

# Badania nad mechanizmami działania i rozwoju oporności na bakteriocyny klasy II u bakterii Gram-dodatnich

dr inż. Aleksandra Tymoszevska✉,

dr hab. Tamara Aleksandrak-Piekarczyk

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_517](https://doi.org/10.18388/pb.2021_517)

✉ autor korespondujący: tymoszevska@ibb.waw.pl

**Słowa kluczowe:** bakteriocyny klasy II, bakterie *Lactococcus lactis*, mannozo-specyficzna fosfotransferaza (Man-PTS), mechanizmy oporności na bakteriocyny, receptory bakteriocyn, system regulacyjny YsaCB-KinG-LlrG

**Wykaz skrótów:** ABC transporter (ang. *ATP-binding cassette transporter*) – transporter wiążący ATP; AH (ang. *amphipathic  $\alpha$ -helix*) – amfipatyczna  $\alpha$ -helisa; AMPs (ang. *antimicrobial peptides*) – peptydy przeciwdrobnoustrojowe; GRAS (ang. *generally recognized as safe*) – generalnie uznawane za bezpieczne; LAB (ang. *lactic acid bacteria*) – bakterie kwasu mlekowego; MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) – odporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*; Man-PTS (ang. *mannose phosphotransferase system*) – mannozo-specyficzna fosfotransferaza; HP (ang. *hairpin*) – struktura szpilki do włosów; TH (ang. *transmembrane helix*) – transmembranowa  $\alpha$ -helisa; VRE – (ang. *vancomycin-resistant Enterococcus spp.*) – odporny na wankomycynę *Enterococcus spp.*

ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY  
W RAMACH

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Merck sp. z o.o. za Najlepszą Pracę Doktorską z Biochemii im. Witolda Drabikowskiego

Laureat: dr inż. Aleksandra Tymoszevska

TYTUŁ ROZPRAWY: Bakteriocyny Klasy II Bakterii Gram-Dodatnich – Oddziaływania z Receptorem i Rozwój Oporności

Promotor: dr hab. Tamara Aleksandrak-Piekarczyk

## STRESZCZENIE

Bakteriocyny to grupa peptydów lub białek wytwarzanych przez bakterie w celu zabijania lub hamowania wzrostu innych bakterii zasiedlających tę samą niszę ekologiczną. Zainteresowanie bakteriocynami wynika z ich potencjalnego zastosowania m.in. w konserwacji żywności i terapii zakażeń wywołanych przez antybiotykooporne szczepy bakterii chorobotwórczych. Liczba publikacji identyfikujących nowe szczepy bakterii produkujących bakteriocyny nieustannie wzrasta. Jednocześnie, zauważalny jest brak badań opisujących mechanizmy działania większości nowo zidentyfikowanych bakteriocyn, a także mechanizmy nabywania oporności na te bakteriocyny i oporności krzyżowej na antybiotyki. Dokładne poznanie tych zagadnień pozwoli na opracowanie wytycznych zapewniających najbardziej efektywne, bezpieczne i długotrwałe stosowanie bakteriocyn bez ryzyka rozwoju oporności. W niniejszej pracy opisano główne założenia rozprawy doktorskiej dr inż. Aleksandry Tymoszevskiej, której celem była identyfikacja mechanizmów działania i rozwoju oporności na bakteriocyny klasy II u bakterii Gram-dodatnich. Wykorzystując jako model badawczy komórki bakterii *Lactococcus lactis*, zbadano dwie grupy bakteriocyn: (i) garwicyny Q, A, B i C, oraz BacSJ; a także (ii) bakteriocyny aureocyno A53 (AurA53)- i enterocyno L50 (EntL50)-podobne. Pokazano, że bakteriocyny grupy (i) rozpoznają komórki wrażliwe i tworzą pory wewnątrz błony komórkowej bakterii wykorzystując specyficzny receptor, system mannozo-specyficznej fosfotransferazy (Man-PTS), a także, że bakterie wrażliwe nabywają oporność na badane bakteriocyny poprzez modyfikacje struktury Man-PTS. Z kolei nabywanie oporności na bakteriocyny grupy (ii), tworzące pory bezpośrednio w błonie komórkowej bakterii, zachodzi poprzez zmiany w strukturze ściany i błony komórkowej wywołane zmianami w ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm lipidów lub stanowiących elementy systemu regulacyjnego YsaCB-KinG-LlrG. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na dotychczasowe poglądy dotyczące mechanizmów działania bakteriocyn i szeroko otwierają możliwości ich dalszych badań.

## WPROWADZENIE

Odkrycie pierwszego antybiotyku przez Aleksandra Fleminga w 1928 roku zrewolucjonizowało biologię i medycynę, pozwoliło zapobiec śmierci milionów ludzi na całym świecie i znacząco wydłużyło średnią długość życia. Niestety, nieodpowiednie stosowanie lub nadużywanie antybiotyków przyczyniły do obserwowanego w ostatnich dekadach gwałtownego wzrostu liczby zakażeń wywołanych przez szczepy bakterii odporne na dotychczas stosowane antybiotyki. Dokładna skala antybiotykooporności nie jest znana, jednak według analiz opublikowanych w 2022 roku na łamach prestiżowego czasopisma Lancet, w samym tylko 2019 roku lekooporne bakterie przyczyniły się do śmierci 4,95 miliona ludzi, z czego w 1,27 miliona przypadków były bezpośrednią przyczyną zgonu [1]. Przewiduje się, że jeśli antybiotykooporność bakterii będzie narastać w obecnym tempie, liczba zgonów może wzrosnąć do 10 milionów rocznie w 2050 roku [2]. Tym bardziej niepokojący jest fakt, że od 2017 do 2021 roku zatwierdzono jedynie 12 nowych antybiotyków, z których aż 10 należy do już istniejących klas, co oznacza, że oporność na nie już istnieje lub rozwinie się bardzo szybko [3]. Aby przezwyciężyć problem antybiotykooporności, pilnie potrzebne jest opracowanie leków przeciwbakteryjnych o nowych mechanizmach działania.

Równie ważnym problemem zdrowia publicznego jest rosnąca liczba chorób wywołanych przez żywność skażoną czynnikami chorobotwórczymi. Globalizacja produkcji żywności, handel międzynarodowy i wzmożona migracja przyczyniły się do tego, że każdego roku skażona żywność jest odpowiedzialna za 600 milionów przypadków chorób, z których 420 000 kończy się śmiercią [4]. Bakterie są jednym z najczęstszych czynników chorobotwórczych spotykanych w żywności [4]. Aby zapobiec ich rozwojowi stosuje się fizyczne lub chemiczne metody konserwacji. Te pierwsze znacząco obniżają walory organoleptyczne gotowych produktów, podczas gdy drugie, stosowane w nadmiarze, mogą prowadzić do problemów zdrowotnych i zanieczyszczenia środowiska. Aby sprostać wymaganiom społeczeństwa, które oczekuje naturalnych i bezpiecz-

nych konserwantów żywności, konieczna jest identyfikacja nowych, skutecznych środków przeciwbakteryjnych naturalnego pochodzenia.

## ZNACZENIE BAKTERIOCYN

Grupą związków, które mają szansę być stosowane zarówno jako antybiotyki nowej generacji jak i naturalne konserwanty żywności są bakteriocyny – produkowane przez bakterie peptydy lub białka o działaniu bakteriobójczym lub bakteriostatycznym należące do szerokiej grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs – ang. *antimicrobial peptides*). Nierybosomalnie syntetyzowane AMPs znane są od dziesięcioleci, a wiele z nich (m.in. bacytracyna, gramicydyna i daptomycyna) jest obecnie stosowanych jako antybiotyki. W ostatnich latach uwagę naukowców przyciągnęły rybosomalnie syntetyzowane AMPs, szczególnie bakteriocyny, ze względu na swój wciąż niewykorzystany potencjał. Bakteriocyny produkowane są zarówno przez bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne, jednak to właśnie te pierwsze wykazują aktywność przeciwko *Staphylococcus aureus* opornym na metycylinę (MRSA – ang. *methicillin-resistant S. aureus*) i bakteriom z rodzaju *Enterococcus* opornym na wankomycynę (VRE – ang. *vancomycin-resistant Enterococcus spp.*), które są przyczyną ciężkich zakażeń szpitalnych [5], a także, przeciwko *Listeria monocytogenes*, będącej przyczyną najcięższych zakażeń odżywnościowych [4]. Co więcej, wiele bakterii Gram-dodatnich wytwarzających bakteriocyny należy do grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB – ang. *lactic acid bacteria*) i posiada status generalnie uznawanych za bezpieczne (GRAS – ang. *generally recognized as safe*), dlatego ich stosowanie w medycynie lub konserwacji żywności prawdopodobnie nie wzbudziłoby niepokoju konsumentów [6].

Bakteriocyny lub ich Gram-dodatni producenci mają również wiele potencjalnych zastosowań w tzw. utrzymaniu zdrowia, jako składniki preparatów probiotycznych, produktów do pielęgnacji skóry, jamy ustnej lub higieny intymnej, wpływających na utrzymanie prawidłowej mikroflory bakteryjnej [7]. W ostatnich latach stało się jednak jasne, że działanie bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram-dodatnie znacznie wykracza poza ich aktywność przeciwbakteryjną. Jak wskazują wyniki badań z użyciem nizyny – pierwszej bakteriocyny wyizolowanej z bakterii Gram-dodatnich i szeroko stosowanej obecnie jako konserwant żywności o symbolu E234 – bakteriocyny wykazują również potencjał w terapii nowotworów [8]. Co więcej, niektóre z nich wykazują aktywność przeciwwirusową, przeciw pasożytniczą, przeciwzapalną i immunomodulującą [9]. Mimo ogromnego potencjału aplikacyjnego, większość bakteriocyn wciąż nie znalazła szerokiego komercyjnego zastosowania, co może wynikać m.in. z niewystarczającej wiedzy na temat mechanizmów ich działania, oraz mechanizmów powstawania oporności na bakteriocyny i oporności krzyżowej na inne związki przeciwdrobnoustrojowe [10]. Poznanie tych zagadnień jest kluczowe dla umożliwienia ich bezpiecznego stosowania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i medycynie.

