkiego. Wskazuje to, że wersja allelu bakteriocyny skorelowana jest z pochodzeniem szczepów *S. aureus*, a sama metoda jego oznaczania może być przydatna do śledzenia transmisji szczepów pomiędzy gospodarzami. Zatem obecność konkretnego wariantu bakteriocyny może być kolejnym przykładem odrębności genetycznej szczepów pochodzenia ludzkiego i odzwierzęcego [Władyka et al., 2013]. Ponadto, zasocjowanie genu kodującego bakteriocynę z genem kodującym czynnik wirulencji wskazuje na rolę bakteriocyn nie tylko w eliminacji konkurencyjnych mikroorganizmów ale też w interakcji gospodarz-patogen jak również w samej wirulencji gronkowców, na co wskazują wyniki najnowszych badań [Władyka et al., 2015].

Zatem, w ramach prac nad bakteriocyną BacCH91:

- wykazano po raz pierwszy zdolność do produkcji bakteriocyny o charakterze lantibiotyku przez szczep *S. aureus*;

- dokonano charakterystyki BacCH91, wykazując jej względną termostabilność i odporność na działanie proteaz;

- wykazano jej aktywność bakteriobójczą w stosunku do szeregu bakterii gram-dodatnich, w tym gronkowców;

- zidentyfikowano gen kodujący bakteriocynę i wskazano jego lokalizację w genomach gronkowca i unikalną organizację w szczepie *S. aureus* CH91;

- zbadano rozpowszechnienie genu bakteriocyny w szczepach *S. aureus* i wykazano obecność dwóch jego alleli, które korelowały z pochodzeniem szczepów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Pozostałe osiągnięcia w dużej części dotyczą prac prowadzonych we współpracy, w której wiodącą rolę posiadali współpracownicy z rodzimego wydziału dr Grzegorz Dubin (Zakład Mikrobiologii WBBiB UJ) oraz dr Dariusz Dziga (Zakład Fizjologii i Rozwoju Roślin WBBiB UJ). Zwrócono też uwagę na aspekty aplikacyjne wynikające z prowadzonych badań.

Charakterystyka proteaz gronkowcowych i ich inhibitorów.

Współpraca z dr. G. Dubinem dotyczyła charakterystyki biochemicznej i strukturalnej proteaz gronkowcowych, w szczególności proteaz serynowych kodowanych w operonie *spl* (serine protease-like). Rozpoczęła się jednak od wykazania molekularnej koewolucji stafopain i ich specyficznych inhibitorów, stafostatyn [Dubin et al., 2007]. Wszystkie szczepy *S. aureus* posiadają geny stafopainy A i B oraz ich odpowiednich inhibitorów [Golonka et al., 2004]. Dodatkowo szczep CH91 posiada operon stafopainy C składający się z genów proteazy i jej inhibitora [Władyka, 2007]. Operony kodujące homologi stafopain zidentyfikowano również u innych gatunków gronkowców (m. in. *S. epidermidis*, *S. warneri*). Stosując metodę koekspresji tych białek w *E. coli* oraz wykorzystując oczyszczone preparaty w badaniach *in vitro* wykazano krzyżowe oddziaływania pomiędzy proteazami i ich inhibitorami. Jednak wyznaczone stałe kinetyczne tych interakcji wskazują, że występują dwie grupy (A i B) par stafopaina-stafostatyna, które najprawdopodobniej powstały w wyniku duplikacji allelu operonu po czym nastąpiła równoległa ewolucja pary enzym-inhibitor. Zasugerowano, że taka ścisła koewolucja jest wynikiem ochronnego działania stafostatyny na toksyczne działanie zbyt wcześnie zaktywowanych cząsteczek stafopainy na komórki *S. aureus* [Dubin et al., 2007].

