Kraków, 10.06.2019.

Doktorant: mgr Gabriela Zielińska

Zakład Biochemii Analitycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Temat rozprawy doktorskiej:

Identyfikacja i charakterystyka proteazy fibrynolitycznej (MfpA) produkowanej przez bakterie z rodzaju *Microbacterium*

STRESZCZENIE

Niesłabnące zainteresowanie proteazami bakteryjnymi ma dwojakie podłoże: z jednej strony służy poszerzeniu wiedzy w zakresie fizjologii mikroorganizmów oraz badaniu mechanizmu interakcji z organizmem gospodarza, jak również wynika z wszechstronnych zastosowań praktycznych tej grupy enzymów. Rodzaj *Microbacterium* obejmuje obecnie ponad 100 gatunków szeroko rozpowszechnionych w środowisku Gram-dodatnich bakterii tlenowych, wśród których wyróżnia się gatunki wolnożyjące, komensalne, jak również potencjalne patogeny oportunistyczne. Wiele gatunków *Microbacterium* spp. posiada zdolność do syntezy związków o zróżnicowanych funkcjach i spektrum aktywności biologicznej, w tym enzymów degradujących specyficznie wielkocząsteczkowe substraty naturalne. Charakteryzowana w niniejszej pracy proteaza fibrynolityczna uzupełnia listę dotychczas poznanych enzymów wytwarzanych przez *Microbacterium* spp. Fibrynogen, będący białkiem osocza krwi kręgowców, odgrywa kluczową rolę w końcowej fazie procesu krzepnięcia krwi i utrzymaniu homeostazy układu krwionośnego. Ponadto fibrynogen odgrywa również rolę rusztowania sprzyjającego tworzeniu biofilmu bakteryjnego, co ma negatywne skutki w utrzymaniu higieny urządzeń technicznych, sanitarnych i sprzętu medycznego, a także może mieć udział w etologii zakażeń szpitalnych.

Punktem wyjścia dla referowanego projektu badawczego była obserwacja fibrynolitycznego działania pożywki, w której uprzednio prowadzono hodowlę *Microbacterium* sp. JK6B. Sugerowało to obecność produkowanego przez bakterie enzymu odpowiedzialnego za takie właściwości. Uwzględniając kontekst praktyczny odkrycia fibrynolitycznych właściwości bakterii *Microbacterium* sp. JK6B przyjęto ogólne cele badawcze obejmujące: 1) identyfikację oraz charakterystykę produkowanego przez te bakterie czynnika fibrynolitycznego, 2) próbę wyjaśnienia biologicznej roli tego czynnika w oddziaływaniach bakteria – organizm gospodarza oraz 3) poszukiwania możliwych zastosowań aplikacyjnych.

W ramach przeprowadzonych prac potwierdzony został enzymatyczny charakter czynnika fibrynolitycznego uwalnianego przez *Microbacterium* sp. JK6B do pożywki hodowlanej. Proteaza została wyizolowana z pożywki hodowlanej *Microbacterium* sp. JK6B, a następnie zidentyfikowana dzięki sekwencjonowaniu N-końcowego fragmentu metodą degradacji Edmana. Ze względu na unikatowość tej sekwencji dla rodzaju *Microbacterium* proteaza otrzymała nazwę – MfpA (ang. Microbacterial fibrinolytic protease A). Następnie gen kodujący proteazę MfpA został

amplifikowany i sekwencjonowany. Zsekwencjonowanie genomu *Microbacterium* sp. JK6B dostarczyło dodatkowych informacji na temat otoczenia sekwencji kodującej proteazę. Dzięki poznaniu kompletnej sekwencji aminokwasowej możliwe było zaklasyfikowanie analizowanej proteazy do rodziny M12 metalopeptydaz. Sekwencję zymogenu poprzedza 27-aminokwasowy peptyd sygnalny, a po usunięciu propeptydu zostaje uwolniona dojrzała forma proteazy MfpA o masie cząsteczkowej 20,5 kDa. Centrum aktywne MfpA tworzą trzy reszty histydynowe (H_{206}, H_{210} i H_{216}) wiążące atom metalu oraz reszta kwasu glutaminowego (E_{207}) pełniąca funkcje katalityczne. Aktywność proteazy jest niemal całkowicie hamowana przez 1,10-fenantrolinę, lecz nie przez EDTA.

Wykazana została zdolność proteazy MfpA do preferencyjnej degradacji fibrynogenu i fibryny. W testach fibrynolizy *in vitro* proteaza MfpA upłynnia skrzepy fibrynowe, a tempo tego procesu dodatnio koreluje ze stężeniem proteazy. Wykonana metodami degradacji Edmana oraz spektrometrii mas (LC-MS) analiza miejsc trawienia w obrębie cząsteczki fibrynogenu wołowego oraz łańcucha β insuliny ludzkiej pozwoliła na określenie specyficzności substratowej MfpA. Proteaza ta hydrolizuje wiązania peptydowe poprzedzające takie reszty aminokwasowe jak leucyna (L), fenyloalanina (F), izoleucyna (I), tyrozyna (Y), tryptofan (W), metionina (M).

Rozszerzenie badań na kolekcję 26 szczepów z rodzaju *Microbacterium* służyło lepszemu poznaniu roli biologicznej proteazy MfpA oraz wzbogaceniu charakterystyki tego taksonu. Analizy potwierdziły rozpowszechnienie genu *mfpA* w obrębie tego rodzaju, a wyniki sekwencjonowania genu u poszczególnych szczepów wykazały wysoki poziom konserwatywności tej sekwencji. Zaobserwowano również różnice w poziomie aktywności proteolitycznej (fibrynolitycznej) między poszczególnymi szczepami. Nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w poziomie aktywności między grupami izolatów środowiskowych, a izolatami pochodzącymi z krwi lub tkanek ludzkich oraz zwierzęcych.

W testach *in vivo* z zastosowaniem nicieni *Caenorhabditis elegans* jako organizmu modelowego obserwowano zmniejszoną przeżywalność oraz zahamowanie wzrostu i rozwoju nicieni pod wpływem bakterii *Microbacterium* spp. Powstawanie zmian morfologicznych w ciele nicieni może wskazywać na potencjalnie szkodliwy wpływ bakterii z rodzaju *Microbacterium*. Jednakże brak statystycznie istotnych różnic we wpływie na przeżywalność nicieni między grupami wysokoproteolitycznych i niskoproteolitycznych szczepów *Microbacterium* spp., nie pozwala rozstrzygnąć czy proteaza MfpA może odgrywać rolę czynnika wirulencji.

Ponadto udowodniono hamujący efekt proteazy MfpA na tworzenie biofilmu przez komórki *Staphylococcus aureus* oraz jej zdolność do degradacji już istniejącego biofilmu. Efekt ten był najsilniejszy na powierzchniach traktowanych uprzednio fibrynogenem. Obserwacja ta może być ważna w kontekście poszukiwania nowych strategii zapobiegających tworzeniu biofilmu bakteryjnego na szczególnie podatnych na to zjawisko powierzchniach sprzętu medycznego mającego kontakt z krwią oraz płynami ustrojowymi.

Przytaczane wyniki poszerzają stan wiedzy na temat rodzaju *Microbacterium*, porządkują dostępne dotychczas informacje oraz pozwalają na wyznaczenie dalszych kierunków badań dotyczących praktycznych zastosowań proteazy MfpA.

Gabriela Zielińska