

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Tomasz M. Karpiński

**Nowy peptyd (Entap)
o aktywności antyproliferacyjnej
produkowany przez bakterie
z rodzaju *Enterococcus***

ROZPRAWA HABILITACYJNA

Poznań 2012

Recenzent

Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

Skład i łamanie

Mirosława Zajączkowska

Korekta

Grażyna Dromirecka

Tytuł angielski

New peptide (Entap) with anti-proliferative activity produced by bacteria of Enterococcus genus

ISBN 978-83-7597-165-1

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Poznań 2012

© Copyright by Tomasz M. Karpiński, Poznań 2012

Niniejsze badania były finansowane z uczelnianego projektu badawczego T.M. Karpińskiego
(nr 502-14-02206316-50508) oraz badań statutowych (nr 502-01-02206316-02658)

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70
www.wydawnictwo.ump.edu.pl

Ark. wyd. 6,2 . Ark. druk. 8,5.
Format B5. Zam. nr 79/12.
Druk ukończono w maju 2012 r.

Nauczycielom moim dziękuję

Spis treści

1. WSTĘP	7
1.1. Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	7
1.2. Czynniki zjadliwości bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	9
1.3. Najważniejsze mechanizmy oporności u bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	11
1.3.1. Oporność na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (HLAR)	11
1.3.2. Oporność na glikopeptydy (VRE)	12
1.3.3. Oporność na linezolid (LRE)	14
1.4. Bakteriocyiny	14
1.5. Enterocyiny	20
1.6. Chorobotwórczość bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	25
2. CEL PRACY	27
3. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ	28
3.1. Szczepy <i>Enterococcus</i>	28
3.2. Hodowla bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	28
3.3. Otrzymywanie supernatantów z hodowli bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	30
3.4. Izolacja i oczyszczanie czynnika antyproliferacyjnego	30
3.4.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	31
3.4.2. Sączenie molekularne w systemie FPLC	31
3.4.3. Analiza składu aminokwasowego	31
3.4.4. Kontrola jakości wyizolowanego peptydu Entap	32
3.5. Hodowle komórkowe	32
3.6. Badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap	33
3.7. Badania wytwarzania Entap przez bakterie z rodzaju <i>Enterococcus</i>	35
3.8. Badania aktywności antyproliferacyjnej Entap	35
3.9. Badania histologiczne linii komórek rakowych	36
3.9.1. Badania w mikroskopii optycznej	36
3.9.2. Badania ultrastruktury w transmisyjnej mikroskopii elektronowej	37
3.10. Badania ekspresji genów w komórkach rakowych	38
3.11. Metody statystyczne	41
4. WYNIKI	42
4.1. Charakterystyka fenotypowa izolowanych szczepów klinicznych <i>Enterococcus</i>	42
4.2. Wytwarzanie peptydu przez bakterie z rodzaju <i>Enterococcus</i>	46
4.3. Izolacja peptydu	46
4.4. Aktywność przeciwbakteryjna izolowanego peptydu Entap	51

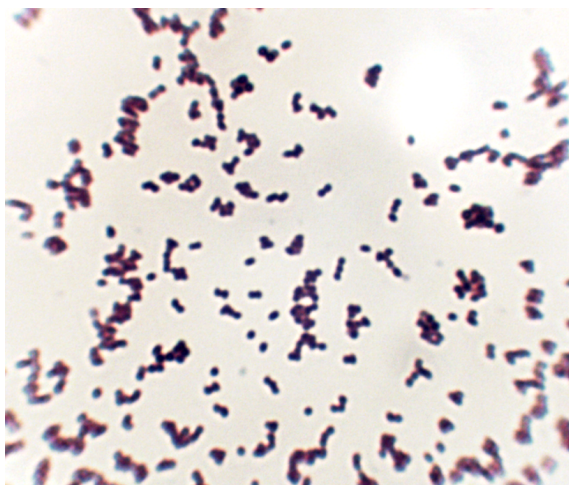
4.5. Aktywność antyproliferacyjna izolowanego peptydu Entap	58
4.6. Ocena badanych komórek rakowych w mikroskopii optycznej	60
4.7. Ocena badanych komórek rakowych w transmisyjnej mikroskopii elektronowej	65
4.8. Analiza ekspresji wybranych genów w badanych komórkach rakowych	72
5. DYSKUSJA	75
6. WNIOSKI	84
7. PIŚMIENNICTWO	85
8. STRESZCZENIE	97
9. SUMMARY	100

1. WSTĘP

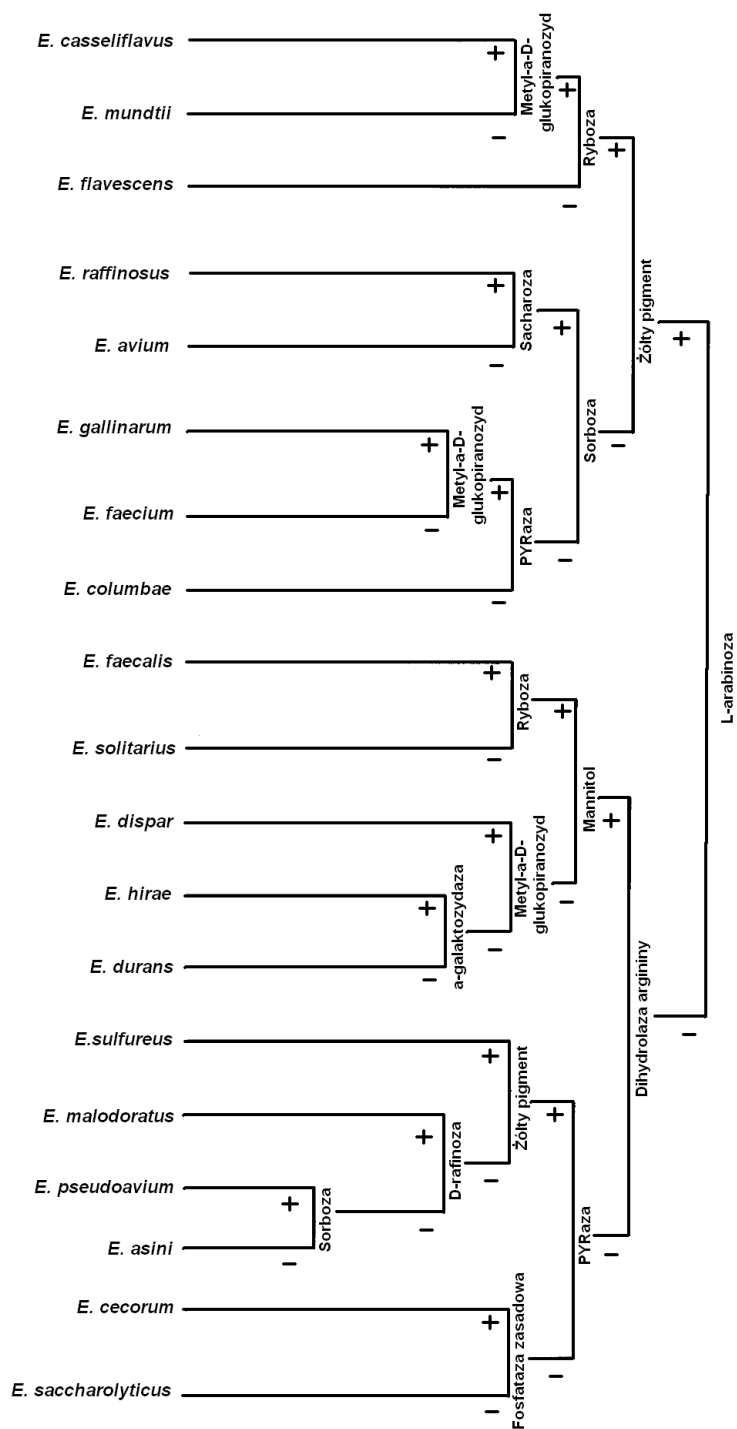
1.1. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* (rodzina: *Enterococcaceae*) należą do prawidłowej mikroflory ludzi i zwierząt, a naturalnym miejscem ich bytowania u zdrowych ludzi są śluzówki przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego. Enterokoki są Gram-dodatnimi (Fot. 1.), katalazo-ujemnymi ziarenkowcami, względnie beztlenowymi, nieurzęsionymi (z wyjątkiem gatunków: *E. casseliflavus* i *E. gallinarum*). Występują pojedynczo, parami lub w łańcuszkach. Wykazują zdolność wzrostu na podłożach zawierających 6,5% chlorku sodu oraz w szerokim zakresie temperatur 10–45°C. Hydrolizują eskulinę w obecności 40% soli żółciowych, produkują aminopeptydazę leucynową i pirolidonylarylamidazę (PYR) (z wyjątkiem *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* i *E. saccharolyticus*). Są bardzo odporne na wysychanie. Identyfikację gatunków w obrębie rodzaju *Enterococcus* przeprowadza się głównie na podstawie ich cech biochemicznych (Ryc. 1.).

Ważną cechą diagnostyczną w przypadku gatunku *E. faecalis* jest jego zdolność do wzrostu i rozkładu eskuliny na podłożu z tellurynem potasowym. Większość bakterii z rodzaju *Enterococcus* charakteryzuje obecność antygeny grupowo-swoistego D Lancefield, u niektórych można stwierdzić antygen Q Lancefield. Enterokoki nie wywołują hemolizy lub wywołują hemolizę α na agarze tryptozowo-sojowym lub agarze z 5% krwią baranią. Na podłożu z krwią końską, króliczą lub ludzką niektóre szczepy mogą wywoływać hemolizę β [86, 179].



Fot. 1. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* barwione metodą Grama (pow. 1000 x).



Ryc. 1. Klucz identyfikacji biochemicznej bakterii z rodzaju *Enterococcus*, wg [128]. PYRaza = aminopeptydaza pirolidonylu.

Aktualnie wyróżnia się 34 gatunki w obrębie rodzaju *Enterococcus*. W materiale klinicznym pobranym od ludzi najczęściej występuje gatunek *E. faecalis*, do którego należy 80–90% wszystkich izolatów enterokoków. Na drugim miejscu znajduje się *E. faecium* stanowiący 10–15% ogółu enterokoków. Około 3% izolatów enterokoków stanowi gatunek *E. durans*, a tylko 1% – gatunek *E. avium*. Pozostałe gatunki razem stanowią około 1% ogółu enterokoków występujących w próbkach materiałów pobieranych od ludzi [179, 192].

1.2. Czynniki zjadliwości bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Obecnie znanych jest wiele czynników warunkujących patogenność niektórych szczepów enterokoków. Są to głównie czynniki powierzchniowe, warunkujące kolonizację komórek gospodarza, oraz wydzielane substancje, oddziałujące destrukcyjnie na komórki gospodarza. Najważniejszymi czynnikami powierzchniowymi enterokoków są: substancja agregująca (AS), powierzchniowe białko enterokokowe (Esp), białko wiążące kolagen (Ace), adhezyna ściany komórkowej (Efa A) oraz białko SgrA. Z kolei czynnikami wirulencji wydzielanymi przez enterokoki są: cytolizyna (CylL), żelatynaza oraz hialuronidaza (Hyl) [154, 174, 179].

Substancja agregująca (AS) jest białkiem o m.cz. 137 kDa. AS ułatwia przyleganie bakterii do komórek gospodarza, takich jak erytrocyty, makrofagi i komórki nabłonkowe, wspomaga agregację komórek bakteryjnych, zwiększa hydrofobowość powierzchni komórek bakterii oraz zwiększa przeżywalność bakterii w makrofagach [163, 177]. Aktywność AS, polegająca na tworzeniu zagregowanych skupisk komórek bakterii, zapewnia kontakt pomiędzy nimi w trakcie koniugacji, zwiększając efektywność przenoszenia plazmidów. Charakterystyczny jest udział w tym procesie feromonów płciowych, których prekursorzy są kodowane przez geny zlokalizowane w chromosomie i oddziałujących swoiście wobec określonego plazmidu koniugacyjnego. Synteza i transport AS na powierzchnię komórki dawcy jest rezultatem wnikięcia do niej feromonu. Na powierzchni komórek enterokoków występuje substancja wiążąca (EBS), która oddziałuje z AS, tworząc agregaty koniugacyjne [25, 109]. Białko AS w obecności swojego ligandu, posiadającego budowę zbliżoną do kwasu teichojowego, może wykazywać cechy superantygeny [166].

Powierzchniowe białko enterokokowe (Esp) posiada m.cz. 202 kDa i jest najcięższym wśród poznanych białek enterokokowych. Wytwarzane jest przez szczepy *E. faecalis* oraz *E. faecium*. Gen dla białka Esp zlokalizowany jest na wyspie patogenności (PAI), istotnie różniący się jednak pomiędzy oboma gatunkami pod względem zawartości innych genów kodujących czynniki wirulencji. Obecność genu *esp* w tym obszarze jest prawdopodobnie wynikiem horyzontalnego transferu genów pomiędzy tymi gatunkami [114]. Białko Esp odgrywa

najistotniejszą rolę w kolonizacji oraz zakażeniu dróg moczowych. Wykazano, że białko powierzchniowe Esp ułatwia przyleganie bakterii do nabłonka układu moczowego, zwiększa ich wirulencję i umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [167]. Potwierdzony został również wpływ Esp na przyłączanie bakterii do powierzchni abiotycznych oraz tworzenie na nich biofilmu [99, 181]. Białko Esp enterokoków wykazuje duże podobieństwo strukturalne do białka Bap występującego u *Staphylococcus aureus*, związanego z tworzeniem biofilmu [183]. Udowodniona rola Esp w tworzeniu biofilmu może wskazywać na udział tego białka w innym groźnym schorzeniu związanym z występowaniem tej struktury – w zapaleniu wsierdza [82].

Białko wiążące kolagen (Ace) posiada m.cz. 74 kDa. Wytwarzane jest jedynie przez szczepy *E. faecalis* i odgrywa pomocniczą funkcję w procesie kolonizacji tkanek gospodarza. Odpowiada za przyłączanie *E. faecalis* do kolagenu typu I, kolagenu typu IV, lamininy oraz zębiny [108, 141]. Gen kodujący białko Ace występuje powszechnie wśród szczepów *E. faecalis* [142].

Adhezyna ściany komórkowej (Efa A) posiada m.cz. 37 kDa i jest odpowiedzialna za adhezję do komórek wsierdza. Zidentyfikowana została u szczepów *E. faecalis* izolowanych z krwi pacjentów z enterokokowym zapaleniem wsierdza, a także u szczepów *E. faecalis* odpowiedzialnych za zakażenia endodontyczne [55, 123, 164, 168].

Białko SgrA jest jedynym znanym białkiem *E. faecalis* wiążącym nidogen, składnik wszystkich błon podstawnych. SgrA posiada również wysoką zdolność wiązania do powierzchni abiotycznych oraz znaczny udział w tworzeniu biofilmu [81].

