

ZAŁĄCZNIK 3a

Autoreferat

dr Grzegorz Dubin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

1. Imię i Nazwisko.

Grzegorz Dubin

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

Data nadania stopnia naukowego doktora: 06.03.2007
(Rada Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Kraków)

Dziedzina i dyscyplina nadanego stopnia: nauki biologiczne, biochemia

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Recenzenci: prof. dr hab. Andrzej Kozik; prof. dr hab. Jacek Otlewski

Tytuł rozprawy doktorskiej: Gronkowcowe proteiny i ich inhibitory.

2b. Tytuł zawodowy magistra

Data nadania tytułu zawodowego magistra: czerwiec 2002
(Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UJ, Kraków)

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Tytuł pracy magisterskiej: Cloning, expression and purification of p56, the N-terminal truncated part of the Retinoblastoma protein (pRb)

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

Okres zatrudnienia	Stanowisko	Miejsce zatrudnienia
11.2007 – do chwili obecnej	adiunkt	Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ
01.2007-11.2007	samodzielny biolog	Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ





Ponadto od grudnia 2012 roku habilitant pełni funkcję Kierownika Pracowni Rentgenograficznej w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ (funkcja ta nie wiąże się z dodatkowym zatrudnieniem)

4. Wskazanie osiągnięcia¹ 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.):


Oświadczenia współautorów dotyczące ich indywidualnego wkładu w przygotowanie publikacji wspólnych zamieszczono w załączniku 6.


¹ w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

4a. Tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~**Charakterystyka funkcjonalna i strukturalna zewnątrzkomórkowego systemu proteolitycznego Gronkowca złocistego.**4b. Autor/autorzy², tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

1. Pustelny, K., Zdzalik, M., Stach, N., Stec-Niemczyk, J., Cichon, P., Czarna, A., Popowicz, G., Mak, P., Drag, M., Salvesen, G.S., Wladyka, B., Potempa, J., Dubin, A., **Dubin, G.** 
Staphylococcal SplB Serine Protease Utilizes a Novel Molecular Mechanism of Activation.
(2014) J. Biol. Chem. 289:15544-15553
(IF₂₀₁₄=4,573; IF₅=4,693; MNiSzW=35; c=0)
2. Burchacka, E., Zdzalik, M., Stec-Niemczyk, J., Pustelny, K., Popowicz, G., Wladyka, B., Dubin, A., Potempa, J., Sienczyk, M., **Dubin, G.**, Oleksyszyn, J.
Development and binding characteristics of phosphonate inhibitors of SplA protease from *Staphylococcus aureus*.
(2014) Prot. Sci. 23:179-189
(IF₂₀₁₃=2,861; IF₅=2,877; MNiSzW=25; c=0)
3. Zdzalik, M., Kalinska, M., Wysocka, M., Stec-Niemczyk, J., Cichon, P., Stach, N., Gruba, N., Stennicke, H.R., Jabaiah, A., Markiewicz, M., Kedracka-Krok, S., Wladyka, B., Daugherty, P.S., Lesner, A., Rolka, K., Dubin, A., Potempa, J., **Dubin, G.** 
Biochemical and Structural Characterization of SplD Protease from *Staphylococcus aureus*.
(2013) PLoS One, 8: e76812
(IF₂₀₁₃=3,534; IF₅=3,702; MNiSzW=40; c=0)
4. Zdzalik, M., Karim, A.Y., Wolski, K., Buda, P., Wojcik, K., Brueggemann, S., Wojciechowski, P., Eick, S., Calander, A.M., Jonsson, I.M., Kubica, M., Polakowska, K., Miedzobrodzki, J., Wladyka, B., Potempa, J., **Dubin, G.** 
Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* – important targets triggering immune response *in vivo*.
(2012) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 66:220-229
(IF₂₀₁₂=2,684; IF₅=2,747; MNiSzW=25; c=6)
5. Kalinska, M., Kantyka, T., Greenbaum, D.C., Larsen, K.S., Wladyka, B., Jabaiah, A., Bogyo, M., Daugherty, P.S., Wysocka, M., Jaros, M., Lesner, A., Rolka, K., Schaschke, N., Stennicke, H., Dubin, A., Potempa, J., **Dubin, G.** 
Substrate specificity of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases – Staphopains A, B and C.
(2012) Biochimie, 94:318-327
(IF₂₀₁₂=3,142; IF₅=3,124; MNiSzW=30; c=4)

²Udział habilitanta jako autora korespondencyjnego wskazano symbolem (✉).

6. Stec-Niemczyk, J., Pustelny, K., Kisieleska, M., Bista, M., Boulware, K.T., Stennicke, H.R., Thøgersen, I.B., Daugherty, P.S., Enghild, J.J., Baczynski, K., Popowicz, G.M., Dubin, A., Potempa, J., **Dubin, G.** 
Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*.
(2009) Biochem. J. 419: 555-564
(IF₂₀₀₉=5,155; IF₅=4,660; MNiSzW=35; c=12)

7. **Dubin, G.** , Stec-Niemczyk, J., Kisieleska, M., Pustelny, K., Popowicz, G., Bista, M., Kantyka, T., Boulware, K.T., Stennicke, H.R., Czarna, A., Phopaisarn, M., Daugherty, P.S., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Thornberry, N., Dubin, A., Potempa, J.
Enzymatic activity of the *Staphylococcus aureus* SplB serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln.
(2008) J. Mol. Biol. 379: 343-356
(IF₂₀₀₈=4,146; IF₅=3,702; MNiSzW=30; c=14)

4c. Omówienie celu naukowego/~~artystycznego~~ ww. ~~pracy/prac~~ i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest zdolny do bezobjawowej kolonizacji jamy nosowej zdrowych nosicieli. Przejściowe nosicielstwo dotyczy nawet do 80% populacji ludzkiej [1]. Jednocześnie Gronkowiec złocisty jest groźnym patogenem ludzi i zwierząt. Szacuje się, że bakteria ta odpowiada za prawie 15% wszystkich infekcji wewnątrz szpitalnych i że problem dotyczy prawie co setnego przyjętego pacjenta [2]. Ponadto Gronkowiec złocisty odpowiada za znaczącą liczbę zakażeń poza szpitalnych, jednak problem ten jest znacznie słabiej scharakteryzowany pod względem statystycznym. Gronkowiec wykazuje zdolność do kolonizacji szeregu organów i jako taki jest odpowiedzialny za zróżnicowane objawy chorobowe [3]. Jest przyczyną stosunkowo niegroźnych choć dolegliwych zakażeń miejscowych takich jak liszajec, zapalenie mieszków włosowych, czyraki, ropnie i inne. Gronkowiec powoduje także zakażenia inwazyjne, bezpośrednio zagrażające życiu, takie jak posocznica, zapalenie wsierdzia, zapalenia płuc oraz zakażenia ran pooperacyjnych i inne. Gronkowce są także odpowiedzialne za kilka rodzajów toksemii, w tym zakażenia żywności, syndrom Rittera, czy syndrom szoku toksycznego. Szeroko opisywany w literaturze przedmiotu i niezwykle niepokojący jest fakt rosnącej antybiotykooporności wśród gronkowców [4]. W połączeniu z brakiem skutecznej szczepionki stwarza to istotne zagrożenie dla systemu ochrony zdrowia. Wydaje się iż jedyną długoterminową perspektywą skutecznej walki z zakażeniami *S. aureus* jest szczegółowe poznanie fizjologii tego organizmu co pozwoli na opracowanie nowych strategii antybakteryjnych. Badania przedstawione jako osiągnięcie naukowe habilitanta wpisują się w dynamiczny nurt prac zmierzających do lepszego poznania szerokiego wachlarza czynników wirulencji Gronkowca złocistego.

Inaczej niż w przypadku wielu bakterii, wirulencja gronkowca nie opiera się na produkcji pojedynczego czynnika (wyjątek stanowią tutaj jedynie toksemie, które nie są jednak szerzej omawiane w tym opracowaniu). Wydaje się raczej iż zjadliwość poszczególnych szczepów opiera się na produkcji szerokiego spektrum czynników wirulencji, które dopiero wspólnie i przy odpowiedniej regulacji warunkują właściwości patogenne. Pomimo dynamicznego rozwoju prac badawczych, powiązania te pozostają nadal bardzo słabo poznane.

