

ZAŁĄCZNIK 2

**AUTOREFERAT
W JĘZYKU POLSKIM**

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Radosław Stachowiak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

13.03.2006: Nadanie stopnia doktora nauk biologicznych przez Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka szczepów *Bacillus subtilis* eksprymujących zmodyfikowaną listeriolizynę”, promotorem pracy był Prof. dr hab. Jacek Bielecki.

08.08.2000: Stopień magistra nadany przez Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł pracy: „Molekularne podstawy działania hemolizyny *Listeria monocytogenes*”. Praca wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. J. Bieleckiego.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2016 - do dnia dzisiejszego: Zatrudnienie na stanowisku asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW

15.02.2011 - 31.12.2015: Zatrudnienie na ¼ etatu na stanowisku specjalisty w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w związku z udziałem w projekcie POIG “Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie”

01.10.2006 – 30.09.2016: Zatrudnienie na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW

01.04.2006 - 30.09.2006: Zatrudnienie na stanowisku asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW

01.10.2004 - 25.04.2005: Zatrudnienie jako wykonawca grantu w laboratorium Weterynaryjnej Mikrobiologii Molekularnej na Uniwersytecie w Bristolu, Wielka Brytania

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

Cytolizyna *Listeria monocytogenes* - charakterystyka i wykorzystanie do eradykacji komórek nowotworowych

b) *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy*

(autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa czasopisma, liczba punktów i cytowań)

1. Stachowiak R., Wiśniewski J., Osińska O., Bielecki J. 2009. Contribution of cysteine residue to the properties of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Can. J. Microbiol.* 55: 1153-1159

IF₂₀₀₉ – 1,262; IF_{5-letni} - 1,400; punkty MNiSW - 15; liczba cytowań (wg WoS) –8

Wkład habilitanta: 80% - współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie większości doświadczeń, modelowanie *in silico*, analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie i złożenie manuskryptu, korespondencja z recenzentami, autor korespondencyjny.

2. Stachowiak R., Granicka L.H., Wiśniewski J., Łyżniak M., Kawiak J., Bielecki J. 2011. Cytotoxicity of listeriolysin O produced by encapsulated in membrane *Bacillus subtilis* on leukemia cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1193-1198

IF₂₀₁₁ - 1,381; IF_{5-letni} - 1,789; punkty MNiSW - 20; liczba cytowań (wg WoS) –3

Wkład habilitanta: 70% - współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie części doświadczeń, analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie i złożenie manuskryptu, korespondencja z recenzentami, autor korespondencyjny.

3. Stachowiak R., Łyżniak M., Budziszewska K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J. 2012. Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including listeriolysin O, on leukocyte targets. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2012/954375

IF₂₀₁₂ - 2,880; IF_{5-letni} - 2,587; punkty MNiSW - 25; liczba cytowań (wg WoS) –1

Wkład habilitanta: 60% - współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie części doświadczeń, analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie i złożenie manuskryptu, korespondencja z recenzentami.

4. Stachowiak R., Łyżniak M., Grabowska M., Roeske M., Jagielski T., Bielecki J., Budziszewska B.K., Hoser G., Kawiak J. 2014. Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnology*, 14: 77

IF₂₀₁₄ - 2,034; IF_{5-letni} - 2,865; punkty MNiSW - 30; liczba cytowań (wg WoS) –4

Wkład habilitanta: 70% - współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie części doświadczeń, opieka nad studentką (M. Grabowska), analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie i złożenie manuskryptu, korespondencja z recenzentami.

5. Gryzik M., Grzywocz Z., Wasilewska D., Kawiak J., Stachowiak R., Bielecki J., Hoser G. 2015. Human lymphocytic B-leukemia cell line treatment with the bacterial toxin listeriolysin O and rituximab (anti-CD20 antibody): Effects of similar localization of their receptors. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 28: 329-340

IF₂₀₁₅ - 1,470; IF_{5-letni} - 1,561; punkty MNiSW - 0; liczba cytowań (wg WoS) –1

Wkład habilitanta: 30% - współautorstwo koncepcji badań i zaplanowanie doświadczeń, oczyszczanie i oznaczanie aktywności cytolitycznej i cytotoksycznej LLO, analiza i interpretacja wyników badań oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:
zgodnie z rokiem opublikowania: 9,027
zgodnie z aktualnym pięcioletnim IF: 10,202
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: 90
- Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science): 17

- c) *Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania*

Wstęp

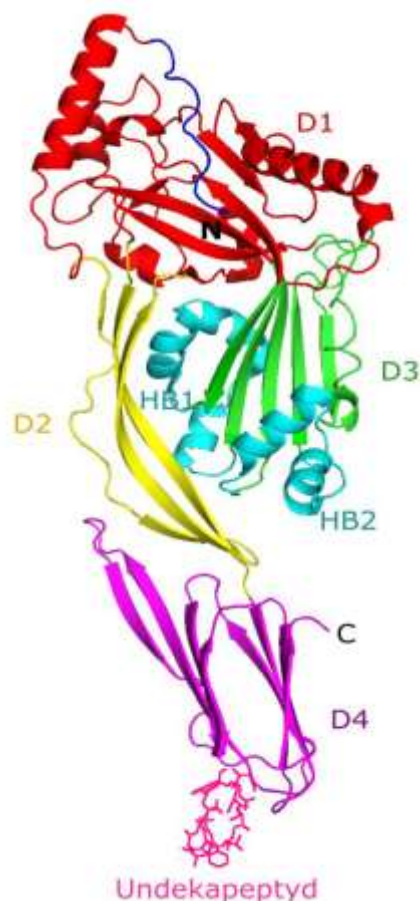
Listeriolizyna O (LLO) jest cytolizyną syntetyzowaną przez *Listeria monocytogenes*. Bakteria ta jest fakultatywnym wewnątrzkomórkowym patogenem, do zakażenia dochodzi drogą pokarmową. Cykl infekcyjny *L. monocytogenes* zaczyna się od inwazji jelitowych komórek epitelialnych. Po przekroczeniu bariery jelitowej *Listeria* rozprzestrzenia się przez krew i układ limfatyczny do dalszych tkanek i organów, głównie do wątroby i śledziony. Podczas ciężkich zakażeń, może dojść do infekcji centralnego układu nerwowego lub łożyska i zakażenia płodu. Inwazja komórek eukariotycznych przez bakterie może być bierna lub indukowana przez białka powierzchniowe z rodziny internalin. Po fagocytozie komórki *Listeria* są zamykane w wakuoli, z której uciekają do cytoplazmy. Proces lizy błony endosomu jest zależny od aktywności listeriolizyny, która została szczegółowo omówiona poniżej oraz od dwóch fosfolipaz. W cytoplazmie bakterie dzielą się, jak również są zdolne do poruszania przy pomocy białka ActA. Białko to indukując polimeryzację monomerów aktyny prowadzi do utworzenia charakterystycznej struktury za komórkami patogena, zwanej „kometą listeryjną”. Filamenty aktynowe przesuwają komórki bakteryjne do błony komórkowej, która po wybrzuszeniu umożliwia przedostanie się do sąsiedniej komórki. Ten cykl wewnątrzkomórkowy ulega wielokrotnemu powieleniu i w ten sposób *L. monocytogenes* rozprzestrzenia się do kolejnych komórek, czy innych tkanek [18].

Hemolizyna *L. monocytogenes* należy do rodziny cytolizyn wiążących cholesterol (Cholesterol Dependent Cytolysins – CDC), do niedawna znanych jako toksyny aktywowane

przez grupy tiolowe. Wszystkie toksyny z tej rodziny są syntetyzowane przez bakterie Gram-dodatnie, najczęściej są wydzielane przez bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Streptococcus* i *Bacillus*. Trzy gatunki z rodzaju *Listeria* są hemolityczne, z których jeden, *L. seeligeri* jako jedyny wśród bakterii posiadających toksynę CDC jest niepatogenny. Toksyny z tej rodziny cechuje wysoki, od 40 do 70% stopień podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej, przy czym najwyższą homologię stwierdzono dla C–końcowych fragmentów białek. Obecnie wiadomo, że białka CDC posiadają nie tylko podobną sekwencję, ale również strukturę. Toksyny z tej rodziny cechują się również bardzo dużą spójnością cech biochemicznych, wśród których wyróżniamy dużą aktywność lityczną wobec wszystkich komórek eukariotycznych, a szczególnie erytrocytów (stąd starsza nazwa hemolizyny) przy jednoczesnym braku aktywności enzymatycznej. Zgodnie z nazwą, aktywność toksyn CDC jest zależna od obecności cholesterolu w błonie, w związku z czym błony niezawierające cholesterolu są całkowicie odporne na działanie tych toksyn. Cytolizyny zależne od cholesterolu posiadają zbliżoną masę cząsteczkową, która wynosi od 50 do 60 kDa [1].