## SYSTEMATYKA BAKTERIOCYN

Dotychczas zidentyfikowano setki bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich (ponad pięćset w samych tylko gatunkach LAB, według bazy danych LABiocin) znacząco różniących się między sobą mechanizmem syntezy, strukturą, właściwościami fizykochemicznymi i spektrum działania, co utrudnia ich kompleksową klasyfikację i wymusza jej częste modyfikacje w odpowiedzi na identyfikację nowych przedstawicieli tej grupy związków [10]. Najogólniejszy podział wyróżnia trzy klasy bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich. Klasa I obejmuje małe (19–28 aminokwasów, <5 kDa), termostabilne peptydy, które na skutek rozległych modyfikacji potranslacyjnych zawierają nietypowe aminokwasy. Klasa II obejmuje nieco większe (30–60 aminokwasów, <10 kDa), termostabilne peptydy, które, poza tworzeniem mostków dwusiarczkowych lub cyklizacją, nie ulegają modyfikacjom potranslacyjnym. Natomiast duże, labilne termicznie bakteriocyny tworzą klasę III [11]. Od lat pięćdziesiątych XX wieku większość badań poświęcano klasie I ponieważ do niej właśnie należy nizyna – najlepiej poznana i najszerzej stosowana bakteriocyna. Jednak w ostatnich latach coraz więcej badań koncentruje się wokół klasy II, która jest bardzo liczna, różnorodna, a jednocześnie relatywnie słabo poznana [10].

W obrębie klasy II najczęściej wyróżnia się cztery podklasy. Bakteriocyny podklasy IIa, nazywane również pediocynami od najlepiej poznanego przedstawiciela tej grupy – pediocyny PA-1 (PedPA-1), posiadają konserwowaną sekwencję aminokwasową YGNG[V/L] i silną aktywność przeciwko *L. monocytogenes*. Podklasy IIb i IIc zawierają, odpowiednio, bakteriocyny dwupeptydowe, które do uzyskania pełnej aktywności wymagają obecności dwóch peptydów i bakteriocyny cykliczne. Natomiast bakteriocyny, które nie mieszczą się w żadnej z powyższych podklas zostały umieszczone w podklasie II d [11]. Ze względu na swoje unikalne cechy to właśnie bakteriocyny należące do podklasy II d były tematem prezentowanej rozprawy doktorskiej.

## MECHANIZMY DZIAŁANIA BAKTERIOCYN

Większość bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich posiada ładunek dodatni, który ułatwia ich dokowanie na ujemnie naładowanej powierzchni komórek bakteryjnych. Następnie bakteriocyny te oddziałują z błoną komórkową bakterii lub specyficznym receptorem błonowym. Bakteriocyny oddziałujące bezpośrednio z błoną komórkową powodują zwiększenie jej przepuszczalności, głównie poprzez tworzenie porów, co w konsekwencji prowadzi do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych i śmierci bakterii. Takie działanie wykazują przede wszystkim bakteriocyny o budowie saponino-podobnej. Saponiny są to małe białka lizosomalne zaangażowane w katabolizm sfingolipidów. Składają się z czterech lub pięciu  $\alpha$ -helis, które oddziałują z lipidami błonowymi i modyfikują je, umożliwiając w ten sposób działanie różnych enzymów lizosomalnych rozkładających lipidy [12]. Bakteriocyny saponino-podobne zbudowane są z od trzech do pięciu amfipatycznych  $\alpha$ -helis, które tworzą globularną strukturę o silnie kationowej, hydrofilowej powierzchni i hydrofobowym rdzeniu. Uważa się, że to wła-

śnie taka struktura, a przede wszystkim eksponowane na powierzchni reszty aminokwasów aromatycznych takich jak tryptofan i tyrozyna, pozwalają na bezpośrednią interakcję bakteriocyn sapozyno-podobnych z błoną komórkową szerokiego spektrum bakterii [13].

Bakteriocyny niezdolne do samodzielnej permeabilizacji błony rozpoznają i wiążą się do specyficznych receptorów powodując tworzenie porów, hamowanie syntezy ściany komórkowej lub oba te efekty. Dotychczas zidentyfikowano setki bakteriocyn niesapozyno-podobnych o znacząco różnych strukturach, właściwościach fizykochemicznych i spektrach aktywności, co doprowadziło do obecnie przyjętego założenia, że rozpoznają one różne receptory na komórkach docelowych [14]. Co ważne, do chwili obecnej zidentyfikowano jedynie siedem takich receptorów. Pierwszym zidentyfikowanym i najlepiej zbadanym receptorem jest lipid II, niezbędny prekursor ściany komórkowej, wykorzystywany przez niektóre bakteriocyny klasy I, w tym nizynę, oraz bakteriocynę należącą do podklasy IId – laktokokynę 972 (Lcn972). Mechanizm działania nizyny polega na hamowaniu syntezy peptydoglikanu, a następnie tworzeniu porów [15], podczas gdy Lcn972 hamuje tworzenie septum podczas podziałów komórkowych [16]. Drugim poznany receptorem jest system mannozo-specyficznej fosfotransferazy (Man-PTS), który jest głównym systemem transportu mannozy u *Firmicutes* i *Gammaproteobacteria* [17]. Do czasu rozpoczęcia badań nad prezentowaną rozprawą błonowe podjednostki IIC i IID Man-PTS zostały zidentyfikowane jako receptor dla pediocyno-podobnych bakteriocyn podklasy IIa oraz dwóch bakteriocyn podklasy IId – laktokokyn A i B (LcnA i B) [18]. Inne poznane receptory to fosfataza pirofosforanu undekaprenyłu UppP, transporter aminokwasów z rodziny APC oraz białko CorC wykorzystywane odpowiednio przez laktokokynę G i enterocynę 1071 [22], plantocynę JK [23] oraz plantarycynę EF [24], należące do podklasy IIb, a także ABC (ang. *ATP-binding cassette* – wiążący ATP) transporter maltozy wykorzystywany przez garwicynę ML należącą do podklasy IIc [19], oraz zależna od cynku metalopeptydaza YvjB wykorzystywana przez bakteriocyny podklasy IId – LsbB, enterocyny K1 i Ej97 [20,21]. Warto zaznaczyć, że bakteriocyny zależne od receptora wykazują specyficzne, czasem bardzo wąskie spektrum działania i wykazują działanie przeciwbakteryjne w bardzo niskich stężeniach, szczególnie w porównaniu do bakteriocyn działających bezpośrednio na błonę komórkową, co czyni je wyjątkowo atrakcyjnymi pod względem aplikacyjnym. Z tego też powodu badania nad identyfikacją receptorów i mechanizmem oddziaływania bakteriocyna-receptor są szczególnie ważne [10].

## MECHANIZMY POWSTAWANIA OPORNOŚCI

W wyniku ekspozycji na działanie bakteriocyny, bakterie wrażliwe mogą wykształcić oporność (ang. *resistance*). Nabytej oporności nie należy mylić z odpornością (ang. *immunity*) bakterii produkujących bakteriocyny, która wynika z produkcji białka odpornościowego (ang. *immunity protein*), jak również z niewrażliwością bakterii (ang. *insensitivity*), która wynika np. z braku funkcjonalnego receptora. Najczęstsze mechanizmy nabywania oporności na bakteriocyny można podzielić na dwie grupy: (i) zmiany w receptorach błono-

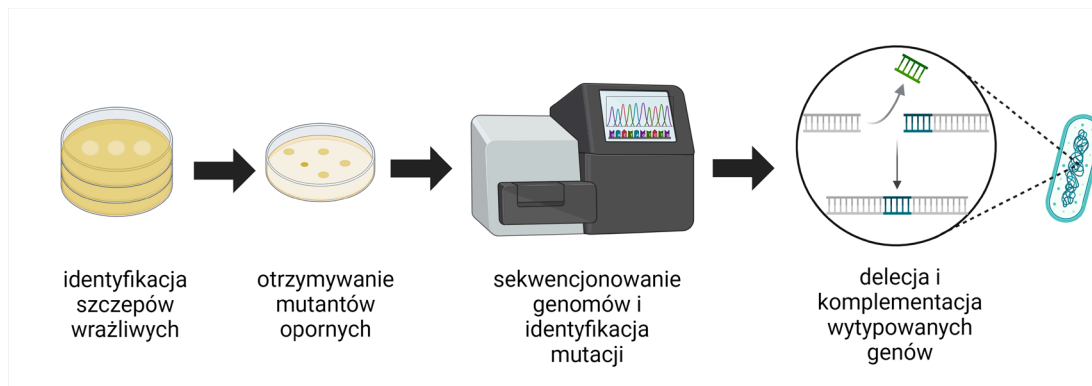
wych oraz (ii) zmiany w budowie błony i ściany komórkowej [10]. Zmiany w receptorach wywołane są przez mutacje w genach kodujących receptor lub genach niezbędnych do jego syntezy, i obejmują jego utratę, zmniejszoną ekspresję lub zmianę sekwencji aminokwasowej wpływającą na jego strukturę i/lub funkcjonowanie. W rezultacie bakteriocyna nie może rozpoznawać komórek wrażliwych, wiązać się z receptorem ani tworzyć porów w błonie komórkowej. Taki mechanizm powstawania oporności został opisany m.in. dla bakteriocyn oddziałujących z Man-PTS [25].