Cytolizyna (CylL_L m.cz. 3,4 kDa + CylL_S m.cz. 2 kDa) wytwarzana jest przez szczepy *E. faecalis* i *E. faecium*. Szczepy wytwarzające cytolizynę powodują β-hemolizę erytrocytów króliczych, końskich i ludzkich, a niekiedy także krwinek baranich [7, 35, 137]. Oprócz aktywności cytolitycznej, toksyna ta posiada właściwości bakteriocydy skutecznej wobec bakterii Gram-dodatnich [39]. Badania nad przebiegiem zakażeń u królików i myszy wywołanych przez *E. faecalis* wykazały, że szczepy wytwarzające cytolizynę wywołują zakażenia o cięższym przebiegu i z wyższą śmiertelnością niż szczepy pozbawione tej cechy [28, 53].

Żelatynaza (m.cz. 30 kDa) jest metaloendoproteinazą zależną od jonów cynku. Jest produkowana przez szczepy *E. faecalis* i niektóre szczepy *E. faecium*. Żelatynaza hydrolizuje żelatynę, kolagen i elastynę, a także inne peptydy aktywne biologicznie, jak np. białka związane z feromonami, produkowane przez *E. faecalis* [7].

Hialuronidaza (Hyl) posiada m.cz. 45 kDa. Jest to enzym proteolityczny wytwarzany przez szczepy *E. faecium*, powodujący niszczenie tkanki łącznej, co umożliwia rozprzestrzenianie się bakterii [7].

1.3. Najważniejsze mechanizmy oporności u bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Oporność naturalna enterokoków obejmuje cefalosporyny, niskie stężenia aminoglikozydów, linkozamidy, trimetoprim/sulfametoksazol. *E. faecium* charakteryzuje się również obniżoną wrażliwością na penicyliny, a *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* posiadają ponadto oporność naturalną na niskie stężenia glikopeptydów (fenotyp VanC). Enterokoki posiadają również mechanizmy oporności nabytej, spośród których największe znaczenie kliniczne mają: oporność na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (HLAR), oporność na glikopeptydy (VRE) oraz oporność na linezolid (LRE) [111]. Geny wrodzonej oporności na antybiotyki kodowane są na chromosomie bakteryjnym. Istotną cechą enterokoków, a zwłaszcza szczepów wieloopornych, jest ich zdolność do nabywania genów warunkujących oporność na antybiotyki. U bakterii z rodzaju *Enterococcus* geny oporności na antybiotyki mogą być przenoszone za pośrednictwem transpozonów koniugacyjnych, plazmidów swoistych gatunkowo (w tym plazmidów kodujących feromony płciowe) oraz plazmidów nieswoistych gatunkowo [34, 122].

1.3.1. Oporność na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych (HLAR)

Naturalny mechanizm oporności na niskie stężenia aminoglikozydów występujący u enterokoków związany jest ze słabą przepuszczalnością ściany komórkowej bakterii dla cząsteczek antybiotyku i uniemożliwia stosowanie tych leków w monoterapii. Skuteczne w leczeniu jest natomiast zastosowanie terapii skojarzonej aminoglikozydu z penicylinami lub glikopeptydami, pod warunkiem wrażliwości *in vitro* na te grupy antybiotyków. Połączenie wykazuje działanie synergistyczne i umożliwia osiągnięcie efektu bakteriobójczego [29, 116].

Termin HLAR (ang. *high level aminoglycoside resistance*) jest używany do określenia wysokiego poziomu oporności na aminoglikozydy i oznacza brak istotnego klinicznie synergizmu z β -laktamami oraz glikopeptydami. Oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy jest mechanizmem nabytym i związana jest z enzymami modyfikującymi cząsteczki aminoglikozydów: adenylotransferazą streptomycyny, 3'-fosfotransferazą oraz 2'-fosfotransferazą i 6'-acetyltransferazą [54, 172], a w przypadku streptomycyny może to być także modyfikacja podjednostki 30S rybosomu bakteryjnego, czyli miejsca docelowego działania leku. Najważniejsze fenotypy oporności wysokiego stopnia na aminoglikozydy to: HLGR, HLSR, HLKR.

Fenotyp HLGR – *high level gentamicin resistance* (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$ wg EUCAST [60]) oznacza wysoki poziom oporności na gentamycynę. Klinicznie

oznacza to oporność na wszystkie aminoglikozydy z wyjątkiem streptomycyny oraz utratę synergizmu z β -laktamami oraz glikopeptydami. Oporność ta związana jest z działaniem enzymu o aktywności acetylazo-fosfotransferazy, warunkującego oporność krzyżową na wszystkie aminoglikozydy (z wyjątkiem streptomycyny) [111].

Fenotyp HLSR – *high level streptomycin resistant* (MIC > 1024 $\mu\text{g/mL}$ wg EUCAST [60]) oznacza wysoki poziom oporności na streptomycynę. Klinicznie oznacza to oporność tylko na streptomycynę, przy zachowanej wrażliwości na pozostałe aminoglikozydy oraz utratę synergizmu z β -laktamami i glikopeptydami dla streptomycyny. Oporność ta związana jest z działaniem enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy, modyfikującego streptomycynę, bądź mutacjami w obrębie genów kodujących składniki podjednostki 30S rybosomu bakteryjnego [111].

Fenotyp HLKR – *high level kanamycin resistant* (MIC > 512 $\mu\text{g/mL}$ wg EUCAST [60]) oznacza wysoki poziom oporności na kanamycynę. Klinicznie oznacza to wysoki poziom oporności na kanamycynę i amikacynę oraz utratę synergizmu działania amikacyny i kanamycyny z β -laktamami i glikopeptydami. Oporność ta związana jest z działaniem fosfotransferazy lub enzymu o aktywności acetylazofosfotransferazy [111].

1.3.2. Oporność na glikopeptydy (VRE)

Mechanizm oporności na wankomycynę (VRE – ang. *vancomycin resistant enterococci*) polega na wytwarzaniu przez bakterie zmienionych cząsteczek: D-alanino-D-mleczanu oraz D-alanino-D-seryny o niskim powinowactwie do wankomycyny, które włączane są zamiast D-alanylo-D-alaniny w łańcuch prekursora biorącego udział w budowie ściany komórkowej. W przypadku włączenia zmienionych cząsteczek wankomycyna nie jest już w stanie zablokować syntezy peptydoglikanu [38]. Zidentyfikowano 7 różnych fenotypów oporności na antybiotyki glikopeptydowe: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG i VanL. Różnią się one poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę oraz stopniem indukcji oporności przez te antybiotyki [45, 195]. Typy oporności na antybiotyki glikopeptydowe u bakterii z rodzaju *Enterococcus* przedstawiono w tabeli 1. Największe znaczenie kliniczne mają fenotypy VanA i VanB, ze względu na częstotliwość występowania i szybkość rozprzestrzeniania się w populacji bakteryjnej. Oporność VanA i VanB jest przekazywana między komórkami drobnoustrojów za pomocą ruchomych elementów genetycznych, takich jak plazmidy i transpozony, co warunkuje wysoki potencjał epidemiczny tych szczepów [37, 155].

Oporność typu VanA ma charakter indukcyjny, co znaczy, że ujawnia się dopiero w obecności antybiotyku. Fenotyp VanA indukowany jest zarówno przez wankomycynę (MIC 64–100 $\mu\text{g/mL}$) jak i teikoplaninę (MIC 16–512 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 1. Typy oporności na antybiotyki glikopeptydowe u bakterii z rodzaju *Enterococcus*, wg M. Przybylskiego [155]

Oporność	Nabyta					Wrodzona niskiego poziomu
	wysokiego poziomu	zmiennego poziomu	średniego poziomu		niskiego poziomu	
Typ	VanA	VanB	VanD	VanG	VanE	VanC
MIC wankomycyny	64–1000 mg/L	4–1000 mg/L	64–256 mg/L	16 mg/L	8–32 mg/L	2–32 mg/L
MIC teikoplaniny	16–1000 mg/L	0,5–1 mg/L	2–256 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5–1 mg/L
Gatunki	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. faecalis</i>
Ekspresja	indukowana		konstrytutowana lub indukowana	indukowana		konstrytutowana
Lokalizacja	plazmid lub chromosom		chromosom	chromosom		chromosom

Występuje najczęściej u gatunków: *E. faecium*, *E. faecalis*, ale również u *E. avium*, *E. durans* oraz *E. raffinosum* [101].

Fenotyp VanB cechuje się indukowalną opornością na wankomycynę na różnym poziomie (MIC 4–1024 µg/ml) przy zachowanej wrażliwości *in vitro* na teikoplaninę (MIC 0,5–1 µg/ml). Występuje u gatunków *E. faecium*, *E. faecalis* oraz *E. durans* i *E. gallinarum* [116, 191]. Według danych KORDL VanB jest obecnie dominującym fenotypem w populacji enterokoków w Polsce [111].

Fenotyp VanC jest mechanizmem oporności naturalnej, związanym z konstytutywnym, niskim stopniem oporności na wankomycynę (MIC 2–32 µg/ml) przy zachowanej wrażliwości na teikoplaninę (MIC 0,5–1 µg/ml). Mechanizm ten występuje u gatunków *E. gallinarum* oraz *E. casseliflavus* o niskim potencjale epidemicznym [37].

Pozostałe fenotypy: VanD, VanE, VanG oraz VanL występują rzadko i warunkują oporność na wankomycynę (wyjątek stanowi VanD, który może powodować oporność na wankomycynę oraz teikoplaninę).

1.3.3. Oporność na linezolid (LRE)

Oporność na linezolid (LRE – ang. *linezolid resistant enterococci*) jest wynikiem mutacji punktowej w genie kodującym 23S rRNA, co w konsekwencji prowadzi do utraty powinowactwa leku do rybosomu i zahamowania syntezy białek [71]. Dotychczas LRE jest rzadko występującym mechanizmem oporności u enterokoków [111].

Oprócz szczepów patogennych znane są również szczepy enterokoków, które nie posiadają czynników wirulencji, korzystnie oddziałują na mikroflorę przewodu pokarmowego, hamując wzrost bakterii patogennych, jak np. *E. faecium* SF68 czy *E. faecalis* Symbioflor 1 [14, 48]. Produkowane przez takie szczepy bakteriocyny (niskocząsteczkowe peptydy) wykazują silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe [21, 31].

1.4. Bakteriocyny

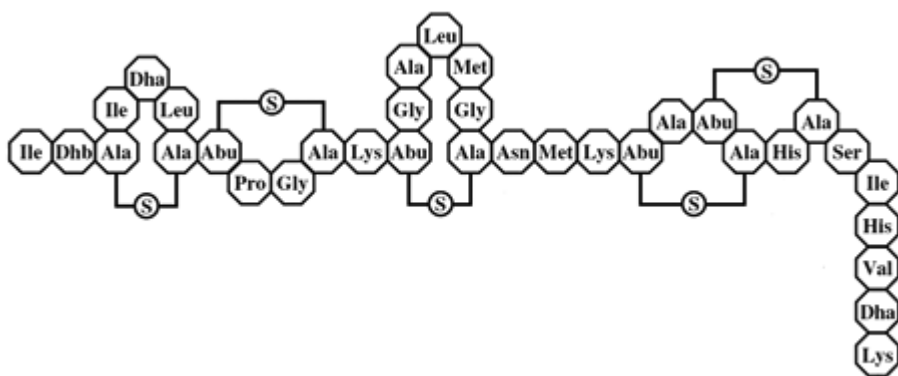
Bakteriocyny to niskocząsteczkowe peptydy, wykazujące właściwości antibakteryjne, zazwyczaj wobec gatunków blisko spokrewnionych z producentem [21, 31]. Produkowane są zarówno przez bakterie Gram-dodatnie (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*), jak i Gram-ujemne (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*) [31, 143, 148]. Ze względu na pełnioną funkcję, a także podobieństwo strukturalne, bakteriocyny należą do grupy związków przeciwdrobnoustrojowych, która obejmuje m.in.: defensyny (produkowane przez ssaki), tioniny (wytwarzane przez rośliny), magaininy (wydzielane przez żaby) czy mellitynę (obecną w jadzie

pszczół). Obecnie, według bazy bakteriocyn BACTIBASE, opisanych zostało 210 bakteriocyn [10]. Zainteresowanie bakteriocynami wynika głównie z potencjalnego zastosowania tych metabolitów, jak również mikroorganizmów bakteriocynogennych jako naturalnych konserwantów żywności [42, 44].

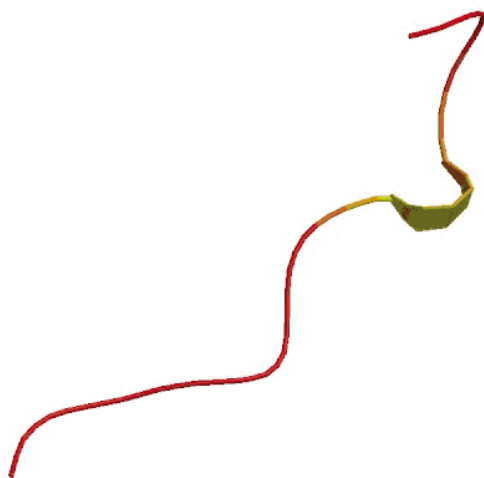
Bakteriocyny produkowane przez bakterie Gram-dodatnie sklasyfikowane zostały po raz pierwszy przez Klaenhammera w 1993 roku [107]. Klasyfikacja bakteriocyn, w tym enterocyn ulega ciągłym zmianom, co związane jest przede wszystkim z badaniami nad ich strukturą, sekwencją aminokwasową oraz poznawanymi mechanizmami działania. Z tego też powodu, w tej pracy, przyjęto poniższą klasyfikację bakteriocyn biorąc pod uwagę m.in. masę cząsteczkową, występowanie motywu YGNGVXC, występowanie mostków dwusiarczkowych, aktywność wobec bakterii z rodzaju *Listeria*, wrażliwość na temperaturę [68, 96, 143, 185].

Klasa I obejmuje lantybiotyki, czyli termostabilne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa. Ulegają one modyfikacji potranslacyjnej. W swoim składzie zawierają aminokwasy nietypowe, takie jak: lantionina, metylolantionina, dehydroalanina, dehydrobutyryna czy D-alanina [147]. Lantybiotyki podzielono na dwie grupy: lantybiotyki typu A i typu B, zróżnicowane na podstawie właściwości strukturalnych i funkcjonalnych. Lantybiotyki typu A to wydłużone cząsteczki działające poprzez permeabilizację błony cytoplazmatycznej wrażliwych komórek, natomiast lantybiotyki typu B to cząsteczki globularne o zróżnicowanym sposobie działania. Najlepiej poznaną bakteriocyną, należącą do klasy I, jest nizyna (Ryc. 2. i 3.) produkowana przez niektóre szczepy *Lactococcus lactis*. Nizyna charakteryzuje się szerokim zakresem aktywności przeciwbakteryjnej skierowanej wobec bakterii Gram-dodatnich, jak: *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria*. Zapobiega również tworzeniu przetrwalników i hamuje rozwój komórek wegetatywnych bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* [31, 44]. Nizyna jest jedyną bakteriocyną posiadającą status GRAS (*generally recognized as safe*) i jest stosowana w ponad czterdziestu krajach jako konserwant, m.in. produktów mięsnych i mlecznych, konserw warzywnych i owocowych, produktów z ryb i jajek [165]. W przemyśle spożywczym oznaczona jest jako E 234. Nizyna jest łatwo trawiona przez trypsynę i dlatego jest nietoksyczna w stosunku do organizmów wyższych, a zatem bezpieczna także dla zdrowia człowieka [152].