W ramach współpracy uczestniczyłem również w wyznaczaniu specyficzności substratowej stafopain. Stosując różne techniki badawcze wykazano, że stafopainy są enzymami o dość szerokiej specyficzności substratowej, jednak różniącej się pomiędzy sobą. Wszystkie trzy proteazy w pozycji P3 (nomenklatura zgodnie z konwencją Schechter i Berger, 1967) preferują aminokwasy o alifatycznych łańcuchach bocznych (Leu, Ile, Val, i Thr) oraz niewielkie aminokwasy w pozycjach P1 (Gly) i P1’ (Ser i Ala). Pozycja P2 rozróżnia natomiast stafopainę A (preferującą Leu) od stafopain B i C (preferujące aminokwasy aromatyczne o dużych łańcuchach bocznych, Phe i Tyr) [Kalińska et a., 2012]. Brałem też udział w badaniach dotyczących specyficzności substratowej proteaz SplB [Pustelny et al., 2014a] i SplD [Zdżalik et al., 2013] oraz opracowaniu syntetycznego inhibitora dla SplA [Burchacka et al., 2014]. Ponadto uczestniczyłem w pracach prowadzących do wyznaczenia mechanizmu aktywacji zymogenu SplB w oparciu o porównanie struktury przestrzennej zymogenu i formy dojrzałej tej proteazy. Aktywacja polega na rearanżacji sieci wiązań wodorowych z dala od centrum aktywnego proteazy w wyniku proteolitycznego usunięcia peptydu sygnalnego co odróżnia się od „klasycznych” sposobów aktywacji proteaz

polegających na strukturalnych rearanżacjach w obrębie centrum aktywnego po odcięciu profragmentu [Pustelny et., 2014b].

Ponadto w badania dotyczące proteaz gronkowcowych wpisują się prace nad mechanizmem aktywacji zymogenu stafopainy C [Władyka et., 2011a], rozpowszechnieniem genów kodujących proteazy gronkowcowe w klinicznych szczepach *S. aureus* [Zdżalik et al., 2012] oraz polimorfizmem genu kodującego aureolizynę, metaloproteazę produkowaną przez szczepy *S. aurues* [Sabat et al., 2008].

Charakterystyka enzymów degradujących toksyny sinicowe.

Doświadczenia w pracy z proteazami gronkowcowymi oraz produkcją proteaz w formie białek rekombinowanych zaowocowały współpracą z dr. D. Dzigą dotyczącą drogi enzymatycznego rozkładu mikrocystyn, toksyn produkowanych przez sinice, których cząsteczka jest cyklicznym nonapeptydem zawierającym aminokwasy niebiałkowe [Dziga et al., 2013]. Grupa badaczy z Australii wykazała zdolność bakterii szczepu *Sphingomonas* sp. ACM-3962 do enzymatycznego rozkładu mikrocystyn w którym udział mają trzy białka kodowane w operonie *mlr* [Bourne et al., 2001]. W ramach prowadzonych prac uzyskano te białka (MlrA, MlrB i MlrC) w formie rekombinowanej oraz dokonano biochemicznej charakterystyki ich oddziaływania z substratami. Stosując mutagenezę wykazano reszty aminokwasowe zaangażowane w aktywność enzymatyczną tych białek oraz potwierdzono ich domniemaną klasę katalityczną [Dziga et al., 2012a i b; Dziga et al., 2014].

Aplikacyjne aspekty prowadzonych badań.

Wydajna produkcja stafopainy C przez szczep *S. aureus* CH91 skłoniła mnie do opracowania systemu ekspresyjnego wykorzystującego promotor genu *stpC*. W tym celu przygotowano serię wektorów plazmidowych zawierających sekwencje promotorowe o różnych długościach oraz wektor dodatkowo kodujący sekwencję sygnalną pozwalający na eksport białka rekombinowanego na zewnątrz komórki. Funkcjonalność wektorów zawierających promotor wykazano na przykładach, w których przedstawiono wydajną produkcję białek rekombinowanych (stafopainy C, GFP oraz proteazy SplB). Ponadto udowodniono, że opracowany system pozwala na produkcję białek rekombinowanych w różnych szczepach gronkowców oraz bakteriach z rodzaju *Bacillus*. Wynalazek ten jest przedmiotem patentu (PAT.215031) o zasięgu krajowym pt. „Wysokowydajny promotor ekspresji w komórce

bakteryjnej, konstrukt genowy, wektor, transformant, systemy ekspresji i sekrecji heterologicznego białka oraz ich zastosowania" [Władyka i Dubin 2013].