Znaczącą część zidentyfikowanych dotychczas gronkowcowych czynników wirulencji stanowią białka sekrecyjne będące pierwszą linię kontaktu patogenu z organizmem gospodarza [5-7]. Wśród szeregu czynników wydzielniczych, różne szczepy gronkowca produkują do 11 enzymów proteolitycznych, których rola w patogenezie tej bakterii pozostaje stosunkowo słabo wyjaśniona pomimo wielu lat prac nad ich charakterystyką [8]. Wiadomo iż pozbawienie bakterii zdolności do produkcji szeregu białek sekrecyjnych (w tym proteinaz) powoduje znaczące obniżenie wirulencji [9]. Wyniki różnorodnych analiz *in vitro* wskazują pośrednio iż wybrane gronkowcowe proteazy posiadają szereg właściwości analogicznych do czynników wirulencji innych bakterii lub bezpośrednio sugerują rolę tych enzymów w patogenezie [10]. Jednak wyniki badań *in vivo* na modelach zwierzęcych przynoszą stosunkowo niespójny obraz roli poszczególnych enzymów z uwagi na wewnętrzne ograniczenia stosowanych obecnie modeli oraz fakt iż większość gronkowcowych czynników wirulencji manifestuje swoje działanie jedynie w układach synergistycznych [8]. Ponadto wybrane gronkowcowe proteazy pozostają praktycznie całkowicie niescharakteryzowane *in vitro* i *in vivo*. W związku z powyższym, **przewodnim celem prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe habilitanta była charakterystyka funkcjonalna i strukturalna zewnątrzkomórkowego systemu proteolitycznego Gronkowca złocistego** przy wykorzystaniu metod biochemii, enzymologii i biologii strukturalnej.

Przedstawione osiągnięcie naukowe nie stanowi bezpośredniej próby wyjaśnienia roli poszczególnych proteinaz w wirulencji gronkowca. W pierwszej części prac autor skupia się na ogólnej charakterystyce zewnątrzkomórkowego systemu proteolitycznego Gronkowca złocistego poprzez analizę rozpowszechnienia genów kodujących poszczególne proteiny w populacji gronkowców oraz pośrednią analizę ekspresji tych genów podczas zakażenia [11]. Prace te mają na celu uzyskanie ogólnego obrazu potencjału poszczególnych proteinaz do pełnienia przypisywanej im roli czynników wirulencji, uzupełniając wiedzę dostępną na czas prowadzenia opisanych prac. Po ustaleniu wyżej wymienionej zależności autor skupia się na podstawowej charakterystyce biochemicznej i strukturalnej wybranych proteinaz [12-15]. Prace te mają na celu uzupełnienie wiedzy podstawowej dotyczącej interesującej klasy enzymów oraz stworzenie solidnych podstaw i narzędzi [16], które umożliwią innym naukowcom bezpośrednią analizę roli wybranych proteinaz w patogenezie gronkowca. Osiągnięcia na tym polu przedstawiono w podsumowaniu niniejszej części autoreferatu, nie stanowią one jednak bezpośrednio części przedstawionego przez habilitanta osiągnięcia z uwagi na wstępny charakter tych prac. Ponadto, analizując właściwości biochemiczne i strukturalne wybranych proteinaz gronkowcowych ujawniono interesujące charakterystyki mechanizmu aktywacji [17] i determinacji specyficzności substratowej, które analizowano szczegółowo. Dlatego, poza lepszym poznaniem gronkowcowych czynników wirulencji, prace te wnoszą istotny wkład w zrozumienie ogólnych mechanizmów działania enzymów proteolitycznych.

Rozpowszechnienie genów kodujących proteiny wśród izolatów klinicznych *Staphylococcus aureus*. Korelacja z jednostkami chorobowymi. Analiza ekspresji proteinaz w warunkach zakażenia.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* – important targets triggering immune response in vivo. (2012). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 66:220-229)

Główne cele naukowe prac:

- analiza rozpowszechnienia genów kodujących proteiny w reprezentatywnej puli szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus*
- próba korelacji występowania poszczególnych genów z jednostkami chorobowymi z jakich pochodziły izolaty
- analiza ekspresji proteinaz gronkowcowych w zakażeniach ludzi
- analiza ekspresji proteinaz gronkowcowych w zwierzęcym modelu infekcji.

Jak przedstawiono we wstępie, pomimo wieloletnich badań bezpośredni udział poszczególnych proteinaz gronkowcowych w wirulencji jest słabo poznany. W czasie realizacji prac opisanych w publikacji w literaturze nie została opisana próba korelacji obecności poszczególnych genów (a więc potencjalnej zdolności do produkcji konkretnej proteiny) z typem zakażenia gronkowcowego. Dlatego wraz z zespołem podjąłem badania obejmujące analizę rozpowszechnienia genów kodujących poszczególne proteiny gronkowcowe w obrębie izolatów klinicznych dobrze scharakteryzowanych pod względem jednostek chorobowych celem wykazania potencjalnej korelacji. W tym celu wyselekcjonowano zróżnicowaną genetycznie (na podstawie analiz PFGE oraz typowania spa) pulę 167 izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów cierpiących na mukowiscydozę, zapalenie płuc, infekcję ran pooperacyjnych, infekcje skóry, infekcję układu moczowego, infekcję kości, infekcję oczu, zapalenie ucha, infekcję górnych dróg oddechowych, sepsę oraz inne zakażenia wewnątrz szpitalne a także szczepów komensalnych. Dla wszystkich szczepów określono metodą PCR występowanie genów kodujących poszczególne proteiny gronkowcowe, tj. metaloproteinę (auriolizyna), proteiny serynowe (V8, SplA, SplB, SplC, SplD, SplE i SplF) oraz proteiny cysteinowe (stafopaina A i stafopaina B). Analiza ta wykazała iż geny kodujące proteinę V8, aureolizynę oraz obie proteiny cysteinowe występują praktycznie we wszystkich analizowanych genomach co sugeruje rolę tych genów jako tzw. czynników housekeeping (ang). W przeciwieństwie do powyższych, geny kodujące poszczególne proteiny operonu *spi* wykazały zróżnicowane rozpowszechnienie w puli analizowanych szczepów. Gen *spiC* (najbardziej rozpowszechniony) występował w 77% analizowanych izolatów a gen *spiD* (najmniej rozpowszechniony) jedynie w 45%. Rozpowszechnienie pozostałych genów zawierało się w powyższych granicach. Największe rozpowszechnienie genów kodujących proteiny Spl (jako grupy genów) występowało wśród szczepów komensalnych oraz izolatów z zapalenia płuc. Występowanie genu *spiD* było wyraźnie niższe (19%) wśród izolatów pochodzących od pacjentów cierpiących na mukowiscydozę w porównaniu do średniej dla wszystkich szczepów. Dane te sugerują potencjalną rolę genów operonu *spi* w komensalnej kolonizacji człowieka oraz rozwoju zapalenia płuc, w tym drugim jednak przypadku mogą sugerować również iż badane przypadki zapalenia płuc pochodzą od szczepów komensalnych. Ponadto uzyskane dane sugerują negatywny wpływ obecności

genu kodującego proteainazę SplD na powstawanie zakażenia u pacjentów z mukowiscydozą. Wszystkie powyższe konkluzje wymagają jednak dalszej weryfikacji, wskazując jedynie potencjalne kierunki badań.

Obecność genu kodującego dane białko nie pozwala wnioskować o jego ekspresji podczas zakażenia. W okresie prowadzenia prac nie były dostępne bezpośrednio metody wykrywania obecności badanych proteainaz w zakażonych tkankach (np. przeciwciała lub specyficzne substraty). Dlatego, celem analizy ekspresji badanych enzymów podczas zakażenia zastosowano metodę pośrednią polegającą na wykrywaniu metodą ELISA przeciwciał wytworzonych przez gospodarza i skierowanych przeciw analizowanym enzymom. Przeanalizowano 26 próbek surowicy pochodzących od pacjentów cierpiących na głębokie zakażenia gronkowcowe oraz 14 próbek od osób zdrowych. Statystycznie istotną różnicę w poziomie przeciwciał przeciw konkretnym proteainazom w tych dwóch grupach uzyskano dla proteainazy SplF, oraz stafopain A i B, co sugeruje zwiększoną ekspresję tych białek podczas zakażenia (w odróżnieniu od komensalnej kolonizacji). W przypadku pozostałych enzymów z uwagi na duży rozrzut rejestrowanego poziomu przeciwciał w badanych próbach, różnice pomiędzy grupami, nawet jeśli występowały, nie osiągnęły istotności statystycznej. Pomimo tego, już sam fakt występowania przeciwciał przeciw wszystkim analizowanym enzymom w surowicy zdrowych i chorych dawców wskazuje na wcześniejszy kontakt wszystkich badanych osób z proteainazami gronkowcowymi, zapewne podczas wcześniejszych infekcji lub produkowanymi przez szczepy komensalne. Próbną pośredniej odpowiedzi na pytanie czy przeciwciała występujące we krwi zdrowych dawców mogły powstać podczas wcześniejszego kontaktu w czasie infekcji były eksperymenty przeprowadzone na myszach. Używany w badaniach test ELISA nie pozwolił na wykrycie przeciwciał przeciw żadnemu z analizowanych enzymów w surowicach młodych zdrowych myszy. Zwierzęta te poddano następnie dożylniej inokulacji *S. aureus* 8325-4. W surowicach wszystkich analizowanych zwierząt, w 14 dni po infekcji, wykazano obecność przeciwciał przeciwko każdej z analizowanych proteainaz³, wskazując wprost iż enzymy te są produkowane podczas infekcji, przynajmniej w analizowanym modelu mysim.