Niezbędna funkcja błony komórkowej lub lipidu II sprawia, że nabywanie oporności na bakteriocyny atakujące te cele jest dużo bardziej złożone, zachodzi wolniej i zwykle skutkuje niższymi poziomami oporności, szczególnie w porównaniu z nabywaniem oporności na bakteriocyny oddziałujące z Man-PTS [10]. Zwykle obejmuje kilka procesów, które zmieniają strukturę ściany i błony komórkowej, i z których najczęstsze to D-alanylnacja kwasów teichojowych i L-lizynacja fosfolipidów w wyniku zwiększonej ekspresji odpowiednio operonu *dltABCD* i genu *mprF*. W efekcie dochodzi do włączenia dodatkowo naładowanych cząsteczek do ściany i błony komórkowej bakterii i odpychania dodatnio naładowanych peptydów. Inne procesy odpowiedzialne za powstawanie komórek opornych to zwiększona polimeryzacja peptydoglikanu w wyniku nadekspresji genu *pbp2*, lub zmiany w składzie i/lub budowie fosfolipidów i kwasów tłuszczowych. Wszystkie te procesy mają na celu utrudnić przedostawanie się bakteriocyny do błony komórkowej lub jej błonowego receptora [26,27]. Co ważne, za zmiany w ekspresji przytoczonych genów często odpowiadają złożone systemy regulacyjne, których rolą jest odpowiedź na tzw. stres ściany i błony komórkowej (stres otoczki). Podstawę działania systemów regulacyjnych stanowią białko sensorowe (kinaza histydynowa) oraz białko regulatorowe (regulator transkrypcji), które odbierają sygnał o obecności czynnika stresowego i zmieniają profil ekspresji genów zmniejszając wrażliwość bakterii na stres [28]. Modyfikacje błony i ściany komórkowej mogą prowadzić do jednoczesnego zmniejszenia wrażliwości bakterii na szeroką gamę bakteriocyn i antybiotyków działających na otoczkę bakterijną. Niestety, podobnie jak receptory błonowe, również mechanizmy powstawania oporności na bakteriocyny są w większości nieznanne. Jeszcze mniej jest wiadomo na temat korelacji między opornością na bakteriocyny i inne związki przeciwbakteryjne. Identyfikacja tych mechanizmów jest szczególnie ważna aby zapewnić bezpieczne stosowanie bakteriocyn i zapobiec rozwojowi zjawiska oporności [10].

## BADANIA NAD MECHANIZMEM DZIAŁANIA I POWSTAWANIA OPORNOŚCI NA GARWICYNY Q, A, B I C, ORAZ BacSJ

Do pierwszej grupy bakteriocyn podklasy IId będących przedmiotem badań prezentowanej rozprawy należą garwicyny Q, A, B i C, oraz BacSJ. Garwicyna Q (GarQ) i BacSJ to peptydy o długości 50 aminokwasów, wykazujące podobieństwo sekwencji aminokwasowej, wytwarzane odpowiednio przez bakterie *Lactococcus garvieae* BCC 43578 i *Lactocaseibacillus paracasei* BGSJ2-8, wyizolowane ze sfermentowanej żywności [29–31]. Garwicyny A, B i C (GarA, GarB i GarC) to peptydy o długości 43 (GarA) lub 51 (GarB





Rycina 1. Schemat prowadzący do identyfikacji genów, których mutacje prowadzą do powstawania oporności na bakteriocyny. Rysunek wykonano w programie Bio-Render.

i GarC) aminokwasów kodowane przez plazmidy bakterii *L. garvieae* 21881 wyizolowanej z ludzkiej krwi. Według danych literaturowych pochodzących sprzed rozpoczęcia prezentowanych badań, GarQ wykazuje szerokie spektrum aktywności wobec bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria* i *Pediococcus* [29], natomiast GarA (jedyna bakteriocyna wydzielana przez szczep *L. garvieae*) wykazuje aktywność wobec innych szczepów *L. garvieae* [32]. To właśnie różnorodne spektra aktywności GarQ i GarA oraz brak wiedzy na temat aktywności GarB, GarC i BacSJ były powodem ich wyboru do dalszych badań. Schemat badań był zbliżony dla wszystkich bakteriocyn i został przedstawiony na rycinie 1.

Pierwszy krok obejmował określenie aktywności antagonistycznej badanych bakteriocyn wobec szerokiego spektrum bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i drożdży. Zaobserwowano, że najszersze spektrum aktywności wykazywała GarQ aktywna wobec wszystkich szczepów bakterii z rodzajów *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Listeria* i niektórych szczepów z rodzajów *Lactobacillus* i *Pediococcus* [33]. Nieco węższe spektrum aktywności wykazywała BacSJ, która działała wobec wszystkich szczepów bakterii z rodzajów *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* i *Listeria* i niektórych szczepów z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Pediococcus* [34]. Najwęższe spektra aktywności, ograniczone jedynie do rodzaju *Lactococcus*, wykazywały GarA, GarB (aktywne wobec *L. garvieae*), i GarC (aktywne wobec *L. garvieae* i *L. lactis*) [35].

Aby zidentyfikować geny, których mutacje prowadzą do powstania oporności na GarQ, GarA, GarB, GarC i BacSJ w kolejnym etapie otrzymano spontaniczne mutanty odporne na testowane bakteriocyny poprzez ekspozycję dwóch wysoce wrażliwych szczepów *L. garvieae* IBB3403 i *L. lactis* IL1403 na działanie dwóch bakteriocyn o największym potencjale przeciwbakteryjnym – GarQ i GarA. Następnie, wykorzystując metodę sekwencjonowania genomowego DNA stwierdzono, że mutacje odpowiadające za powstawanie oporności na badane bakteriocyny znajdują się w genach kodujących błonowe podjednostki IICIID Man-PTS.

Bezpośrednie zaangażowanie mutacji w *man-PTS* w nadawanie oporności na GarQ, GarA, GarB, GarC i BacSJ potwierdziła obserwacja, że badane bakteriocyny nie wy-

kazują aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *L. garvieae* i *L. lactis* z delecją operonu *man-PTS* [33–35]. Badania nad aktywnością GarQ, A, B i C, i BacSJ wobec szczepów *L. lactis*, w których delecję *man-PTS* komplementowano genami kodującymi błonowe podjednostki IICIID Man-PTS<sub>*L. lactis*</sub> lub Man-PTS<sub>*L. garvieae*</sub> pokazały, że ich obecność jest niezbędna dla nadawania wrażliwości na badane bakteriocyny [33–35]. Zakres pracy nie obejmował badań nad bezpośrednimi oddziaływaniami bakteriocyna-Man-PTS, jednak na podstawie uprzednio przeprowadzonych badań, które wykazały tworzenie kompleksów PedPA-1-Man-PTS lub LcnA-Man-PTS [18] można przypuszczać, że również bakteriocyny będące tematem przedstawionej rozprawy wykorzystują Man-PTS jako receptor, a także, że bakterie uodporniają się na testowane bakteriocyny poprzez mutacje powodujące jego utratę lub modyfikację. Otrzymane wyniki sugerują, że Man-PTS jest zaangażowany w wiązanie wielu bakteriocyn o różnych strukturach i spektrach aktywności przeciwbakteryjnych. Co ważne, były to pierwsze badania pokazujące, że bakteriocyny spoza grupy pediocyn i laktokokocyn A i B oddziałują z Man-PTS.

#### UTWORZENIE NOWEJ RODZINY BAKTERIOCYN ATAKUJĄCYCH MAN-PTS

Badania prowadzone równoległe przez inne zespoły badawcze pozwoliły na identyfikację kolejnych bakteriocyn, które jako receptor wykorzystują Man-PTS – uberycyny K, laktokokocyny Z (LcnZ) i angicyny [36–38]. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej z GarQ wytypowano również bowicynę 255 (Bov255) [39] jako bakteriocynę o potencjalnie wykorzystującą ten sam receptor. W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej porównano sekwencje aminokwasowe wszystkich bakteriocyn oddziałujących z Man-PTS, co pozwoliło na utworzenie pięciu grup, które nazwano na podstawie pierwszego zidentyfikowanego przedstawiciela, mianowicie: PedPA-1, LcnA, GarQ, GarA i GarC [10]. W każdej grupie zidentyfikowano charakterystyczne motywy sekwencji aminokwasowej, które przedstawiono na rycinie 2.

W toku prowadzonych badań zaobserwowano, że bakteriocyny atakujące Man-PTS różnią się nie tylko sekwencją aminokwasową, ale również spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Różnice te widoczne są nawet w obrębie bakteriocyn należących do wspólnej grupy i zostały

GRUPA		10	20	30	40	50
I	<b>PedPA-1</b>	KYYGNGVT	CGKHS	CSVDW	GKATTCI	INNGAMAXATGGHQGNHKK
	SakP	KYYGNGVH	CGKHS	CTVDW	GTAIGNI	GNNAANWATGGNAGWNK
	EntP	ATRSY	YGNVY	CNNSK	CWVNW	GEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH
	Consensus	..kyYGN	G.V	#WG	.A..nI	.nn.a..wAtGg .g.hk.
II	<b>LcnA</b>	KLTFIQ	STAAGD	LYYNT	NTHKYV	YQQTQNAFGAAANTIVNGWMGGAAGGFGLHH
	LcnZ	ALQFIQ	NTASG	ALYYNT	RTHKYQ	YQQTSGAMGAAINVFNQGINW
	LcnB	SLQYV	MSAGPY	TWYK	DTRT	GKTICKQIDTASYTFGVMAEGWGKTFH
	Consensus	.Lq%!q	sta.g.lyy	#T	.ThKy.yq	QT..a.gaa.nv..#gw.....
III	<b>GarQ</b>	YHLMN	GANGY	LTR-	VNGKYV	YRVTKDPVSAVFGVINSNGWGSAGAGFGPQH
	BacSJ	YSYFG	GSNGY	SWRDKR	GHWHY	TVTKGGFETVIGIIGDGGWGSAGAPGPGQH
	Uberycyna	AKGVCK	YVYPG	SNGYAC	RYPNGE	WGYIVTKSNFEATKDVIVNGWVSSLGGGYFHGNRG
	Bov255	GKGYCK	PVYYA	ANGYSC	RYSNGE	WGYVVTKGAFQATTDVIANGWVSSLGGGYFGKP
	Angicyna	GSGYCK	PVMV	GANGYAC	RYSNGR	WDYKVTKGIFQATTDVIKGWAEY--GPWIPRH
Consensus	.....y	.....g	ANGY..R	..ng.w.Y	.VTKg.f.av.g!I.nGWgsa.gag...qh..	
IV	<b>GarA</b>	IGGAL	GNALN	GLGTW	ANMM	NGGFF--VNQWQVYANKGK----INQYRPY
	GarB	IGGAL	GNALAG	LGNGLK	QWNTT	GFSEYNIGGGKVNNKAPTSPAYNPYGH
	Consensus	IGGAL	GNALa	GLGngan	qmNgg	GF..yNqgggkannGK....InaYrPY..
V	<b>GarC</b>	HWIGDVLGAIGGAAHPVNPQKVVDQLNGKPAIKPHSCSPYGTGGTPNSCNW				