Listeriolizyna wykazuje wszystkie powyżej wymienione właściwości, jednak wyróżnia ją cecha, która czyni LLO dość unikalnym członkiem rodziny CDC. Toksyny z tej rodziny wykazują największą aktywność w fizjologicznych warunkach (pH 7,4), natomiast LLO jest najbardziej aktywna w kwaśnym środowisku (pH 5-6). Fakt ten ma podstawowe znaczenie dla patogenezy *L. monocytogenes*, gdyż umożliwia tej bakterii ucieczkę z fagosomu, gdzie panują właśnie takie warunki [4].

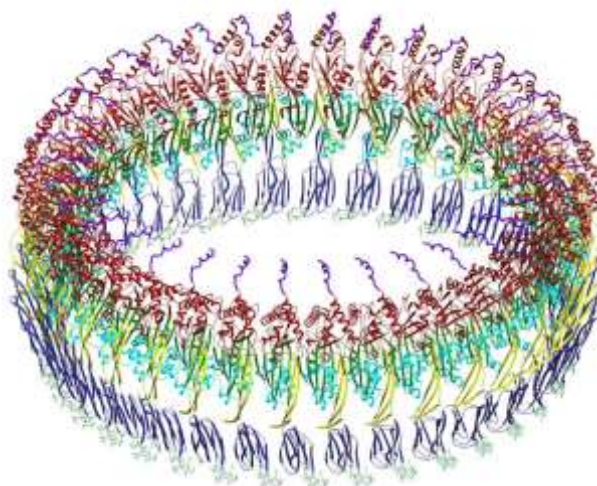
Struktura listeriolizyny O (rys. 1) została rozwiązana stosunkowo niedawno, w 2014 roku [9], podczas gdy pierwszą strukturę krystaliczną białka z rodziny CDC udało się uzyskać już w 1997 roku [15]. Obecnie dostępne są struktury krystaliczne 10 toksyn z tej rodziny. Białka CDC charakteryzują się stosunkowo podobną, 4-domenową strukturą trzeciorzędową i mechanizmem działania. Domena 1 i 3 tworzą nieciągłą, globularną domenę do której za pośrednictwem domeny 2 przyłączona jest domena 4. Wspomniana powyżej domena globularna, jest coraz częściej w literaturze określana mianem domeny MACPF (Membrane Attack Complex and Perforin) /CDC, w celu podkreślenia jej homologii względem struktury konserwowanej w tej nadrodzinie białek [14]. Rdzeń domeny MACPF/CDC składa się z silnie zwiniętej i wygiętej, trójwarstwowej struktury beta-kartki, nazywanej centralną beta-kartką. Centralna beta-kartka otoczona jest dwoma grupami alfa-helis: HB1 i HB2 (Helix Bundle). Domena 2 składa się z 4



Rys. 1. Struktura krystaliczna LLO
D1-D4 – domeny białka, HB – grupy alfa-helis [9].

nici beta które tworzą wspólnie trójwarstwową strukturę beta-kartki łączącą domenę MACPF/CDC z C-kończącą domeną 4. Domena ta złożona jest z dwóch ciasno upakowanych czterowarstwowych beta-kartek. W przeciwieństwie do domeny MACPF/CDC i domeny 2, które się wzajemnie przeplatają, domena 4 jest wyraźnie wyodrębniona i połączona z nimi tylko za pośrednictwem jednej glicyny. Na dole domeny 4 znajduje się hydrofobowa pętla (rys. 1) utworzona z 11 aminokwasów o sekwencji ECTGLAWEWWR. Motyw ten, zwany po prostu undekapeptydem, jest wysoce konserwowany (szczególnie drugi z aminokwasów – cysteina) i charakterystyczny dla toksyn z rodziny CDC [1].

Proces cytolizy składa się z trzech, wyraźnie rozdzielonych etapów: w pierwszym pojedyncze monomery cząstek toksyn przyłączają się do błony, po czym następuje polimeryzacja prowadząca do ostatniego etapu, czyli lizy błony. Monomery łączą się za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych tworząc strukturę pierścienia. Tak powstały kompleks lityczny tworzy w błonie duży, wypełniony wodą kanał o średnicy od 20 do 30 nm (rys. 2.). Zgodnie z aktualnym modelem, początkowy kontakt z błoną przez domenę 4. ułatwia interakcję cząsteczek toksyny z cholesterolem. Powoduje to zmianę konformacji



Rys. 2. Struktura kompleksu litycznego

Model pierścienia złożonego z 36 cząsteczek LLO [9].

w monomerze, zwiększając jego zdolność do oligomeryzacji, hydrofobowość oraz powinowactwo do błony. Transformacja ta zachodzi poprzez zmianę zlokalizowanych w domenie 3. dwóch motywów (HB1 i 2) zbudowanych z trzech alfa-helis każdy, w dwie beta-szpilki zdolne do przeniknięcia błony. W kolejnym etapie, kompleks przejściowy dokonuje insercji w błonę przez pionowe zapadnięcie się struktury toksyny, dzięki czemu beta-szpilki mogą przeniknąć poprzez dwuwarstwę formując transbłonowy kanał (rys. 2) o strukturze beta-baryłki [9].

Jak już wspomniano, szczególną cechą LLO na tle innych białek z rodziny CDC jest optymalna aktywność w niskim pH. Od początku badań nad LLO, kilkakrotnie zmieniał się paradygmat dotyczący tego, która część jej struktury pełni rolę „sensora pH” i w jaki sposób wpływa ona na konformacje pozostałych części białka. Przez długi czas panowała opinia, że kluczowym aminokwasem w zarządzaniu aktywnością LLO zależnie od pH jest leucyna znajdująca się w pozycji 461 (Leu461). Przeprowadzone w 2002 roku doświadczenie, w trakcie którego porównywano aktywności dzikiej LLO z wersją niosącą mutację Leu461 → Thr na wzór PFO (Thr w pozycji 461 występuje naturalnie w sekwencji perfringolizyny - cytolizyny *Clostridium perfringens*) wykazało, że mutacja znacząco zwiększa aktywność LLO w neutralnym pH, jednocześnie ponad 100-krotnie zmniejszając wirulencję *L. monocytogenes* w modelu mysim [5]. Tymczasem, w toku późniejszych badań ujawniane były kolejne potencjalne miejsca mogące brać udział w zależnej od pH regulacji aktywności LLO [16]. Rozwiązanie i analiza struktury krystalicznej LLO, nie rozstrzygnęła tego

problemu – autorzy tej analizy wskazali wręcz więcej potencjalnych miejsc które mogą brać udział w zmianie konformacji białka pod wpływem pH [9]. Wiadomo jednak, że wrażliwość LLO na pH ma podstawowe znaczenie dla procesu patogenezy – już ponad 20 lat temu przeprowadzono doświadczenie podczas którego do szczepu *L. monocytogenes* Δ hly wprowadzono gen kodujący PFO. Szczep ten odzyskał zdolność hemolizy i inwazji do makrofagów, ale ze względu na niezależną od pH aktywność tej toksyny, nie był on w stanie przetrwać i rozmnażać się w komórkach eukariotycznych [6]. O ciągłym braku jednoznacznych danych, dokładnie stwierdzających w jaki sposób pH moduluje aktywność LLO może świadczyć praca z roku 2015, w której autorzy stwierdzili że tworzenie porów jest całkowicie niezależne od pH, a samo pH wpływa na raczej na przepuszczalność błony w miejscu utworzonych porów [13].

Cel naukowy

Pomimo bardzo zaawansowanego stanu wiedzy na temat budowy i funkcjonowania LLO oraz innych CDC wciąż nie rozstrzygnięto powodu, dla którego znajdująca się w konserwowanym undekapeptydzie cysteina jest tak ściśle konserwowana. Odpowiedź na to pytanie dostarczyłaby nie tylko wiedzy podstawowej o fundamentalnym znaczeniu, ale mogłaby również pozwolić lepiej kontrolować aktywność LLO, co byłoby bardzo cenne podczas badań aplikacyjnych. Właściwości listeriolizyny, a przede wszystkim optymalna aktywność w pH 5,6 i zmniejszona aktywność w neutralnym pH oraz krótki okres półtrwania w cytoplazmie, czynią z tej hemolizyny idealną cząsteczkę do wykorzystania w biotechnologii. Wyjaśnia to popularność cytolizyny *Listeria* w badaniach nad konstrukcją doświadczalnych szczepionek. Szczególne nadzieje pokłada się w wykorzystaniu LLO do konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych [17].