Osiągnięte wyniki:

- wykazano iż geny kodujące proteainazę V8, stafopainy A i B oraz aureolizynę występują praktycznie we wszystkich szczepach Gronkowca złocistego, natomiast dystrybucja genów kodujących proteainazy Spl jest zróżnicowana
- nie wykazano silnej korelacji między obecnością poszczególnych genów kodujących proteainazy Spl a analizowanymi jednostkami chorobowymi, wskazano jednak potencjalne słabsze związki których istotność wymaga dalszej analizy
- pośrednio wykazano iż przynajmniej proteainaza SplF, oraz stafopainy A i B są produkowane podczas infekcji gronkowcowej u człowieka

³ Rozwinięciem opisanych badań było wykazanie przez habilitanta iż indukowane infekcją gronkowcową przeciwciała są zdolne do zahamowania aktywności wybranych proteainaz, a więc bezpośredniej inaktywacji wybranych czynników wirulencji gronkowca bezpośrednio w miejscu interakcji. Badania te opisano w FEMS Immunol. Med. Mic. (2008). 52: 267-272. Publikacja ta nie jest przedstawiona jako część osiągnięcia naukowego habilitanta ponieważ wspomniane wyniki stanowią jedynie niewielki fragment publikacji. Wyniki te przedstawiono jedynie w przypisie z uwagi na ich uzupełniający charakter w stosunku do prac opisanych w niniejszym paragrafie.

- wykazano iż wszystkie badane proteiny są produkowane podczas infekcji w modelu zwierzęcym.

Analiza specyficzności substratowej gronkowcowych enzymów proteolitycznych

(Zwięzły opis analizy specyficzności substratowej proteinaz gronkowcowych przedstawionej w publikacjach: Biochemical and Structural Characterization of SplD Protease from *Staphylococcus aureus*. PLoS One (2013). 8: e76812

Substrate specificity of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases – Staphopains A, B and C. Biochimie (2012). 94:318-327.

Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. (2009). 419: 555-564.

Enzymatic activity of the *Staphylococcus aureus* SplB serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln. J. Mol. Biol. (2008). 379: 343-356).

Główny cel naukowy prac:

- analiza specyficzności substratowej gronkowcowych proteinaz SplA, SplB, SplD oraz stafopain A, B i C

Funkcja enzymów proteolitycznych jest m.in. bezpośrednią pochodną ich specyficzności substratowej a więc zestawu rozpoznawanych i hydrolizowanych wiązań peptydowych w obrębie cząsteczek docelowych. Znane są enzymy o szerokiej specyficzności, hydrolizujące wiązania peptydowe praktycznie niezależnie od rodzaju reszt aminokwasowych w okolicy hydrolizowanego wiązania. Enzymy te są najczęściej odpowiedzialne za niespecyficzną degradację białek w celu pozyskiwania czynników odżywczych lub degradację tkanek w celu łatwiejszego rozprzestrzeniania się infekcji. Przykładem enzymu o szerokiej specyficzności może być proteinaza K powszechnie stosowana do niespecyficznego hydrolizowania białek podczas oczyszczania kwasów nukleinowych [18]. Zupełnie odmienne właściwości wykazują wysoce specyficzne enzymy proteolityczne zdolne do hydrolizy jedynie niewielkiej ilości wiązań peptydowych specyficznie określonych przez sekwencję sąsiadujących aminokwasów i/lub strukturę trzeciorzędową substratu. Przykładem jest np. gronkowcowa toksyna epidermolityczna dla której do chwili obecnej zidentyfikowano jedynie pojedynczy substrat białkowy [19]. Z powyższych powodów, wnioskowanie o potencjalnej roli fizjologicznej proteinaz jest znacznie ułatwione poprzez precyzyjne określenie ich specyficzności substratowej. Znane są różnorodne techniki eksperymentalne pozwalające na określenie specyficzności substratowej proteinaz, jednak wszystkie one sprowadzają się do prezentacji możliwie dużej liczby potencjalnych substratów i analizy miejsc hydrolizowanych przez badany enzym. W obrębie prac przedstawionych jako osiągnięcie habilitanta stosowano dwa warianty opisanych metod (i) biblioteki peptydowe prezentowane na komórkach (ang. Cellular Libraries of Peptide Substrates; CLIPS) oraz (ii) biblioteki syntetycznych substratów peptydowych. Pierwsza metoda bazuje na prezentacji kombinatorycznej biblioteki peptydowej w obrębie jednej z pętli białka błonowego *E. coli*. W metodzie tej klon zawierający hydrolizowaną sekwencję oddziela się od klonów niehydrolizowanych przy wykorzystaniu sortera komórkowego (ang. Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). Druga metoda polega na przygotowaniu dużej kombinatorycznej biblioteki fluorescencyjnych lub chromogennych substratów peptydowych i jej analizie na podstawie skanowania

pozycyjnego w różnych wariantach⁴. Wymienionymi metodami dokonano analizy specyficzności substratowej następujących proteinaz gronkowcowych: stafopain A, B i C oraz proteinaz Spl A, B i D.

Enzymy proteolityczne dzielimy na kilka klas katalitycznych odzwierciedlających różnice w mechanizmie katalizy na poziomie molekularnym [20]. Pośrednio, różnice te dotyczą także mechanizmu rozpoznania substratu. Dlatego celowym jest dalsze osobne omówienie wyników uzyskanych dla proteinaz cysteinowych (stafopain A, B oraz C) i proteinaz serynowych (SplA, B i D).

Specyficzność substratowa stafopain

Specyficzność substratową stafopain analizowano przy wykorzystaniu metody CLIPS oraz równolegle przy wykorzystaniu bibliotek peptydowych substratów syntetycznych a także metod pochodnych obejmujących analizę bibliotek inhibitorów.

Sekwencje konsensusowe określone metodą CLIPS rozpoznawane i hydrolizowane przez stafopainę A, B i C przedstawiono w Tabeli I. Analiza danych surowych wskazuje jednak na niższą specyficzność substratową wszystkich analizowanych enzymów niż wynikałoby to jedynie z analizy danych przedstawionych w tabeli, a wskazane sekwencje odpowiadają jedynie kinetycznie preferowanym substratom tych enzymów.

Tabela I. Sekwencje konsensusowe rozpoznawane i hydrolizowane przez proteiny cysteinowe Gronkowca złocistego (stafopainy) określone metodą CLIPS. Nomenklatura reszt rozpoznawanych w obrębie substratu wg. Schechter i Berger (1967).

Enzym	P4	P3	P2	P1	P1'
Stafopaina A	-	L/V	L	G	S
Stafopaina B	I/L	-	F/Y	G	A
Stafopaina C	-	L/V/I	F/Y	G	S/A

Konkluzję taką w pełni potwierdzają badania przy wykorzystaniu skanowania pozycyjnego bibliotek peptydowych oraz pochodnych metod opartych na kombinatorycznych bibliotekach peptydopodobnych inhibitorów. Obie te metody wskazują ponownie iż wszystkie stafopainy charakteryzuje stosunkowo niska preferencja substratowa.

Wykazanie niskiej specyficzności substratowej stafopain jest istotne z punktu widzenia dalszej analizy roli tych enzymów w fizjologii Gronkowca złocistego. Drugim ważnym osiągnięciem przeprowadzonych badań było wykazanie iż w przypadku enzymów o niskiej specyficzności (takich jak np. stafopainy) ostatecznie określona sekwencja konsensusowa jest zależna bardziej od stosowanej metody niż od testowanego enzymu. Wykazanie tego faktu jest jedną z pierwszych dostępnych w literaturze dobrze udokumentowanych obserwacji wskazujących iż w takich przypadkach wnioskowanie należy koniecznie opierać na większej ilości zróżnicowanych eksperymentów. Podejście takie jest niestety wciąż rzadko stosowane w literaturze przedmiotu. W większości przypadków znanych z literatury, specyficzność analizowana jest tylko jedną wybraną metodą i przyjmuje się – jak wykazano niesłusznie – iż stanowi to wynik absolutny, niezależny od przyjętej metody.

⁴Szczegóły techniczne selekcji bibliotek opisano dokładnie w cytowanych pracach habilitanta.

Specyficzność substratowa proteinaz operonu spl

W odróżnieniu od stafopain, proteiny operonu *spl* charakteryzują się wysoką specyficznością substratową jak wykazano w pracach przedstawionych jako osiągnięcie habilitanta. Co istotne, każda z analizowanych dotychczas proteinaz w obrębie operonu wykazuje odmienną od pozostałych specyficzność. Zróznicowana specyficzność wydaje się dobrze tłumaczyć powód dla którego bakteria produkuje jednocześnie do sześciu homologicznych enzymów proteolitycznych. Wyniki analizy specyficzności substratowej proteinaz SplA, SplB i SplD uzyskane metodą CLIPS przedstawiono w Tabeli II w postaci sekwencji konsensusowych rozpoznawanych i hydrolizowanych przez te proteiny. Analiza surowych danych oraz przeprowadzone równoległe badania specyficzności przy wykorzystaniu bibliotek peptydowych substratów syntetycznych prowadzą do podobnych konkluzji, tj. potwierdzają wysoką specyficzność substratową tych enzymów⁵.