Podczas badań nad układem toksyna-antytoksyna PemIK wykazano, że w transkrypcie genu hipotetycznego białka SaoC sekwencja rozpoznawana przez toksynę jest statystycznie istotnie niedoreprezentowana. Samo białko zaś należy do potencjalnego systemu regulującego transkrypcję genów u *S. aureus*. Podczas badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej przez dr. Michała Bukowskiego, którego byłem promotorem pomocniczym, wykazano homologi genu *saoC* u bakterii z rodzaju *Staphylococcus* [Bukowski 2015]. Zwrócono uwagę na fakt unikalnego wzoru konserwatywności genu *saoC* co stało się podstawą do opracowania metody identyfikacji i typowania szczepów gronkowca w oparciu o metodę PCR-RFLP [Bukowski et al., 2015]. Opracowana metoda jest przedmiotem zgłoszenia patentowego krajowego (P.404497) oraz międzynarodowego w procedurze PTC (WO2014209145) pt. „Sposób określenia pokrewieństwa szczepów z rodzaju *Staphylococcus*" [Bukowski et al., 2013].

Najnowsze badania we współpracy z dr. hab. Pawłem Makiem (Zakład Biochemii Analitycznej WBBiB UJ) doprowadziły do odkrycia peptydu produkowanego przez szczep *S. pseudintermedius* 222, który wykazuje właściwości zarówno bakteriocyny jak i czynnika wirulencji [Władyka et al., 2015]. Zastosowanie tego peptydu oraz sposób jego otrzymywania jest przedmiotem zgłoszeń patentowych P.411370 oraz PCT/IB2015/056711 [Mak et al., 2015].

6. Aktualne i przyszłe plany badawcze

Aktualnie moje badania skupiają się na dalszej identyfikacji i charakterystyce czynników, które mogą być odpowiedzialne za preferencje szczepów gronkowca w kolonizacji gospodarza. Stosuję tu jednak, oprócz metod z dziedziny biochemii i mikrobiologii, podejście genomiczne i proteomiczne. Takie kompleksowe podejście ma na celu otrzymanie możliwie pełnej informacji na temat badanych szczepów gronkowcowych, zaczynając od wywodzących się z doświadczeń *in vivo* danych na temat wirulencji, poprzez badania genomiczne pozwalające na identyfikacje obecności genów czynników wpływających na wirulencję, a kończąc na analizach proteomicznych wykazujących fizyczną obecność wspomnianych czynników w puli białek wytwarzanych przez konkretne szczepy gronkowców. Badania te prowadzone są przy wsparciu Narodowego Centrum Nauki (NCN) w ramach projektu Sonata pt. „Identyfikacja i badania czynników wpływających na wirulencję gronkowców z

wykorzystaniem genomiki i proteomiki" (UMO-2012/07/D/NZ2/04282), którego jestem kierownikiem.

Równolegle prowadzę badania nad rolą układów toksyna-antytoksyna u gronkowców. W ramach wcześniejszych prac scharakteryzowano układ PemIK u *S. aureus* wykazując jego regulacyjną rolę [Bukowski et al., 2013]. W ramach aktualnych badań planuję zweryfikować hipotezę przestawiającą układy TA jako regulatory ekspresji genów u gronkowców oraz zbadać ich wpływ na tworzenie biofilmu oraz przyjmowania fenotypu „persister cells" przez te bakterie. Również te badania prowadzone są przy wsparciu NCN w ramach projektu Opus pt. „Systemy toksyna-antytoksyna jako regulatory ekspresji genów u gronkowców" (UMO-2014/13/B/NZ1/00043), którego jestem kierownikiem. Otrzymane finansowanie pozwoliło na utworzenie miejsc pracy dla osoby z doktoratem oraz doktorantów i umożliwia zorganizowanie samodzielnej grupy badawczej, która jest na etapie tworzenia.

Ponadto, w ramach współpracy z dr. hab. Pawłem Makiem (Zakład Biochemii Analitycznej WBBiB UJ), planuję kontynuować badania nad bakteriocynami produkowanymi przez gronkowce. Owocem naszej współpracy oprócz charakterystyki bakteriocyny BacCH91 [Władyka et al., 2013] jest opisanie unikalnego peptydu produkowanego przez szczep *S. pseudintermedius* 222, który oprócz właściwości antybakteryjnych wykazuje również cechy czynnika wirulencji. To połączenie dwóch wydawałoby się odmiennych właściwości rzuca nowe światło na rolę bakteriocyn w wirulencji gronkowców i zdecydowanie zasługuje na dalsze badania [Władyka et al., 2015].