Do klasy II należą bakteriocyny nientybiotyczne, które nie zawierają w swoim składzie lantioniny. Są to termostabilne peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa. Bakteriocyny te nie ulegają modyfikacji potranslacyjnej. Na podstawie różnic w ich budowie wyodrębnione zostały trzy podklasy.



Ryc. 2. Struktura pierwszorzędowa nizyny A, wg Cheigh i Pyun [26]. Modyfikowane potranslacyjnie reszty aminokwasowe: Dha – dehydroalanina, Dhb – kwas dehydromasłowy, Abu – kwas aminomasłowy, Ala-S-Ala – lantionina, Abu-S-Ala – 3-metylolantionina.



Ryc. 3. Struktura trzeciorzędowa nizyny A (model wykonano przy użyciu serwera I-TASSER [94]).

Do podklasy IIa zalicza się pedicynopodobne bakteriocyyny o silnej aktywności wobec bakterii z rodzaju *Listeria*. Posiadają one hydrofilowy region kationowy z motywem konserwatywnym Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys (YGNGVXC) oraz dwie cysteiny połączone mostkiem siarczkowym [68, 185]. Bakteriocyyny te wykazują wysoki stopień zgodności sekwencji (38–80% identycznych sekwencji).

cji aminokwasowych), szczególnie w N-końcowym regionie cząsteczki. Region C-końcowy natomiast jest bardziej hydrofobowy i zróżnicowany [21, 64].

Podklasa IIb obejmuje bakteriocyny, posiadające 1 mostek siarczkowy i zbudowane z dwóch peptydów. Mogą zawierać N-końcową sekwencję Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys [185] lub jej nie zawierają [68]. W podklasie IIb wyodrębnia się: a) bakteriocyny, których aktywność wymaga obecności obu peptydów, ponieważ osobno żaden z nich nie posiada aktywności przeciwbakteryjnej np. laktokokcyna G [146] oraz b) bakteriocyny, w których jeden lub oba peptydy posiadają aktywność, ale kombinacja obu zwiększa tę aktywność, np. laktacyna F [6].

Do podklasy IIc należą bakteriocyny wydzielane na drodze sekrecji typu Sec, nazywane bakteriocynami *sec*-zależnymi. Posiadają 1 mostek siarczkowy, ale nie zawierają N-końcowej sekwencji Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys [69, 185].

Podklasa IId obejmuje bakteriocyny, które odbiegają budową, mechanizmem sekrecji i działania od bakteriocyn zaklasyfikowanych do podklas IIa-IIc. Przykładem są enterocyny L50 (EntL50A i EntL50B) wytwarzane przez *Enterococcus faecium* L50. System EntL50 przypomina bakteriocyny zbudowane z dwóch peptydów, ponieważ oba peptydy działają synergistycznie, jednak sekwencja tych peptydów nie wykazuje podobieństwa do bakteriocyn z podklas IIa-IIc, a ponadto są one wydzielane z komórki bez udziału peptydu sygnałowego [31]. Podklasa IId obejmuje także bakteriocyny aktywowane przez grupy tiolowe, takie jak laktokokcyna B [188].

Do klasy III należą bakteriocyny o masie cząsteczkowej powyżej 30 kDa. Są one termolabilne, produkowane głównie przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [186].

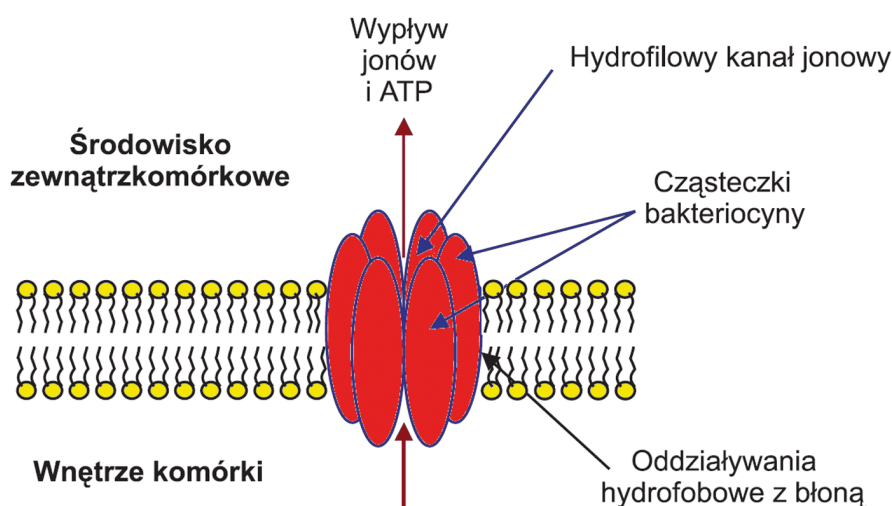
Klasa IV obejmuje bakteriocyny, które do uzyskania pełnej aktywności wymagają obecności części lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce [196]. Podstawowe charakterystyki wybranych bakteriocyn przedstawiono w tabeli 2.

Bakteriocyny, jako cząsteczki o niskiej masie cząsteczkowej i przeważnie hydrofobowym charakterze, wykazują tendencję do łączenia się w agregaty, co powoduje spadek ich aktywności. Przykładem jest propioniczna PLG-1, która występuje w postaci małych cząsteczek o masie około 10 kDa oraz agregatów o masie powyżej 100 kDa [126]. Natomiast laktacyna B ma tendencję do tworzenia makrocząsteczkowych kompleksów z lipidowymi i węglowodanowymi komponentami pożywek hodowlanych [11]. Wzrost aktywności bakteriocyn można uzyskać poprzez rozbitcie agregatów i zwiększenie liczby cząsteczek aktywnych, stosując np. Triton X100. Pod wpływem tej substancji wzrasta aktywność przeciwbakteryjna cereiny 7, najprawdopodobniej właśnie w wyniku dezagregacji większych cząsteczek [149]. Zdolność do rozbijania agregatów bakteriocyn posiada również mocznik, który powoduje m.in. 200-krotny wzrost aktywności laktacyny B [11].

Tabela 2. Podstawowe charakterystyki wybranych bakteriocyn (nie uwzględniono enterocyn)

Klasa bakteriocyn	Bakteriocyna	Masa cząsteczkowa	Szczep produkujący	Aktywność wobec bakterii
Klasa I	Nizyna A [31, 44]	3,517 kDa	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i>
	Saliwaricyna A [159]	2,315 kDa	<i>Streptococcus salivarius</i>	bakterie Gram-dodatnie
	Leukocyna A [80]	3,932 kDa	<i>Leuconostoc gelidum</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Klasa II ► podklasa IIa	Kurwacyna A [182]	4,327 kDa	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
	Pediocyna PA-1 [124]	4,647 kDa	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
	Laktocyna-705 [190]	3,376 kDa	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Streptococcus</i>
► podklasa IIb	Plantarycyna F [47]	3,722 kDa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>
	Subtilizyna A [169]	5,813 kDa	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Shigella sonnei</i>
	Uberolizyna [194]	7,086 kDa	<i>Streptococcus uberis</i> strain 42	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i>
► podklasa IIc	Acydocyna B [118]	5,773 kDa	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium sporogenes</i>
	Helwetycyna J [98]	37 kDa	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
	Glikocyna F [189]	5,2 kDa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	brak danych

Większość bakteriocyn wykazuje działanie bakteriobójcze na komórki wrażliwe. Pierwszy kontakt bakteriocyny z wrażliwą komórką odbywa się za pomocą oddziaływań elektrostatycznych dodatnio naładowanej, hydrofobowej cząsteczki bakteriocyny z naładowanymi ujemnie fosfolipidami w błonie cytoplazmatycznej wrażliwej komórki [27]. Mechanizm działania bakteriocyn polega na tworzeniu w błonie cytoplazmatycznej wrażliwych bakterii przejściowych kompleksów poracyjnych i kanałów jonowych (Ryc. 4.). Towarzyszy temu bierny wypływ małych cząsteczek, takich jak: jony potasu, magnezu i fosforu, aminokwasy i ATP. W ten sposób dochodzi do zaburzenia potencjału błonowego, gradientu pH i zahamowania funkcji pompy protonowej. Niski poziom ATP i niedobór jonów w komórce powoduje zahamowanie syntezy DNA, RNA, białek i polisacharydów. Ostatecznie dochodzi do śmierci komórki bakteryjnej [135]. Taki mechanizm został opisany między innymi u *Listeria monocytogenes* pod wpływem działania sakacyny P produkowanej przez *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a [42].



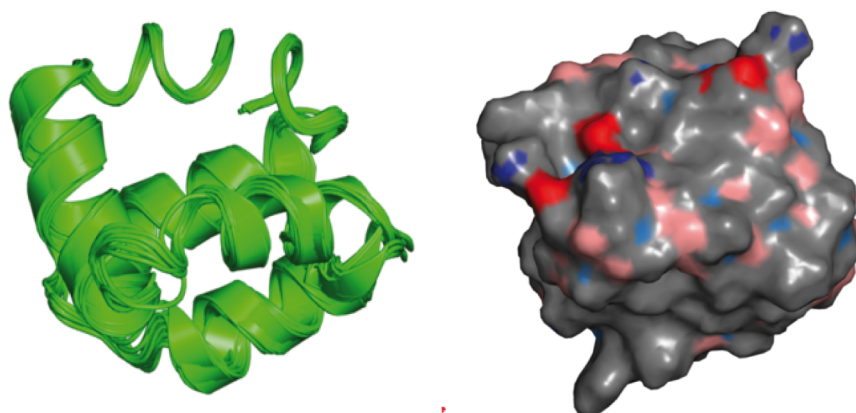
Ryc. 4. Schemat działania bakteriocyn tworzących kanały jonowe w błonie cytoplazmatycznej [77].

Innym mechanizmem działania bakteriocyn jest zdolność do wywoływania lizy komórek bakteryjnych. Proces ten związany jest z interakcją bakteriocyn z kwasami: tejchojowym, lipotejchojowym lub tejchuronowym, będącymi składnikami ściany komórkowej. Dochodzi do uwolnienia i aktywacji związanych z tymi kwasami enzymów autolitycznych, co w efekcie prowadzi do autolizy komórki. Takie działanie ma miejsce w przypadku plantarycyny C wytwarzanej

przez *Lactobacillus plantarum* LL441. Bakteriocyna ta powoduje m.in. całkowitą lizę komórek szczepu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG 13551 [72]. Bakteriocyny, należące do klasy lantybiotyków, mogą dodatkowo zaburzać procesy biosyntezy ściany komórkowej. Hamują syntezę peptydoglikanu na poziomie transglikozylacji, przy czym nie dochodzi do zaburzeń biosyntezy DNA, RNA i białek [135].

1.5. Enterocyny

Enterocyny są bakteriocynami produkowanymi przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* [69, 107, 143]. Enterocyny charakteryzują się dużą różnorodnością i szerokim rozprzestrzenieniem wśród izolatów pobranych z różnych źródeł. Ta różnorodność wydaje się być związana z możliwością otrzymywania materiału genetycznego. Sugeruje się, że enterocyny mogą być wynikiem wymiany genetycznej pomiędzy różnymi rodzajami bakterii, co potwierdzają m.in. podobieństwa sekwencji enterolizyny i gronkowcowej lizostafiny czy też enterocyny AS-48 (Ryc. 5.) i cyrkularyny wytwarzanej przez *Clostridium beijerinckii* [68]. Do dobrze opisanych mechanizmów transferu genów u *Enterococcus* należą plazmidy koniugacyjne i niekoniugacyjne oraz transpozony koniugacyjne. Szczególne znaczenie dla przenoszenia genów bakteriocyn mają plazmidy koniugacyjne wrażliwe na feromony [34].



Ryc. 5. Struktura trzeciorzędowa enterocyny AS-48 (modele wykonano przy użyciu serwera I-TASSER [94]).

Na plazmidach kodowane są m.in. determinanty genetyczne cytolizyny, bakteriocyny 31, enterocyny EJ97 i enterocyny AS-48. Taki mechanizm transferu genów może powodować szybkie i efektywne przeniesienie genów enterocyn pomiędzy enterokokami. Jednocześnie plazmidy koniugacyjne feromono-wrażliwe mogą zawierać geny oporności na antybiotyki, co ma duże znaczenie kliniczne. Produkcja bakteriocyn może również odgrywać rolę w kolonizacji przetworów spożywczych przez enterokoki, szczególnie produktów mlecznych i mięsnych. Wiele enterocyn wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii z rodzajów: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* czy *Clostridium*. Z tego też powodu enterokoki produkujące bakteriocyny, a także wyizolowane bakteriocyny, hamujące rozwój *Listeria monocytogenes* czy *Clostridium tyrobutyricum*, badane są w kierunku ich zastosowania w produkcji serów oraz w procesach fermentacji [68]. W tabeli 3. przedstawiono podstawowe charakterystyki wybranych enterocyn, zaś w tabeli 4. – sekwencje wybranych enterocyn (część danych uzyskano z bazy bakteriocyn BACTIBASE [10, 78]).

Tabela 3. Podstawowe charakterystyki wybranych enterocyn

Enterocyna	Masa cząsteczkowa	Szczep produkujący	Aktywność wobec bakterii
KLASA I			
Cytolizyna (CylL _S)	2031 Da	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Micrococcus</i> [39]
Cytolizyna (CylL _L)	3437 Da	<i>Enterococcus faecalis</i>	
KLASA II			
Podklasa IIa			
Awicyna A [16]	4288 Da	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus avium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. maldoratus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Enterocyna A [9]	4851,38 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pediococcus</i>
Enterocyna P [31]	4648,91 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Podklasa IIb			
Enterocyna I (L50A)	5209,14 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Clostridium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Enterocyna Q [13]	3970,31 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Enterocyna Xalfa [88]	4420,1 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Listeria innocua</i>
Enterocyna Xbeta [88]	4068,5 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i>

od. tabeli 3.