Znacznie rzadsze są próby wykorzystania toksyn, a w szczególności LLO jako czynnika bezpośrednio zabijającego komórki nowotworowe. Wykorzystanie bakterii lub izolowanych toksyn bakteryjnych do leczenia nowotworów nie jest pomysłem nowym. Już w drugiej połowie XIX wieku zauważono przypadki remisji guza u chorych, u których doszło do zakażeń bakteryjnych. Niemieccy lekarze, W. Busch i F. Fehleisen zaobserwowali remisję guzów u chorych, u których doszło do zakażenia *Streptococcus pyogenes*. W roku 1894 amerykański chirurg z Nowego Jorku, William B. Coley opisywał przypadki całkowitej remisji guzów u chorych, którym podano w okolice guza mieszaninę jałowych nadsączy z hodowli bakterii *S. pyogenes* i *Serratia marcescens*. Mieszaninę wspomnianych nadsączy nazwano toksyną Coley'a i próbowano stosować z dobrym skutkiem u wielu chorych. Niestety, mimo poprawy stanu u wielu chorych, a nawet przypadków całkowitego wyleczenia, toksyny dawały zmienne wyniki oraz powodowały liczne powikłania [12]. Niestabilność preparatów, niepowtarzalność wyników, ryzyko zagrażających życiu zakażeń oraz rodzące się nadzieje związane z radioterapią uśpiły na wiele lat dalsze próby wykorzystania toksyn bakteryjnych w onkologii. Renesans badań nad wykorzystaniem toksyn nastąpił po opracowaniu produkcji przeciwciał monoklonalnych, które pozwoliły ukierunkować potencjał toksyczny minimalizując skutki uboczne. Większość grup

badawczych konstruuje immunotoksyny na bazie toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtherie*, egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa* oraz rycyny z *Ricinus communis* [7]. Na dzień rozpoczęcia projektu przykłady zastosowania LLO do eradykacji komórek nowotworowych były bardzo nieliczne, a doniesień konstrukcji immunotoksyn z udziałem LLO czy innej CDC nie było w ogóle. Przez długi czas cytolizyny nie były brane pod uwagę jako komponent immunotoksyn, co może być zrozumiałe biorąc pod uwagę ich budowę i mechanizm działania – nie jest możliwe rozdzielanie części białka odpowiedzialnej za kierowanie toksyny do komórki docelowej od komponentu warunkującego cytotoxycyzność, tak jak to ma miejsce w przypadku często wykorzystywanych toksyn AB. Pomimo tego, zalety cytolizyn, a w szczególności LLO są na tyle znaczące, że nasz zespół podjął badania w tym kierunku

W przedstawionej rozprawie opisano próbę bezpośredniego wykorzystania aktywności cytotoxycyznej LLO do zwalczania komórek nowotworowych. Jako model terapeutyczny wykorzystano komórki białaczkowe, gdyż jest to często spotykany nowotwór hematologiczny (w samej Polsce 3 tys. przypadków rocznie), a w porównaniu do guzów litych, zastosowanie cytotoxyn do terapii rozsianych komórek nowotworowych przynosi znacząco lepsze rezultaty [7].

Omówienie wyników wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Stachowiak R., Wiśniewski J., Osińska O., Bielecki J. (2009). Contribution of cysteine residue to the properties of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 1153-1159

Konserwowany undekapeptyd zawiera aminokwas cysteinę, który z kolei jest najbardziej konserwowanym aminokwasem w sekwencji całego białka. Z tego powodu racjonalne wydaje się początkowe założenie, że aminokwas ten jest niezbędny do funkcjonowania toksyn CDC. Aminokwas ten był uważany za niezbędny do prawidłowego wiązania cholesterolu [1]. Zamiana cysteiny na alaninę faktycznie spowodowała niewrażliwość CDC, w tym LLO na utlenianie lub redukcję przez grupy SH, jednak nie miało to wpływu na poziom aktywności cytolytycznej [11]. Odkrycie toksyn należących do rodziny CDC, które posiadają naturalne substytucje cysteiny jeszcze bardziej podważyło znaczenie tego aminokwasu. Zarówno pyolizyna jak i intermediolizyna zamiast cysteiny posiadają alaninę oraz jeszcze dwie inne substytucje w obrębie konserwowanego undekapeptydu. Chociaż obie toksyny nie ulegają aktywacji przez odczynniki redukujące to wykazują zdolność do cytolizy [1]. W świetle tych danych trudno dalej przypisywać cysteinie rolę aminokwasu niezbędnego dla funkcjonowania toksyn CDC. Tym bardziej zasadne jest pytanie, dlaczego cysteina jest najbardziej konserwowanym aminokwasem w sekwencji cytolyzyn zależnych od cholesterolu i jaką właściwie pełni rolę?

Na potrzeby analizy wpływu zamiany cysteiny na inny aminokwas na lokalną strukturę LLO zbudowano model teoretyczny LLO na matrycy dostępnej struktury krystalograficznej PFO [15]. Analiza modelu natywnej LLO oraz białek zmodyfikowanych ujawniła wpływ mutacji

na lokalną strukturę w przypadku zamiany cysteiny przez alaninę (LLO^{C484A}) powinien być umiarkowany i bardzo znaczący wpływ kiedy w tym miejscu znajdowała się seryna (LLO^{C484S}). Konserwowany undekapeptyd tworzy hydrofobową pętlę na spodzie domeny 4 (rys. 1) i umieszczenie w takim otoczeniu hydrofilowego aminokwasu musi prowadzić do rearanżacji takiej struktury. Co ciekawe, rozwiązanie struktury LLO [9] i zbudowanie modelu oligomeru (rys. 2) potwierdziło postawione w niniejszej pracy tezy, gdyż okazuje się, że konserwowany undekapeptyd bezpośrednio oddziałuje z Leu461 (rys. 2), jednym z aminokwasów biorących udział w odpowiedzi LLO na zmiany pH.

Wykorzystując szczepy *L. monocytogenes* wydzielające zmodyfikowane toksyny oraz szczep dziki zmierzono aktywność hemolityczną w różnych warunkach, stosując kombinację dwóch czynników: pH (5,6 lub 7,4) i odczynnika redukującego (obecność lub brak chlorowodoru cysteiny). W optymalnych warunkach (pH 5,6 z Cys-HCl) wszystkie toksyny wykazywały bardzo wysoką i zbliżoną do siebie aktywność hemolityczną. Z kolei w neutralnym środowisku i bez odczynnika redukującego nie stwierdzono aktywności dla żadnej cytolizyny. Ciekawe różnice pomiędzy badanymi wariantami LLO zaobserwowano w suboptymalnych warunkach (pH 5,6 ale bez Cys-HCl), natywna LLO wykazywała wyraźnie niższą aktywność w porównaniu z wynikami osiągniętymi w optymalnym środowisku, podczas gdy aktywność zmodyfikowanych wariantów toksyn pozostawała na niezmiennie wysokim poziomie. Dalsze eksperymenty uwidocznily jeszcze większe różnice pomiędzy badanymi białkami, a w szczególności pomiędzy LLO^{C484S} a pozostałymi toksynami. Wariant ten, zgodnie z przewidywaniami dostarczonymi przez modelowanie struktury, wykazywał zdecydowanie zmienione i niezwykle ciekawe właściwości. Toksyna LLO^{C484S} wykazywała znacznie wydajniejszą kinetykę działania, w odróżnieniu od pozostałych nie trzeba było czekać 15 min. by zaobserwować hemolizę, już po 5 min. był widoczny efekt w postaci lizy erytrocytów. Najwidoczniej szybka aktywacja monomerów cytolizyny prowadzi do zmniejszonej stabilności tak jak to przewidział Schuerch i wsp. [16], gdyż dla LLO^{C484S} odnotowano najszybszy spadek aktywności po preinkubacji w 37°C poprzedzającej pomiar aktywności hemolitycznej. Zmodyfikowane LLO posiadają wciąż wysoką aktywność, a w niektórych warunkach nawet przewyższają natywną toksynę zdolnością do cytolizy. Otrzymane rezultaty jeszcze bardziej zwiększają wagę pytania o przyczynę tak wysokiego konserwowania cysteiny w sekwencji undekapeptydu LLO.

