

Streszczenie rozprawy doktorskiej „Badania nad biosyntezą oraz aktywnością prozapalną form bakteriocyny peptydowej BacSp222”

Bakteriocyny to szeroko rozpowszechniona grupa peptydów i białek bakteryjnych, które hamują wzrost blisko spokrewnionych (względem producenta) gatunków bakterii. Związki te badane są głównie pod względem aktywności bakteriobójczej i potencjalnego wykorzystania w terapii zakażeń, przemyśle spożywczym lub rolnictwie. Nadal jednak nie jest dobrze poznany potencjalny wpływ bakteriocyn na komórki gospodarza.

Niedawno odkryta bakteriocyna peptydowa BacSp222 produkowana przez odzwierzęcy szczep *Staphylococcus pseudintermedius* 222 to pierwsza znana bakteriocyna, która potranslacyjnie ulega bursztynylacji na grupie ϵ -aminowej reszt lizyny. BacSp222 wykazuje działanie przeciwbakteryjne względem bakterii Gram-dodatnich i posiada również cechy czynnika wirulencji oraz peptydu pobudzającego układ odpornościowy gospodarza.

W badaniach objętych niniejszą rozprawą wykazano, że bursztynylacja BacSp222 przez szczep producencki zależna jest od warunków środowiska takich jak temperatura, pH otoczenia, dostęp do składników odżywczych oraz dostęp do wybranego źródła węgla, a także od obecności związku stresogennego jakim jest tlenek azotu. Bursztynylacja BacSp222 może zachodzić w warunkach *in vitro* w reakcji nieenzymatycznej, gdy donorem grupy bursztynylowej jest bursztynylo-koenzym A - istotny składnik metabolizmu komórkowego, m.in. w cyklu Krebsa. Natomiast reakcja debursztynylacji w warunkach *in vitro* wymaga obecności lizatu bakteryjnego oraz formy utlenionej dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, co świadczy o tym, że reakcja ta jest najprawdopodobniej enzymatyczna.

Bursztynylacja BacSp222 znacząco redukuje właściwości lityczne bakteriocyny, zarówno względem komórek bakteryjnych jak i eukariotycznych. Modyfikowane formy BacSp222 mają także znacząco niższą aktywność bójczą względem komórek producenta, co sugeruje, że bursztynylacja peptydu może być formą autoochrony przed toksycznym działaniem bakteriocyny na producenckie komórki *Staphylococcus pseudintermedius* 222. Biorąc pod uwagę znane ukierunkowane działanie BacSp222 na membrany bakteryjne, obserwowane obniżenie aktywności litycznej form potranslacyjnie modyfikowanych BacSp222 względem cząsteczki niemodyfikowanej spowodowane jest najprawdopodobniej zmianą ładunku na modyfikowanych resztach lizyny z dodatniego na ujemny. Na skutek tego cząsteczka słabiej oddziałuje z dodatnio naładowanymi błonami komórkowymi bakterii.

Natomiast aktywność prozapalna form bursztynylowanych jest identyczna jak formy niemodyfikowanej BacSp222. Bakteriocyna ta rozpoznawana jest przez heterodimer receptorów TLR2/TLR6, powodując zależną od MyD88 aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W wyniku pobudzenia NF- κ B dochodzi do aktywacji syntezy wielu cytokin prozapalnych, w tym TNF (przez mysie komórki monocytarno-makrofagowe) oraz IL-8 (przez ludzkie neutrofile). Co więcej, w obecności IFN- γ BacSp222 wykazuje zdolność do pobudzania mysich komórek monocytarno-makrofagowych do produkcji indukowalnej syntazy tlenu azotu, i w konsekwencji do wydzielania

tlenku azotu. Pozbawienie cząsteczki BacSp222 N-końcowej formylowanej metioniny znacząco ogranicza właściwości zapalne peptydu, co sugeruje, że N-końcowy fragment cząsteczki jest istotny w rozpoznawaniu BacSp222 przez receptor.

BacSp222 jest pierwszą dokładnie przebadaną bakteriocyną, która wykazuje właściwości lityczne zarówno względem komórek bakteryjnych jak i eukariotycznych. Przedstawione w niniejszej pracy doświadczenia, w przeciwieństwie do wielu innych opisanych w literaturze badań związanych z tematyką bakteriocyn, wykonane były z użyciem dokładnie zweryfikowanych pod względem czystości (w tym pod względem potencjalnych zanieczyszczeń endotoksynami) preparatach. Dodatkowo, po raz pierwszy przedstawiono prozapalne właściwości cząsteczki bakteriocyny dla dokładnie zweryfikowanych, nietoksycznych stężeń BacSp222, jednocześnie rozpoznając receptor, który odpowiada za interakcję peptydu z komórkami eukariotycznymi. Uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej dane sugerują pewien potencjał BacSp222 do zastosowania w medycynie. Jako ligand receptora TLR2, cząsteczka ta może bowiem zostać wykorzystana w terapiach przeciwnowotworowych lub jako adiuwant w szczepionkach, jednak wymaga to dalszych badań.