

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza potencjału inhibicyjnego pałeczek *Yersinia enterocolitica* wobec proteaz cysteinowych z rodziny papainy”

STRESZCZENIE

Proteazy cysteinowe z rodziny papainy stanowią szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie grupę enzymów, które odgrywają ważne role fizjologiczne w wielu organizmach. W komórkach zwierzęcych występują głównie wewnątrz lizosomów pod nazwą katepsyn cysteinowych i są zaangażowane między innymi w trawienie białek, aktywację proenzymów, dojrzewanie prohormonów, resorpcję kości, apoptozę i odpowiedzi odpornościowe w postaci fagocytozy i prezentacji antygeny. Nadmierny wzrost ich aktywności jest częstą przyczyną rozwoju różnych stanów patologicznych, w tym zapaleń stawów i kości, osteoporozy, miażdżycy, dystrofii mięśniowej oraz szeregu nowotworów. Wobec tego, sporą nadzieję pokłada się w zastosowaniu inhibitorów tych proteaz jako potencjalnych leków przeciwko wyżej wymienionym chorobom. Takie inhibitory zwykle syntetyzuje się w laboratoriach lub izoluje z różnych organizmów. Saprofityczne i pasożytnicze drobnoustroje nieraz wytwarzają inhibitory, które hamują aktywność katepsyn cysteinowych żywiciela, biorących udział w odpowiedziach odpornościowych. W ten sposób mikroorganizmy ograniczają te odpowiedzi i zapewniają sobie przetrwanie wewnątrz ustroju gospodarza.

Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Yersinia enterocolitica* są wewnątrzkomórkowymi patogenami ludzi i zwierząt. Wykształciły różne mechanizmy, by uniknąć fagocytozy przez komórki żerne układu immunologicznego, jednak dotychczas nie wykazano, aby produkowały jakiegokolwiek inhibitorów proteaz cysteinowych. Biorąc pod uwagę potencjalne znaczenie takich czynników w patofizjologii bakterii, jak również ich możliwe zastosowanie w medycynie, w niniejszej pracy za główny cel obrano analizę potencjału inhibicyjnego *Y. enterocolitica* wobec proteaz cysteinowych z rodziny papainy.

Pomiary aktywności enzymatycznej, wykonane przy użyciu fluorogennego substratu, udowodniły, że środowiskowe szczepy *Y. enterocolitica*, wyizolowane z roniących loch i poronionych świńskich płodów oraz należące do różnych bioserotypów i genotypów, wytwarzały inhibitory papainy i ludzkiej katepsyny L, ale nie wołowej katepsyny B. Właściwości inhibicyjne względem proteaz wykryto w ekstraktach z bakterii i na powierzchni ich komórek. W czasie hodowli szczepy wydzielają też do podłoża inhibitory papainy. Pałeczki synte-

tyzowały inhibitory peptydaz w różnych fazach wzrostu (wykładniczej i stacjonarnej) oraz temperaturach (optymalnej dla nich 28 °C i panującej w organizmie człowieka-żywiciela 37 °C). Zwiększona sekrecja inhibitorów papainy do podłoża następowała w wyniku hodowli bakterii w warunkach stresu środowiskowego (w „głodowym” podłożu minimalnym).

Następnie, przy użyciu fluorymetrii i zymografii dokonano biochemiczno-molekularnej charakterystyki właściwości inhibicyjnych *Y. enterocolitica*. Okazało się, że występujące na powierzchni komórek inhibitory papainy i katepsyny L wiązały się peryferyjnie z błoną zewnętrzną poprzez oddziaływania hydrofobowe i/lub elektrostatyczne. Natomiast, obecne w ekstraktach inhibitory tych peptydaz były termolabilne (wrażliwe na działanie temperatur wyższych niż 40 °C) i stabilne w zakresie wartości pH 5-9 (zachowując ponad 90% aktywności inhibitorowej). Hamowały one proteazy w sposób odwracalny. Stanowiły je związki wysokocząsteczkowe; metodą zymografii odwróconej zidentyfikowano cztery białkowe inhibitory papainy o różnych masach – od poniżej 50 kDa do ponad 120 kDa.

Potencjał inhibicyjny *Y. enterocolitica* porównano z wpływem innych Gram-ujemnych bakterii na aktywność proteaz cysteinowych. Ekstrakty z klinicznego szczepu *Escherichia coli* H64 i referencyjnego szczepu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hamowały papainę, katepsynę L i, w przeciwieństwie do ekstraktów z *Y. enterocolitica*, katepsynę B. Powierzchnie tych pałeczek ograniczały aktywność papainy i katepsyny L (podobnie jak komórki *Y. enterocolitica*), a w czasie hodowli bakterie wydzielały do podłoża inhibitory papainy (*P. aeruginosa* także inhibitory katepsyny L).

Metodą chromatografii powinowactwa do papainy, z ekstraktów *Y. enterocolitica* i *E. coli* wyizolowano białko o masie cząsteczkowej około 18 kDa. Tylko to białko komórkowe silnie oddziaływało z papainą w złożu chromatograficznym i przy pomocy LC-MS/MS zidentyfikowano je jako peryplazmatyczny chaperon Skp, który uczestniczy w kontroli prawidłowego fałdowania wielu wirulentnych białek błony zewnętrznej u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Eluaty zawierające Skp, w odróżnieniu od eluatów bez tego białka, hamowały aktywność papainy i katepsyny L. Dodatkowo, eluat z chaperonem, otrzymany w wyniku chromatografii ekstraktu z *Y. enterocolitica*, a następnie pozbawiony wszelkich związków niskocząsteczkowych za pomocą dializy, hamował aktywność katepsyn cysteinowych wytwarzanych przez ludzkie fibroblasty z linii NHDF. Pozwoliło to z wysokim prawdopodobieństwem założyć, że chaperon Skp jest potencjalnym inhibitorem proteaz cysteinowych, tym samym wskazując na nową możliwą jego rolę biologiczną. Istnieje jednak potrzeba przeprowadzenia dalszych badań, by jednoznacznie potwierdzić to przypuszczenie.

Mateusz Kędzior