Tabela II. Sekwencje konsensusowe rozpoznawane i hydrolizowane przez wybrane proteiny serynowe Gronkowca złocistego (proteiny operonu *spl*) określone metodą CLIPS.

Enzym	P4	P3	P2	P1	P1'
SplA	-	W/Y	L	Y	T/S
SplB	W	E	L	Q	S
SplD	R	Y/W	P/L	T/I/L/V	S

Potencjalne substraty fizjologiczne proteinaz Spl

Funkcja fizjologiczna proteinaz operonu *spl* pozostaje nieznana. Analiza mutantów z wyłączoną ekspresją tego operonu w modelu zwierzęcym nie wykazała różnic w wirulencji w porównaniu ze szczepem dzikim [21]. W genomie gronkowca operon *spl* znajduje się jednak na tzw. wyspie patogenności grupującej szereg innych czynników wirulencji. Ponadto regulacja ekspresji operonu *spl* jest charakterystyczna dla czynników wirulencji. Te dwa fakty pośrednio wskazują na potencjalną rolę proteinaz Spl w patogenezie gronkowca. Z uwagi na wysoką specyficzność substratową pełnią one zapewne rolę w precyzyjnej hydrolizie kilku pojedynczych białek. Białka te mogą być nieznacznie inne u zwierząt laboratoryjnych i u człowieka co może tłumaczyć brak fenotypu mutantów w modelach zwierzęcych. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku niezwykle specyficznych enzymów proteolitycznych - gronkowcowych toksyn epidermolitycznych, które powodują objawy podobne do obserwowanych u ludzi jedynie w wybranych gatunkach zwierząt laboratoryjnych. Efekt taki jest związany z różnicami gatunkowymi w budowie białek rozpoznawanych przez te enzymy [19]. Warto podkreślić iż proteiny Spl charakteryzują się stosunkowo wysoką homologią sekwencji i struktury trzeciorzędowej do toksyn epidermolitycznych.

Znając specyficzność substratową wybranych proteinaz operonu *spl* podjęto analizę bioinformatyczną zmierzającą do identyfikacji potencjalnych celów molekularnych tych

⁵ Ponadto, niepublikowane dotychczas dane uzyskane przez habilitanta wskazują, że pozostałe proteiny operonu *spl* także charakteryzują się wysoką specyficznością substratową, komplementarną do specyficzności podanych w Tabeli II. Wyniki te nie są przedstawione jako część osiągnięcia habilitanta z uwagi na ich niepełny charakter.

enzymów w genomie człowieka. Najciekawszym wnioskiem tej analizy była identyfikacja receptorów węchowych jako potencjalnych białek docelowych wszystkich analizowanych enzymów. Wyniki te nie mają potwierdzenia eksperymentalnego, jednak wydają się interesujące z uwagi na niszę bytowania *Gronkowca złocistego* w organizmie człowieka. Wskazują tym samym jeden z wartych eksploracji kierunków przyszłych poszukiwań fizjologicznej roli proteinaz Spl.

Opracowanie specyficznych substratów peptydowych

Precyzyjne określenie specyficzności substratowej stafopain i proteinaz operonu *spl* pozwoliło na opracowanie specyficznych i czułych fluorescencyjnych substratów peptydowych. Substraty będą mogły zostać wykorzystane w przyszłości w pracach innych badaczy do monitorowania aktywności poszczególnych enzymów np. w modelowych zakażeniach. Listę opracowanych substratów oraz ich podstawowe parametry przedstawiono w Tabeli III.

Tabela III. Fluorogenne substraty syntetyczne

Enzym	Substrat	k_{cat}/K_M
Stafopain A	ABZ-Phe-Gly-Ala-Lys-ANB-NH ₂	127 800
Stafopain B	ABZ-Ile-Ala-Ala-Gly-ANB-NH ₂	118 000
Stafopain C	ABz-Ile-Ala-Lys-Asp-ANB-NH ₂	62 400
SplD	ABZ-Ala-Tyr-Phe-Ile-ANB-NH ₂	1 169 200

Osiągnięte wyniki i potencjał ich wykorzystania:

- wykazano iż stafopainy A, B i C charakteryzują się stosunkowo niską specyficznością substratową
- wykazano wysoką specyficzność substratową proteinaz SplA, B i D
- zidentyfikowano potencjalne cele molekularne proteinaz Spl otwierając drogę do dalszych badań nad poznaniem ich roli fizjologicznej
- opracowano substraty syntetyczne pozwalające na wykrywanie aktywności stafopain oraz proteinazy SplD dostarczając dogodnej metody oznaczania obecności tych enzymów w analizowanych próbkach.

Analiza strukturalna determinant specyficzności substratowej

(Zwięzły opis analizy strukturalnej proteinaz gronkowcowych przedstawionej w publikacjach:

Biochemical and Structural Characterization of SplD Protease from *Staphylococcus aureus*. PLoS One (2013). 8: e76812

Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. (2009). 419: 555-564

Enzymatic activity of the *Staphylococcus aureus* SplB serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln. J. Mol. Biol. (2008). 379: 343-356)

Główny cel naukowy prac:

- określenie struktur krystalograficznych proteinaz SplA, SplB i SplD

- analiza sposobu rozpoznawania substratu i opis determinant specyficzności substratowej.

Wysoka specyficzność substratowa charakteryzująca proteainazy Spl jest cechą stosunkowo nietypową dla rodziny S1 (merops.sanger.ac.uk) proteinaz chymotrypsynopodobnych do której należą analizowane enzymy. Większość enzymów rodziny S1 charakteryzuje się specyficznością ograniczoną do miejsca P1⁶ [22], a specyficzność w dalszych miejscach jest stosunkowo rzadka. Analogicznie, o ile strukturalne determinanty specyficzności substratowej w miejscu P1 są dobrze poznane to informacja na temat pozostałych miejsc jest mniej precyzyjna. Dlatego habilitant podjął badania strukturalne zmierzające do określenia determinant specyficzności substratowej wybranych proteinaz operonu *spl*. Opracowano wydajne systemy ekspresji rekombinowanych proteinaz SplA, B oraz D. Białka oczyszczono do stanu homogennego i uzyskano w postaci krystalicznej. Analiza rentgenograficzna pozwoliła na rozwiązanie struktur przestrzennych wszystkich trzech białek. Analiza porównawcza z innymi proteinazami rodziny S1 oraz modelowanie molekularne prawdopodobnego sposobu rozpoznawania substratu pozwoliło na określenie molekularnych determinant specyficzności substratowej analizowanych proteinaz⁷.

Osiągnięte wyniki i potencjał ich wykorzystania:

- określono struktury krystalograficzne proteinaz SplA, SplB i SplD
- scharakteryzowano determinanty strukturalne specyficzności substratowej
- uzyskane dane mogą być wykorzystane do ukierunkowanej modyfikacji specyficzności substratowej proteinaz Spl.

Analiza nietypowego mechanizmu aktywacji proteainazy SplB

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji:

Staphylococcal SplB Serine Protease Utilizes a Novel Molecular Mechanism of Activation. J. Biol. Chem. (2014). 289:15544-15553)

Główny cel naukowy prac:

- charakterystyka mechanizmu aktywacji proteainazy SplB na poziomie strukturalnym.

Molekularny mechanizm aktywacji proteinaz serynowych z rodziny S1 (proteainaz chymotrypsynopodobnych) został szczegółowo opisany w latach 70-tych XX wieku na podstawie analizy enzymów trawiennych, trypsyny i chymotrypsyny [23, 24]. Oba te enzymy produkowane są w postaci nieaktywnych zymogenów zawierających propeptyd (dodatkowe aminokwasy na N-końcu w porównaniu z formą dojrzałą). Produkcja w postaci zymogenu chroni trzustkę przed niekontrolowaną proteolizą. W jelitach dochodzi do aktywacji

⁶ Nomenklatura wg. Schechter i Berger (1967). Miejsce P1 oznacza resztę aminokwasową bezpośrednio w sąsiedztwie hydrolizowanego wiązania peptydowego w kierunku aminowego końca wyjściowego polipeptydu.