Podklasa IIc				
Enterocyna B [21]	5484,14 Da	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. subtilis</i>	
Hiracyna JM79 [161]	5093,2 Da	<i>Enterococcus hirae</i> DCH5	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Propionibacterium acidipropionici</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. grayi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,	
Durancyna TW-49M [89]	5246,92 Da	<i>Enterococcus durans</i> QU 49	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactobacillus alimentarius</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sakei</i> ssp, <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. circulans</i>	
Enterocyna 96 [95]	5493,92 Da	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. sulfureus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> , <i>E. columbae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i>	
KLASA III				
Enterolizyna A [145]	34524,69 Da	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. ivanovi</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Propionibacterium ensenii</i>	
Niesklasyfikowane				
Enterocyna AS-48 [162]	7186,77 Da	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Nocardia corrallina</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>M. lysodeikticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus inconstans</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	

Tabela 4. Sekwencje aminokwasowe wybranych enterocyn (na podstawie bazy BACTI-BASE [10])

Enterocyna	Sekwencja aminokwasowa
KLASA I – Lantybiotyki	
Cytolizyna (Cyl _S)	TTPACFTIGLVGALFSAKFC
Cytolizyna (Cyl _L)	TTPVCAVAATAAASAACGWVGGGIFTGVTVVVSLKHC
KLASA II	
Podklasa IIa	
Awicyna A	MTRSKKLNLRMKNVVGGTTYGNGVSCNKKGCSVDWGKAISIIGNN-SAA NLATGGAAGWKS
Enterocyna A	MKHLKILSIKETQLIYGGTTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCI AGMSIGGFLGGAIPGKC
Enterocyna P	MRKKLFSLALIGIFGLVVTNFGTKVDAATRSYGNGVYCNSKWCWNW GEAKENIAGIVISGWASGLAGMGH
Podklasa IIb	
Enterocyna I (L50A)	MGAI AKLVAKFGWPVKKYYKQIMQFIGEGWAINKII EWIKKHI
Enterocyna Q	MNFLKNGIAKWMTGAELQAYKKKYGCLPWEKISC
Enterocyna Xalfa	MQNVKEVSVKEMKQIIGGSNDLWYGVGQFMGKQANCITNHPVKH- MIIPGYCLSKILG
Enterocyna Xbeta	MKKYNELSKKELLQIQGGI APIIVAGLGYLVKDAWDHSDQIISGFKK- GWNGGRRK
Podklasa IIc	
Enterocyna B	MQNVKELSTKEMKQIIGGENDHRMPNELNRPNNLSKGGAKCGAAIAG GLFGIPKGPLAWAAGLANVYSKCN
Hiracyna JM79	MKKKVLKHCVILGILGTCLAGIGTGIKVDAATYYGNGLYCNKEKCWV DWNQAKGEIGKII VNGWVNHGPWAPRR
Durancyna TW-49M	MQTIKELNTMELQKIIGGENDHRMPYELNRPNNLSKGGAKCAAGILGA GLGAVGGGPGGFISAGISAVLGCM
Enterocyna 96	MLNKKLENGVVNAVITIDELDAQFGGMSKRD CNLMKACCAGQAVTY AIHSLNRLGGDSSDPAGCNDIVRKYCK
KLASA III	
Enterolizyna A	MKNILLSILGVLSIVVSLAFSSYSVNAASNEWSWPLGKPYAGRYEEGQQF GNTAFNRGGTYFHDGDFGSAIYGNGSVYAVHDGKILYAGWDPVGGGSL GAFIVLQAGNTNVIYQEF SRNVGDIKVSTGQTVKKGQLIGKFTSSHLHLG MTKKEWRS AHSSWNKDDGTWFNPILQGGSTPTPNPGPKNF TTVRY GLRVLGGSWLPEVTNFNNTNDGFAGYPNRQHDMLYIKVDKGQMKYRV HTAQSGWLPWVSKGDKSDTVNGAAGMPGQAIDGVQLNYITPKGEKLSQ AAYRSQTTRSGWLKVSADNGSIPGLDSYAGIFGEPLDRLQIGISQSNPF

cd. tabeli 4.

Niesklasyfikowane	
Enterocyna AS-48	MVKENKFSKIFILMALSLGLALFSASLQFLPIAHMAKEFGIPAAVAGTV LNVVEAGGWVTTIVSILTAVGSGGLSLLAAAGRESIKAYLKKEIKKKGK RAVIAW

Legenda: A – alanina, C – cysteina, D – kwas asparaginowy, E – kwas glutaminowy, F – fenyloalanina, G – glicyna, H – histydyna, I – izoleucyna, K – lizyna, L – leucyna, M – metionina, N – asparagina, P – prolina, Q – glutamina, R – arginina, S – seryna, T – treonina, V – walina, W – tryptofan, Y – tyrozyna

1.6. Chorobotwórczość bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Enterokoki rozwinęły wiele mechanizmów umożliwiających ich przetrwanie w przewodzie pokarmowym. W okrężnicy człowieka występuje ponad 100 hodowlanych gatunków bakterii, z przewagą beztlenowców [121]. Enterokoki u zdrowego gospodarza odpowiadają za utrzymanie symbiozy pomiędzy układem odpornościowym a bakteriami. Załamanie tej równowagi, np. przez stosowanie antybiotyków, może prowadzić do zmiany dynamiki kolonizacji i w następstwie do rozwoju zakażenia. Podawanie antybiotyków o szerokim spektrum działania powoduje zwiększenie kolonizacji przewodu pokarmowego przez enterokoki odporne na antybiotyki, w tym odporne na wankomycynę (VRE) oraz zmniejszenie wydzielania czynników przeciwbakteryjnych, w tym peptydu jelitowego RegIIIγ, produkowanego przez nabłonek jelitowy i komórki Panetha [49, 173, 175]. Peptyd RegIIIγ wykazuje aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich. Zmniejszenie jego wydzielania wydaje się być związane z eradykacją, przez antybiotyki o szerokim spektrum działania, bakterii Gram-ujemnych, głównie beztlenowych, które są odpowiedzialne za aktywację sygnałów niezbędnych do produkcji peptydu RegIIIγ. Innym czynnikiem, który może również działać preferencyjnie na wzrost liczby enterokoków w jelicie, jest podwyższone pH żołądka, zwykle jako następstwo stosowania inhibitorów pompy protonowej. Nadmierny wzrost liczby enterokoków w jelicie może mieć wpływ na wystąpienie deficytu immunologicznego, zwiększając tym samym ryzyko zakażenia [18].

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* wywołują przede wszystkim zakażenia dróg moczowych, dróg żółciowych, zapalenie wsierdza, ropnie w obrębie brzucha i miednicy, zakażenia ran pooperacyjnych, zakażenia w obrębie skóry i tkanek miękkich, bakteriemie oraz posocznice [154]. Enterokoki są obecnie bardzo ważnymi patogenami szpitalnymi, określanymi jako patogeny XXI wieku lub super-zarazki. Należą do najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych, głównie *E. faecalis* i *E. faecium* [17, 192]. Enterokoki odpowiedzialne są za wywoływanie 12,8–24% szpitalnych zakażeń układu moczowego oraz 5–10% pozaszpitalnych zakażeń układu moczowego [63, 129, 134]. Jak wynika z badań epidemiologicznych *Enterococcus faecalis* jest najczęściej izolowanym

gatunkiem kolonizującym cewniki pęcherzowe Folley'a [46]. Natomiast u pacjentów po przeszczepie nerki częstość zakażeń układu moczowego wywołanych bakteriami z rodzaju *Enterococcus* w okresie okołozabiegowym wynosi 33% [4].

Enterokoki odpowiedzialne są za 5–17% przypadków wszystkich bakteryjnych zapaleń wsierdza. Najczęściej izolowany jest *E. faecalis* (80%), rzadziej *E. faecium* (10%), sporadycznie *E. hirae* i inne [65, 83, 139, 140].

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* izolowane są również w mieszanych zakażeniach ran chirurgicznych i oparzeniowych, a także w ranach przewlekłych u pacjentów z cukrzycą (w szczególności zakażenia stopy cukrzycowej) i niewydolnością krążenia. U chorych ze stopą cukrzycową enterokoki odpowiedzialne są za 7–13,5% zakażeń [3, 32].

Enterokoki, szczególnie *E. faecalis*, mają duże znaczenie w zakażeniach kanałów korzeniowych zębów. Badania wykazują, że *E. faecalis* występuje w 23–70% kanałów korzeniowych w przewlekłym zapaleniu tkanek okołowierzchołkowych związanym z leczeniem endodontycznym. Często zakażenia te są jednogatunkowe, co tłumaczy się supresyjnym oddziaływaniem na inne gatunki bakterii, substancji wytwarzanych przez *E. faecalis*, takich jak: cytolizyna i bakteriocyny [102].

Stwierdzono, że bakterie *E. durans* i *E. hirae* mogą wywoływać zapalenia żołądkowo-jelitowe o łagodnym i umiarkowanym przebiegu [58]. Ponadto, dobrze już udokumentowano występowanie endogennych zakażeń bakteriami z rodzaju *Enterococcus* w przebiegu chorób nowotworowych, głównie przewodu pokarmowego. Już w 1951 roku McCoy i Mason [130] opisali przypadek posocznicy enterokokowej w przebiegu raka esicy. Współwystępowanie zakażenia enterokokowego w przebiegu choroby nowotworowej układu pokarmowego prezentowali także inni autorzy: Roses i wsp. [158] – w raku jelita grubego-odbytnicy; Teitz i wsp. [180] – związek infekcji *E. faecalis* z rakiem esicy; Milbrandt [133] – związek infekcji *E. faecalis* z rakiem jelita ślepego; Christakis i wsp. [30] – związek infekcji *E. faecalis* z rakiem jelita grubego. Jednocześnie, publikowano opisy zakażeń wywoływanych enterokokami we wczesnych bezobjawowych postaciach raka jelita grubego [2, 66]. Z powyższych raportów klinicznych wynika, że zakażenie enterokokowe może stanowić jeden z czynników toczącego się procesu nowotworowego.

W kontekście tych danych, prawdopodobna wydała się możliwość oddziaływania produktów wytwarzanych przez enterokoki na proliferację komórek nowotworowych. We wstępnych badaniach, przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, stwierdzono, że szczepy gatunków *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans* mogą oddziaływać na wzrost komórek rakowych poprzez wytwarzanie czynnika o właściwościach antyproliferacyjnych [178].

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było dokonanie identyfikacji fizyko-chemicznej oraz zanalizowanie wybranych właściwości czynnika antyproliferacyjnego, wytwarzanego przez szczepy bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Cel ten był realizowany w następujących zadaniach badawczych:

1. Izolacja nowego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* i określenie jego natury biochemicznej.
2. Dokonanie oceny lekowrażliwości szczepów z rodzaju *Enterococcus* w kontekście izolowanego czynnika.
3. Oznaczenie masy cząsteczkowej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
4. Dokonanie analizy aktywności przeciwbakteryjnej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
5. Dokonanie oceny aktywności antyproliferacyjnej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
6. Dokonanie oceny histologicznej wybranych linii komórek rakowych i ich ekspresji genów pod wpływem izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.

3. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Niniejszą pracę wykonano w następujących jednostkach naukowych:

- Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Katedra Patomorfologii Klinicznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Katedra i Zakład Histologii i Embriologii UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

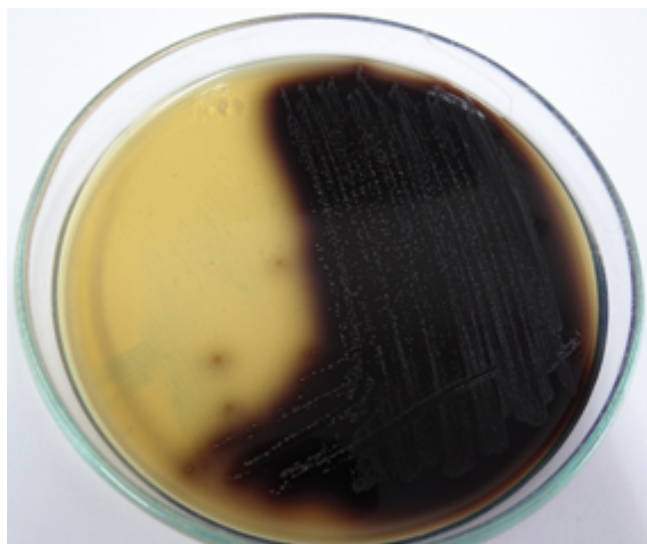
Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu: Uchwała nr 246/12. Badania były finansowane z uczelnianego projektu badawczego T.M. Karpińskiego nr 502-14-02206316-50508 oraz badań statutowych nr 502-01-02206316-02658.

3.1. Szczepy *Enterococcus*

Materiał badawczy stanowiło 30 szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, izolowanych od pacjentów w wieku 23–60 lat (20 kobiet, 10 mężczyzn), zgłaszających się do Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu, w celu wykonania badań bakteriologicznych. U 24 osób stwierdzono zakażenia dróg moczowych, u 6 zakażenia ran skóry.

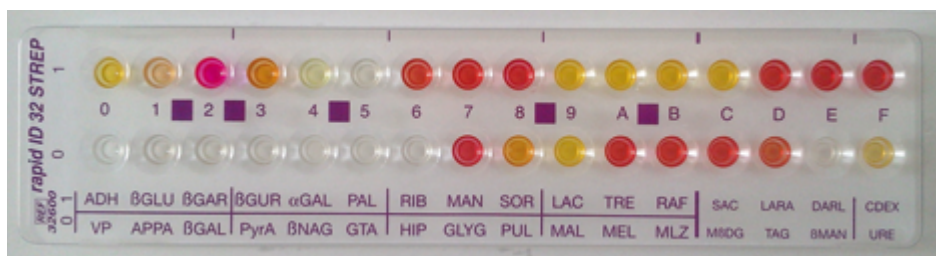
3.2. Hodowla bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Próbki materiału klinicznego posiewano na podłoże D-Coccosel agar (bioMérieux). Agar D-Coccosel, zawierający m.in. żółć i eskulinę, używany jest do wybiórczej izolacji i różnicowania enterokoków. Wybiórczość podłoża w stosunku do bakterii Gram-ujemnych związana jest z obecnością azydku sodu. Żółć hamuje wzrost niektórych bakterii Gram-dodatnich, innych niż enterokoki. Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 18–24 godzin w atmosferze tlenowej. Charakterystyczne kolonie enterokoków są bezbarwne lub szare, otoczone czarną obwódką (hydroliza eskuliny) (Fot. 2.).



Fot. 2. Wzrost bakterii z rodzaju *Enterococcus* na podłożu D-Coccosel agar.

Identyfikację gatunkową wyizolowanych, klinicznych szczepów enterokoków przeprowadzono przy użyciu testu biochemicznego rapid ID 32 STREP (bioMerieux) (Fot. 3.) zgodnie z instrukcją producenta, stosując odczyt w aparacie ATB (bioMerieux). Zdolność wyizolowanych enterokoków do wytwarzania hemolizy badano na agarze z krwią końską (bioMerieux).



Fot. 3. Test biochemiczny rapid ID 32 STREP (bioMerieux) stosowany do identyfikacji bakterii z rodzajów *Streptococcus* i *Enterococcus*.

Wrażliwość na antybiotyki szczepów *Enterococcus* oznaczano jako wartość MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) wykorzystując metodę dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku, zachowując wymagane warunki standaryzacji podane przez European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(EUCAST) i Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) [60, 111, 115]. Używano zawiesiny bakteryjnej o gęstości 0,5 McFarlanda (McF). W badaniach zastosowano paski Etest (bioMérieux) zawierające następujące antybiotyki: penicylinę G (PG), ampicylinę (AM), gentamycynę (GM), ciprofloksacynę (CI), lewofloksacynę (LE), wankomycynę (VA) i teikoplaninę (TP). Hodowle prowadzono na podłożu Mueller-Hinton Agar (bioMérieux) z 5% dodatkiem krwi baraniej i inkubowano w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ przez 16–18 godzin w atmosferze tlenowej. Zastosowaną interpretację otrzymanych wyników Etest, opartą na wytycznych EUCAST, przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Interpretacja wyników Etest ($\mu\text{g/ml}$) wg EUCAST

Antybiotyk	Szczep wrażliwy (S)	Szczep oporny (R)
penicylina G (PG)	≤ 8	≥ 16
ampicylina (AM)	≤ 4	> 8
gentamycyna (GM)	≤ 128	> 128
ciprofloksacyna (CI)	≤ 1	≥ 4
lewofloksacyna (LE)	≤ 2	≥ 8
wankomycyna (VA)	≤ 4	> 4
teikoplanina (TP)	≤ 2	> 2

3.3. Otrzymywanie supernatantów z hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Z hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus* otrzymywano zawiesinę 0,5 McF bakterii w 2 ml soli fizjologicznej. Do 2 ml RPMI-1640 wzbogaconego 0,5% glukozą dodawano 0,1 ml zawiesiny bakterii i hodowano przez 24 godziny w 37°C . Następnie hodowlę filtrowano przez sączki uzyskując supernatant.