**Rycina 2.** Porównanie sekwencji aminokwasowych bakteriocyn rozpoznających Man-PTS. Na podstawie występowania wspólnych motywów sekwencji aminokwasowej wyodrębniono pięć grup: bakteriocyny PedPA-1 - (Grupa I), LcnA - (Grupa II), GarQ - (Grupa III), GarA - (Grupa IV) podobne, oraz GarC - (Grupa V) [10]. Wysoko i nisko konserwowane aminokwasy oznaczono odpowiednio na czerwono i niebiesko. # oznacza D lub N, % oznacza F lub Y, ! oznacza I lub V. Charakterystyczne motywy sekwencji aminokwasowej oznaczono szarym tłem. Rysunek wykonano przy użyciu programu MultAlin.

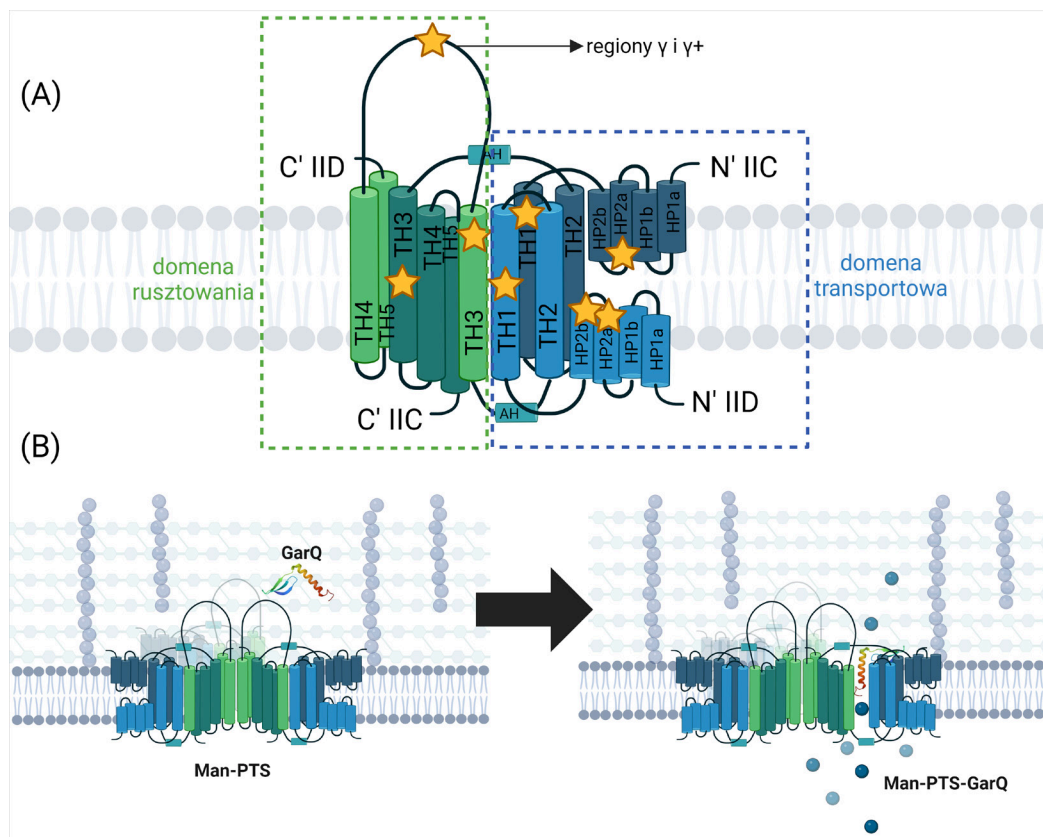
przedstawione w tabeli 1. Prawdopodobnie wynikają one z unikalnej, gatunkowo-specyficznej budowy błonowych podjednostek IICIID Man-PTS. Badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze pokazały, że spośród trzech znanych grup filogenetycznych Man-PTS, tylko grupa I charakteryzująca się obecnością trzech unikalnych regionów aminokwasowych:  $\alpha$  i  $\beta$  w podjednostce IIC oraz  $\gamma$  w podjednostce IID, służy jako receptor dla bakteriocyn [14]. Pediocyny wykazują aktywność wobec bakterii z rodzajów *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, których Man-PTS posiada region  $\alpha$ . Z kolei LcnA i LcnB są aktywne jedynie wobec bakterii *L. lactis*, które nie posiadają regionu

$\alpha$  w Man-PTS [40]. Dzięki badaniom przeprowadzonym w ramach prezentowanej rozprawy zidentyfikowano kolejny unikalny region aminokwasy, region  $\gamma+$ , który występuje w podjednostce IID Man-PTS *L. garvieae*. Wykazano, że obecność tego regionu jest ważna dla wrażliwości bakterii na GarA, GarB oraz GarC, a nie jest istotna dla wrażliwości bakterii na GarQ i BacSJ [33–35]. Spektra aktywności przeciwbakteryjnej i regiony Man-PTS kluczowe dla nadawania wrażliwości na uberycynę K, LcnZ, angicynę i Bov255 nie zostały poznane i wymagają dalszych badań.

Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano utworzenie nowej rodziny bakteriocyn, które oddziałują z

**Tabela 1.** Spektrum aktywności przeciwbakteryjnej bakteriocyn oddziałujących z Man-PTS. „+”, „-” i „ND” oznaczają odpowiednio aktywność, brak aktywności lub brak danych.

Szczep wskaźnikowy (typ Man-PTS)	I PedPA-1 SakP EntP	II LcnA LcnB LcnZ	III GarQ	BacSJ	Uberycyna K	Angicyna	Bov255	IV GarA GarB	V GarC
<i>L. monocytogenes</i> ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	+	-	+	+	+	+	ND	-	-
<i>Streptococcus</i> spp. ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. lactis</i> ( $\beta$ , $\gamma$ )	-	+	+	+	+	ND	ND	-	+
<i>L. garvieae</i> ( $\beta$ , $\gamma$ , $\gamma+$ )	-	-	+	-	+	ND	ND	+	+



**Rycina 3.** Lokalizacja aminokwasów Man-PTS zaangażowanych w interakcję z GarQ, GarA, GarB, GarC i BacSJ (A) oraz model interakcji Man-PTS z GarQ (B). W każdym protomerze domeny transportowe i rusztowania są zaznaczone odpowiednio na niebiesko i zielono (ciemnym kolorem w IIC, jasnym kolorem w IID). HP, TH i AH oznaczają odpowiednio spinikę do włosów, transmembranową  $\alpha$ -helisę i amfipatyczną  $\alpha$ -helisę. Miejsca występowania aminokwasów zaangażowanych w wiązanie bakteriocyn oznaczono gwiazdką. Rysunek wykonano w programie BioRender.

Man-PTS. Tym samym podważono dotychczasowy pogląd, mówiący, że bakteriocyny o różnych strukturach i spektrach aktywności wykorzystują różne receptory błonowe, pokazując kluczową rolę Man-PTS jako receptora dla wielu homologicznych i niehomologicznych bakteriocyn podklasy IId [10].

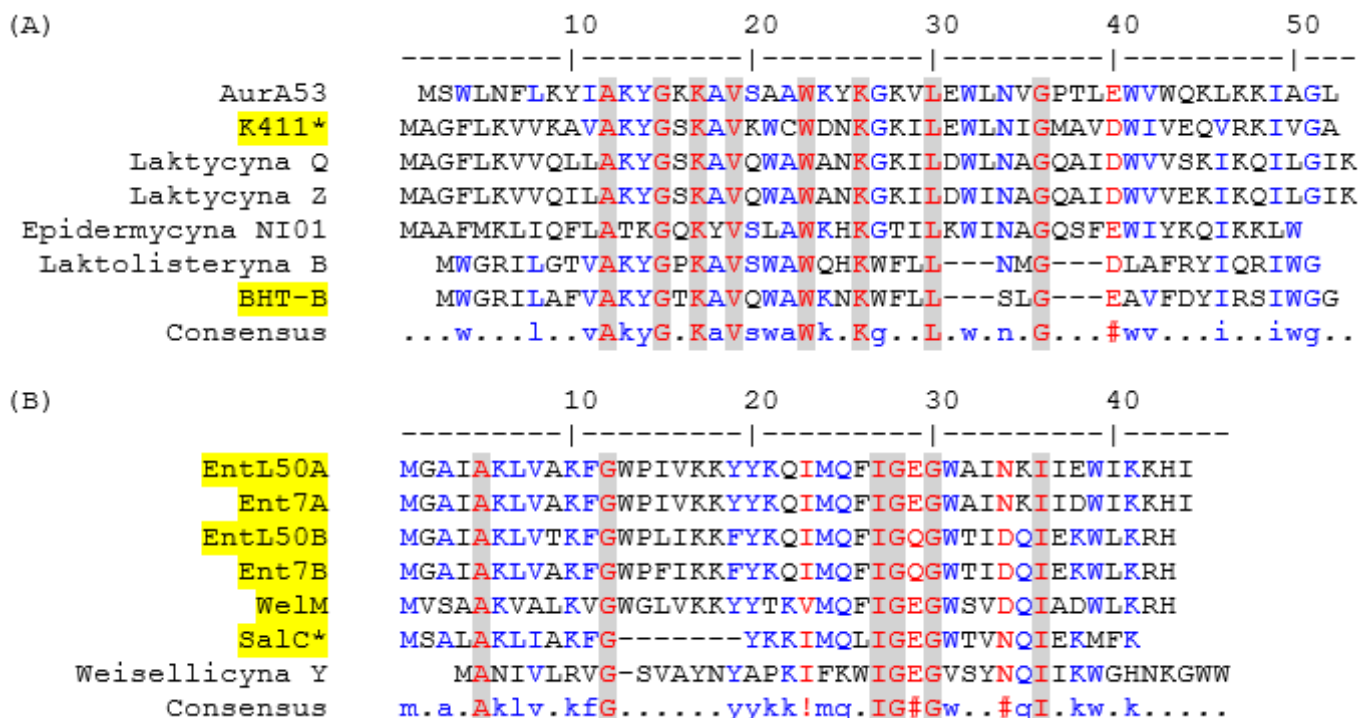
### IDENTYFIKACJA MODELI INTERAKCJI BAKTERIOCYNAMA-PTS