⁷ Powyższe prace są obecnie kontynuowane przez habilitanta, a ich ostatecznym celem jest ukierunkowana modyfikacja specyficzności substratowej proteinaz Spl. Wysoka specyficzność substratowa tych enzymów w połączeniu z możliwością jej ukierunkowanej modyfikacji powinna pozwolić na stworzenie nowych, interesujących narzędzi inżynierii białka oraz być może także enzymów przydatnych do zastosowania terapeutycznego. Wspomniane prace nie są przedstawiane jako część osiągnięcia naukowego, niemniej stanowią jego bezpośrednią kontynuację.

zymogenów poprzez ograniczoną hydrolizę w obrębie propeptydu. Nowy N-koniec enzymu wchodzi w interakcję z resztami aminokwasowymi w obrębie miejsca aktywnego enzymu co wywołuje zmiany strukturalne w obrębie tego miejsca wyzwalając aktywność proteolityczną. Analogiczny mechanizm opisano później dla szeregu innych proteinaz serynowych z rodziny S1 i obecnie wiedza ta stanowi podręcznikowy przykład aktywacji enzymu przez ograniczoną proteolizę zymogenu. Wstępna charakterystyka proteiny SplB sugerowała analogiczny mechanizm aktywacji. Rekombinowane białko zawierające na N-końcu dodatkowe aminokwasy – artefakt klonowania – wykazywało bardzo niską aktywność właściwą podczas gdy usunięcie tych aminokwasów, m.in. przez trawienie aminopeptydazą, powodowało wzrost aktywności właściwej do poziomu wykazywanego przez typ dziki. Jednakże struktura krystalograficzna proteiny SplB określona w celu analizy mechanizmu determinującego specyficzność substratową enzymu (jak opisano wyżej) ukazała iż w aktywnej proteolitycznie formie dojrzałej N-koniec enzymu usytuowany jest zupełnie inaczej niż w znanych dotychczas proteinach rodziny S1 sugerując odmienny mechanizm aktywacji. By rozszyfrować jego szczegóły strukturalne na poziomie atomowym opracowano strukturę krystalograficzną formy enzymu o niskiej aktywności (posiadającej dodatkowe aminokwasy na N-końcu). Porównanie struktur formy aktywnej i nieaktywnej wykazało zmiany jedynie w obrębie trzech początkowych aminokwasów odległych od miejsca aktywnego podczas gdy w przypadku aktywacji chymotrypsynogenu różnice występują w obrębie całego miejsca aktywnego. By uzyskać dodatkowe informacje na temat mechanizmu aktywacji analizowano reszty N-końcowe oraz reszty sąsiadujące w szeregu muteinach. Ostatecznie przyjęto hipotezę w której zmiany strukturalne w miejscu odległym od miejsca aktywnego wpływają na dynamikę całości białka co przekłada się na obserwowane zmiany aktywności. Podsumowując, wykazano iż pomimo że SplB należy do rodziny S1 proteinaz serynowych, a mechanizm aktywacji tego enzymu obejmuje procesowanie N-końca analogicznie jak dla innych proteinaz tej rodziny, strukturalne szczegóły tego mechanizmu są całkowicie odmiennie od tych opisanych wcześniej dla chymotrypsyny – najbardziej znanego przedstawiciela rodziny S1 oraz szeregu innych proteinaz należących do tej rodziny. Tym samym prace prowadzone przez habilitanta pozwoliły na identyfikację i szczegółowy opis całkowicie nowego mechanizmu aktywacji proteinaz serynowych.

Osiągnięte wyniki:

- określono szczegóły mechanizmu aktywacji proteiny SplB na poziomie strukturalnym
- opisano całkowicie nowy mechanizm aktywacji proteiny serynowej rodziny S1.

Opracowanie inhibitorów proteiny SplA

Główny cel naukowy prac:

- opracowanie syntetycznych inhibitorów proteiny SplA
- zobrazowanie mechanizmu wiązania inhibitorów przy wykorzystaniu analizy strukturalnej.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji:

Development and binding characteristics of phosphonate inhibitors of SplA protease from *Staphylococcus aureus*. Prot. Sci. (2014).23:179-189)

Inhibitory enzymów stanowią pożądane narzędzia badawcze, szczególnie w badaniach funkcji fizjologicznych. Na dzień rozpoczęcia prac nie były znane żadne inhibitory proteinaz operonu *spl*. We współpracy z grupą prof. J. Oleksyszyna z Politechniki Wrocławskiej podjęto prace zmierzające do opracowania inhibitorów proteiny *SplA*. Grupa prof. J. Oleksyszyna zapewniła doświadczenie w syntezie chemicznej inhibitorów a grupa habilitanta opracowywała i analizowała struktury krystalograficzne kompleksów proteinaza-inhibitor celem zapewnienia informacji zwrotnej do optymalizacji inhibitorów. W ramach prac przygotowano i przetestowano 46 związków poczynając od prostych pochodnych aminokwasów a kończąc na pochodnych peptydów zoptymalizowanych względem sekwencji rozpoznawanej przez proteinazę *SplA*. Najlepsze inhibitory charakteryzowały się stałymi inhibicji w zakresie kilku mikromoli. Opracowano struktury proteiny *SplA* w kompleksie z prostą pochodną aminokwasu oraz inhibitorem na bazie peptydu konsensusowego wykazując – co interesujące – iż w przypadku rozbudowanych inhibitorów na bazie peptydów konsensusowych jedynie reszta w pozycji P1 wchodzi w widoczne oddziaływania z białkiem docelowym. Tym samym wykazano iż inhibitory fosfonianowe oddziałują z proteinazą *SplA* w sposób częściowo odmienny od przypuszczalnego sposobu oddziaływania substratu (pomimo ogólnie przyjętej prawidłowości iż oddziaływanie takich inhibitorów w większości przypadków jest analogiczne do oddziaływania enzymu z substratem).

Osiągnięte wyniki i potencjał ich wykorzystania:

- opracowano małowcząsteczkowe inhibitory proteiny *SplA* które mogą znaleźć zastosowanie w badaniach funkcji fizjologicznej enzymu
- określono mechanizm oddziaływania inhibitorów z enzymem docelowym.

Wykorzystanie praktyczne wyników prac nad charakterystyką proteiny *SplB*

Główny cel na prac:

- Wdrożenie nowej metody usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych.

Jak wspomniano powyżej, analiza specyficzności substratowej proteiny *SplB* wykazała iż enzym ten charakteryzuje się ścisłą preferencją substratową. Wysoka specyficzność substratowa jest stosunkowo rzadko spotykaną charakterystyką proteinaz, a enzymy posiadające taką cechę są powszechnie wykorzystywane do usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych. Z uwagi na fakt iż nie są do tej pory znane enzymy charakteryzujące się absolutną preferencją substratową (katalizujące reakcje hydrolizy jedynie w obrębie jednej, ściśle określonej sekwencji aminokwasowej) często konieczny jest eksperymentalny dobór enzymu katalizującego hydrolizę interesującego białka fuzyjnego jedynie w pożądanym miejscu i nie powodującego jego niespecyficznej degradacji. Wiedza ta skłoniła habilitanta do analizy potencjału zastosowania proteiny *SplB* jako alternatywnego narzędzia do usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych. W ramach kierowanego przez habilitanta projektu „Inicjatywa Technologiczna” przeprowadzono szereg testów które wykazały iż proteinaza *SplB* stanowi odpowiednie narzędzie do usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych i w szeregu przypadków charakteryzuje się lepszą specyficznością niż powszechnie wykorzystywane w tym celu enzymy takie jak trombina, czynnik Xa, proteinaza TEV czy proteinaza PreScission. Uzyskano ochronę patentową na zastosowanie proteiny *SplB* do usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych i wraz z Centrum Innowacji i Transferu Technologii UJ i firmą BioCentrum sp. z o.o. podjęto działania

zmierzające do komercjalizacji opracowanego wynalazku. Prace te okazały się owocne i w chwili obecnej produkt opracowany na podstawie wyników przedstawionych badań i zgłoszeń patentowych habilitanta jest dostępny handlowo m.in. przez następujących dystrybutorów: Sigma-Aldrich (pod nazwą CleanCut) oraz ThermoScientific (pod nazwą WELQut).

Osiągnięte wyniki i potencjał ich wykorzystania:

- Wdrożono nową metodę usuwania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych opartą na zastosowaniu proteiny SplB
- Proteinaza SplB jest obecnie oferowana przez światowych dystrybutorów odczynników chemicznych jako odczynnik do zastosowania przy usuwaniu metek fuzyjnych.