3.4. Izolacja i oczyszczanie czynnika antyproliferacyjnego

Izolację i oczyszczenie czynnika antyproliferacyjnego z uzyskanych supernatantów z hodowli *Enterococcus* przeprowadzono w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych (kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu.

3.4.1. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Zasada rozdzielania białek metodą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących opiera się na różnicy mas cząsteczkowych analizowanych białek, które opłaszczone zjonizowanym siarczanem dodecyłu sodu (SDS) migrują z różną prędkością w polu elektrycznym w kierunku anody. Wyjściowy 30% roztwór poliakrylamidów otrzymywano przez rozpuszczenie 29 g amidu kwasu akrylowego i 1g N,N'-metylenobisakrylamidu w 70 ml wody. Roztwór przechowywano w butelce z ciemnego szkła w temperaturze pokojowej. W celu uzyskania czynnika antyproliferacyjnego elektroforezę SDS-PAGE supernatantów z hodowli *Enterococcus* przeprowadzano w 15% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących. Po spolimeryzowaniu i usunięciu grzebienia żel umieszczano w aparacie do elektroforezy (Bio-Rad) wypełnionym buforem (25 mM Tris, 250 mM glicyny, 1% SDS). Elektroforezę prowadzono przy napięciu prądu wynoszącym 10–15 V/cm długości żelu. Po zakończonym rozdziale żel poliakrylamidowy umieszczano w roztworze barwiącym (0,25 g barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 ml etanolu, 10 ml lodowatego kwasu octowego, 40 ml wody) i inkubowano przez 2 godziny. Następnie żel przenoszono do roztworu odbarwiającego (30 ml metanolu, 10 ml kwasu octowego, 60 ml wody).

3.4.2. Sączenie molekularne w systemie FPLC

W następnym etapie izolacji próbki poddawano sączeniu molekularnemu w systemie FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) na złożu Toyopearl HW40 (Sigma) w buforze 50 μ M Tris-HCl, z 10 μ M NaCl, w pH 7,5. Zastosowano kolumnę o długości 100 cm i średnicy 1,6 cm. Przepływ wynosił 0,3 ml/min. Objętość frakcji wynosiła 2,5 ml. Rechromatografie poszczególnych frakcji przeprowadzano w wodzie na złożu Toyopearl HW40 stosując kolumnę XK16/100 (GE Healthcare). Objętość próby wynosiła 900 μ l.

3.4.3. Analiza składu aminokwasowego

Analizę składu aminokwasowego przeprowadzono za pomocą GLC-MS – chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową, stosując selektywny detektor masowy Hewlett-Packard 5971A. Badany materiał (0,1 mg) hydrolizowano przy pomocy 10M HCl (0,5 ml) w temp. 80°C przez 20 min. Standardem wewnętrznym dodanym w odpowiedniej ilości do próbki była β -alanina. Hydrolizat suszono strumieniem azotu, po czym dodawano 0,3 ml mieszaniny n-butanolu z chlorkiem acetylu (10:1 v/v) i reakcję przeprowadzano w temperaturze 120°C przez 20 min. Próbkę suszono strumieniem azotu, a następnie dodano 0,1 ml octanu etylu oraz 40 μ l bezwodnika heptafluorobutyrylowego (Sigma) i ogrzewano w 150°C przez 5 min. Po wysuszeniu strumieniem

azotu próbkę rozpuszczono w octanie etylu i analizowano na chromatografie gazowo-cieczowym, sprzężonym ze spektrometrem masowym GLC-MS (Thermo-Sci). Pochodne aminokwasów analizowano na kolumnie kapilarnej HP-1 o wymiarach 0,22 mm x 12 m. Pomiary prowadzono w temp. 150–270°C (8°C/min), z helem jako gaz nośny.

3.4.4. Kontrola jakości wyizolowanego peptydu Entap

Kontrolę jakości i ilości izolowanego białka wykonano stosując spektrometr UV-VIS (Hewlett-Packard). Próbkę białka odpowiednio rozcieńczano i przenoszono do standardowych kuwet kwarcowych o pojemności 1 ml. Badano absorpcję maksymalną, która dla białek wynosi $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ [79].

3.5. Hodowle komórkowe

Badania aktywności antyproliferacyjnej izolowanego peptydu przeprowadzono na następujących liniach komórkowych, uzyskanych z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC – American Type Culture Collection, Manassas, USA) oraz z Fibiger Institute (Kopenhaga, Dania):

- komórki AGS (ATCC CRL-1739),
- komórki HeLa (ATCC CCL-2),
- komórki MDA-MB-231 (ATCC HTB-26),
- komórki 22Rv1 (ATCC CRL-2505),
- komórki HT-29 (ATCC HTB-38),
- komórki K-562 (ATCC CCL-243),
- komórki HUV-EC-C (ATCC CRL-1730),
- komórki MRC-5 (ATCC CCL-171),
- komórki CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790),
- komórki HU-609 (Fibiger Institute).

Komórki hodowano w naczyniach hodowlanych T-25 i T-75 (Nunc), w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Podłoże hodowlane złożone było z płynu RPMI-1460 (Sigma) wzbogaconego 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma) z dodatkiem penicyliny 100 U/ml i streptomycyny 20 mg/ml (Sigma). Podłoże wymieniano 3 razy w tygodniu.

Komórki AGS (ATCC CRL-1739) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z gruczolakoraka (*adenocarcinoma*) żołądka. Zostały wyizolowane w 1979 roku od 54-letniej kobiety pochodzenia kaukaskiego. Są komórkami hyperdiploidalnymi, około 60% komórek AGS posiada liczbę modalną 49 chromosomów, zaś 3,6% tych komórek cechuje się poliploidią. Czas duplikacji wynosi 20 godzin. Stanowią one dobry model dla badań raka (*adenocarcinoma*) żołądka *in vitro* [12].

Komórki HeLa (ATCC CCL-2) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z gruczolakoraka szyjki macicy. Zostały wyizolowane

w 1951 roku od 31-letniej kobiety rasy czarnej. Są komórkami posiadającymi liczbę modalną 82 chromosomów. Wykazano, że zawierają sekwencje wirusa brodawczaka ludzkiego HPV-18.

Komórki MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z gruczolakoraka gruczołu piersiowego. Pobrane zostały z miejsca przerzutowego w opłucnej. Zostały wyizolowane od 51-letniej kobiety pochodzenia kaukaskiego. Są komórkami aneuploidalnymi, posiadającymi liczbę modalną 64 chromosomów. Wykazują ekspresję onkogenu WNT7B.

Komórki 22Rv1 (ATCC CRL-2505) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z raka prostaty. Wykazują ekspresję antygenu swoistego dla prostaty (PSA).

Komórki HT-29 (ATCC HTB-38) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z gruczolakoraka okrężnicy. Zostały wyizolowane w 1964 roku od 44-letniej kobiety pochodzenia kaukaskiego. Komórki HT-29 posiadają liczbę modalną 71 chromosomów.

Komórki K-562 (ATCC CCL-243) są komórkami ludzkimi o morfologii limfoblastów. Pochodzą ze szpiku kostnego i mają cechy komórek białaczkowych przewlekłej białaczki mieloblastycznej (CML). Są komórkami wysoce nie zróżnicowanymi. Zostały wyizolowane od 53-letniej kobiety w terminalnej kryzie blastycznej. 25% komórek K-562 wykazuje ekspresję antygenu CD7.

Komórki HUV-EC-C (ATCC CRL-1730) są zdrowymi komórkami ludzkimi o morfologii endotelialnej. Pochodzą z żyły pępowinowej. Przewidywany czas życia tych komórek to 50–60 duplikacji. W hodowli wymagają suplementu wzrostu komórek endotelialnych (ECGS).

Komórki MRC-5 (ATCC CCL-171) są zdrowymi komórkami ludzkimi o morfologii fibroblastów. Zostały pobrane z płuca 14-tygodniowego płodu. Posiadają normalny kariotyp 46, XY.

Komórki CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790) są komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą ze zdrowej okrężnicy. Zostały pobrane z 21-tygodniowego płodu płci żeńskiej.

Komórki HU-609 (*Fibiger Institute*) są zdrowymi komórkami ludzkimi o morfologii nabłonkowej. Pochodzą z nabłonka pęcherza moczowego osoby dorosłej.

3.6. Badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap

W ocenie aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap zastosowano metodę dyfuzyjno-krażkową oraz fluorescencyjną metodę oceny żywotności bakterii. Badano wpływ peptydu względem następujących szczepów klinicznych bakterii: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*.

W metodzie dyfuzyjno-krażkowej standardowe krążki bibułowe o średnicy 6 mm nasączano rozcieńczeniami otrzymanego w trakcie izolacji supernatantu, zawierającego peptyd w stężeniu 400 µg/ml, uzyskując odpowiednio:

- 20 µg peptydu/krażek – krążki nr 1,
- 10 µg peptydu/krażek – krążki nr 2,
- 5 µg peptydu/krażek – krążki nr 3,
- 2,5 µg peptydu/krażek – krążki nr 4,
- 1,125 µg peptydu/krażek – krążki nr 5 oraz
- krążki kontrolne (K) – nasączone solą fizjologiczną.

Do badań używano zawiesiny bakteryjnej o gęstości 0,5 McFarlanda (McF). Bakterie posiewano na podłoża Mueller-Hinton Agar lub agar z 5% dodatkiem krwi baraniej (bioMérieux). Na hodowle nakładano przygotowane wcześniej krążki i inkubowano w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ przez 24 godziny w atmosferze tlenowej, po czym dokonywano odczytu.



Fot. 4. Zestaw Live/Death BacLight Bacterial Viability Kit zastosowany do oceny żywotności bakterii.

W metodzie oceny żywotności bakterii zastosowano test fluorescencyjny Live/Death BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, USA) zawierający SYTO9 i jodek propidyny (Fot. 4.). SYTO9 wybarwia komórki żywe na

kolor zielony, zaś jodek propidyny – komórki martwe na kolor czerwony. Na płycie 96-dółkowej zakładano podwójne hodowle poszczególnych bakterii:

- 1 mln bakterii/200 μ l podłoża złożonego z RPMI-1640 z 5% surowicą płodową bydlęcą (Sigma),
- 1 mln bakterii/187,5 μ l podłoża z dodatkiem 12,5 μ l supernatantu uzyskanego w trakcie izolacji, zawierającego peptyd w stężeniu 400 μ g/ml,
- 1 mln bakterii/175 μ l podłoża z dodatkiem 25 μ l powyższego supernatantu,
- 1 mln bakterii/150 μ l podłoża z dodatkiem 50 μ l powyższego supernatantu.

Hodowle inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Odczytu dokonywano w czasie zerowym, po 1 godzinie i po 24 godzinach przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E200 (pow. 1000 x).

3.7. Badania wytwarzania Entap przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*

Z hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus* otrzymywano zawiesinę 0,5 McF bakterii w 2 ml soli fizjologicznej. Do 2 ml RPMI-1640 (Sigma) wzbogaconego 0,5% glukozą dodawano 0,1 ml zawiesiny bakterii i hodowano przez 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 i 48 godzin w 37°C. Następnie hodowle filtrowano przez sączi używając supernatanty.

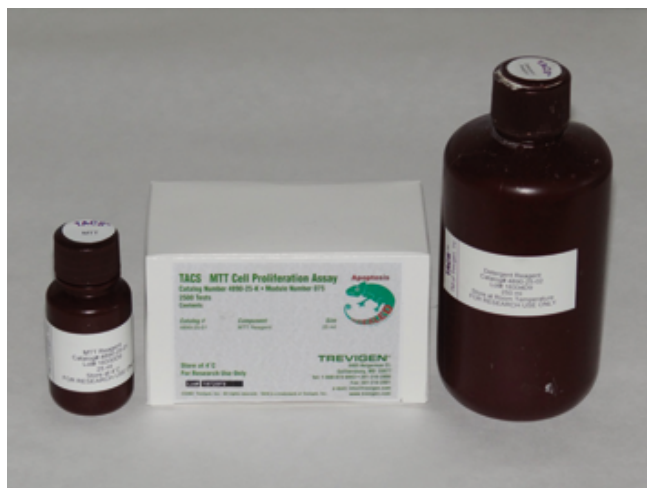
W badaniach określano zawartość peptydu Entap (μ g/ml) w poszczególnych supernatantach, stosując przedstawione wyżej metody izolacji i oczyszczania.

3.8. Badania aktywności antyproliferacyjnej Entap

Oceny aktywności proliferacyjnej komórek ludzkich dokonywano przy użyciu testu proliferacji komórek (TACS MTT Cell Proliferation Assay, Trevigen) (Fot. 5.). Badano aktywność proliferacyjną komórek w obecności zbuforowanej soli fizjologicznej PBS (20 μ l/10⁶ komórek/1 ml podłoża) oraz w obecności izolowanego peptydu (20 μ g/10⁶ komórek/1 ml podłoża). Podłoże stanowił płyn RPMI-1460 (Sigma) wzbogacony 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma). Przygotowane komórki inkubowano przez 2 godziny w inkubatorze w 37°C z 5% CO₂. Następnie przepłukiwano płynem hodowlanym i przeprowadzano badania aktywności proliferacji komórek stosując test TACS MTT Cell Proliferation Assay. Do próbek dodawano po 10 μ l MTT i inkubowano przez 20 godzin w 37°C, po czym dodawano po 100 μ l detergentu (Detergent Reagent) i inkubowano 3 godziny. Wyniki odczytywano przy absorpcji 570 nm.

Redukcję proliferacji badanych ludzkich linii komórkowych w obecności izolowanego peptydu obliczano na podstawie odczytu absorbancji (czytnik Reader 250, BioMerieux). Procent redukcji proliferacji obliczano wg wzoru:

$$\% \text{ redukcji proliferacji} = \left(\text{wartość } A_{570} \text{ proliferacji komórek} - \text{wartość } A_{570} \text{ proliferacji komórek w obecności peptydu} \right) \times 100\%.$$



Fot. 5. Zestaw TACS MTT Cell Proliferation Assay zastosowany do oceny aktywności proliferacyjnej komórek.

