

## STRESZCZENIE POPULARNONAUKOWE

BacSp222 to niedawno odkryta w naszym zespole bakteriocyna peptydowa produkowana przez *Staphylococcus pseudintermedius* szczep 222 - komensalną bakterią bytującą na skórze oraz na błonach śluzowych zwierząt domowych. Bakteriocyna BacSp222 zabija szerokie spektrum bakterii Gram-dodatnich, umożliwiając komórkom producenta wyeliminowanie konkurencyjnych szczepów bakteryjnych. Dotychczasowe badania nad BacSp222 koncentrowały się głównie na biologii molekularnej peptydu, na fizykochemicznym mechanizmie jego działania wobec błon bakteryjnych, a także na określeniu struktury cząsteczki peptydu techniką jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Tym niemniej, najbardziej intrygujące okazały się wyniki dowodzące, że opisana bakteriocyna nie tylko jest zdolna do zabijania bakterii, ale także wykazuje istotną aktywność wobec komórek organizmu gospodarza. Przy wyższych dawkach peptyd działa bowiem cytotoksycznie, natomiast przy stężeniach bardzo małych (nanomole/l) działa jako immunomodulatoryjny czynnik prozapalny, stymulując wydzielanie czynnika martwicy nowotworu (TNF) oraz indukując w makrofagowych liniach komórkowych produkcję tlenku azotu (NO) przez indukowaną syntazę NO (iNOS). Drugie intrygujące odkrycie wykazało, iż peptyd BacSp222 jest produkowany i wydzielany wraz ze swoimi kilkoma potranslacyjnie modyfikowanymi izoformami, zidentyfikowanymi jako pochodne bursztynylowane (butanodiowe). W odniesieniu do tych wstępnych wyników, przedstawiony projekt poświęcony jest szeroko zakrojonym badaniom nad mechanizmem powstawania wspomnianych modyfikacji potranslacyjnych bakteriocynty BacSp222, nad ich wpływem na strukturę cząsteczki peptydu oraz nad aktywnością prozapalną izoform bakteriocynty wobec komórek eukariotycznych.

Badania będą prowadzone z wykorzystaniem izoform bakteriocynty BacSp222 wyizolowanych z pożywki pochodzącej od bakterii. Jako peptyd kontrolny będzie stosowana bakteriocyna w postaci natywnej - niemodyfikowanej. Mechanizm obróbki potranslacyjnej bakteriocynty oraz wpływ czynników środowiskowych na to zjawisko będzie badany technikami chromatograficznymi. Wpływ bursztynylacji na strukturę cząsteczki BacSp222 będzie określany techniką NMR. Badania nad aktywnością bakteriobójczą oraz cytotoksyczną izoform bakteriocynty będą prowadzone na różnych szczepach bakterii oraz z wykorzystaniem modelowych linii komórkowych zwierzęcych i ludzkich, a także komórek pierwotnych. Analiza cytokin lub czynników wzrostowych wytwarzanych przez komórki po ekspozycji na izoformy bakteriocynty zostanie przeprowadzona przy użyciu cytometru przepływowego i zestawów do badania wielu cytokin. Badania nad wpływem izoform na ekspresję iNOS będą prowadzone poprzez bezpośrednie pomiary aktywności enzymu w komórkach oraz w oparciu o pomiary ekspresji genu enzymu metodą RT-PCR. Identyfikacja receptorów komórkowych zaangażowanych w rozpoznanie izoform bakteriocynty będzie przeprowadzana z wykorzystaniem ko-stymulacji komórek poprzez izoformy oraz specyficzne dla określonych receptorów związki antagonistyczne, poprzez pomiary wydzielania określonych cytokin, poprzez pomiary wewnątrzkomórkowej mobilizacji cAMP oraz/lub przy użyciu zmodyfikowanych linii komórkowych, eksponujących określone komórkowe receptory rekombinowane. Oznaczenia wpływu izoform bakteriocynty na czynniki transkrypcyjne (np. AP-1, NFκB) będą wykonywane przy użyciu elektroforetycznej techniki EMSA. Wpływ izoform bakteriocynty na morfologię komórek oraz weryfikacja ich internalizacji do wnętrza komórek będą badane za pomocą mikroskopii konfokalnej, znakowanego fluorescencyjnie peptydu i/lub technikami immunochemicznymi.

Pod względem biologicznym bakteriocynty definiuje się jako peptydy lub białka wytwarzane przez bakterie na rybosomach, zdolne do zabijania blisko spokrewnionych szczepów żyjących w tej samej niszy fizjologicznej lub ekologicznej. Cząsteczki bakteriocynty pełnią również rolę regulatorów metabolizmu bakterii zależnych od gęstości ich populacji lub obecności innych mikroorganizmów. Szacuje się, że 99% szczepów bakterii wytwarza co najmniej jedną bakteriocynę, tak więc biologiczne i ekologiczne znaczenie tych czynników jest ogromne. Ponadto, bakteriocynty lub też mikroorganizmy produkujące bakteriocynty są szeroko stosowane w produkcji żywności oraz pasz, w weterynarii i w medycynie. Realizacja badań przedstawionych w niniejszym projekcie pozwoli na zbadanie nowego potranslacyjnego mechanizmu regulacji aktywności biologicznej bakteriocynty, opartego na bursztynylacji łańcucha polipeptydowego. Pozwoli także określić, czy produkowane przez oportunistyczne patogeny bakteriocynty oraz ich zmodyfikowane izoformy mogą także odgrywać rolę czynników wirulencji, zdolnych do modulowania aktywności komórek odpornościowych zainfekowanego organizmu.