Podsumowanie

Prace badawcze przedstawione jako osiągnięcie habilitanta pozwoliły na przybliżenie podstawowych właściwości gronkowcowego systemu proteolitycznego. Scharakteryzowano pod względem statystycznym występowanie genów kodujących poszczególne proteiny w populacji gronkowca, wykazano zasługujące na dalszą analizę trendy w występowaniu wybranych proteinaz w kilku jednostkach chorobowych oraz wykazano produkcję wybranych enzymów w zakażeniach ludzkich i wszystkich enzymów w eksperymentalnym modelu zwierzęcym. Scharakteryzowano specyficzność substratów wybranych proteinaz gronkowcowych co pozwoliło zawęzić ich potencjalną rolę w patogenezie oraz opracować specyficzne substraty mogące służyć jako dogodne narzędzia do wykrywania ich aktywności. Opisano molekularne podstawy determinujące specyficzność wybranych enzymów oraz scharakteryzowano nietypowy mechanizm aktywacji i determinacji specyficzności w przypadku proteiny SplB. Opracowano inhibitory proteiny SplA które mogą w przyszłości posłużyć jako dogodne narzędzia do analizy fizjologicznej roli tego enzymu. Wyniki opisywanych prac znalazły także zastosowanie praktyczne w postaci alternatywnego enzymu do odcinania metek fuzyjnych z białek rekombinowanych. Prace te opisano w siedmiu publikacjach naukowych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Przedstawione w ramach osiągnięcia prace stanowią wstęp do próby określenia fizjologicznej roli proteinaz gronkowcowych w patogenezie tej bakterii⁸. W celu kontynuacji tego nurtu prac w ubiegłym roku podjęto współpracę z naukowcami z Queen Elizabeth Hospital w Australii badającymi rolę gronkowców w patofizjologii różnorodnych dysfunkcji błon śluzowych układu oddechowego. Ze swojej strony dostarczamy partnerowi oczyszczone gronkowcowe enzymy proteolityczne, dogodne substraty do detekcji ich aktywności oraz niskocząsteczkowe inhibitory co jest możliwe dzięki wcześniejszym pracom przedstawionym jako osiągnięcie habilitanta. Partner zagraniczny prowadzi badania w modelach komórkowych i tkankowych *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych. Mam nadzieję iż synergia i wykorzystanie wiedzy obu partnerów w zakresie komplementarnej metodologii badawczej

⁸ Odpowiedz na to pytanie nie jest bynajmniej trywialna o czym świadczy liczba prac naukowych powstałych w ostatnich dekadach dokumentujących sprzeczne wyniki na temat roli proteinaz gronkowcowych w patogenezie.

doprowadzi z czasem do wyjaśnienia przynajmniej wybranych zagadnień związanych z rolą gronkowcowego systemu proteolitycznego w patogenezie tej bakterii.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (~~artystycznych~~).

Utworzenie Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej

Tematyką badań strukturalnych realizowanych przy wykorzystaniu metodologii krystalografii rentgenowskiej, zainteresowałem się podczas realizacji pracy doktorskiej. Wybrane eksperymenty stanowiące część rozprawy realizowałem w ramach staży naukowych w grupie prof. Tadeusza Holaka będącej częścią laboratorium prof. Roberta Hubera w Instytucie Maksa-Plancka w Monachium. Opracowując strukturę niewielkiego białka bakteryjnego zapoznałem się tam z metodologią NMR jednak moje największe zainteresowanie wzbudziły możliwości współczesnej krystalografii. Po powrocie do kraju zacząłem organizować w jednostce macierzystej zaplecze laboratoryjne umożliwiające kontynuację badań krystalograficznych. Prace te umożliwiły mi utworzenie w pełni funkcjonalnego laboratorium krystalograficznego, najpierw w strukturze Zakładu Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, a obecnie w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Prowadzone przeze mnie obecnie Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej obejmuje zespół kilkunastu naukowców realizujących zróżnicowane tematycznie projekty badawcze. Główne kierunki prac poza tematyką zawartą w osiągnięciu habilitanta obejmują charakterystykę mechanistyczno-strukturalną proteinaz o nieznanym mechanizmie katalizy, analizę funkcjonalną i strukturalną proteinaz z rodziny kalikrein, niekanonicznych subkieszeni w obrębie miejsca wiążącego substrat w kinazach istotnych w procesie nowotworowym oraz białek adaptorowych uczestniczących w przekazywaniu sygnału w komórkach eukariotycznych. Jednocześnie staram się zapewnić zaplecze krystalograficzne możliwie dużej grupie naukowców z innych ośrodków zainteresowanych rozwinięciem interesujących ich zagadnień badawczych o tematykę strukturalną. W tym zakresie w ramach dodatkowej działalności Laboratorium realizujemy szereg mniej rozbudowanych projektów o bardzo zróżnicowanej tematyce dostosowanej do potrzeb zewnętrznych partnerów naukowych. Ponadto staramy się w miarę możliwości nie ograniczać prowadzonych prac jedynie do badań strukturalnych, prowadząc równolegle charakterystykę funkcjonalną analizowanych układów.

Równolegle do działalności w zakresie badań podstawowych prowadzimy współpracę z przemysłem farmaceutycznym w zakresie wspomagania projektowania nowych leków metodami krystalografii rentgenowskiej. Prace te obejmują charakterystykę celów molekularnych oraz ich kompleksów z małowcząsteczkowymi inhibitorami na różnym etapie rozwoju.

Poniżej przedstawiono skrótowo opublikowane osiągnięcia badawcze powstałe w ramach realizowanych obecnie oraz zakończonych projektów w podziale na ważniejsze grupy tematyczne.

Inhibitory oddziaływania białek Mdm2 / MdmX z białkiem p53.

Jednym z istotnych zagadnień badawczych rozwijanych przez zespół habilitanta we współpracy z zespołem prof. Tadeusza Holaka z Max-Planck Institute for Biochemistry (obecnie także Wydział Chemii UJ) są prace nad opracowaniem inhibitorów oddziaływania białek Mdm2/Mdmx-p53. Inhibitory takie mogłyby w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii chorób nowotworowych – oczywiście po spełnieniu całego szeregu warunków. W ramach tych prac habilitant opublikował następujący cykl prac naukowych:

1. Zak, K., Pecak, A., Rys, B., Wladyka, B., Domling, A., Weber, L., Holak, TA., **Dubin, G.** (2013). MDM2 and MdmX inhibitors for the treatment of cancer: a patent review (2011-present). *Expert Opinion On Therapeutic Patents* 23:425-448.
Krytyczny przegląd literatury patentowej w zakresie małocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania MDM2/MdmX-p53 ogłoszonej w latach 2011-2013.
2. Bista, M., Smithson, D., Pecak, A., Salinas, G., Pustelny, K., Min, J., Pirog, A., Finch, K., Zdzalik, M., Waddell, B., Wladyka, B., Kedracka-Krok, S., Dyer, M.A., **Dubin, G.**, Guy, R.K. (2012). On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53. *PLoS One*, 7:e37518.
Szczegółowy opis mechanizmu działania związku SJ-172550, jednego z pierwszych ujawnionych małocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania MDM4-p53.
3. Zdzalik, M., Pustelny, K., Kedracka-Krok, S., Huben, K., Pecak, A., Wladyka, B., Jankowski, S., Dubin, A., Potempa, J., **Dubin, G.** (2010). Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle* 9:4584-4591.
Systematyczny opis oddziaływań białek Mdm2 i Mdmx z białkami docelowymi – p53, p63 i p73.
4. Czarna, A., Popowicz, GM., Pecak, A., Wolf, S., **Dubin, G.**, Holak, TA. (2009). High affinity interaction of the p53 peptide-analogue with human Mdm2 and Mdmx. *Cell Cycle*. 8: 1176-1184.
Opracowanie testu wykrywającego inhibitory oddziaływania Mdm2/Mdmx z białkiem p53.

Analiza czynników wirulencji i innych białek istotnych w patogenezie Gronkowca złocistego

Charakterystyka czynników wirulencji Gronkowca złocistego i mechanizmów patogeny tej bakterii stanowi jeden z wiodących tematów realizowanych w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ gdzie habilitant przygotowywał pracę doktorską i jest zatrudniony od czasu uzyskania stopnia doktora. Efektem współpracy w tym zakresie z badaczami z Zakładu Mikrobiologii, Zakładu Biochemii Analitycznej oraz innymi ośrodkami w kraju i na świecie jest następujący zbiór publikacji:

1. Jusko, M., Potempa, J., Kantyka, T., Bielecka, E., Miller, HK., Kalinska, M., **Dubin, G.**, Garred, P., Shaw, LN., Blom, AM. (2014). Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *Journal of Innate Immunity*, 6:31-46.
Analiza oddziaływania gronkowcowych enzymów proteolitycznych na ludzki układ dopełniacza.