3.9. Badania histologiczne linii komórek rakowych

Badania histologiczne zostały przeprowadzone w Katedrze Patomorfologii Klinicznej (kierownik: prof. dr hab. med. Przemysław Majewski) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.9.1. Badania w mikroskopii optycznej

Dokonano oceny histologicznej wybranych linii komórek rakowych: gruczolakoraka żołądka AGS (ATCC CRL-1739), gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) i gruczolakoraka okrężnicy HT-29 (ATCC HTB-38). Komórki badano w obecności zbuforowanej soli fizjologicznej PBS (20 μ l /10⁶ komórek/1 ml podłoża) oraz w obecności izolowanego peptydu (20 μ g/10⁶ komórek/1 ml podłoża). Podłoże stanowił płyn RPMI-1460 (Sigma) wzbogacony 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma). Przygotowane komórki inkubo-

wano przez 2 godziny w inkubatorze w 37°C z 5% CO₂, po czym przepłukiwano je płynem hodowlanym i hodowano przez 20 godzin w 37°C. Następnie wykonywano rozmaz na szkiełku podstawowym. Preparaty utrwalano stosując odczynnik cytofix. Następnie barwiono je hematoksyliną i eozyną (H+E). Jednocześnie przeprowadzano badania mikroskopowo-elektronowe próbek.

3.9.2. Badania ultrastruktury w transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Materiał pobrany do badań ultrastrukturalnych był utrwalany w utrwalaczu wg Karnowskiego, zawierającym 4% paraformaldehyd i 0,5% aldehyd glutarowy w 0,2 M buforze kakodylowym (pH 7,4), temp. 4°C. Po utrwaleniu materiał płukano w 0,1 M buforze kakodylowym (pH 7,4) przez noc w temp. 4°C, a następnie dotrwalano wodnym roztworem 1% czterotlenku osmu z dodatkiem 0,8% żelazicyjanku potasowego przez 1 godzinę. Tak przygotowany materiał był odwadniany poprzez przeprowadzenie przez szereg alkoholowo-acetonowy i zatapiany w żywicy epoksydowej Epon 812 (SERVA). Zatopiony materiał pozostawiano w cieplarni w temp. 40°C na 24 godziny, a następnie w temp. 60°C do spolimerizowania.



Fot. 6. Transmisyjny mikroskop elektronowy JEM-1011.

Material do oceny w mikroskopie świetlnym

Z bloczków eponowych sporządzano skrawki półcienkie grubości 1 μm , które dobarwiano błękitem toluidyny w 1% boraksie. Ocenę świetlno-mikroskopową preparatów wykonano przy użyciu mikroskopu Olympus CH-2.

Material do oceny w transmisyjnym mikroskopie elektronowym

Bloczki z zatopionym materiałem krojono na ultramikrotomie Reichert na skrawki grubości 75 nm. Skrawki nanoszono na miedziane siatki, a następnie kontrastowano 9% nasyconym roztworem octanu uranylu przez 5 minut, płukano wodą bidestylowaną, dobarwiano cytrynianem ołowiu przez 5 minut i ponownie płukano wodą bidestylowaną. Tak przygotowane skrawki były oceniane i fotografowane w kolumnie transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM-1011 (Fot. 6.).

3.10. Badania ekspresji genów w komórkach rakowych

Badania ekspresji genów zostały przeprowadzone dzięki uprzejmości prof. dr hab. Ludwika K. Malendowicza w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii (kierownik: prof. dr hab. Maciej Zabel) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Zmiany w ekspresji genów w hodowlach komórek nowotworowych pod wpływem izolowanego peptydu (20 $\mu\text{g}/10^6$ komórek/1 ml podłoża) badano przy użyciu metody mikromacierzy. Zastosowano zestaw GeneAtlas 3' IVT Express Kit i GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain Kit for 3' IVT Arrays (Affymetrix) przeznaczony do badania ekspresji genów ludzkich oraz mikromacierze Affymetrix® Human Genome U219 Array Strip zawierające ponad 36 000 transkryptów i wariantów, reprezentujących ponad 20 000 genów.

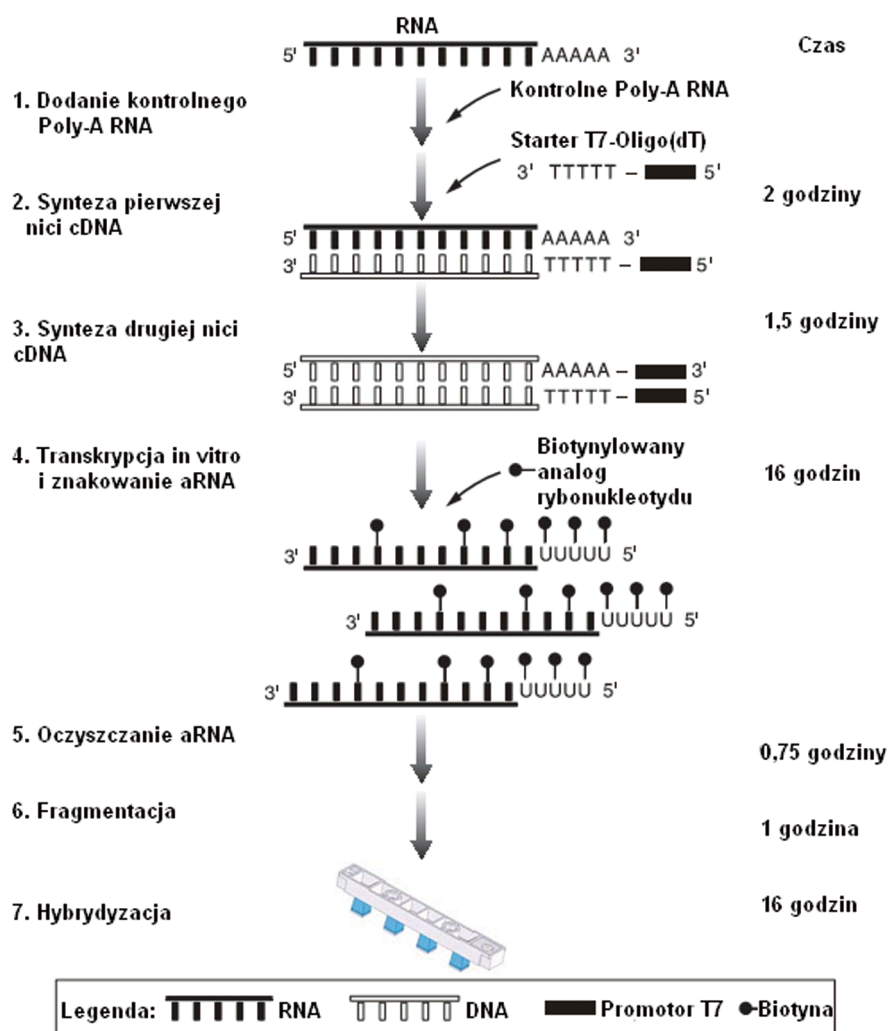
RNA badanych komórek izolowano stosując TRI Reagent (Sigma-Aldrich), zgodnie z zaleceniami producenta, po czym oczyszczano przy użyciu kolumn NucleoSpin RNA Binding (Macherey-Nagel). Analizę ilości oraz czystości wyizolowanego RNA przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Affymetrix).

Badania ekspresji genów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Pierwszym etapem badania ekspresji genów jest odwrotna transkrypcja zainicjowana przez przyłączenie startera T7-Oligo prowadząca do syntezy pierwszej nici cDNA zawierającej sekwencję promotora T7. Następnie przy udziale polimerazy DNA i RNazy H dochodzi do równoczesnej degradacji RNA oraz syntezy drugiej nici cDNA. Kolejny etap to transkrypcja *in vitro* (IVT) przy udziale biotynyłowanych analogów rybonukleotydów, prowadząca do amplifikacji kopii modyfikowanego biotyną aRNA. Zamplifikowane znakowane aRNA jest oczysz-

czane oraz fragmentowane. Następnie przeprowadza się hybrydyzację na mikromacierzach Affymetrix® Human Genome U219 Array Strip. Do wykonania hybrydyzacji oraz odczytu ekspresji genów zastosowano blok cieplny AccuBlock (Labnet), aparat GeneAtlas Personal Microarray System (Affymetrix) (Fot. 7.) oraz oprogramowanie Partek Express i Ariadne Pathway Express (Affymetrix Edition). Schemat procedury amplifikacji aRNA przedstawiono na ryc. 6.



Fot. 7. Blok cieplny AccuBlock oraz zestaw GeneAtlas Personal Microarray System (poniżej) stosowane w badaniach ekspresji genów.



Ryc. 6. Schemat procedury amplifikacji aRNA w badaniu ekspresji genów.

3.11. Metody statystyczne

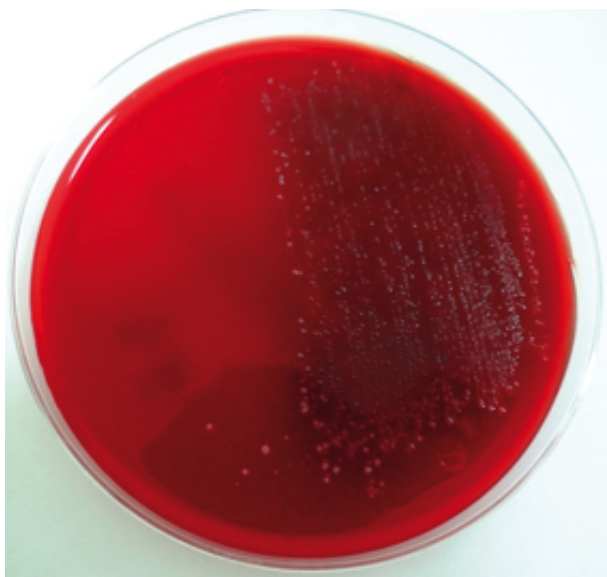
Uzyskane w badaniach wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 8 dla systemu operacyjnego Windows. W analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne, które pozwalają na wyliczanie szerokiego zakresu różnych miar położenia (średnia, mediana itd.) i dyspersji (odchylenie standardowe) dając w ten sposób pełny obraz danych. Są to metody niezależne od parametrów lub niezależne od rozkładu.

W analizie porównawczej aktywności proliferacyjnej stosowanych linii komórkowych zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya oraz test Kruskala-Wallisa. W badaniu ekspresji genów zastosowano test ANOVA. Hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka fenotypowa izolowanych szczepów klinicznych *Enterococcus*

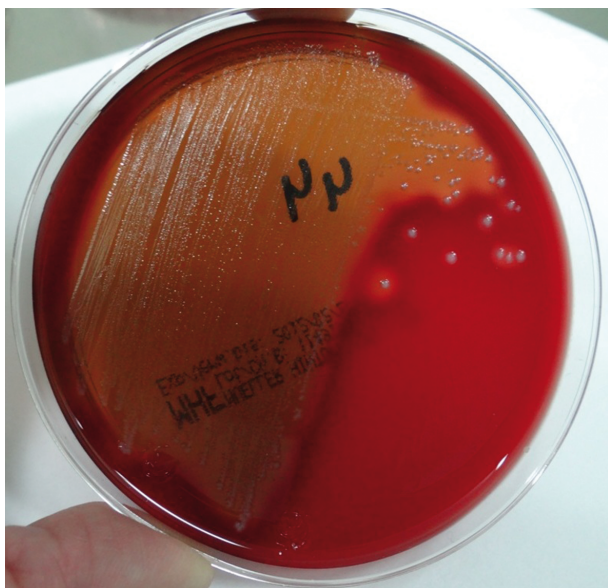
Spośród 30 szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, izolowanych od pacjentów, 25 należało do gatunku *E. faecalis*, 4 do gatunku *E. faecium* i 1 do *E. durans*. Zdolność do wytwarzania hemolizy alfa (Fot. 8.) stwierdzono u 12 szczepów *E. faecalis* oraz 2 szczepów *E. faecium*, hemolizy beta (Fot. 9.) u 8 szczepów *E. faecalis*, 1 szczepu *E. faecium* oraz szczepu *E. durans*. Brak wytwarzania hemolizy stwierdzono u 5 szczepów *E. faecalis* oraz 1 szczepu *E. faecium* (Tabela 6.).



Fot. 8. Hemoliza alfa na agarze z krwią końską.

Tabela 6. Charakterystyka badanych szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Gatunek	Materiał badany		Typ hemolizy		
	Mocz n = 24	Wymaz z rany n = 6	Alfa n = 14	Beta n = 10	Gamma n = 6
<i>Enterococcus faecalis</i> n = 25	22	3	12	8	5
<i>Enterococcus faecium</i> n = 4	2	2	2	1	1
<i>Enterococcus durans</i> n = 1	–	1	–	1	–



Fot. 9. Hemoliza beta na agarze z krwią końską.

Tabela 7. Analiza lekowrażliwości szczepów z gatunku *E. faecalis*

Antybiotyki	Szczepy wrażliwe (S)		Szczepy odporne (R)	
	liczba (%)	zakres wartości MIC (µg/ml) [mediana]	liczba (%)	zakres wartości MIC (µg/ml) [mediana]
penicylina G (PG)	24 (96%)	0,75–4 [1,75]	1 (4%)	256
ampicylina (AM)	24 (96%)	0,25–1 [0,5]	1 (4%)	256
gentamycyna (GM)	23 (92%)	0,25–96 [8]	2 (8%)	256 [256]
ciprofloksacyna (CI)	21 (84%)	0,25–1 [0,5]	4 (16%)	4–32 [6]
lewofloksacyna (LE)	23 (92%)	0,125–2 [0,5]	2 (8%)	32–48 [40]
wankomycyna (VA)	25 (100%)	0,5–4 [1,5]		
teikoplanina (TP)	25 (100%)	0,032–0,5 [0,125]		

Wrażliwość badanych szczepów *Enterococcus* na wybrane antybiotyki, oznaczona jako wartość MIC, została przedstawiona w tabelach 7–9. Wszystkie izolowane szczepy były wrażliwe na wankomycynę i teikoplaninę (szczepy VSE). Z kolei dwa szczepy *E. faecium* oraz dwa szczepy *E. faecalis* charakteryzowały się opornością wysokiego stopnia na aminoglikozydy (szczepy HLAR).