Różnice w sekwencji aminokwasowej i zakresach aktywności przeciwdrobnoustrojowej testowanych bakteriocyn wskazały na możliwość interakcji bakteriocyna-receptor za pośrednictwem odmiennych modeli. Aby zidentyfikować aminokwasy i/lub regiony Man-PTS zaangażowane w interakcję z GarQ, GarA, GarB, GarC i BacSJ, otrzymano mutanty, które były odporne na każdą z badanych bakteriocyn i zachowały funkcjonalność Man-PTS. Zachowana funkcjonalność Man-PTS, potwierdzona badaniami jego zdolności do transportu mannozy, pozwoliła nam spekulować, że aminokwasy zmienione w wyniku mutacji *man-PTS*, mogą być bezpośrednio zaangażowane w interakcję z bakteriocyną [33]. Do otrzymywania mutantów wykorzystano dwie metody: (i) opracowaną w ramach tej pracy metodę mutagenyzy spontanicznej polegającą na inkubacji szczepów wrażliwych w obecności bakteriocyny i mannozy jako jedyne źródła węgla; oraz (ii) mutagenezę ukierunkowaną. Zaobserwowano, że mutanty odporne na bakteriocynę, w obecności której zostały otrzymane, wykazywały różne po-

ziomy oporności na pozostałe badane bakteriocyny lub nie wykazywały jej wcale, co dodatkowo potwierdza przypuszczenie, że badane bakteriocyny posiadają odmienne wzorce wiązania z Man-PTS. Na podstawie oceny poziomów oporności otrzymanych mutantów wytypowano aminokwasy Man-PTS, które prawdopodobnie biorą bezpośredni udział w wiązaniu każdej bakteriocyny (wysoki poziom oporności mutantów), oraz takie, które pełnią jedynie rolę pomocniczą (niski poziom oporności mutantów) [33–35].

W czasie wykonywania testów na GarQ, GarA, GarB, GarC i BacSJ struktura Man-PTS była nieznana, a analizy lokalizacji aminokwasów zaangażowanych w interakcję z badanymi bakteriocynami prowadzono jedynie w oparciu o modele utworzone przy użyciu oprogramowania do przewidywania struktury trzeciorzędowej i topologii w błonie [33–35]. Opublikowanie struktury Man-PTS z bakterii *Escherichia coli* oraz *L. monocytogenes* (samej oraz w kompleksie z PedPA-1) pozwoliło na ponowne przeprowadzenie analiz i weryfikację opublikowanych modeli. Jak pokazały rozwiązane struktury, kompleks błonowy Man-PTS jest trimerym, a każdy protomer zbudowany jest z podjednostek IIC i IID ułożonych tak, że tworzą dwie oddzielne domeny – transportową i rusztowania. W obrębie każdej podjednostki obecne są dwie struktury szpilki do włosów (HP, ang. *hairpins*), pięć transmembranowych  $\alpha$ -helis (TH, ang. *transmembrane  $\alpha$ -helices*) i jedna amfipatyczna  $\alpha$ -helisa (AH – ang. *amphipathic  $\alpha$ -helix*) [41,42]. Kolejne analizy wykazały, że aminokwasy potencjalnie zaangażowane w interakcję





Rycina 4. Porównanie sekwencji aminokwasowych bakteriocyn AurA53 - (A) i EntL50 - (B) podobnych. Wysoko i nisko konserwowane aminokwasy oznaczono odpowiednio na czerwono i niebiesko. # oznacza D, E, Q lub N. Żółtym tłem oznaczono bakteriocyny wybrane do badań. \* oznaczono hipotetyczne bakteriocyny wybrane do badań na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej do pozostałych członków rodziny. Rysunek wykonano przy użyciu programu MultAlin.

z badanymi bakteriocynami lokalizują się w obrębie HP2, TH1 i TH3 podjednostek IICIID, oraz w zewnątrzkomórkowej pętli podjednostki IID (pomiędzy TH3 i TH4; głównie w regionach  $\gamma$  i  $\gamma^+$ ). Zaobserwowano, że pomimo tego, iż badane bakteriocyny posiadają inne wzorce wiązania Man-PTS, ogólna lokalizacja aminokwasów zaangażowanych w ich wiązanie jest zbliżona. Co więcej, koreluje ona z lokalizacją aminokwasów Man-PTS<sub>L. monocytogenes</sub> zaangażowanych w wiązanie PedPA-1, co pozwala przypuszczać, że badane bakteriocyny posiadają zbliżony do PedPA-1 mechanizm tworzenia porów [10]. Lokalizację omawianych aminokwasów przedstawiono na rycinie 3A.

#### MECHANIZM TWORZENIA PORÓW PRZEZ BAKTERIOCYN Y ATAKUJĄCE MAN-PTS

Analiza lokalizacji aminokwasów Man-PTS zaangażowanych w wiązanie bakteriocyn wykazała, że znajdują się one w zewnątrzkomórkowej pętli domeny rusztowania oraz na styku domen transportowej i rusztowania. Na tej podstawie zaproponowano, że regiony  $\gamma$  i  $\gamma^+$ , eksponowane na powierzchni domeny rusztowania, stanowią miejsce dokowania badanych bakteriocyn na komórce. Następnie bakteriocyny lokalizują się między domenami transportową i rusztowania - działając jak klin odsuwają je od siebie i wchodzi w błonę komórkową prowadząc do powstania porów, przez które dochodzi do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych i śmierci bakterii [10]. Mechanizm ten dodatkowo potwierdza podobieństwo sekwencji aminokwasowej między badanymi bakteriocynami, a transbłonowymi regionami białek transportujących jony i aminokwasy [33-35]. Dla przykładu, C-terminalna  $\alpha$ -helikalna część

GarQ wykazuje wysokie podobieństwo do sodowo-prolinowego transportera (ang. *sodium:proline solute transporter*), a co za tym idzie prawdopodobnie to właśnie ona odpowiada za odpychanie domen Man-PTS i tworzenie poru w błonie [33]. Zaproponowany mechanizm tworzenia porów przez GarQ przedstawiono na rycinie 3B. Niemniej jednak, w celu weryfikacji przedstawionego modelu niezbędne są dalsze badania.

#### BADANIA NAD MECHANIZMAMI POWSTAWANIA OPORNOŚCI NA BAKTERIOCYN Y AUREOCYNO A53- I ENTEROCYNO L50-PODOBNE

Druą grupą bakteriocyn, wybrana do badań ze względu na swoje interesujące właściwości, obejmowała bakteriocyny aureocyno A53 (AurA53)- i enterocyno L50 (EntL50)-podobne produkowane przez wiele gatunków bakterii z rodzajów *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* i *Weissella*. Według danych literaturowych pochodzących sprzed rozpoczęcia prezentowanych badań rodzina bakteriocyn AurA53-podobnych obejmuje sześć bakteriocyn jednopeptydowych o długości 43-53 aminokwasów, natomiast rodzina bakteriocyn EntL50-podobnych zawiera cztery bakteriocyny jedno- lub dwupeptydowe o długości 42-44 aminokwasów. Bakteriocyny te wykazują wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowych w obrębie swoich rodzin i jego brak między rodzinami. Mimo to wszystkie posiadają wysoc dodatni ładunek i saponino-podobną strukturę, która pozwala im na permeabilizację błony komórkowej szerokiego spektrum bakterii, w tym bakterii patogennych, bez obecności specyficznego receptora [43]. Do badań wybrano cztery znane bakteriocyny - BHT-B, EntL50 (EntL50A i En-

tL50B), enterocynę 7 (Ent7: Ent7A i Ent7B) i weisellicynę M (WelM), oraz dwie hipotetyczne bakteriocynty – K411 i salicycynę C (SalC), które przedstawiono na rycinie 4.

Badania prowadzono według schematu przedstawionego na rycinie 1. W pierwszym kroku wykazano, że BHT-B, K411, EntL50, Ent7, WelM i SalC posiadają szerokie spektra aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wszystkie bakteriocynty wykazywały aktywność antagonistyczną wobec bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, a niektóre z nich także przeciwko MRSA (BHT-B, K411, EntL50, Ent7 i WelM), *Campylobacter jejuni* i *Pseudomonas aeruginosa* (EntL50, Ent7, WelM i SalC) [44]. Jest to o tyle wyjątkowe odkrycie, że bakteriocynty produkowane przez bakterie Gram-dodatnie zazwyczaj nie wykazują aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych (*C. jejuni* i *P. aeruginosa*) ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej. Tym samym pokazano szeroki potencjał aplikacyjny badanych bakteriocynty i potwierdzono przynależność K411 i SalC do grupy aktywnych bakteriocynty AurA53- i EntL50-podobnych [10].