7. Podsumowanie

Sumarycznie, mój dorobek naukowy obejmuje 35 publikacji naukowych w czasopismach z tzw. Listy Filadelfijskiej, w tym 26 prac eksperymentalnych i 8 artykułów przeglądowych, jeden patent oraz 4 zgłoszenia patentowe. Sumaryczny współczynniki oddziaływania (IF) opublikowanych prac wynosi 108,054. Publikacje te były cytowane 267 razy, (indeks Hirscha = 10). W moim dorobku naukowym ponadto znajduje się 66 komunikatów zjazdowych, w tym 7 wystąpień ustnych i 59 doniesień plakatowych na 19 zagranicznych i 15 krajowych zjazdach i konferencjach naukowych. Jestem ponadto współautorem dwóch rozdziałów w skrypcie akademickich i trzech rozdziałów w książce naukowej. Dotychczas kierowałem dwoma projektami badawczymi finansowanymi przez MNiSW, oraz byłem wykonawcą siedmiu innych. Obecnie kieruje dwoma projektami finansowanymi przez NCN i dodatkowo jestem wykonawcą w jednym projekcie. Za działalność naukową otrzymałem dwukrotnie

Nagrody Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego (w latach 2012 i 2014). Ponadto praca dotycząca roli systemu toksyna-antytoksyna PemIK u gronkowca złocistego, która stanowi część osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, została uznana za najlepszą pracę doświadczalną z dziedziny biochemii wykonaną w kraju, opublikowaną w 2013 i wyróżniona nagrodą im. Jakuba Karola Parnasa przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. Praca ta została również nagrodzona w konkursie im. Profesora K. Bassalika (przez Komitet Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk) za najlepszą pracę z zakresu mikrobiologii wykonaną w polskim laboratorium i opublikowaną w roku 2013. Zamierzam kontynuować prace dotyczące molekularnych podstaw wirulencji gronkowców oraz roli systemów toksyna-antytoksyna w regulacji ekspresji genów w ramach samodzielnej grupy badawczej, która jest aktualnie na etapie organizacji w ramach etatów utworzonych z uzyskanego wsparcia badań przez NCN. Ponadto, zamierzam rozwijać badania w ramach nawiązanej współpracy z ośrodkami w kraju i zagranicą.

8. Piśmiennictwo

Armstrong PB. (2006) Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. Immunobiology, 211, pp. 263-281.

Bourne DG, Riddles P, Jones GJ, Smith W, Blakeley RL. (2001) Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. Environmental Toxicology, 16(6), pp. 523-534.

Bukowski M, Łyżen R, Helbin WM, Bonar E, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G, Dubin G, Dubin A, Władyka B. (2013) A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system $PemIK_{Sa}$. Nature Communications, 4, art. no. 2012

Bukowski M, Polakowska K, Helbin W, Sitarska A, Nytko K, Władyka B. (2013) Sposób określenia pokrewieństwa szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. Zgłoszenie patentowe krajowe: P.404497, Data zgłoszenia 28-06-2013.

Bukowski M, Polakowska K, Ilczyszyn WM, Sitarska A, Nytko K, Kosecka M, Międzobrodzki J, Dubin A, Władyka B. (2015) Species determination within *Staphylococcus* genus by extended PCR-restriction fragment length polymorphism of *saoC* gene. FEMS Microbiology Letters, 362 (1), pp. 1-11.

Bukowski M, Rojowska A, Władyka B. (2011) Prokaryotic toxin-antitoxin systems - the role in bacterial physiology and application in molecular biology. Acta Biochimica Polonica, 58 (1), pp. 1-9

Bukowski M. (2015) Charakterystyka hipotetycznego operou *saoABC* potencjalnie kodującego nieznany system regulacji transkrypcji genów u *Staphylococcus aureus*. Rozprawa doktorska, WBBiB UJ

Burchacka E, Zdzalik M, Steć-Niemczyk J, Pustelny K, Popowicz G, Władyka B, Dubin A, Potempa J, Sieńczyk M, Dubin G, Oleksyszyn J. (2014) Development and binding characteristics of phosphonate inhibitors of SplA protease from *Staphylococcus aureus*. Protein Science, 23 (2), pp. 179-189.

Dubin G, Władyka B, Steć-Niemczyk J, Chmiel D, Zdzalik M, Dubin A, Potempa J. (2007) The staphostatin family of cysteine protease inhibitors in the genus *Staphylococcus* as an example of parallel evolution of protease and inhibitor specificity. Biological Chemistry, 388 (2), pp. 227-235

Dziga D, Liszniańska M, Władyka B. (2014) Bioreactor Study Employing Bacteria with Enhanced Activity toward Cyanobacterial Toxins Microcystins. Toxins (Basel), 6(8), pp. 2379-92, doi: 10.3390/toxins6082379

Dziga D, Wasylewski M, Szetela A, Bocheńska O, Władyka B. (2012a) Verification of the role of MlrC in microcystin biodegradation by studies using a heterologously expressed enzyme. Chemical Research in Toxicology, 25 (6), pp. 1192-1194.