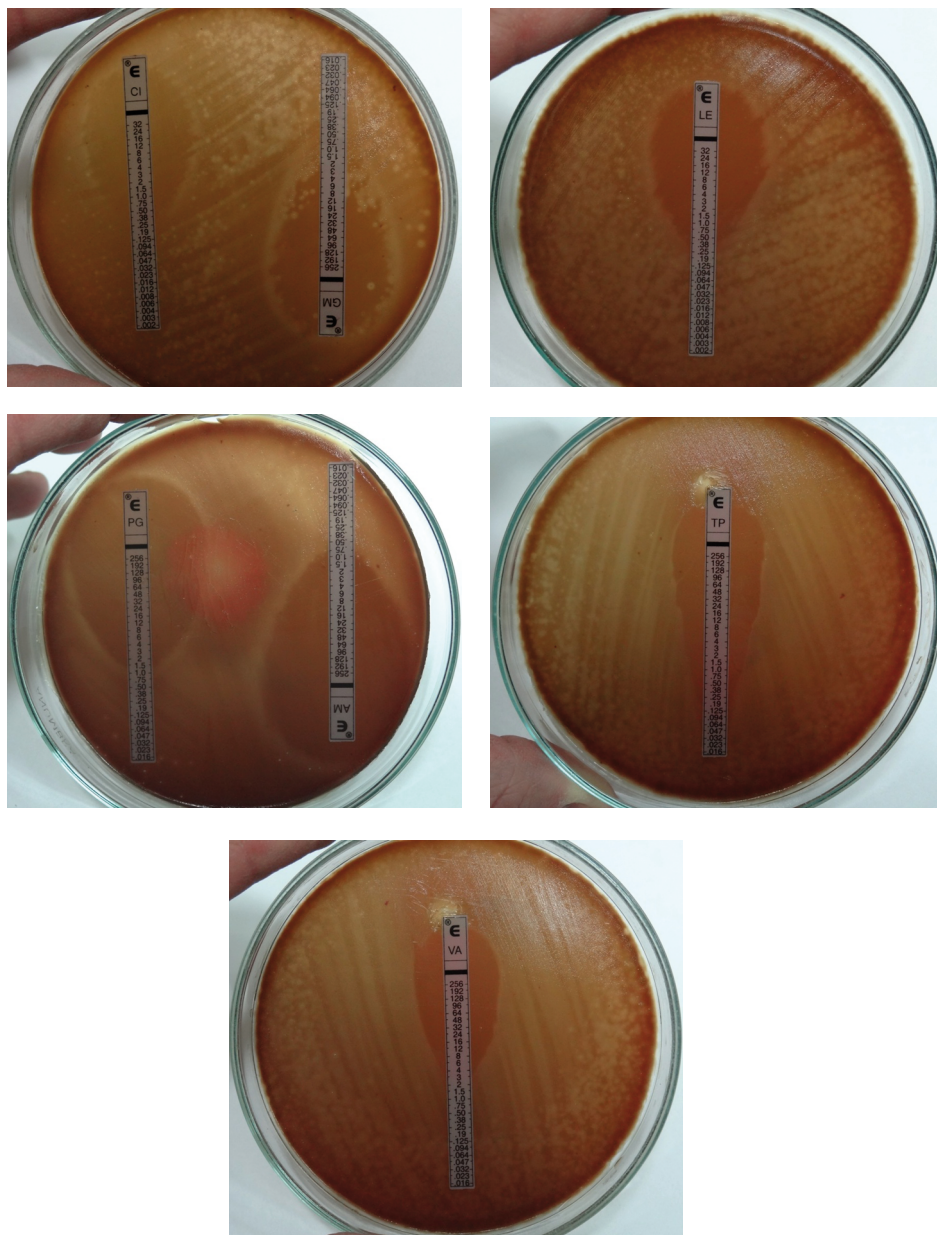
Tabela 8. Analiza lekowrażliwości szczepów z gatunku *E. faecium*

Antybiotyk	Szczepy wrażliwe (S)		Szczepy odporne (R)	
	liczba (%)	zakres wartości MIC (µg/ml) [mediana]	liczba (%)	zakres wartości MIC (µg/ml) [mediana]
penicylina G (PG)	3 (75%)	1–2 [1]	1 (25%)	64
ampicylina (AM)	3 (75%)	0,38–0,5 [0,5]	1 (25%)	64
gentamycyna (GM)	2 (50%)	4–16 [10]	2 (50%)	256 [256]
ciprofloksacyna (CI)	3 (75%)	0,38–0,75 [0,5]	1 (25%)	32
lewofloksacyna (LE)	3 (75%)	0,19–0,25 [0,25]	1 (25%)	12
wankomycyna (VA)	4 (100%)	0,25–3 [1,5]		
teikoplanina (TP)	4 (100%)	0,094–0,25 [0,1575]		

Tabela 9. Analiza lekowrażliwości szczepu z gatunku *E. durans*

Antybiotyk	Szczep wrażliwy (S) wartość MIC (µg/ml)
penicylina G (PG)	1,5
ampicylina (AM)	0,75
gentamycyna (GM)	3
ciprofloksacyna (CI)	0,19
lewofloksacyna (LE)	0,38
wankomycyna (VA)	3
teikoplanina (TP)	0,047

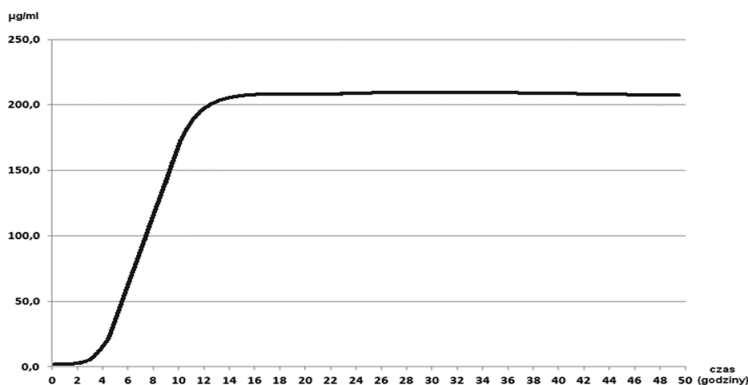
Na fotografii 10. przedstawiono przykładowe strefy zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Enterococcus*, w badaniu lekowrażliwości. Zastosowano paski Etest zawierające gradient antybiotyku. Hodowle prowadzono na podłożu Mueller-Hinton Agar z 5% dodatkiem krwi baraniej.



Fot. 10. Strefy zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Enterococcus*, w badaniu lekowrażliwości. Zastosowano paski Etest zawierające gradient antybiotyku.

4.2. Wytwarzanie peptydu przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*

Stwierdzono, że w warunkach hodowli, wszystkie badane szczepy *Enterococcus* wytwarzają peptyd o właściwościach antyproliferacyjnych. Peptyd ten jest wydzielany do podłoża w fazie wzrostu bakterii, począwszy od około 3. godziny, aż do wczesnej fazy stacjonarnej (około 10–12 godzin od założenia hodowli). Po tym czasie dochodzi do zahamowania produkcji peptydu (Ryc. 7.).

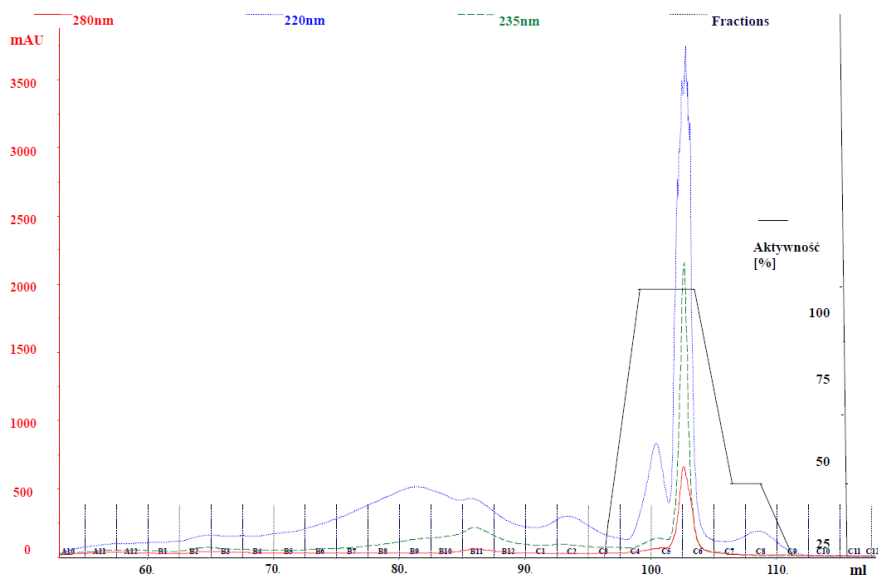


Ryc. 7. Wytwarzanie peptydu o właściwościach antyproliferacyjnych przez szczepy *Enterococcus* w hodowli 48-godzinnej (temp. 37°C).

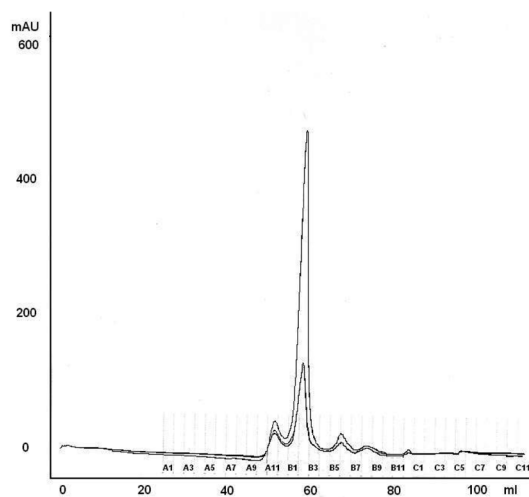
4.3. Izolacja peptydu

W przeprowadzonych badaniach aktywnego supernatantu, uzyskanego z bakterii *Enterococcus*, analiza elektroforetyczna SDS-PAGE wykazała obecność peptydu o masie cząsteczkowej około 6,2 kDa.

Oczyszczenie peptydu prowadzono stosując metodę sączenia molekularnego w systemie FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). W badaniu tym wykazano kilka frakcji, które testowano pod względem aktywności antyproliferacyjnej (Ryc. 8.). Aktywny materiał rozdzielano dalej w procesie rechromatografii i również testowano uzyskane frakcje pod względem ich aktywności antyproliferacyjnej (Ryc. 9.). W razie konieczności frakcje aktywne poddawano dalszej rechromatografii. Cały proces pozwolił na uzyskanie ostatecznej frakcji aktywnej, którą analizowano na obecność aminokwasów przy użyciu chromatografii gazowo-cieczowej, sprzężonej ze spektrometrią masową (Tab. 10.).



Ryc. 8. Chromatogram FPLC frakcji aktywnej zawierającej izolowany peptyd.

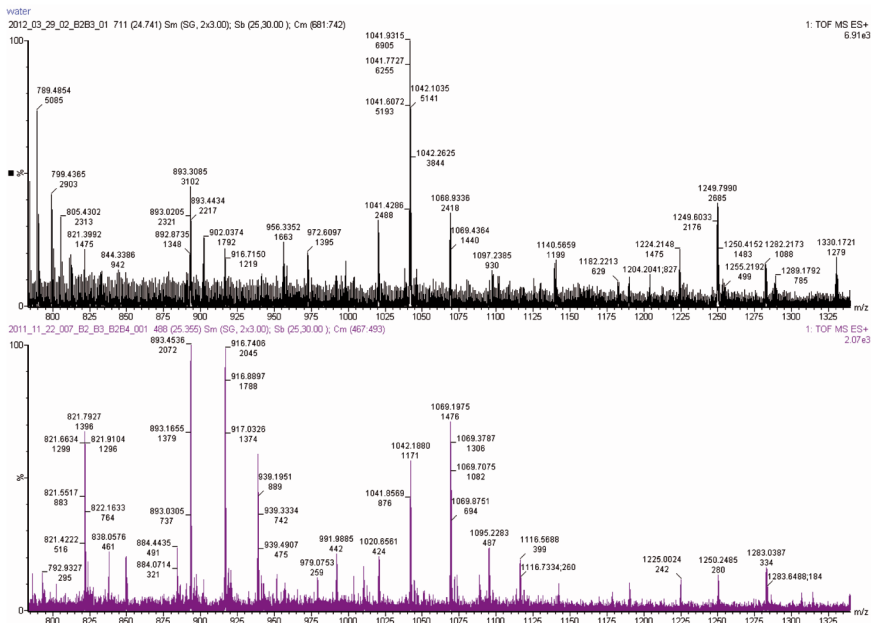


Ryc. 9. Rechromatografia FPLC frakcji aktywnej zawierającej izolowany peptyd.

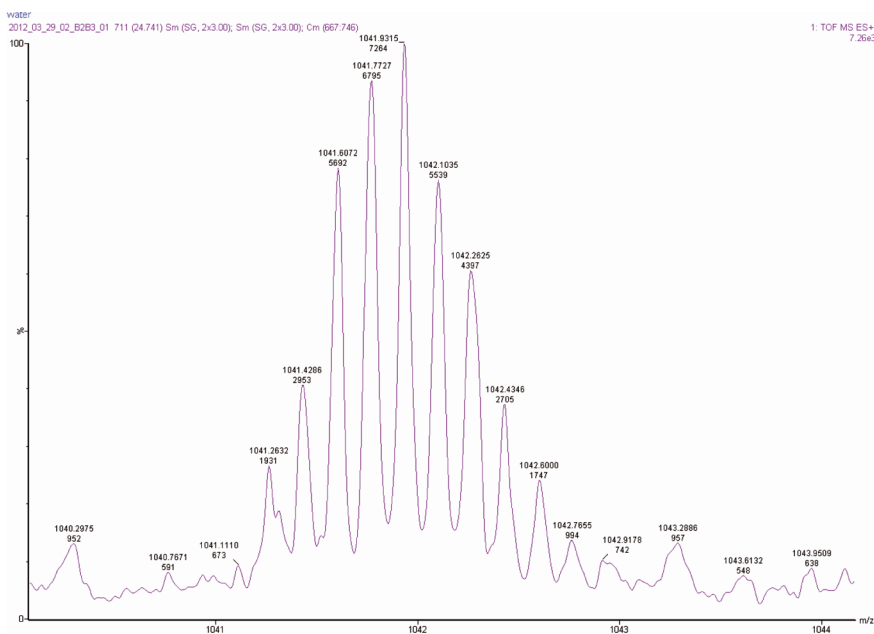
Analiza aminokwasowa wykazała obecność znacznej ilości aminokwasów hydrofobowych (Ala, Gly, Val, Leu, Ile), co determinuje silne hydrofobowe właściwości badanego materiału. Charakterystyczny jest brak aminokwasów siarkowych w badanej cząsteczce. Nie stwierdzono obecności cukrów lub lipidów w próbkach aktywnych frakcji.

Tabela 10. Wyniki oznaczenia aminokwasów metodą GLC-MS

Aminokwas	Czas retencji [min]	nmol/w próbce	Proporcje molarne
Alanina	7,15	4,914	9,83
Glicyna	7,36	12,705	25,41
Walina	8,32	4,763	9,53
Leucyna	8,70	4,205	8,41
Izoleucyna	9,01	5,722	11,45
Hydroksypolina	10,93	0,763	1,53
Seryna	11,25	2,113	4,23
Treonina	11,52	0,264	0,53
Fenylalanina	12,06	1,188	2,38



Ryc. 10. Widmo masowe (zależność masa/ladunek) GLC-MS pików izolowanego peptydu (jon 1041/1042).



Ryc. 11. Widmo masowe dla jonu 1041/1042 m/z.