2. Pustelny, K., Stach, N., Władyka, B., Dubin, A., **Dubin, G.** (2014). Evaluation of P1' substrate specificity of staphylococcal SplB protease. *Acta Biochim. Pol.* 61:149-52.
Analiza specyficzności substratowej proteiny SplB w miejscu P1'.
3. Władyka, B., Wielebska, K., Włoka, M., Bochenska, O., **Dubin, G.**, Dubin, A., Mak, P. (2012). Isolation, biochemical characterization, and cloning of a bacteriocin from the poultry-associated *Staphylococcus aureus* strain CH-91. (2013). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7229-7239.
Charakterystyka właściwości bakteriocyny produkowanej przez kurzy szczep Gronkowca złocistego.
4. Bukowski, M., Lyzen, R., Helbin, W.M., Bonar, E., Szalewska-Palasz, A., Wegrzyn, G., **Dubin, G.**, Dubin, A., Władyka, B. (2013). A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin-antitoxin system pemIK_{sa}. *Nature Communications*, 4:2012. doi:10.1038/ncomms3012
Szczegółowy opis systemu toksyna-antytoksyna kodowanego na plazmidzie CH-91 Gronkowca złocistego.
5. Polakowska, K., Lis, M., Helbin, W.M., **Dubin, G.**, Dubin, A., Niedziolka, J., Miedzobrodzki, J., Władyka, B. (2012). The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. *Microbes Infect.* 14: 1352-1362.
Analiza korelacji wirulencji gronkowców w dwóch modelach zwierzęcych z genotypem szczepów.
6. Burchacka, E. Walczak, M., Sienczyk, M., **Dubin, G.**, Zdzalik, M., Potempa, J., Oleksyszyn, J. (2012). The development of first *Staphylococcus aureus* SplB protease inhibitors: Phosphonic analogues of glutamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 5574-5578.
Opracowanie małych cząsteczkowych inhibitorów proteiny serynowej SplB.
7. Władyka, B., Kozik, A.J., Bukowski, M., Rojowska, A., Kantyka, T., **Dubin, G.**, Dubin, A. (2011) Alpha-1-Antichymotrypsin inactivates staphylococcal cysteine protease in cross-class inhibition. *Biochimie*, 93: 948-953.
W pracy opisano inaktywację gronkowcowej proteiny cysteinowej przez alpha-1-antychymotrypsynę.
8. Władyka, B., **Dubin, G.**, Dubin, A. (2011). Activation mechanism of thiol protease precursor from broiler chicken specific *Staphylococcus aureus* strain CH-91. *Vet. Microbiol.* 147:195-199.
Opis aktywacji prekursora proteiny cysteinowej ze szczepu CH-91 Gronkowca złocistego.
9. Calander, A.M., **Dubin, G.**, Potempa, J., Tarkowski, A. (2008). *Staphylococcus aureus* infection triggers production of neutralizing, V8 protease-specific antibodies. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 52: 267-272
Analiza właściwości przeciwciał powstających w modelu mysim w odpowiedzi na infekcję gronkowcową.
10. Beaufort, N., Wojciechowski, P., Sommerhoff, C.P., Szmyd, G., **Dubin, G.**, Eick, S., Kellermann, J., Schmitt, M., Potempa, J., Magdolen, V. (2008). The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. *Biochem. J.* 410: 157-165.
Analiza oddziaływania metaloproteiny gronkowcowej na system fibrynolityczny człowieka.

11. Kulig, P., Zabel, BA., **Dubin, G.**, Allen, SJ., Ohyama, T., Potempa, J., Handel, TM., Butcher, EC., Cichy, J. (2007). *Staphylococcus aureus*-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *J. Immunol.* 178: 3713-3720.
Badania nad aktywacją ludzkiej chemeryny przez gronkowcową proteinazę cysteinową.
12. Popowicz, G., **Dubin, G.**, Stec-Niemczyk, J., Czarna, A., Dubin, A., Potempa, J., Holak T.A. (2006). Functional and Structural Characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 358: 270-279.
Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna gronkowcowej proteinazy SplC.
13. **Dubin, G.**, Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., Dubin, A. (2001). Molecular cloning and biochemical characterization of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* 382, 1575-1582.
Analiza właściwości proteinaz produkowanych przez S. epidermidis.

Analiza czynników wirulencji bakterii innych niż Gronkowiec złocisty

Poza badaniami nad czynnikami wirulencji Gronkowca złocistego w obszarze zainteresowań Zakładu Mikrobiologii WBBiB UJ znajduje się także charakterystyka czynników wirulencji innych bakterii. Habilitant uczestniczył w realizacji wybranych prac o tej tematyce czego owocem stały się następujące publikacje naukowe:




1. Karim, AY., Kulczycka, M., Kantyka, T., **Dubin, G.**, Jabaiah, A., Daugherty, PS., Thogersen, IB, Enghild, JJ., Nguyen, KA., Potempa, J. (2010). A Novel Matrix Metalloprotease-like Enzyme (Karilysin) of the Periodontal Pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol. Chem.* 391: 105-117.
Charakterystyka właściwości metaloproteinazy produkowanej przez Tannerella forsythia.
2. Kantyka, T., Latendorf, T., Wiedow, O., Bartels J., Glaser, R., **Dubin, G.**, Schroder, J-M., Potempa, J., Meyer-Hoffert, U. (2009). Elafin is specifically inactivated by RgpB from *Porphyromonas gingivalis* by distinct proteolytic cleavage. *Biol. Chem.* 390: 1313-1320.
Inaktywacja ludzkiego inhibitora elastazy (elafiny) przez proteinazę RgpB, czynnik wirulencji Porphyromonas gingivalis.

Gronkowcowe inhibitory proteinaz

Jednym z tematów zawartych w pracy doktorskiej habilitanta była charakterystyka strukturalna i funkcjonalna nowo odkrytych gronkowcowych inhibitorów proteinaz cysteinowych. Białka te stanowiły w tamtym czasie interesujący temat badawczy z uwagi na odmienną strukturę i specyficzność od znanych inhibitorów. Habilitant opublikował w tym temacie następujące doniesienia:


1. **Dubin, G.** ✉, Władyka, B., Stec-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. *Biol. Chem.* 388: 227-235.

Zbiorcza analiza oddziaływania proteinaz cysteinowych i ich dedykowanych inhibitorów z różnych gatunków gronkowca.

2. **Dubin, G.** , Stec-Niemczyk, J., Dylag, T., Silberring, J., Dubin, A., Potempa, J. (2004). Characterisation of a highly specific, endogenous inhibitor of cysteine protease from *Staphylococcus epidermidis*, a new member of the staphostatins family. *Biol. Chem.* 385:543-546.
Analiza właściwości inhibitora proteiny cysteinowej Staphylococcus epidermidis.
3. **Dubin, G.**, Popowicz, G., Krajewski, M., Potempa, J., Dubin, A., Holak, T.A., (2004). Letter to the editor: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR resonance assignments of staphostatins A, a specific *Staphylococcus aureus* cysteine protease inhibitor. *J. Biomol. NMR* 28:295-96.
Przypisanie częstotliwości rezonansowych w widmach NMR stafostatyny A Gronkowca złocistego – inhibitora proteiny cysteinowej tej bakterii. Praca stanowi wstęp do rozwiązania struktury przestrzennej białka metodą NMR.
4. **Dubin, G.** , (2003). Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* 50:715-724.
Praca opisująca stan wiedzy na temat gronkowcowych proteinaz cysteinowych i ich inhibitorów.
5. **Dubin, G.** , Krajewski, M., Popowicz, G., Stec-Niemczyk, J., Bochtler, M., Potempa, J., Dubin, A., Holak, T.A. (2003). A novel class of cysteine protease inhibitors: solution structure of staphostatins A from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.* 42:13449-13456.
Przedstawiono strukturę przestrzenną i właściwości biochemiczne stafostatyny A – inhibitora gronkowcowej proteiny cysteinowej. Strukturę określono metodą NMR w roztworze.

Inne prace krystalograficzne i powiązane z krystalografią

Prace zrealizowane we współpracy z innymi grupami badawczymi zainteresowanymi uzupełnieniem prowadzonej przez siebie tematyki badawczej o charakterystykę strukturalną analizowanych układów.

1. Horwacik, I., Golik, P., Grudnik, P., Kolinski, M., Zdzalik, M., Rokita, H., **Dubin, G.**  (2015). Structural Basis of GD2 Ganglioside and Mimetic Peptide Recognition by 14G2a Antibody. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14: 2577-2590.
Analiza strukturalna oddziaływania terapeutycznego przeciwciała 14G2a z cząsteczką docelową (gangliozydem GD2) oraz peptydami naśladującymi GD2.
2. Zuwała, K., Golda, A., Kabala, W., Burmistrz, M., Zdzalik, M., Nowak, P., Kedracka-Krok, S., Zarebski, M., Dobrucki, J., Florek, D., Zeglen, S., Wojarski, J., Potempa, J., **Dubin, G.**, Pyrc, K., (2015). The Nucleocapsid Protein of Human Coronavirus NL63. *Plos ONE*, 10:e0117833
Analiza właściwości białka nukleokapsydu wirusa NL63 – wyniki prac poprzedzających planowaną analizę strukturalną białka.

