

## Streszczenie

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) to oportunistyczny patogen ludzi i zwierząt. Nawet 50-60% populacji ludzkiej jest przejściowo kolonizowane przez gronkowca złocistego. W warunkach homeostazy bakterie te bytują na błonach śluzowych i skórze gospodarza nie wywołując zakażeń. Przerwanie powłok skórnych umożliwia gronkowcom wywołanie infekcji. *S. aureus* stanowi czynnik etiologiczny chorób zapalnych skóry i tkanek podskórnych oraz bakteremii. Szczególnie niebezpiecznymi i trudnymi do zwalczania czyni bakterie gronkowca złocistego ich narastająca antybiotykooporność oraz zdolność syntezy licznych czynników wirulencji, a także wykształcone mechanizmy adaptacyjne warunkujące przetrwanie, pośród których istotną rolę odgrywają systemy toksyna-antytoksyna (TA).

Systemy TA to niewielkie elementy genetyczne szeroko rozpowszechnione u bakterii, które kodowane są zarówno w plazmidach jak i chromosomach bakteryjnych. Zidentyfikowano osiem typów systemów TA, które zbudowane są z dwóch części, toksyny i antytoksyny. Mechanizm aktywacji systemów TA polega na zaburzeniu równowagi między ilością toksyny i antytoksyny w komórce. Systemy TA odpowiadają za utrzymywanie plazmidów, wpływają na odpowiedź komórek na stres, regulują ekspresję genów oraz promują zmianę fenotypu, na komórki biofilmujące lub typu *persisters*. U bakterii *S. aureus* opisano systemy TA typu I i II, jednak funkcja niektórych z nich wciąż pozostaje niejasna.

W pracy badano wpływ systemu TA typu I SprG1/SprF1 oraz typu II PemK/PemI na zmiany ekspresji genów gronkowca złocistego wykorzystując techniki proteomiki: dwuwymiarową elektroforezę różnicową (2D-DIGE) i spektrometrię masową oraz transkryptomiki: sekwencjonowanie nowej generacji oraz reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym.

Przed podjęciem badań 2D-DIGE porównano kilka metod strącania białek gronkowcowych. Jako najlepszą wybrano metodę wykorzystującą odczynnik TRI Reagent ze względu na najwyższą wydajności i najlepszy rozdział plamek białkowych w żelu poliakrylamidowym.

W badaniach dotyczących systemu SprG1/SprF1 wykazano wpływ antytoksyny SprF1 na zmiany ekspresji kilkunastu genów w komórkach. Globalne zahamowanie translacji oraz obniżenie ekspresji genów pod wpływem działania antytoksyny pozwalają postulować o jej możliwej roli w powstawaniu komórek o fenotypie *persisters*. Usunięcie kasety sytemu SprG1/SprF1 korelowało ze zmniejszeniem wydzielania białek poza komórki. Za obniżoną

sekrecję najprawdopodobniej odpowiada toksyna SprG1. Jako że wśród białek wydzielanych poza komórki bakterii patogennych są czynniki wirulencji (między innymi: czynnik zlepiający B, białko A, endopeptydaza glutamyłowa, stafopaina B), obniżone wydzielanie białek poza komórki przy braku toksyny może sugerować związek tego systemu TA z wirulencją gronkowca złocistego.

Kolejną część pracy stanowiła analiza porównawcza wpływu dwóch homologicznych toksyn systemów PemK/PemI. Toksyny PemK<sub>Sa</sub> i PemK<sub>Sd</sub> wykazują aktywność endorybonukleazową, lecz różnią się toksycznością względem komórek *S. aureus*, co wynika z różnic w sekwencji obu białek. Ekspresja genów obserwowana na poziomie transkryptomu zmienia się w czasie, u bakterii z ekspresją PemK<sub>Sd</sub> obserwowane zmiany zanikają, a z PemK<sub>Sa</sub> nasilają się. Toksyna PemK<sub>Sd</sub> zmienia poziom ekspresji niektórych genów, prowadząc do nadekspresji większości z nich, jednocześnie nie wywiera wpływu na szybkość wzrostu komórek. Jest zatem mało prawdopodobne, aby toksyna PemK<sub>Sd</sub> miała istotny udział w globalnej regulacji ekspresji genów, a jej funkcja nadal pozostaje do wyjaśnienia. Druga toksyna PemK<sub>Sa</sub> znacząco zmienia ekspresję ponad jednej trzeciej genów *S. aureus*, w tym związanych z transportem i metabolizmem, translacją, biogenezą rybosomów, wirulencją i wieloma innymi procesami komórkowymi. Skutkuje to deregulacją metabolizmu i spowolnieniem wzrostu komórek. Aktywność toksyny PemK<sub>Sa</sub> prowadzi także do obniżenia wydzielania białek z komórki, co może sugerować związek tej toksyny z regulacją wirulencji.

Otrzymane wyniki poszerzają stan wiedzy o gronkowcowych systemach TA i mogą stanowić podstawę do dalszych badań.