Dziga D, Wasylewski M, Władyka B, Nybom S, Meriluoto J. (2013) Microbial degradation of microcystins. Chemical Research in Toxicology, 26 (6), pp. 841-852.

Dziga D, Władyka B, Zielińska G, Meriluoto J, Wasylewski M. (2012b) Heterologous expression and characterisation of microcystinase. Toxicon, 59 (5), pp. 578-586.

Gettins PG. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. Chemical Reviews, 102, pp. 4751-4803.

Golonka E, Filipek R, Sabat A, Sinczak A, Potempa J (2004) Genetic characterization of staphopain genes in *Staphylococcus aureus*. Biological Chemistry, 385, pp. 1059–1067.

Imamura T, Tanase S, Hayashi I, Potempa J, Kozik A, Travis J. (2002) Release of a new vascular permeability enhancing peptide from kininogens by human neutrophil elastase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, pp. 423-428.

Kalińska M, Kantyka T, Greenbaum DC, Larsen KS, Władyka B, Jabaiah A, Bogyo M, Daugherty PS, Wysocka M, Jaros M, Lesner A, Rolka K, Schaschke N, Stennicke H, Dubin A, Potempa J, Dubin G. (2012) Substrate specificity of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases - Staphopains A, B and C. Biochimie, 94 (2), pp. 318-327.

Kloos WE, Zimmerman RJ, Smith RF. (1976) Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin, Applied and Environmental Microbiology. 31, pp. 53-59.

Kolar SL, Ibarra JA, Rivera FE, Mootz JM, Davenport JE, Stevens SM, Horswill AR, Shaw LN (2013) Extracellular proteases are key mediators of *Staphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. Microbiologyopen, 2, pp. 18–34.

Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL,et al. (2009) Recent humanto-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. P Natl Acad Sci USA, 106, pp.19545–19550.

Maeda H, Yamamoto T. (1996) Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections, Biological Chemistry, 377, pp. 217-226.

Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(32), pp.13206-13211.

Mak P, Władyka B, Piejko M, Dubin A, Bukowski M, Bonar E, Międzobrodzki J, Bereźnicka A, Krzysik M. (2015) „Polipeptyd, kodujący go polinukleotyd lub wektor ekspresyjny, szczep *Staphylococcus pseudintermedius* oraz ich zastosowania i sposób otrzymywania". Zgłoszenie patentowe krajowe: P.411370, Data zgłoszenia 25-02-2015. Zgłoszenie w trybie PCT/IB2015/056711, data zgłoszenia 03-09-2015.

Polakowska K, Lis MW, Helbin WM, Dubin G, Dubin A, Niedziółka JW, Międzobrodzki J, Władyka B. (2012) The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. Microbes and Infection, 14 (14), pp. 1352-1362.

Potempa J, D. Fedak, A. Dubin, A. Mast, J. Travis, (1991) Proteolytic inactivation of alpha-1-anti-chymotrypsin. Sites of cleavage and generation of chemotactic activity. Journal of Biological Chemistry, 266, pp. 21482-21487.

Potempa J, Wątorek W, Travis J. (1986) The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry, 261, pp. 14330-e14334.

Pustelny K, Stach N, Władyka B, Dubin A, Dubin G. (2014a) Evaluation of P1' substrate specificity of staphylococcal SplB protease. Acta Biochimica Polonica, 61 (1), pp. 149-152.

Pustelny K, Zdzalik M, Stach N, Steć-Niemczyk J, Cichoń P, Czarna A, Popowicz G, Mak P, Drąg M, Salvesen GS, Władyka B, Potempa J, Dubin A, Dubin G. (2014b) Staphylococcal splb serine protease utilizes a novel molecular mechanism of activation. Journal of Biological Chemistry, 289 (22), pp. 15544-15553.

Reed SB, Wesson CA, Liou LE, Trumble WR, Schlievert PM, Bohach GA, Bayles KW. (2001) Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. Infection and Immunity, 69(3), pp.1521-1527.

Ruscher, C. Lübke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH, Walther B. (2009) Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidaes. Veterinary Microbiology, 136, pp. 197- 201.

Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasprowicz A, Sekowska A, van Den Burg B, Travis J, Potempa J (2000) Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity, 68, pp. 973–976.

Sabat AJ, Władyka B, Kosowska-Shick K, Grundmann H, Van Dijl JM, Kowal J, Appelbaum PC, Dubin A, Hryniewicz W. (2008) Polymorphism, genetic exchange and intragenic recombination of the aureolysin gene among *Staphylococcus aureus* strains. BMC Microbiology, 8, art. no. 129.

Savini V, Barbarini D, Polakowska K, Gherardi G, Białecka A, Kasprowicz A, Polilli E, Marrollo R, Di Bonaventura G, Fazii P, D'Antonio D, Miedzobrodzki J, Carretto E. (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. Journal of Clinical Microbiology, 51, pp. 1636-1638.

Schechter I, Berger A, (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, pp. 157-162.

Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB. (2003) *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis, Infection and Immunity, 71, pp. 2208-2217.

Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Enright MC, Smyth CJ. (2009) Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*, Journal of Medical Microbiology. 58, pp. 1343-1353.

Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA., (2008) *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray, Microbiology 154, pp. 1949-1959.

Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. (2006) First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. Journal of Clinical Microbiology, 44, pp. 4609-4612.

Władyka B, Bista M, Sabat AJ, Bonar E, Grzeszczuk S, Hryniewicz W, Dubin A. (2008) A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. Acta Biochimica Polonica, 55 (3), pp. 525-536.

Władyka B, Dubin G, Dubin A. (2011a) Activation mechanism of thiol protease precursor from broiler chicken specific *Staphylococcus aureus* strain CH-91. Veterinary Microbiology, 147 (1-2), pp. 195-199.

Władyka B, Dubin G. (2013) Wysokowydajny promotor ekspresji w komórce bakteryjnej, konstrukt genowy, wektor, transformant, systemy ekspresji i sekrecji heterologicznego białka oraz ich zastosowania. Patent PAT.215031 Zgłoszenie patentowe P.389523, Urząd Patentowy RP. (2009).

Władyka B, Kozik AJ, Bukowski M, Rojowska A, Kantyka T, Dubin G, Dubin A. (2011b) α1-Antichymotrypsin inactivates staphylococcal cysteine protease in cross-class inhibition. Biochimie, 93 (5), pp. 948-953.

Władyka B, Piejko M, Bzowska M, Pięta P, Krzysik M, Mazurek Ł, Guevara-Lora I, Bukowski M, Sabat AJ, Friedrich AW, Bonar E, Międzobrodzki J, Dubin A, Mak P. (2015) A peptide factor secreted by *Staphylococcus pseudintermedius* exhibits properties of both bacteriocins and virulence factors. Scientific Reports, przyjęte do publikacji

Władyka B, Puzia K, Dubin A. (2005) Efficient co-expression of a recombinant staphopain A and its inhibitor staphostatin A in *Escherichia coli*. Biochemical Journal, 385 (1), pp. 181-187.

Władyka B, Wielebska K, Włoka M, Bocheńska O, Dubin G, Dubin A, Mak P. (2013) Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain C11-91. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (16), pp. 7229-7239.

Władyka B. (2007) Operon stafopainy C, analiza i charakterystyka kodowanych białek. Rozprawa doktorska, WBBiB UJ.

Zdzalik M, Kalińska M, Wysocka M, Steć-Niemczyk J, Cichoń P, Stach N, Gruba N, Stennicke HR, Jabaiah A, Markiewicz M, Kędracka-Krok S, Władyka B, Daugherty PS, Lesner A, Rolka K, Dubin A, Potempa J, Dubin G. (2013) Biochemical and Structural Characterization of SplD Protease from *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE, 8 (10), art. no. e76812,.

Zdzalik M, Karim AY, Wolski K, Buda P, Wójcik K, Brueggemann S, Wojciechowski P, Eick S, Calander AM, Jonsson IM, Kubica M, Polakowska K, Międzobrodzki J, Władyka B, Potempa J, Dubin G. (2012) Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* - important targets triggering immune response *in vivo*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 66 (2), pp. 220-229.

Zhu L, Inoue K, Yoshizumi S, Kobayashi H, Zhang Y, Ouyang M, Kato F, Sugai M, Inouye M. (2009) *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. Journal of Bacteriology. 191(10), pp.3248-3255.