Odpowiedzi na to pytanie dostarczyły eksperymenty, podczas których zakażano linie tkankowe szczepami *L. monocytogenes* niosącymi badane warianty LLO. Testy inwazyjności wykazały, że oba mutanty wnikały z mniejszą wydajnością do komórek badanych linii. Najwyraźniej mniejsza stabilność LLO^{C484S} doprowadziła do niewystarczającej aktywności cytolitycznej w krytycznym momencie, jakim jest ucieczka bakterii z wakuoli [18]. Z kolei zbyt duża aktywność LLO^{C484A} w warunkach fizjologicznych mogła doprowadzić do zbyt dużej aktywności wewnątrz komórki eukariotycznej, a tym samym jej zniszczenia, tak jak to miało miejsce w przypadku ekspresji PFO lub LLO^{L461T} przez *L. monocytogenes* [5]. Tym samym wykazano, że obecność cysteiny gwarantuje właściwą regulację i optymalną aktywność LLO podczas cyklu życiowego *L. monocytogenes*.

Główne osiągnięcia naukowe

Wyniki badań wyjaśniają rolę cysteiny w funkcjonowaniu LLO. Mechanizm polega na utrzymaniu odpowiedniej struktury konserwowanego undekapeptydu, co umożliwia odpowiednią aktywację LLO po kontakcie z błoną komórkową i pod wpływem czynników redukujących. Regulacja aktywności LLO za pośrednictwem cysteiny pozwala *L. monocytogenes* na efektywne przeżycie wewnątrz komórek eukariotycznych.

Stachowiak R., Granicka L.H., Wiśniewski J., Łyżniak M., Kawiak J., Bielecki J. (2011). Cytotoxicity of listeriolysin o produced by encapsulated in membrane *Bacillus subtilis* on leukemia cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1193-1198

Skuteczne leczenie wielu schorzeń, w tym nowotworów, wymaga dostarczenia biologicznie aktywnych cząstek do odpowiedniego miejsca w organizmie i ich uwalniania w kontrolowany sposób. Systemy opierające się na immobilizowanych komórkach w półprzepuszczalnych membranach mających postać implantu dają medycynie nowe możliwości i umożliwiają produkcję substancji, których organizm sam produkować nie może. Co najważniejsze, implantacja immobilizowanych bakterii umożliwia jednoczesną ochronę pacjenta przed niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się bakterii oraz izoluje bakterie od układu odpornościowego. Tym samym, immobilizacja może stanowić rozwiązanie problemu bezpieczeństwa terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem bakterii produkujących toksyny. Ponieważ żaden system nie jest w 100% skuteczny, koniecznie należy przeznaczyć do tego typu terapii patogeny atenuowane, a jeszcze bezpieczniejsze jest wykorzystanie zrekombinowanych niepatogennych szczepów bakteryjnych, które dzięki modyfikacjom genetycznym niosą tylko wybrane czynniki patogenezu.

Mając na uwadze powyżej przedstawione argumenty, w przedstawionej pracy skonstruowano szczep *Bacillus subtilis* zdolny do wydzielania LLO. Ta Gram-dodatnia bakteria jest modelowym organizmem o dobrze poznanej genetyce, jest niepatogenna i relatywnie dość blisko spokrewniona z *L. monocytogenes* co umożliwia łatwe przenoszenie i ekspresję genów, tak jak to zademonstrowano dla *llo*. W przedstawionej pracy zastosowano modyfikowane membrany polipropylenowe do enkapsulacji komórek *B. subtilis*. Początkowe testy wykazały, że dostępne komercyjnie kapilary polipropylenowe, pomimo nominalnie małej wielkości porów, nie zapewniają odpowiedniej szczelności i bakterie wydostawały się z nich na zewnątrz. Dlatego membrany zostały powleczone poli-L-lizyną, która utworzyła na powierzchni kapilary polielektrolitową powłokę skutecznie utrzymującą komórki bakteryjne wewnątrz kapilar. Funkcjonowanie opracowanego systemu przetestowano najpierw na erytrocytach, modelowych komórkach eukariotycznych do badania aktywności cytolitycznej. Wykazano, że immobilizowane komórki *B. subtilis* skutecznie wydzielają aktywną LLO, która przedostaje się przez membranę polipropylenową. Zgodnie z danymi literaturowymi [4] najwyższą aktywność odnotowano w niskim pH w obecności czynnika redukującego (pH 5,6 z dodatkiem Cys-HCl) a najmniejszą w neutralnym pH bez czynników redukujących. Jednak, w odróżnieniu od *L. monocytogenes*, aktywność hemolityczna *B. subtilis* w tych warunkach była znacząca, co jest istotne ze względu na planowane użycie LLO w warunkach fizjologicznych dla komórek eukariotycznych. Wykazano też, że ekspresja LLO jest ściśle kontrolowana i indukowana przez IPTG, niezaindukowane komórki generowały podobną

aktywność hemolityczną co puste kapilary. Kolejne testy potwierdziły przydatność immobilizowanych komórek *B. subtilis*, kapilary z bakteriami umieszczono w hodowli komórek nowotworowych – limfocytów T i B.

Główne osiągnięcia naukowe i omówienie wykorzystania

Opracowano skuteczny system immobilizacji komórek *B. subtilis* poprzez modyfikacje tworzyw polipropylenowych. Synteza LLO była zależna od indukcji i wystarczająco wydajna, by wywołać silny efekt cytotoksyczny. Jak zademonstrowano w niniejszej pracy, komórki *B. subtilis* wydzielające toksyny w takim układzie mogą mieć znaczenie praktyczne, dlatego opracowany system został zgłoszony do Polskiego Urzędu Patentowego: „Membrana poliolefinowa do izolacji mikroorganizmów Gram (+) i sposób jej wytwarzania.”

Stachowiak R., Łyżniak M., Budziszewska K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J. (2012). Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including listeriolysin O, on leukocyte targets. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2012/954375

Jedną z głównych przeszkód do planowanego zastosowania *L. monocytogenes* do celów terapeutycznych, zaraz za kwestią bezpieczeństwa, jest osiągnięcie wystarczającej aktywności cytotoksycznej w warunkach fizjologicznych. Dostosowana do wewnątrzkomórkowego stylu życia *L. monocytogenes* wykazuje niską aktywność cytolityczną w neutralnym pH. Jest to wynikiem zarówno wspomnianej już niskiej aktywności samej LLO, jak i mało wydajną ekspresją genu *llo* w tych warunkach. Może to być wykorzystane do lizy guzów litych, które charakteryzują się wzrostem w mikrośrodkowisku o obniżonej zawartości tlenu i niskim pH. Fakt ten jest znany od dawna i wykorzystywany przy projektowaniu terapii celowanych [19]. Wydaje się, że właśnie ta cecha warunkuje preferencyjny wzrost bakterii patogennych w okolicy guzów i była powodem sukcesów terapii eksperymentalnych wykorzystujących bakterie patogene.

Planowane wykorzystanie LLO do zwalczania nowotworów hematologicznych wymaga innej drogi efektywnej stymulacji syntezy tej toksyny przez natywnego gospodarza. Ekspresja *llo*, jak i pozostałych czynników patogenezы jest regulowana przez białko PrfA [18]. W przedstawionej pracy wykorzystano znany od dawna i nie do końca poznany mechanizm aktywacji syntezy LLO przez dodanie silnego adsorbentu, takiego jak węgiel aktywowany, czy użytej w tej pracy żywicy amberlite. Hodowla *L. monocytogenes* w obecności amberlite zaowocowała silną indukcją syntezy toksyn, uzyskane preparaty wykazywały się zdolnością do efektywnej hemolizy w pH 7,4. Opisana metoda hodowli *Listeria* jest użytecznym sposobem uzyskania preparatów *in vitro* do późniejszego wykorzystania, jednak nie można na niej polegać w przypadku wprowadzenia bakterii do organizmu żywego. Tu z pomocą może przyjść znajomość funkcjonowania PrfA. Opisano mutację genu kodującego to białko, która skutkuje syntezą hiperaktywnego wariantu regulatora, indukującego ciągłą syntezę czynników wirulencji, znanego jako PrfA* [18]. W pracy wykorzystano szczep MAC niosący wspomnianą mutację, który okazał się efektywniej syntetyzować cytotoksyny niż szczep dziki hodowany z żywicą amberlite. Szczep taki będzie efektywnie syntetyzował toksyny *in vivo*,

np. po implantacji immobilizowanych komórek w kapilarach. Naturalnie, istotną kwestią pozostaje bezpieczeństwo terapii, dlatego w niniejszej pracy przedstawiano bezpośrednio porównanie szczepów *L. monocytogenes* oraz *B. subtilis*. W pracy wykorzystano oprócz opisanego już szczepu *B. subtilis* wydzielającego natywną LLO dwa nowe szczepy, zdolne do syntezy zmodyfikowanych wariantów: LLO^{C484A} i LLO^{C484S}. Ekspresja zmutowanych wariantów *llo* pozwoliła lepiej uwidocznić różnice (dość subtelne w przypadku sekrecji przez *L. monocytogenes*) pomiędzy toksynami opisanymi w pierwszej z prezentowanych prac oraz potwierdzić postawione tam hipotezy. Zmodyfikowany wariant LLO^{C484A} wykazał najwyższą aktywność spośród wszystkich analizowanych szczepów, potwierdzając wysoką, niezależną od czynników redukujących stabilność w warunkach fizjologicznych oraz aktywność, a tym samym przydatność do aplikacji w takich warunkach. Z kolei aktywność LLO^{C484S} była zdecydowanie najniższa. Wydaje się, że jest to nie tylko wynikiem niskiej aktywności tego białka w warunkach fizjologicznych, ale również niskiej stabilności, gdyż detekcja białek metodą western blot uwidoczniała szereg prążków, co może być efektem samoistnej degradacji lub proteolizy.