Następnie otrzymano mutanty spontaniczne odporne na wszystkie badane bakteriocynty poprzez ekspozycję wysoce wrażliwego szczepu *L. lactis* LMG7 3419 na działanie BHT-B, K411 lub Ent7. Sekwencjonowanie genomów mutantów opornych wykazało, że mutacje zaangażowane w nadawanie oporności na badane bakteriocynty są w genach: (i) *dgkB* kodującym kinazę diacylglicerolu; (ii) *dxsA* kodującym syntazę 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanu; oraz (iii) *ysaCB* kodujących ABC transporter YsaCB, składnik czterokomponentowego systemu regulacyjnego YsaCB-KinG-LlrG [44,45]. Ponowna mutageniza z wykorzystaniem szczepu *L. lactis* z delecją *ysaCB* wykazała, że również mutacja w genie *llrG* kodujący regulator transkrypcji LlrG (składnik systemu YsaCB-KinG-LlrG) jest zaangażowana w nadawanie oporności na badane bakteriocynty [44]. Co ciekawe, otrzymane mutanty charakteryzowały się dużo niższymi poziomami oporności (2–32-krotny spadek wrażliwości) w porównaniu do mutantów niosących mutacje w genach kodujących Man-PTS (nawet >1024-krotny spadek wrażliwości), co dodatkowo potwierdza, że nabywanie oporności na bakteriocynty aktywne wobec błony komórkowej jest dużo trudniejsze i bakteriocynty posiadające taki mechanizm działania mają wysoki potencjał aplikacyjny [10].

#### **BADANIA OPORNOŚCI KRZYŻOWEJ UZYSKANYCH MUTANTÓW NA ANTYBIOTYKI**

Bakteriocynty zwykle różnią się mechanizmem działania od antybiotyków, dlatego przyjmuje się, że mechanizmy oporności na te dwie grupy środków przeciwdrobnoustrojowych będą również inne, a szczepy odporne na antybiotyki pozostaną podatne na leczenie bakteriocynami [46]. Jednak, jak wykazano w prezentowanej rozprawie, mutanty spontaniczne odporne na bakteriocynty AurA53- i EntL50-podobne wykazują oporność krzyżową na niektóre inne związki przeciwbakteryjne. Wszystkie mutanty wykazywały zmniejszoną wrażliwość na dwie bakteriocynty atakujące lipid II, nizynę i Lcn972, oraz dwa antybiotyki peptydowe, gramicydynę i daptomycynę [44,45]. Gramicydyna działa

poprzez dimeryzację i tworzenie kanałów jonowych w błonie [47] natomiast daptomycyna (w obecności Ca<sup>2+</sup>) oligomeryzuje i tworzy kompleksy z fosfatydyloglicerolem i prekursorami ściany komórkowej, takimi jak lipid II, hamując syntezę peptydoglikanu i reorganizując błonę komórkową [48,49]. Co więcej, mutanty niosące mutacje w genach *dgkB* lub *dxsA* wykazały zmniejszoną wrażliwość na wankomycynę - glikopeptyd, który posiada ładunek dodatni i wiąże się z D-alanylo-D-alaniną blokując syntezę ściany komórkowej oraz kilka antybiotyków niepeptydowych, które mają ładunek dodatni i oddziałują z celami wewnątrzkomórkowymi (gentamycyna, kanamycyna, streptomycyna) lub hamują syntezę ściany komórkowej (fosfomycyna) [45]. Tym samym pokazano, że bakterie mogą wykształcać symultaniczną oporność na bakteriocynty i antybiotyki o zbliżonych mechanizmach działania na ścianę i/lub błonę komórkową bakterii.

Przeprowadzone analizy wykazały nieznane wcześniej, ale niezwykle istotne dla ograniczenia rozwoju lekooporności, zjawisko zwiększania wrażliwości na niektóre antybiotyki w mutantach opornych na bakteriocynty AurA53- i EntL50-podobne. Wszystkie otrzymane mutanty wykazywały zwiększoną wrażliwość na bacytracynę [44,45], antybiotyk peptydowy, który hamuje defosforylację pirofosforanu baktopenolu zakłócając w ten sposób syntezę ściany komórkowej [50]. Dodatkowo mutanty niosące mutacje w genach *dgkB* lub *dxsA* wykazywały zmniejszoną wrażliwość na ujemnie naładowaną karbenicylinę i chlorotetracyklinę [45]. Jest to wyjątkowe odkrycie, które ma szansę zostać wykorzystane do tworzenia preparatów wieloskładnikowych zawierających zarówno wybrane bakteriocynty AurA53- lub EntL50-podobne jak i bacytracynę, co pozwoliłoby im wydajnie działać przeciwbakteryjnie przy jednoczesnym ograniczeniu powstawania zjawiska oporności [10]. Warto zaznaczyć, że są to najobszerniejsze jak dotąd badania wykazujące korelację pomiędzy mechanizmami oporności na bakteriocynty i antybiotyki działające na otoczkę komórkową.

#### **MECHANIZM NADAWANIA OPORNOŚCI PRZEZ MUTACJE W GENACH KODUJĄCYCH BIAŁKA METABOLIZMU LIPIDÓW**

Kinaza diacylglicerolu DgkB jest kluczowym enzymem w metabolizmie lipidów, który ponownie wprowadza diacyloglicerol, powstały w procesie biosyntezy kwasów lipotejchojowych, do szlaku biosyntezy fosfolipidów [51]. Inaktywacja DgkB prowadzi do śmierci bakterii z powodu akumulacji diacylglicerolu lub brak kwasów lipotejchojowych [52]. Mutacje spontaniczne zidentyfikowane w *dgkB* nie doprowadziły do śmierci otrzymanych mutantów, co pozwoliło przypuszczać, że nie spowodowały one inaktywacji kodowanego białka, a raczej zmianę jego aktywności. Hipotezę tę potwierdziły analizy miejsc mutacji w przewidywanej strukturze trzeciorzędowej białka. Na ich podstawie zaproponowano, że mutacje *dgkB* prowadzą do powstania białka o zmniejszonej aktywności, co przekłada się na zmniejszenie liczby anionowych kwasów lipotejchojowych i całkowitego ładunku ujemnego ściany komórkowej. To z kolei czyni komórki mniej wrażliwymi na kationowe środki przeciwdrobnoustrojowe, takiej jak bakteriocynty AurA53-



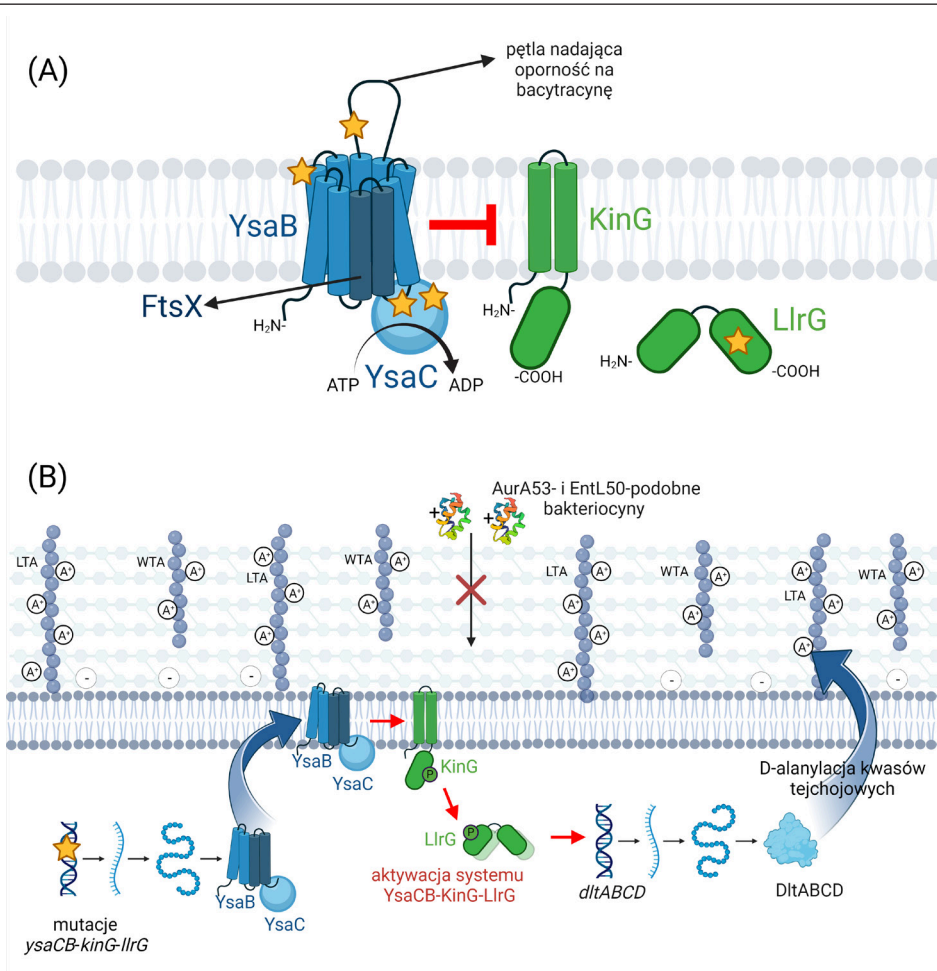
i EntL50-podobne, i bardziej wrażliwymi na te anionowe [10,45].

DxsA jest kluczowym enzymem w biosyntezie izoprenoidów, katalizującym pierwszy etap szlaku syntezy prekursorów izoprenoidów (pirofosforanu izopentenylu i pirofosforanu dimetyloallilu) [53]. Zarówno delecja jak i nadekspresja *dxsA* nie miała istotnego wpływu na wrażliwość otrzymanych szczepów na bakteriocyny i antybiotyki. Co więcej, analizy z wykorzystaniem przewidywanej struktury trzeciorzędowej DxsA, wykazały, że mutacja spontaniczna w *dxsA* prawdopodobnie doprowadziła do powstania skróconego białka z zachowanym miejscem aktywnym. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że mutacja spontaniczna spowodowała specyficzną zmianę aktywności DxsA, co z kolei wpłynęło na liczbę powstających izoprenoidów. Największe zmiany we wrażliwości bakterii zaobserwowano w obecności związków działających na błony komórkowe, dlatego wysunięto hipotezę, że to właśnie zwiększenie ilości hopanoidów – najbardziej rozpowszechnionych izoprenoidów u bakterii, które wbudowują się w błony cytoplazmatyczne nadając im sztywność i wytrzymałość, odpowiadały za zaobserwowaną oporność [10,45]. Niemniej jednak dalsze badania są niezbędne aby potwierdzić zaproponowane mechanizmy. Co ważne, były to pierwsze badania pokazujące zaangażowanie DgkB i DxsA w oporność bakterii na bakteriocyny.