3. Grudnik, P., Debowski, D., Legowska, A., Malicki, S., Golik, P., Karna, N., Rolka, K., **Dubin, G.** (2015). Atomic resolution crystal structure of HV-BBI protease inhibitor from amphibian skin in complex with bovine trypsin. *Proteins – structure, function and bioinformatics*, 83:582-589.
Charakterystyka strukturalna kompleksu cyklicznego inhibitora peptydowego z trypsyną.
4. Zubko, M., Kusz, J., Prodan, A., Sturm, S., van Midden, HJP., Bennett, JC., **Dubin, G.**, Zupanic, E., Bohm, H. (2013). Structural phase transition and related electronic properties in quasi one-dimensional $(\text{NbSe}_4)_{10/3}$. *Acta Crystallographica Section B*. 69:229-237
Charakterystyka strukturalna właściwości $(\text{NbSe}_4)_{10/3}$.
5. Kolesinski, P., Golik, P., Grudnik, P., Piechota, J., Markiewicz, M., Tarnawski, M., **Dubin, G.**, Szczepaniak, A. (2013). Insights into eukaryotic Rubisco assembly - crystal structures of RbcX chaperones from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1830:2899-2906.
*Analiza struktury białek RbcX z *Arabidopsis thaliana*.*

Inne prace badawcze






Inne, nie powiązane tematycznie prace badawcze przygotowane z udziałem habilitanta.

1. Janczak, M., Bukowski, M., Gorecki, A., **Dubin, G.**, Dubin, A., Wladyka, B. (2015). A systematic investigation of the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Acta Biochimica Polonica*, 62:407-411.
Analiza możliwości wykorzystania zielonego białka fluorescencyjnego (ang. green fluorescent protein, GFP) jako metki fuzyjnej zwiększającej produkcję i stabilność partnera fuzyjnego.
2. Hirsch, T., von Peter, S., **Dubin, G.**, Mittler, D., Jacobsen, F., Lehnhardt, M., Eriksson, E., Steinau, H-U., Steinstraesser, L. (2006). Adenoviral Gene Delivery to Primary Human Cutaneous Cells and Burn Wounds. *Mol. Med*. 12: 199-207.
Badania nad możliwością zastosowania adenowirusów jako wektorów do dostarczania genów w modelu ran oparzeniowych skóry.

Prace przeglądowe

Doświadczenie w zakresie realizowanych tematów badawczych pozwoliło habilitantowi na przygotowanie kilku prac przeglądowych na zaproszenie edytorów odpowiednich czasopism. Prace te obejmują następujące pozycje:

1. Zak, K., Pecak, A., Rys, B., Wladyka, B., Domling, A., Weber, L., Holak, TA., **Dubin, G.** (2013). MDM2 and MdmX inhibitors for the treatment of cancer: a patent review (2011-present). *Expert Opinion On Therapeutic Patents* 23:425-448.
Krytyczny przegląd literatury patentowej w zakresie małocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania MDM2/MdmX-p53 ogłoszonej w latach 2011-2013.

2. **Dubin, G.** , Koziel, J., Pyrc, K., Wladyka, B., Potempa. J. (2013). Bacterial proteases in disease - role in intracellular survival, evasion of coagulation/fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. *Curr. Pharm. Des.* 19:1090-113.
Rozdział w przeglądowej publikacji zbiorowej dotyczący metod oddziaływania bakterii na ludzki układ koagulacji / fibrynolizy stanowiących mechanizmy patogenezы bakterii.
3. Bukowski, M., Wladyka, B., **Dubin, G.**  (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2: 1148-1165.
Praca podsumowująca osiągnięcia w charakterystyce mechanizmu działania gronkowcowych toksyn epidermolitycznych.
4. **Dubin, G.**  (2005). Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell. Mol. Life. Sci.* 62:653-669.
Praca przeglądowa katalogująca znane białkowe inhibitory proteinaz cysteinowych.
5. Dubin, A., Mak, P., **Dubin, G.**, Rzychon, M., Stec-Niemczyk, J., Wladyka, B., Maziarka, K., Chmiel, D. (2005). New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochim. Pol.* 52:633-638.
Rozdział w publikacji przeglądowej dotyczący gronkowcowych inhibitorów proteinaz cysteinowych.
6. **Dubin, G.** , (2003). Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* 50:715-724.
Praca opisująca stan wiedzy na temat gronkowcowych proteinaz cysteinowych i ich inhibitorów.
7. **Dubin, G.** , (2002). Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol. Chem.* 383, 1075-1086.
Praca podsumowująca stan wiedzy na temat gronkowcowych proteinaz oraz ich roli w patogenezie.

Podsumowanie

Poza badaniami przedstawionymi jako osiągnięcie naukowe, dotyczącymi charakterystyki funkcjonalnej i strukturalnej zewnątrzkomórkowego systemu proteolitycznego Gronkowca złocistego, habilitant uczestniczył także w szeregu innych prac. Tematem największej ilości prac była analiza czynników wirulencji bakterii – zagadnienie stanowiące temat przewodni Zakładu Mikrobiologii WBBiB UJ którego habilitant pozostaje pracownikiem. Ponadto habilitant prowadził badania obejmujące poszukiwanie inhibitorów oddziaływania białek Mdm2/Mdmx-p53, a także, we współpracy z innymi naukowcami szereg prac krystalograficznych obejmujących niepowiązane tematycznie zagadnienia badawcze. Wynikiem opisanych prac jest 36 publikacji naukowych (wyłączając publikacje przedstawione jako osiągnięcie naukowe habilitanta) opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach z listy filadelfijskiej.

Obecnie w kierowanym przez habilitanta zespole badawczym kontynuowane są wcześniej rozwijane zagadnienia badawcze. Prowadzone są także prace w nowych tematach obejmujące charakterystykę proteinaz o nieznanym mechanizmie katalizy, badania nad rolą kalikrein w przekazie sygnału w obrębie nabłonka, charakterystyką kieszeni wiążących

substrat w kinazach istotnych w procesie nowotworowym a także białek adaptorowych zaangażowanych w przekaz sygnału w komórkach eukariotycznych.

Literatura

1. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
2. Haley, R.W., et al., *The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics*. Am J Epidemiol, 1985. **121**(2): p. 159-67.
3. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
4. Cooper, B.S., et al., *Systematic review of isolation policies in the hospital management of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a review of the literature with epidemiological and economic modelling*. Health Technol Assess, 2003. **7**(39): p. 1-194.
5. Thammavongsa, V., et al., *Staphylococcal manipulation of host immune responses*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(9): p. 529-43.
6. Otto, M., *Staphylococcus aureus toxins*. Curr Opin Microbiol, 2014. **17**: p. 32-7.
7. Kusch, H. and S. Engelmann, *Secrets of the secretome in Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(2): p. 133-41.
8. Dubin, G., *Extracellular proteases of Staphylococcus spp.* Biol Chem, 2002. **383**(7-8): p. 1075-86.
9. Abdelnour, A., et al., *The accessory gene regulator (agr) controls Staphylococcus aureus virulence in a murine arthritis model*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3879-85.
10. Koziol, J. and J. Potempa, *Protease-armed bacteria in the skin*. Cell Tissue Res, 2013. **351**(2): p. 325-37.
11. Zdzalik, M., et al., *Prevalence of genes encoding extracellular proteases in Staphylococcus aureus - important targets triggering immune response in vivo*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **66**(2): p. 220-9.
12. Zdzalik, M., et al., *Biochemical and structural characterization of SplD protease from Staphylococcus aureus*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76812.
13. Kalinska, M., et al., *Substrate specificity of Staphylococcus aureus cysteine proteases--Staphopains A, B and C*. Biochimie, 2012. **94**(2): p. 318-27.
14. Stec-Niemczyk, J., et al., *Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of Staphylococcus aureus*. Biochem J, 2009. **419**(3): p. 555-64.
15. Dubin, G., et al., *Enzymatic activity of the Staphylococcus aureus SplB serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln*. J Mol Biol, 2008. **379**(2): p. 343-56.
16. Burchacka, E., et al., *Development and binding characteristics of phosphonate inhibitors of SplA protease from Staphylococcus aureus*. Protein Sci, 2014. **23**(2): p. 179-89.
17. Pustelny, K., et al., *Staphylococcal SplB serine protease utilizes a novel molecular mechanism of activation*. J Biol Chem, 2014. **289**(22): p. 15544-53.
18. Sweeney, P.J. and J.M. Walker, *Proteinase K (EC 3.4.21.14)*. Methods Mol Biol, 1993. **16**: p. 305-11.
19. Bukowski, M., B. Wladyka, and G. Dubin, *Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel), 2010. **2**(5): p. 1148-65.
20. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman, *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D343-50.
21. Reed, S.B., et al., *Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus serine protease operon*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1521-7.
22. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **27**(2): p. 157-62.

23. Freer, S.T., et al., *Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-chymotrypsin, and implications for zymogen activation*. *Biochemistry*, 1970. **9**(9): p. 1997-2009.
24. Wang, D., W. Bode, and R. Huber, *Bovine chymotrypsinogen A X-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 Å resolution*. *J Mol Biol*, 1985. **185**(3): p. 595-624.