Wyniki aktywności hemolitycznej zostały potwierdzone w dalszych eksperymentach, gdzie zastosowano uzyskane preparaty do cytolizy komórek nowotworowych linii Jurkat oraz komórek nowotworowych izolowanych z krwi pacjentów chorych na białaczkę. Kontrolę stanowiły białe krwinki wyizolowane z krwi obwodowej zdrowych ochotników. Aktywność badanych preparatów była zgodnie z przewidywaniami wprost proporcjonalna do zastosowanej koncentracji. Cytotoksyczność wynikała głównie z aktywności LLO, ale aktywność fosfolipaz również miała wpływ na ostateczne wyniki, dlatego generalnie cytotoksyczność nadsączy pochodzących *L. monocytogenes* była większa niż *B. subtilis*. Najbardziej obiecującym wynikiem było uzyskanie w niektórych warunkach większej cytotoksyczności względem komórek nowotworowych niż komórek kontrolnych. Chociaż mechanizm działania CDC uniemożliwia bezpośrednio ukierunkowanie aktywności, niektóre komórki mogą być bardziej wrażliwe na działanie tych toksyn. Od dawna wiadomo, że komórki eukariotyczne wykazują zróżnicowaną wrażliwość na toksyny z rodziny CDC w zależności od typu komórki i organizmu, z którego pochodzi [1]. W tej pracy wykazano, że limfocyty T są bardziej wrażliwe na działanie LLO niż komórki B. Choć porównanie jest obciążone pewnym ograniczeniem (zbadana były tylko hodowla komórkowa limfocytów T), może to świadczyć o szczególnej przydatności LLO do eradykacji komórek T.

Główne osiągnięcia naukowe i omówienie wykorzystania

Skonstruowano szczepy *B. subtilis* wydzielające zmodyfikowane LLO o dużym potencjale aplikacyjnym. Z tego względu modyfikacje wektorów niosących geny *llo* zostały objęte wnioskiem patentowym: „Zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne, szczepy *B. subtilis* je obejmujące oraz ich zastosowania”. W pracy wykazano, że limfocyty T są bardziej wrażliwe od B na działanie LLO. Mimo to, warto dalej badać możliwość zastosowania LLO do terapii białaczek B komórkowych, gdyż w większości układów komórki nowotworowe były efektywniej eliminowane niż białe krwinki osób zdrowych.

Stachowiak R., Łyżniak M., Grabowska M., Roeske M., Jagielski T., Bielecki J., Budziszewska B.K., Hoser G., Kawiak J. (2014). Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnology*, 14: 7

Przystawione do tej pory rozwiązania zakładały wykorzystanie żywych (najkorzystniej immobilizowanych) komórek bakteryjnych wydzielających toksyny. Takie podejście nieodłącznie zawiera element ryzyka, nawet jeśli użyć niepatogennych mikroorganizmów wydzielających tylko wybrane czynniki patogenezy. Użycie samych toksyn wiąże się oczywiście z niebezpieczeństwem wywołania działań niepożądanych, jednak nie jest ono większe niż w przypadku żywych komórek bakteryjnych produkujących tę samą toksynę. Co ważniejsze, użycie izolowanych białek pozwala na ich modyfikacje metodami biochemicznymi, w szczególności łączenie z przeciwciałami by ukierunkować ich aktywność i ograniczyć efekty uboczne. W końcu, preparaty białkowe posiadają nieporównanie większą możliwość zdefiniowania właściwości farmakokinetycznych, co nie jest bez znaczenia przy planowanej aplikacji w biotechnologii medycznej. Dalsze prace nad możliwością wykorzystania LLO do terapii białaczek wymagały uzyskania oczyszczonego preparatu toksyny. Opublikowane do tej pory protokoły oczyszczania LLO pozwalały uzyskać białko o wysokim stopniu homogenności, jednak żaden z nich nie pozwalał na bezpośrednie otrzymanie preparatu w buforze zapewniającym stabilizację aktywności LLO. Chromatografia powinowactwa pozwala na błyskawiczne, teoretycznie jednoetapowe, oczyszczenie białka w natywnej konformacji, a zatem jest idealną metodą do izolacji tak labilnego białka jak LLO. Oczyszczanie na złożu niklowym wykorzystuje powinowactwo tego atomu do 6 powtórzonych histydyn, motywu zwanego znacznikiem histydynowym. Do elucji związanych ze złożem białek wykorzystuje się imidazol, którym ma większe powinowactwo do atomów Ni niż znacznik histydynowy. Dotychczas opisane metody polegały właśnie na użyciu buforów elucyjnych o wysokim pH i dużym stężeniu imidazolu.

W przedstawionej pracy zaproponowaliśmy użycie buforu elucyjnego o niskim pH, optymalnym dla aktywności i stabilności LLO, co jednocześnie pozwoliło na znaczące zredukowanie stężenia imidazolu, a tym samym skrócenie czasu potrzebnego na pozbycie się imidazolu z preparatu białka. By ułatwić badania, jak również ewentualne zastosowanie LLO, sprawdzono wpływ różnorodnych czynników na zachowanie stabilności białka podczas przedłużonego przechowywania. Testowano różne pH buforu do przechowywania próbek, gradient stężeń: glicerolu, Cys-HCl, EDTA, AEBSF. Spośród testowanych czynników dwa pierwsze okazały się mieć decydujące znaczenie dla zachowania stabilności LLO, pozostałe odczynniki miały drugorzędne znaczenie, dostrzegalne dopiero podczas przedłużonego przechowywania (powyżej 2-3 miesięcy).

Wykazano aktywność oczyszczonego preparatu LLO na erytrocytach oraz mysich i ludzkich leukocytach oraz większą podatność ludzkich komórek na aktywność tej cytolizyny. Mając na uwadze bezpieczeństwo terapii, w pracy zaproponowano metodę regulowania aktywności LLO wykorzystując mechanizm funkcjonowania CDC. Zawartość cholesterolu w błonie komórkowej jest czynnikiem determinującym podatność na działanie tych cytolizyn. Z tego względu postawiono hipotezę, że regulując zawartość tego sterolu w błonie komórkowej,

będziemy mogli (pośrednio) wpłynąć na aktywność LLO. W pracy wykorzystano cholesterol oraz cyklodekstrynę do modyfikacji zawartości cholesterolu w błonach komórek linii Jurkat. Zmierzono zawartość cholesterolu w błonach komórkowych, która zgodnie z oczekiwaniami zwiększyła się po wprowadzeniu dodatkowego cholesterolu do pożywki hodowlanej. Z kolei obecność cyklodekstryny w hodowli komórkowej drastycznie zredukowała, praktycznie do zera, obecność cholesterolu w błonach komórkowych. Dodatek zarówno cholesterolu, jak i cyklodekstryny bardzo efektywnie chronił komórki przed lizą. Zgodnie z teorią funkcjonowania CDC, błony nie zawierające cholesterolu są odporne na działanie cytolizyn [1], stąd skuteczność cyklodekstryny. Z kolei dodatek cholesterolu, choć jak wykazano zwiększył zawartość tego lipidu w błonie, spowodował inaktywację LLO, gdyż toksyny z rodziny CDC wiążą również wolny cholesterol, co prowadzi do przedwczesnych zmian konformacyjnych i tym samym inaktywacji cytolizyny [1]. Co ciekawe, jednoczesne zastosowanie zarówno cholesterolu, jak i cyklodekstryny miało efekt synergistyczny i całkowicie ochroniło badane komórki przed aktywnością cytotoksyczną. Zredukowana zawartość cholesterolu w błonach wraz z dużą koncentracją w roztworze zgodnie z oczekiwaniami całkowicie chroniła limfocyty przed lizą. Chociaż powtórzenie tych wyników *in vivo* może być trudne, nie jest całkowicie wykluczone, gdyż cyklodekstryny są lekiem dopuszczonym do klinicznego zastosowania [3].