## MECHANIZM NADAWANIA OPORNOŚCI PRZEZ MUTACJE W GENACH KODUJĄCYCH BIAŁKA SYSTEMU YsaCB-KinG-LlrG

YsaCB-KinG-LlrG jest jednym z najważniejszych systemów regulacyjnych warunkujących odpowiedź bakterii *L. lactis* na stres otoczeki. Składa się z ABC transportera YsaCB i dwukomponentowego systemu regulacyjnego KinG-LlrG, a mianowicie kinazy histydynowej KinG i regulatora transkrypcji LlrG. Uważa się, że jest to homolog prototypowego systemu BceAB-BceRS, który odpowiada za oporność bakterii *Bacillus subtilis* na AMPs, np. bacytracynę [54]. Aczkolwiek, jak wykazały przeprowadzone badania, wykazuje on również podobieństwo do innych systemów regulacyjnych obecnych w *B. subtilis* [44] i nie powinien być traktowany jako bezpośredni odpowiednik żadnego z nich. Zaangażowanie YsaCB-KinG-LlrG w oporność na bakteriocyny atakujące lipid II (nizynę i Lcn972) zostało opisane w literaturze [55,56], jednak przeprowadzone badania pozwoliły po raz pierwszy wykazać zaangażowanie tego systemu w oporność bakterii na bakteriocyny działające na błonę komórkową. Co więcej, pozwoliły szczegółowo scharakteryzować jego działanie [10].

Po pierwsze zidentyfikowano domenę FtsX, znajdującą się w N-terminalnej części permeazy ABC transportera YsaB, i wykazano jej kluczową rolę w nadawaniu oporności



Rycina 5. Lokalizacja zmian genetycznych nadających oporność na bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne w natywnym systemie YsaCB-KinG-LlrG (A) oraz mechanizm powstawania oporności (B). Miejsca zmienione w wyniku mutacji oznaczono gwiazdką. Rysunek wykonano w programie BioRender.

na badane bakteriocyny. Doprowadziły do tego: (i) analiza miejsc mutacji w *ysaB*, która wykazała, że wszystkie mutacje spontaniczne spowodowały powstanie skróconej permeazy YsaB zawierającej nienaruszoną domenę FtsX; oraz (ii) ekspresja regionu *ysaCB* kodującego YsaC i domenę FtsX YsaB w mutancie z delecją *ysaCB*, która zmniejszyła wrażliwość otrzymanego szczepu na badane środki przeciwbakteryjne. Ekspresja tego samego regionu w mutancie z delecją *llrG* lub regionu kodującego tylko domenę FtsX w mutancie z delecją *ysaCB* wykazała, że zarówno LlrG, jak i YsaC są niezbędne dla działania domeny FtsX, jednak dokładne poznanie mechanizmu nadawania oporności przez FtsX wymaga dalszych badań [10,44].

Po drugie pokazano, że mutacja spontaniczna w *llrG* warunkująca oporność na badane bakteriocyny przy braku ABC transportera YsaCB, znajduje się w motywie wiążącym DNA domeny efektorowej LlrG i prawdopodobnie prowadzi do zmiany aktywności białka. Badania transkryptyczne metodą RT-qPCR wykazały, że mutacja zidentyfikowana w *llrG*, a także mutacje w *ysaB*, prowadzą do zwiększenia transkrypcji operonów *dltABCD* i *ysaDCB*. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że bakterie wrażliwe nabywają oporność na bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne, oraz niektóre antybiotyki peptydowe (daptomycynę i gramicydynę), poprzez aktywację systemu YsaCB-KinG-LlrG, a dokładniej regulatora transkrypcji LlrG. Aktywacja LlrG prowadzi do zwiększenia ekspresji operonu *dlt*, a to z kolei do D-alanylation kwasów teichojowych i zmniejszenia ładunku ujemnego ściany komórkowej, co uodpornia komórki na środki przeciwbakteryjne naładowane dodatnio i/lub skierowane na błonę. Co ważne, przeprowadzone badania pokazały, że jedynie natywny system YsaCB-KinG-LlrG zapewnia ochronę przed bacytracyną i to właśnie modyfikacje permeazy YsaB (a w szczególności utrata jej zewnątrzkomórkowej pętli) w szczepach opornych zwiększają wrażliwość na ten antybiotyk [10,44]. Mechanizm nadawania oporności na bakteriocyny przez system YsaCB-KinG-LlrG przedstawiono na rycinie 5.

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat biologii bakteriocyn a tym samym oferują nowe perspektywy zwiększenia ich potencjału aplikacyjnego. Do najważniejszych wniosków przeprowadzonych badań można zaliczyć wykazanie, że (i) badane bakteriocyny wykazują potencjał w leczeniu zakażeń szpitalnych wywołanych przez *E. faecalis*, *E. faecium* (GarQ, BacSJ, bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne), *S. aureus* i *Streptococcus* spp. (bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne), zakażeń odżywnościowych wywołanych przez *L. monocytogenes* (GarQ, BacSJ, bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne) i *C. jejuni* (bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne), oraz zakażeń wywołanych przez patogenne szczepy *L. garvieae* (GarA, GarB i GarC); (ii) kompleks błonowy Man-PTS, dzięki swojej unikalnej, gatunkowo-specyficznej budowie, pełni funkcję receptora dla nowej rodziny bakteriocyn o zróżnicowanych strukturach i spektrach aktywności przeciwbakteryjnej; (iii) bakteriocyny atakujące Man-PTS posiadają zróżnicowane modele wiązania Man-PTS, ale zbliżony mechanizm działania polegający na tworzeniu poru między

domenami transportową i rusztowania; (iv) bakterie wrażliwe nabywają oporność na bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne poprzez aktywację systemu YsaCB-KinG-LlrG lub enzymów zaangażowanych w metabolizm lipidów; (v) nabywanie oporności na bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne powoduje oporność krzyżową na inne związki działające na błonę komórkową i/lub posiadające ładunek dodatni (daptomycyna, gramicydyna), zmniejsza wrażliwość bakterii na bacytracynę [10].

Co więcej, przeprowadzone badania pozwalają wytypować bakteriocyny, które spełniają kryteria innowacyjności w stosunku do znanych związków przeciwdrobnoustrojowych, mianowicie przynależą do nowej klasy, nie wykazują oporności krzyżowej ze znanymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi, i posiadają unikatowy mechanizm lub cel działania w komórce bakteryjnej. Man-PTS nie jest wykorzystywany jako receptor przez obecnie stosowane antybiotyki, a co więcej, jest nieobecny w komórkach eukariotycznych, co oznacza, że bakteriocyny atakujące Man-PTS posiadają aktywność wobec antybiotykoopornych szczepów bakterii, a jednocześnie brak lub bardzo niską toksyczność. Chociaż bakteriocyny AurA53- i EntL50-podobne działają na błony komórkowe, podobnie jak niektóre antybiotyki nowej generacji np. gramicydyna, posiadają unikatowy mechanizm działania i aktywność wobec bakterii opornych na tradycyjne antybiotyki, które działają na różnych etapach syntezy ściany komórkowej lub na cele wewnątrzkomórkowe [10].

Zastosowana tu nowatorska strategia badawcza może służyć jako model do dalszych badań pozwalających na identyfikację nowych bakteriocyn, mechanizmów ich działania i nabywania oporności przez bakterie wrażliwe. Wiedza na temat receptorów bakteriocyn i wzorców wiązania bakteriocyna-receptor może zostać wykorzystana do projektowania nowych AMP, lub do modyfikowania znanych, w celu zwiększenia ich siły działania lub nadania im aktywności wobec wybranych gatunków bakterii. Z kolei wiedza na temat korelacji pomiędzy mechanizmami oporności na bakteriocyny i antybiotyki może zostać wykorzystana do tworzenia preparatów wieloskładnikowych o zwiększonej aktywności i zmniejszonym ryzyku powstawania oporności [10].

## PIŚMIENNICTWO

1. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629–655
2. O'Neill J (2014) Review on antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. HM Government, Wellcome Trust
3. World Health Organization (2022) 2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. World Health Organization
4. World Health Organization (2015) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organization
5. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. (2016) Antimicrobial-resistant pathogens associated with health-care-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37:1288–1301

6. Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 5:241
7. Negash AW, Tsehai BA (2020) Current applications of bacteriocin. *Int J Microbiol* 2020:4374891
8. Kamarajan P, Hayami T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, et al. (2015) Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS One* 10:e0131008
9. Huang F, Teng K, Liu Y, Cao Y, Wang T, Ma C, et al. (2021) Bacteriocins: potential for human health. *Oxid Med Cell Longev* 2021:5518825
10. Tymoszevska A (2022) Class II bacteriocins of Gram-positive bacteria – interactions with the receptor and the development of resistance. [Doctoral dissertation, Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences]
11. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S (2019) Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb Pathog* 128:171–177
12. Vaccaro AM, Salvioli R, Tatti M, Ciaffoni F (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res* 24:307–314
13. Towle KM, Vederas JC (2017) Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Medchemcomm* 8:276–285
14. Kjos M, Nes IF, Diep DB (2009) Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology (Reading)* 155:2949–2961
15. Medeiros-Silva J, Jekhmane S, Paioni AL, Gawarecka K, Baldus M, Swiezewska E, et al. (2018) High-resolution NMR studies of antibiotics in cellular membranes. *Nat Commun* 9:3963
16. Martínez B, Böttiger T, Schneider T, Rodríguez A, Sahl H-G, Wiedemann I (2008) Specific interaction of the unmodified bacteriocin lactococcin 972 with the cell wall precursor lipid II. *Appl Environ Microbiol* 74:4666–4670
17. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57:543–594
18. Diep DB, Skaugen M, Salehian Z, Holo H, Nes IF (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2384–2389
19. Gabrielsen C, Brede DA, Hernández PE, Nes IF, Diep DB (2012) The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2908–2915
20. Uzelac G, Kojic M, Lozo J, Aleksandrak-Piekarczyk T, Gabrielsen C, Kristensen T, et al. (2013) A Zn-dependent metalloproteinase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J Bacteriol* 195:5614–5621
21. Ovchinnikov KV, Kristiansen PE, Straume D, Jensen MS, Aleksandrak-Piekarczyk T, Nes IF, et al. (2017) The leaderless bacteriocin enterocin K1 is highly potent against *Enterococcus faecium*: a study on structure, target spectrum and receptor. *Front Microbiol* 8:774
22. Kjos M, Oppegård C, Diep DB, Nes IF, Veening J-W, Nissen-Meyer J, et al. (2014) Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol Microbiol* 92:1177–1187
23. Oppegård C, Kjos M, Veening J-W, Nissen-Meyer J, Kristensen T (2016) A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Microbiologyopen* 5:700–708
24. Heeney DD, Yarov-Yarovsky V, Marco ML (2019) Sensitivity to the two peptide bacteriocin plantaricin EF is dependent on CorC, a membrane-bound, magnesium/cobalt efflux protein. *Microbiologyopen* 8:e827
25. Kjos M, Nes IF, Diep DB (2011) Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol* 77:3335–3342
26. Draper LA, Cotter PD, Hill C, Ross RP (2015) Lantibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:171–191
27. López-González MJ, Escobedo S, Rodríguez A, Neves AR, Janzen T, Martínez B (2018) Adaptive evolution of industrial *Lactococcus lactis* under cell envelope stress provides phenotypic diversity. *Front Microbiol* 9:2654
28. Schrecke K, Staroń A, Mascher T (2012) Two-component signalling in the Gram-positive envelope stress response: intramembrane-sensing histidine kinases and accessory membrane proteins, W: Gross R, Beier D (red) Two-component systems in bacteria. Caister Academic Press, U.K., str. 199–229
29. Tosukhowong A, Zendo T, Visessanguan W, Roytrakul S, Pumpuang L, Jaresitthikunchai J, et al. (2012) Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. *Appl Environ Microbiol* 78:1619–1623
30. Lozo J, Jovicic B, Kojic M, Dalgarrondo M, Chobert J-M, Haertlé T, et al. (2007) Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr Microbiol* 55:266–271
31. Kojic M, Lozo J, Jovicic B, Strahinic I, Fira D, Topisirovic L (2010) Construction of a new shuttle vector and its use for cloning and expression of two plasmid-encoded bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8. *Int J Food Microbiol* 140:117–124
32. Maldonado-Barragán A, Cárdenas N, Martínez B, Ruiz-Barba JL, Fernández-Garayzábal JF, Rodríguez JM, et al. (2013) Garvicin A, a novel class II d bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Appl Environ Microbiol* 79:4336–4346
33. Tymoszevska A, Diep DB, Wirtek P, Aleksandrak-Piekarczyk T (2017) The non-lantibiotic bacteriocin garvicin Q targets Man-PTS in a broad spectrum of sensitive bacterial genera. *Sci Rep* 7:8359
34. Tymoszevska A, Walczak P, Aleksandrak-Piekarczyk T (2020) BacSJ – another bacteriocin with distinct spectrum of activity that targets Man-PTS. *Int J Mol Sci* 21:7860
35. Tymoszevska A, Diep DB, Aleksandrak-Piekarczyk T (2018) The extracellular loop of Man-PTS subunit IID is responsible for the sensitivity of *Lactococcus garvieae* to garvicins A, B and C. *Sci Rep* 8:15790
36. Oftedal TF, Ovchinnikov KV, Hestad KA, Goldbeck O, Porcellato D, Narvhus J, et al. (2021) Ubericin K, a new pore-forming bacteriocin targeting mannose-PTS. *Microbiol Spectr* 9:e0029921
37. Daba GM, Ishibashi N, Gong X, Taki H, Yamashiro K, Lim YY, et al. (2018) Characterisation of the action mechanism of a *Lactococcus*-specific bacteriocin, lactococcin Z. *J Biosci Bioeng* 126:603–610
38. Vogel V, Olari L-R, Jachmann M, Reich SJ, Häring M, Kissmann A-K, et al. (2022) The bacteriocin Angicin interferes with bacterial membrane integrity through interaction with the mannose phosphotransferase system. *Front Microbiol* 13:991145
39. Whitford MF, McPherson MA, Forster RJ, Teather RM (2001) Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. *Appl Environ Microbiol* 67:569–574
40. Kjos M, Salehian Z, Nes IF, Diep DB (2010) An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J Bacteriol* 192:5906–5913
41. Zhu L, Zeng J, Wang C, Wang J (2021) Structural basis of pore formation in the mannose phosphotransferase system by pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol* 88:e0199221
42. Liu X, Zeng J, Huang K, Wang J (2019) Structure of the mannose transporter of the bacterial phosphotransferase system. *Cell Res* 29:680–682
43. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2018) Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Front Microbiol* 9:2085
44. Tymoszevska A, Ovchinnikov KV, Diep DB, Słodownik M, Maron E, Martínez B, et al. (2021) *Lactococcus lactis* resistance to aureocin A53- and enterocin L50-like bacteriocins and membrane-targeting peptide antibiotics relies on the YsaCB-KinG-LlrG four-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0092121



45. Tymoszevska A, Aleksandrak-Piekarczyk T (2021) The lactococcal *dgb* (*yecE*) and *dxsA* genes for lipid metabolism are involved in the resistance to cell envelope-acting antimicrobials. *Int J Mol Sci* 22:1014
46. Gradisteanu Pircalabioru G, Popa LI, Marutescu L, Gheorghe I, Popa M, Czobor Barbu I, et al. (2021) Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge. *Pharmaceutics* 13:196
47. Chen CH, Lu TK (2020) Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics (Basel)* 9:24
48. Müller A, Wenzel M, Strahl H, Grein F, Saaki TNV, Kohl B, et al. (2016) Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E7077–E7086
49. Grein F, Müller A, Scherer KM, Liu X, Ludwig KC, Klöckner A, et al. (2020) Ca<sup>2+</sup>-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nat Commun* 11:1455
50. Economou NJ, Cocklin S, Loll PJ (2013) High-resolution crystal structure reveals molecular details of target recognition by bacitracin. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14207–14212
51. Miller DJ, Jerga A, Rock CO, White SW (2008) Analysis of the *Staphylococcus aureus* DgkB structure reveals a common catalytic mechanism for the soluble diacylglycerol kinases. *Structure* 16:1036–1046
52. Jerga A, Lu Y-J, Schujman GE, de Mendoza D, Rock CO (2007) Identification of a soluble diacylglycerol kinase required for lipoteichoic acid production in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 282:21738–21745
53. Xiang S, Usunow G, Lange G, Busch M, Tong L (2007) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J Biol Chem* 282:2676–2682
54. Staroń A, Finkeisen DE, Mascher T (2011) Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:515–525
55. Campelo AB, López-González MJ, Escobedo S, Janzen T, Neves AR, Rodríguez A, et al. (2020) Mutations selected after exposure to bacteriocin Lcn972 activate a Bce-like bacitracin resistance module in *Lactococcus lactis*. *Front Microbiol* 11:1805
56. Kramer NE, van Hijum SAFT, Knol J, Kok J, Kuipers OP (2006) Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1753–1761

# Studies on the mechanisms of action and development of resistance to class II bacteriocins of Gram-positive bacteria

Aleksandra Tymoszevska✉, Tamara Aleksandrak-Piekarczyk

Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warszawa

✉corresponding author: tymoszevska@ibb.waw.pl

**Keywords:** bacteriocin receptors, class II bacteriocins, *Lactococcus lactis*, mannose-specific phosphotransferase system (Man-PTS), resistance mechanisms, YsaCB-KinG-LlrG regulatory system

## ABSTRACT

Bacteriocins are peptides or proteins produced by bacteria to kill or inhibit the growth of other bacteria inhabiting the same ecological niche. The growing interest in bacteriocins reflects their potential use in food preservation and treatment of infections caused by antibiotic-resistant pathogenic bacteria, among other applications. The number of published studies on the identification of new bacteriocin-producing strains is constantly increasing. At the same time, there is a noticeable lack of research describing the mechanisms of action of most newly identified bacteriocins, as well as the mechanisms leading to the development of resistance to these bacteriocins and cross-resistance to antibiotics. Detailed understanding of these issues will allow to develop guidelines ensuring the most effective, safe and long-term use of bacteriocins without the risk of resistance development. This work describes the main assumptions of the doctoral dissertation of Aleksandra Tymoszevska, which objectives were to characterize the mechanisms of action and of resistance to class II bacteriocins of Gram-positive bacteria. Using the model bacterium *Lactococcus lactis*, two groups of bacteriocins were examined: (i) garvicins Q, A, B and C, and BacSJ; and (ii) aureocin A53 (AurA53)- and enterocin L50 (EntL50)-like bacteriocins. Bacteriocins of group (i) have been shown to recognize susceptible cells and form pores in the cell membrane using a specific receptor, the mannose-specific phosphotransferase system (Man-PTS), and sensitive bacteria have been shown to acquire resistance to these bacteriocins by modifying the structure of Man-PTS. On the other hand, the acquisition of resistance to group (ii) membrane-targeting and receptor-independent bacteriocins occurs through changes in the structure of the bacterial cell wall and membrane, which are induced by changes in the expression of proteins involved in lipid metabolism or components of the YsaCB-KinG-LlrG regulatory system. The results shed new light on previous views on the mechanisms of action of bacteriocins and open up opportunities for their further study.