Główne osiągnięcia naukowe

Opracowano nową metodę oczyszczania LLO, która pozwala zaoszczędzić zarówno czas, jak i odczynniki, a przede wszystkim zwiększa stabilność preparatu. Zbadano właściwości i stabilność oczyszczonego preparatu. Zaproponowano metodę regulacji aktywności LLO, która może mieć znaczenie praktyczne w wypadku klinicznego użycia cytolizyn.

Gryzik M., Grzywocz Z., Wasilewska D., Kawiak J., Stachowiak R., Bielecki J., Hoser G. (2015). Human lymphocytic B-leukemia cell line treatment with the bacterial toxin listeriolysin O and rituximab (anti-CD20 antibody): Effects of similar localization of their receptors. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28: 329-340

Rytuksymab (RTX) jest chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym (mAb), składającym się z ludzkich sekwencji stałych oraz z mysich sekwencji zmiennych. Przeciwciało to specyficznie rozpoznaje białko transbłonowe występujące w błonie limfocytów B, oznaczone jako antygen CD20. Związanie RTX z CD20 indukuje śmierć komórki poprzez aktywację układu dopełniacza, cytotoksyczność zależną od przeciwciał lub poprzez apoptozę. Z tego względu RTX jest bardzo skutecznym lekiem, używanym w terapii białaczek o podłożu B komórkowym. W 50% przypadków terapia jest skuteczna, co jest bardzo dobrym wynikiem, ale jednocześnie oznacza, że istnieje duża potrzeba kliniczna na zwiększenie efektywności terapii celowanej [10]. Pierwsze badanie z zastosowaniem LLO jako czynnika wspomagającego tradycyjną terapię pochodzą już z 1997 roku, kiedy użyto tej cytolizyny w połączeniu z bleomycyną [8].

W ostatniej pracy dokonano bezpośredniego i dokładnego porównania cytotoksyczności LLO względem limfocytów T i B przy użyciu linii komórkowych Jurkat i Raji. Już poprzednie badania wskazywały na większą wrażliwość limfocytów T, tym razem jednak wyznaczono dokładną wartość LD₅₀ dla jednej i drugiej linii. Pozwoliło to dokładnie obliczyć różnice w podatności na LLO, gdyż zgodnie z przewidywaniami w były one największe przy dawce powodującej cytotoksyczność na poziomie 50%. Limfocyty T okazały się być niemal dwukrotnie bardziej podatne na działanie LLO niż komórki linii Raji. Kontrolnie przeprowadzono również badanie podatności tych komórek na RTX w obecności serum z ludzkiej krwi. Pierwsze efekty były widoczne już po 30 min. inkubacji, a po dobie niemal wszystkie limfocyty B zostały zabite. Natomiast żywotność komórek linii Jurkat była niezmiennie wysoka przez cały okres trwania eksperymentu, potwierdzając specyficzność zastosowanego mAb. W finalnym eksperymencie użyto mieszaniny LLO i RTX by sprawdzić, czy LLO zwiększy cytotoksyczność badanego mAb przy możliwie niewielkich efektach ubocznych. W tym celu zastosowano niską, sublityczną dawkę LLO, która powodowała niewielką cytotoksyczność zarówno wśród limfocytów B, jak i T. Powyższe założenie udało się spełnić, pod warunkiem podania niewielkiej dawki LLO. Przy jednej jednostce LLO zmieszanej z RTX cytotoksyczność względem komórek T była na poziomie 10%, podczas gdy ta sama mieszanina zastosowana na limfocytach B powodowała śmiertelność na poziomie 35%. Choć efekt był zdecydowanie mocniejszy, to w porównaniu do aplikacji samego RTX na komórki Raji był to tylko 1,5-krotny wzrost skuteczności. Rezultat choć nie jest całkowitym sukcesem, może doprowadzić do polepszenia istniejącej terapii białaczek. Zaletą, ale jednocześnie wadą działania LLO i prawdopodobnego współdziałania z RTX jest preferencyjne łącznie się z błoną w miejscu gęstego występowania cholesterolu, w tzw. tratwach lipidowych. W tych samych domenach w błonie występują również białka transbłonowe, takie jak receptor CD20. Ludzkie białka efektorowe układu dopełniacza i perforyny dzielą z toksynami CDC nie tylko podobną budowę, ale i mechanizm działania [14]. Opisano także zdolność cytolizyn paciorkowców do aktywacji białek układu dopełniacza [2], możliwe że również LLO wykorzystuje ten mechanizm zwiększenia cytotoksyczności w środowisku zewnątrzkomórkowym. Wspólna lokalizacja receptorów dla RTX i LLO, podobieństwa funkcjonalne i strukturalne MACPF i CDC oraz możliwość aktywacji układu dopełniacza przez CDC mogły sprawić, że nie tylko związanie RTX, ale także LLO może aktywować układ dopełniacza i zwiększyć efekt cytotoksyczny.

Główne osiągnięcia naukowe

W pracy dokładnie porównano w sposób jakościowy i ilościowy wrażliwość limfocytów T i B na LLO. Zaproponowano model współdziałania LLO i RTX wyjaśniający, dlaczego obserwujemy zwiększenie efektu działania mAb po dodaniu cytolizyny, ale niestety również zwiększone efekty uboczne.

Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej rozprawie prace opisują molekularną charakterystykę cytolizyny *L. monocytogenes* oraz próbę wykorzystania aktywności cytotoksycznej do eradykacji komórek nowotworowych. Badania pozwoliły ostatecznie wyjaśnić rolę wysoce konserwowanej cysteiny w funkcjonowaniu LLO. Charakterystyka zmodyfikowanych wariantów wskazała na udział tego aminokwasu w regulacji aktywności w zależności od pH i potencjału redoks. Otrzymane wyniki stanowią nie tylko istotne osiągnięcie z punktu widzenia badań podstawowych, ale ukazały także dużą wartość badanych wariantów LLO do zastosowań w biotechnologii biomedycznej. Aby potwierdzić uzyskane wyniki i uzyskać szczepy bakteryjne o dużym potencjale aplikacyjnym, sklonowano geny kodujące natywną i zmodyfikowaną LLO w bakterii modelowej *B. subtilis*. Synteza badanych wariantów cytolizyny w tej bakterii pozwoliła lepiej uwidocznić różnice pomiędzy toksynami opisanymi w pierwszej z prezentowanych prac oraz potwierdzić postawione tam hipotezy. Okazało się, że LLO^{C484A} wykazała najwyższą aktywność cytotoksyczną spośród wszystkich analizowanych wariantów cytolizyny *L. monocytogenes*, a tym samym szczególną przydatność do niszczenia komórek nowotworowych. Z kolei aktywność LLO^{C484S} była zdecydowanie najniższa, szczepy wydzielające to białko mogą być przydatne w innych aplikacjach, gdzie niska cytotoksyczność będzie zaletą, jak konstrukcja szczepionek nowej generacji. Istotną kwestią pozostaje bezpieczne zastosowanie otrzymanych szczepów w aplikacjach biomedycznych, dlatego opracowano skuteczny system immobilizacji komórek *B. subtilis* poprzez modyfikacje tworzyw polipropylenowych. Enkapsulowane komórki *B. subtilis* były zdolne do regulowanego wydzielania toksyn, co ma duże znaczenie praktyczne.

Największym problemem ograniczającym zastosowanie toksyn bakteryjnych pozostają skutki uboczne związane z niespecyficzną cytotoksycznością, wciąż największym wyzwaniem pozostaje ukierunkowanie potencjału toksycznego LLO. Dokładniejsze badanie właściwości LLO oraz interakcji z przeciwciałami wymagało uzyskania czystych białek, dlatego podjęto starania w tym kierunku. Podczas badań opracowano nową, udoskonaloną metodę oczyszczania LLO. Uzyskany preparat zbadano i wykorzystano w kolejnym projekcie, którym było zbadanie współdziałania LLO i leku przeciw białaczkowemu - rytuksymabu. Jednoczesne zastosowanie cytolizyny i przeciwciała pozwoliło na zwiększenie efektu cytotoksycznego skierowanego na komórki docelowe, choć niestety zaobserwowano również zwiększone efekty uboczne.

Uzyskane wyniki mają bardzo duży potencjał aplikacyjny, jedyną istotną przeszkodą do badań wdrożeniowych wydaje się być niespecyficzna aktywność LLO. Problem ten może zostać rozwiązany poprzez trwałe związanie toksyny z RTX czy innym przeciwciałem, to jest uzyskaniem immunotoksyny. Badania w tym kierunku są kontynuowane w naszym zespole, prowadzone prace doprowadziły do uzyskania trwałego kompleksu LLO z RTX. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące, gdyż zgodnie z hipotezą niespecyficzna aktywność LLO została znacząco ograniczona. Aktualnie trwają końcowe prace nad manuskrytem i wyniki zostaną wkrótce opublikowane.

Piśmiennictwo

1. Alouf J.E., Billington S.J., Jost B.H.: Repertoire and general features of the family of cholesterol-dependent cytolysins (w) The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Redakcja: Alouf J.E., Popoff M.R., 3 wyd. Londyn – San Diego: Academic Press; 2005: 643-658.
2. Barnett T.C., Cole J.N., Rivera-Hernandez T., Henningham A., Paton J.C., Nizet V., Walker M.J.: Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell. Microbiol.* **17**, 1721-1741 (2015)
3. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K.: Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.* **6**, E329-357 (2005)
4. Geoffroy C., Gaillard J.L., Alouf J.E., Berche P.: Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **55**, 1641-1646 (1987)
5. Glomski I.J., Gedde M.M., Tsang A.W., Swanson J.A., Portnoy D.A.: The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell. Biol.* **156**, 1029-1038 (2002)
6. Jones S., Portnoy D.A.: Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **62**, 5608-5613 (1994)
7. Kaminski M., Stachowiak R., Bielecki J.: Immunotoksyny – charakterystyka i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **49**, 239-254 (2010)
8. Kerr D.E., Wu G.Y., Wu C.H., Senter P.D.: Listeriolysin O potentiates immunotoxin and bleomycin cytotoxicity. *Bioconjug. Chem.* **8**, 781-784 (1997)
9. Koster S., van Pee K., Hudel M., Leustik M., Rhinow D., Kuhlbrandt W., Chakraborty T., Yildiz O.: Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation. *Nat. Commun.* **5**, 3690 (2014)
10. McLaughlin P. i wsp.: Rituximab chimeric Anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2825-2833 (1998)
11. Michel E., Reich K.A., Favier R., Berche P., Cossart P.: Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol. Microbiol.* **4**, 2167-2178 (1990)
12. Patyar S., Joshi R., Byrav D.S., Prakash A., Medhi B., Das B.K.: Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J. Biomed. Sci.* **17**, 21 (2010)
13. Podobnik M., Marchiorretto M., Zanetti M., Bavdek A., Kisovec M., Cajnko M.M., Lunelli L., Dalla Serra M., Anderluh G.: Plasticity of listeriolysin O pores and its regulation by pH and unique histidine. *Sci. Rep.* **5**, 9623 (2015)
14. Reboul C.F., Whisstock J.C., Dunstone M.A.: Giant MACPF/CDC pore forming toxins: A class of their own. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 475-486 (2016)
15. Rossjohn J., Feil S.C., McKinstry W.J., Tweten R.K., Parker M.W.: Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, **89**, 685-692 (1997)
16. Schuerch D.W., Wilson-Kubalek E.M., Tweten R.K.: Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12537-12542 (2005)
17. Sun R., Liu Y.: Listeriolysin O as a strong immunogenic molecule for the development of new anti-tumor vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 1058-1068 (2013)
18. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 584-640 (2001)
19. Wikehooley J.L., Haveman J., Reinhold H.S.: The Relevance of Tumor pH to the Treatment of Malignant Disease. *Radiother. Oncol.* **2**, 343-366 (1984)

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Stachowiak R., Bielecki J. (2001). Contribution of hemolysin and phospholipase activity to cytolytic properties and viability of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiologica Polonica*, 50: 243-250

Listeriolizyna O i dwie fosfolipazy (PlcA i PlcB) to czynniki o dobrze udokumentowanej roli w procesie patogenezy, jednak dokładny wkład poszczególnych białek w proces cytolizy nie był jasny. Aby ustalić udział wymienionych toksyn w procesie lizy błony komórkowej przygotowano układy doświadczalne, w których erythrocyty inkubowano z preparatami bakteryjnymi o różnej proporcji LLO i PlcA/B. Doświadczenia potwierdziły główną rolę LLO w procesie cytolizy, bez obecności cytolizyny pozostałe toksyny nie były w stanie uszkodzić błony komórkowej. Obecność LLO w preparacie diametralnie zmieniała sytuację, następowała liza erythrocytów. Dodatek fosfolipaz zwiększał efekt cytolityczny w niewielkim stopniu. Znaczenie enzymów wzrastało w pH neutralnym, czyli w warunkach suboptymalnych dla aktywności LLO, dodanie fosfolipaz znacząco zwiększało efekt cytolityczny. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano model, w którym enzymy PlcA/B potrzebują wstępnej lizy błony komórkowej przez LLO, co prowadzi do odsłonięcia wiązań fosfolipidowych i umożliwia dalszą lizę błony przy udziale fosfolipaz.

Kawiak J., Stachowiak R., Łyżniak M., Bielecki J., Granicka L. (2011). The use of hollow fiber membranes combined with cytometry in analysis of bacteriological samples. *Methods in Cell Biology*, 102: 411-429

W niniejszym opracowaniu przedstawiono metodykę immobilizacji komórek bakteryjnych przez enkapsulację. Praca podsumowuje dotychczasową wiedzę w tym zakresie oraz wprowadza opis nowych rozwiązań opracowanych przez nasz zespół. Poruszono istotne kwestie prowadzące do efektywnej immobilizacji: dobór odpowiedniego materiału i jego przetestowanie, w pierwszej kolejności używając wyznakowanych mikroskopijnych kuleczek, a później już bakterii. Istotną kwestią jest zachowanie żywotności i czynności metabolicznej zamkniętych komórek, co należy przetestować po uwolnieniu komórek immobilizowanych przez wyznaczony okres. Zastosowany nośnik do immobilizacji powinien efektywnie unieruchamiać bakterie, ale jednocześnie uwalniać produkowane przez komórki białka. Do zbadania syntezy i wydzielania białek można wykorzystać reporterowe białko GFP, po czym ostatecznie potwierdzić funkcjonalność układu używając docelowego białka. Przykładem takiego opracowania może być opisany w tej pracy *B. subtilis* wydzielający cytolizynę *L. monocytogenes*.

Granicka L., Kawiak J., Bielecki J., Wiśniewski J., Stachowiak R., Łyżniak M. „Membrana poliolefinowa do izolacji mikroorganizmów Gram (+) i sposób jej wytwarzania”. Zgłoszenie patentowe nr: P-389847, data przyznania patentu: 25 X 2012 r.

Podczas badań nad przydatnością różnego rodzaju membran do izolacji mikroorganizmów, stwierdzono, że stwarzają one kłopoty z zamykaniem, są zbyt kruche lub nie zapewniają dostępu substancji odżywczych do materiału biologicznego lub nie zapewniają izolacji bakterii od środowiska zewnętrznego, pomimo odpowiedniego punktu odcięcia gwarantującego izolację i funkcjonowanie bakterii. Problem dotyczył w szczególności bakterii Gram-dodatnich, w szczególności *B. subtilis*, który stanowił istotny element realizowanych projektów. Membranę tworzy się poprzez naniesienie na materiał poliolefinowy biwarstwy utworzonej z warstwy polikationu oraz warstwy z polianionu. Otrzymane membrany modyfikowane, pozwalają na izolację nie tylko komórek eukariotycznych i mikroorganizmów Gram-ujemnych, ale również bakterii Gram-dodatnich. Opracowany nośnik do immobilizacji zapobiega wydostawaniu się mikroorganizmów, jednocześnie nie ogranicza transportu substancji odżywczych przez membranę, pozwalając na wydzielanie substancji o znaczeniu biotechnologicznym.

Jagielski T., Buzzini P., Lassa H., Malinowski E., Branda E., Turchetti B., Polleichtner A., Roesler U., Lagneau P.E., Marques S., Silva E., Thompson G., Stachowiak R., Bielecki J. (2012). Multicentre Etest evaluation of *in vitro* activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 1945-1947

Głony z rodzaju *Prototheca* są jedynym znanym roślinnym patogenem. Do infekcji dochodzi niezwykle rzadko, jednak problemem jest brak skutecznego leczenia ze względu na unikalność i nowatorski charakter zagrożenia. Pod niektórymi względami te mikroorganizmy przypominają drożdże, dlatego postanowiono przeprowadzić kompleksowe badania podatności *Prototheca* na leki przeciwgrzybicze. Zbadano 10 substancji, z czego połowa okazała się nieskuteczna. Największą aktywność wykazano w przypadku amfoterycyny B. W związku z powyższym rekomendujemy ten lek jako główny środek do leczenia zakażeń wywoływanych przez *Prototheca*.

Jagielski T., Grzeszczuk M., Kamiński M., Roeske K., Napiórkowska A., Stachowiak R., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z., Bielecki J. (2013). Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 81: 298-307

W XXI wieku prątki gruźlicy wciąż stanowią w skali globalnej jedno z największych zagrożeń dla zdrowia. Bardzo istotnym problemem współczesnej epidemiologii *Mycobacterium tuberculosis* jest narastająca oporność na antybiotyki. Oporność na izoniazyd jest związana głównie z pojawieniem się mutacji w genie *katG*, kodującym syntezę katalazy.

W przedstawionej pracy przeprowadzono detekcję i charakterystykę mutacji w genie katalazy wśród 46 izolatów klinicznych. Analiza sekwencji *katG* pozwoliła zidentyfikować mutacje w tym genie u 93% badanych szczepów. Zdecydowaną większość stanowiła mutacja w kodonie 315 (74%). Największą skutecznością w nadawaniu oporności na antybiotyk charakteryzowały się mutacje typu nonsense, które wprowadziły przedwczesny kodon stop do sekwencji genu katalazy, tym samym całkowicie blokując syntezę funkcjonalnego enzymu, niezbędnego do powstania aktywnej formy leku. Szczęśliwie tego typu mutacje były rzadkie, stwierdzono je tylko w 2 przypadkach.

Granicka, L.H., Borkowska, M., Grzeczko, A., Stachowiak, R., Szklarczyk, M., Bielecki, J., Strawski, M. (2014). The targeting nanothin polyelectrolyte shells in system with immobilized bacterial cells for antitumor factor production. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102: 2662-2668

Immobilizacja może być wykorzystania nie tylko od izolacji mikroorganizmów, ale może także spełniać dodatkowe funkcje. W tej pracy wykorzystano powłokę z elektrolitów nie tylko do unieruchomienia komórek *B. subtilis*, ale do kierowania bakterii do komórek nowotworowych. W powłoki opłaszczające komórki bakteryjne wkomponowano transferynę, a jako modelowych komórek nowotworowych użyto linii Jurkat, które jak wiele komórek nowotworowych wykazują zwiększoną ekspresję receptora transferyny. W eksperymentach wykazano cytotoksyczny potencjał unieruchomionych poprzez nanoopłaszczanie komórek *B. subtilis* wydzielających LLO. Cytotoksyczność względem komórek białaczkowych była większa, kiedy powłoki polielektrolitowe zawierały transferynę.

Stachowiak R., Bielecki J., Roeske K., Jagielski T., Kamiński M. „Zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne, szczepy *B. subtilis* je obejmujące oraz ich zastosowania”. Zgłoszenie patentowe nr: P-400016, data przyznania patentu: 20 VII 2015 r.

Większość realizowanych projektów zakładała konstrukcję nowych szczepów *B. subtilis*. W odróżnieniu od *E. coli*, ilość dostępnych wektorów dla *B. subtilis* jest mocno ograniczona. Plazmid integracyjny pAG58 znajdujący się w kolekcji Instytutu Mikrobiologii UW był już w czasie rozpoczęcia projektu mocno przestarzałą konstrukcją, nie pozwalającą na efektywne otrzymywanie nowych szczepów zrekombinowanych. Ulepszony konstrukt zawiera dodatkowe marker selekcyjny oraz posiada znacząco rozszerzoną sekwencję akceptorową do klonowania. Dodatkowo, aby zmniejszyć wielkość nowej konstrukcji usunięto zbędne sekwencje, nie pełniące żadnej istotnej funkcji. Uzyskane wektory pozwalają na znacząco efektywniejszą konstrukcję szczepów *B. subtilis*. Ponieważ planowane zastosowanie zakłada zdolność do syntezy LLO i ewentualną syntezę innych białek, przygotowane wektory zawierają już geny *llo* przed miejscem akceptorowym. Miejsca restrykcyjne zaplanowano też tak, że z konstrukcji można łatwo usunąć gen *llo*, jeżeli zajdzie taka potrzeba. Przygotowano dwie wersje wektora ekspresyjnego, umożliwiające syntezę indukowaną lub konstytutywną.

Stachowiak R., Jagielski J., Roeske K., Osińska O., Gunerka P., Wiśniewski J., Bielecki J. (2015). Lmo0171, a novel internalin-like protein, determines cell morphology of *Listeria monocytogenes* and its ability to invade human cell lines. *Current Microbiology*, 70: 267-274

Internaliny to adhezyny *L. monocytogenes*, determinują zakres gospodarzy i specyficzność tkankową. Opisano już wiele białek z tej rodziny, co wydaje się dobrze tłumaczyć występowanie u wielu zwierząt oraz zdolność tej bakterii do zakażenia różnych tkanek i narządów. Genomika umożliwia efektywne poszukiwanie nowych determinantów patogenezy. Gen o dużej homologii do znanych czynników patogenezy, który jednocześnie nie występuje u blisko spokrewnionej, ale niepatogennej bakterii (w tym przypadku *L. innocua*), ma dużą szansę być czynnikiem wirulencji. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna doprowadziła do wytypowania genu o dużej homologii do internalin. Aby zbadać rolę wybranej sekwencji, skonstruowana szczep *L. monocytogenes* z mutacją w genie *lmo0171*. Uzyskany mutant charakteryzuje się szeregiem ciekawych cech fenotypowych, z których najbardziej wyróżniają się zmiany w morfologii. Albowiem szczep ten zamiast klasycznego kształtu pałeczki przyjmuje formy zakrzywione, przypominające rogalik. Ponadto, mutant niezdolny do syntezy białka Lmo0171 cechował się obniżoną zdolnością do inwazji komórek eukariotycznych. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że gen *lmo0171* koduje nowe białko z rodziny internalin o dwóch funkcjach. Internalina Lmo0171 jest zaangażowana w metabolizm ściany komórkowej bakterii oraz adhezję do powierzchni komórek gospodarza.

Kwiatkowska A., Granicka L.H., Grzeczkwicz A., Stachowiak R., Kamiński M., Grubek Z., Bielecki J., Strawski M., Szklarczyk M. (2017). Stabilized nanosystem of nanocarriers with an immobilized biological factor for anti-tumor therapy. *PLOS ONE*, 12: e0170925

Immobilizacja może być stosowana nie tylko do stabilizacji komórek, ale również mniejszych elementów, takich jak białka. Unieruchomione molekuly na powierzchni złożonego nośnika, zwane stabilizowanymi nanostystemami, mogą mieć większe szanse dotrzeć do miejsca docelowego, przykładowo do guza nowotworowego. W przedstawionej pracy wykorzystano to podejście, cząsteczki LLO zostały opłaszczane polielektrolitami i przyłączone do nośnika. Aby móc lepiej śledzić lokalizację nanostystemów, skonstruowano fuzję translacyjną w wyniku której uzyskano białko hybrydowe GFP-LLO. Pomimo znacznego zwiększenia masy białka, aktywność cytolityczna została w większości zachowana. Jako nośnik wykorzystano komórki zarówno bakteryjne, jak i eukariotyczne. Skonstruowano trzy układy (i) opłaszczone LLO przyłączone do powierzchni opłaszczonej komórki, (ii) układ nr 1 z dołączoną transferryną oraz (iii) komórki z 2 układu przyłączone do rdzenia z komórki eukariotycznej, czyli docelowy stabilizowany nanosystem. Porównano cytotoksyczność wszystkich 3 układów względem komórek nowotworowych, największą efektywnością wykazał się stabilizowany nanosystem.

Roeske K., Stachowiak R., Jagielski T., Kaminski M., Bielecki J. (2018). Delivery of chicken egg ovalbumin to dendritic cells by listeriolysin O-secreting vegetative *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:122-135

Głównym wyzwaniem stojącym przed współczesną wakcynologią jest konstrukcja bezpiecznych, jednocześnie skutecznych szczepionek. Większość współcześnie opracowanych preparatów do immunizacji to szczepionki podjednostkowe, które choć są bardzo bezpieczne, to kosztem skuteczności. Takie szczepionki skutecznie stymulują odpowiedź humoralną, ale ważna część reakcji odpornościowej – odpowiedź komórkowa nie jest już aktywowana. W opisanym projekcie użyto *B. subtilis* z genem *llo* jako bezpiecznej platformy do indukcji odpowiedzi komórkowej przeciwko wybranym antygenom. W pracy użyto owoalbuminy (OVA) jako modelowego antygeny. Zaplanowano szereg konstrukcji, zawierających oprócz niezbędnego genu *llo*, różne fragmenty genu *ova* w fuzji translacyjnej z regionem liderowym *llo* pełniącym funkcję adiuwantu i transportera umożliwiającego sekrecję antygeny. W pracy potwierdzono potencjał LLO do indukcji odpowiedzi komórkowej oraz stwierdzono, że kontekst genetyczny jest niezwykle istotny podczas ekspresji antygeny i jego późniejszej prezentacji, gdyż tylko pełnej długości OVA indukowała proliferację limfocytów.