Badania GLC-MS wykazały, że frakcja aktywna złożona jest z kilku peptydów posiadających podobną masę cząsteczkową, oraz identyczny skład aminokwasowy głównej sekwencji. Różnice masy cząsteczkowej pomiędzy peptydami związane są z występowaniem lub brakiem dwóch aminokwasów (Gly+Val lub Gly+Ala) na końcu łańcucha aminokwasowego cząsteczki. Podstawowym peptydem wyizolowanym z aktywnej frakcji jest cząsteczka białkowa o masie 6247,2 Da (Ryc. 10., Tabela 11.). Na rycinie 11. pokazano chromatogram masowy GLC-MS, na którym występuje zespół kilku peptydów posiadających podobną masę cząsteczkową, w tym zidentyfikowany peptyd w czasie retencji 24,74 minut. Peptyd ten charakteryzuje się obecnością około 62 aminokwasów o składzie pokazanym w tabeli 10., gdzie przeważają aminokwasy hydrofobowe. Hydrofobowa natura peptydu oraz liczba aminokwasów pozwalają wnioskować o sferycznej budowie i przewidywanej tendencji do skupiania się w środowisku wodnym w agregaty. Potwierdza to uzyskany model przestrzenny izolowanego peptydu (Ryc. 12.).

W badaniu spektrofotometrycznym UV-VIS uzyskano widmo zgodne ze składem aminokwasowym, czyli z wysoką zawartością aminokwasów alifatycznych nie absorbujących przy długości fali w zakresie 270–290 nm, gdzie możliwe maksimum na widmie o niskiej intensywności może jedynie pochodzić od pierścienia aromatycznego fenyloalaniny występującej w małej ilości (Ryc. 13.).

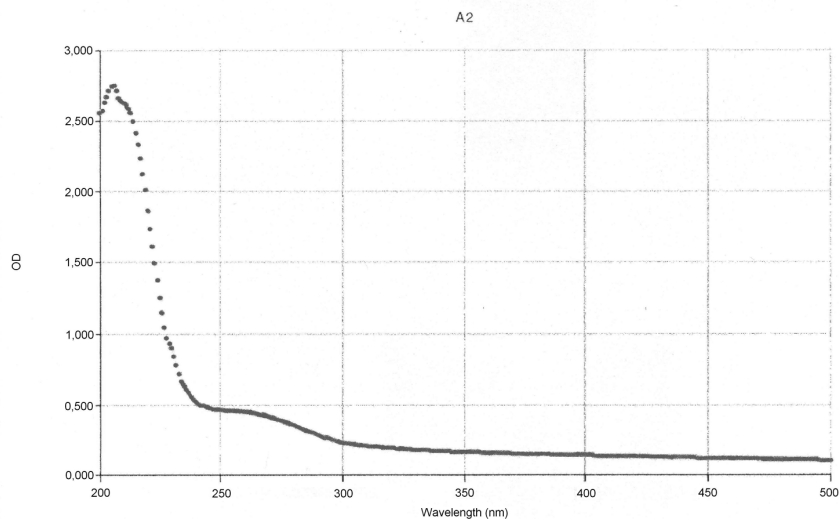
Tabela 11. Wybrane wyniki pomiarów spektrometrycznych dla izolowanych peptydów frakcji B2B3 z ryc. 9.

Jon [m/z]	Ładunek	Masa [Da]	Średnia masa [Da]
1021,02	6	6120,1	6120,1
1250,44	5	6247,2	6247,2
1042,20	6	6247,2	
893,46	7	6247,2	
1283,05	5	6410,2	6410,3
1069,38	6	6410,3	
916,75	7	6410,3	
1095,39	6	6566,3	6566,4
939,04	7	6566,3	
821,80	8	6566,4	



Ryc. 12. Analizowany metodą wizualizacji elektronmikroskopowej model przestrzenny Entap. Hydrofobowe domeny są oddzielone hydrofilowymi, co nadaje cząsteczce właściwości amfipatyczne. Jednocześnie, brak aminokwasów siarkowych, jak w grupie peptydów posiadającej mostki dwusiarczkowe stabilizujące strukturę oraz brak aminokwasów zasadowych jak w grupie peptydów kationowych.

Uzyskany czynnik antyproliferacyjny jest substancją peptydową o masie cząsteczkowej 6247,2 Da, termostabilną w temperaturze 75°C przez 0,5 godziny. Badania peptydu wskazują na jego unikalną hydrofobową budowę wynikającą ze składu aminokwasowego. Jednocześnie peptyd ten ma tendencję do tworzenia agregatów. W związku z aktywnością antyproliferacyjną peptydu nadano mu nazwę Entap (*Enterococcal antiproliferative peptide*).

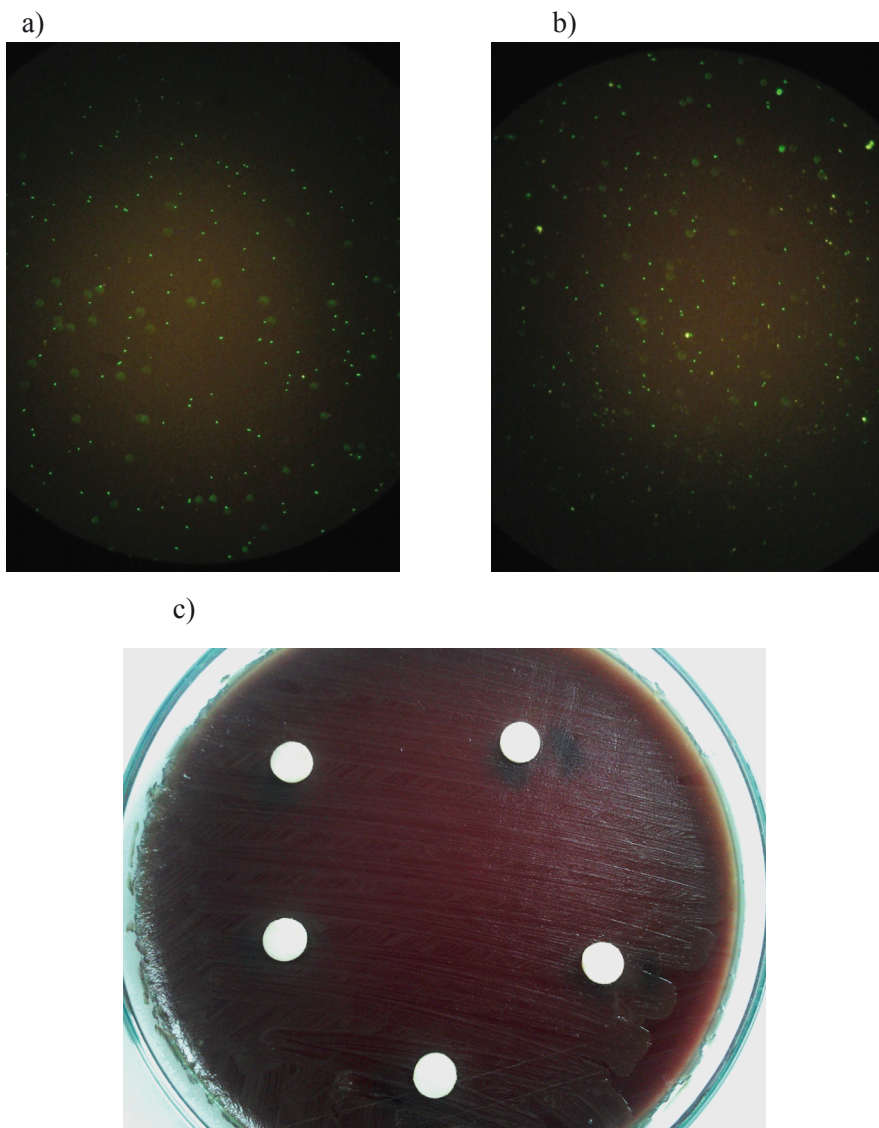


C5-C6

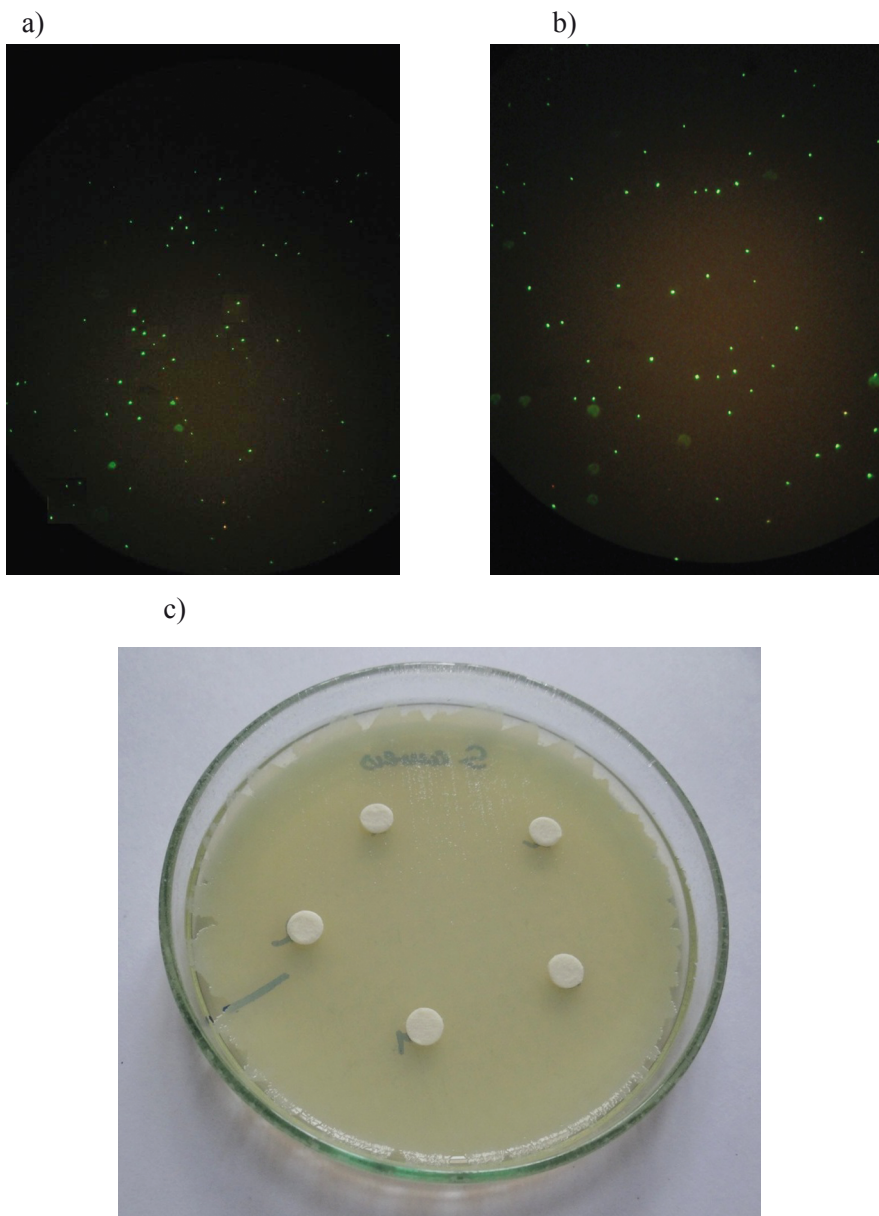
Ryc. 13. Widmo UV-VIS wyizolowanego peptydu.

4.4. Aktywność przeciwbakteryjna izolowanego peptydu Entap

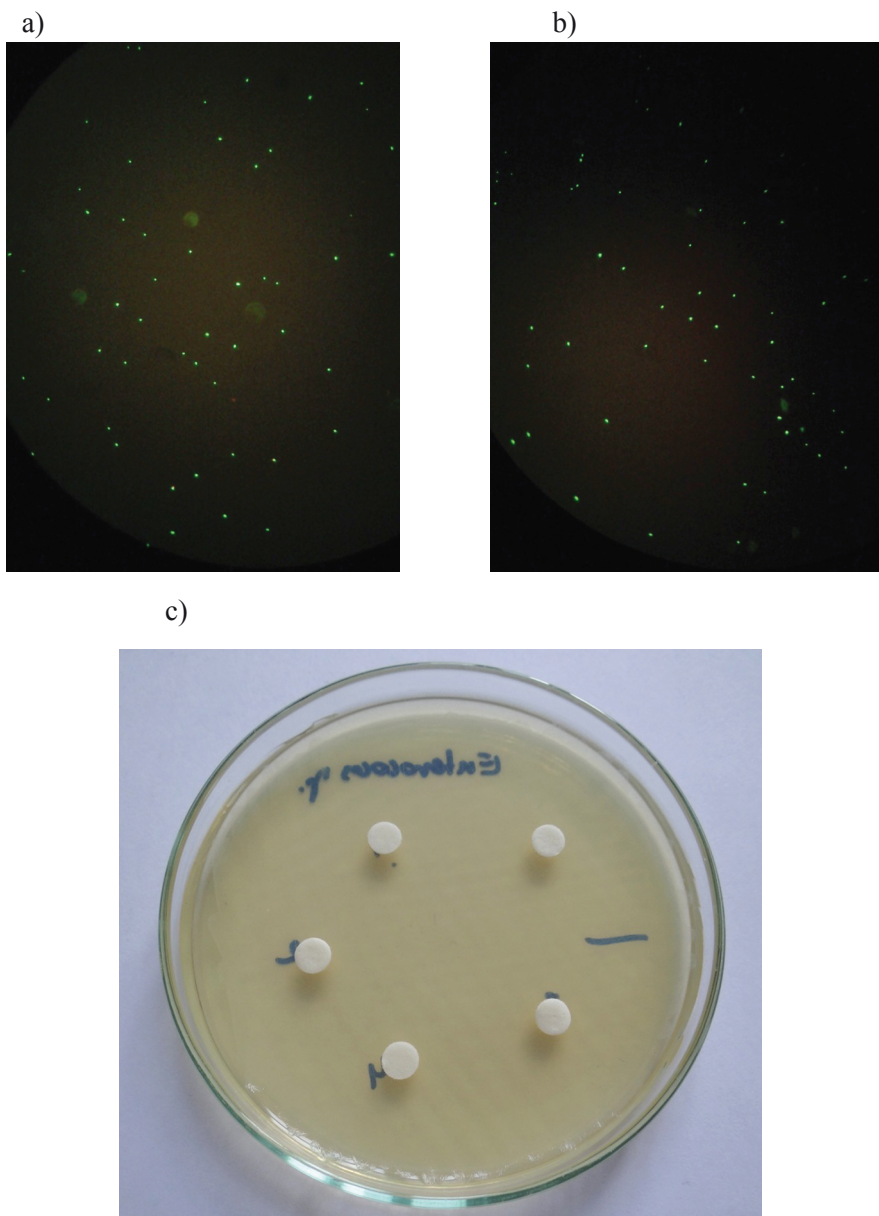
W przeprowadzonych badaniach nie wykazano działania przeciwbakteryjnego peptydu Entap zarówno przy zastosowaniu metody dyfuzyjno-krażkowej, jak i fluorescencyjnego testu oceny żywotności bakterii. W metodzie dyfuzyjno-krażkowej, stosując krążki nasączone odpowiednimi stężeniami izolowanego peptydu, nie stwierdzono stref zahamowania wzrostu po 24 godzinach hodowli następujących szczepów bakterii: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*. W teście fluorescencyjnym, zarówno w próbkach kontrolnych (bez zawartości peptydu), jak i w próbkach po inkubacji z izolowanym peptydem, żywotność powyższych szczepów bakterii w czasie zerowym, po 1 godzinie i po 24 godzinach wynosiła 92–98%. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec poszczególnych szczepów bakterii przedstawiono na fotografiach 11–16.



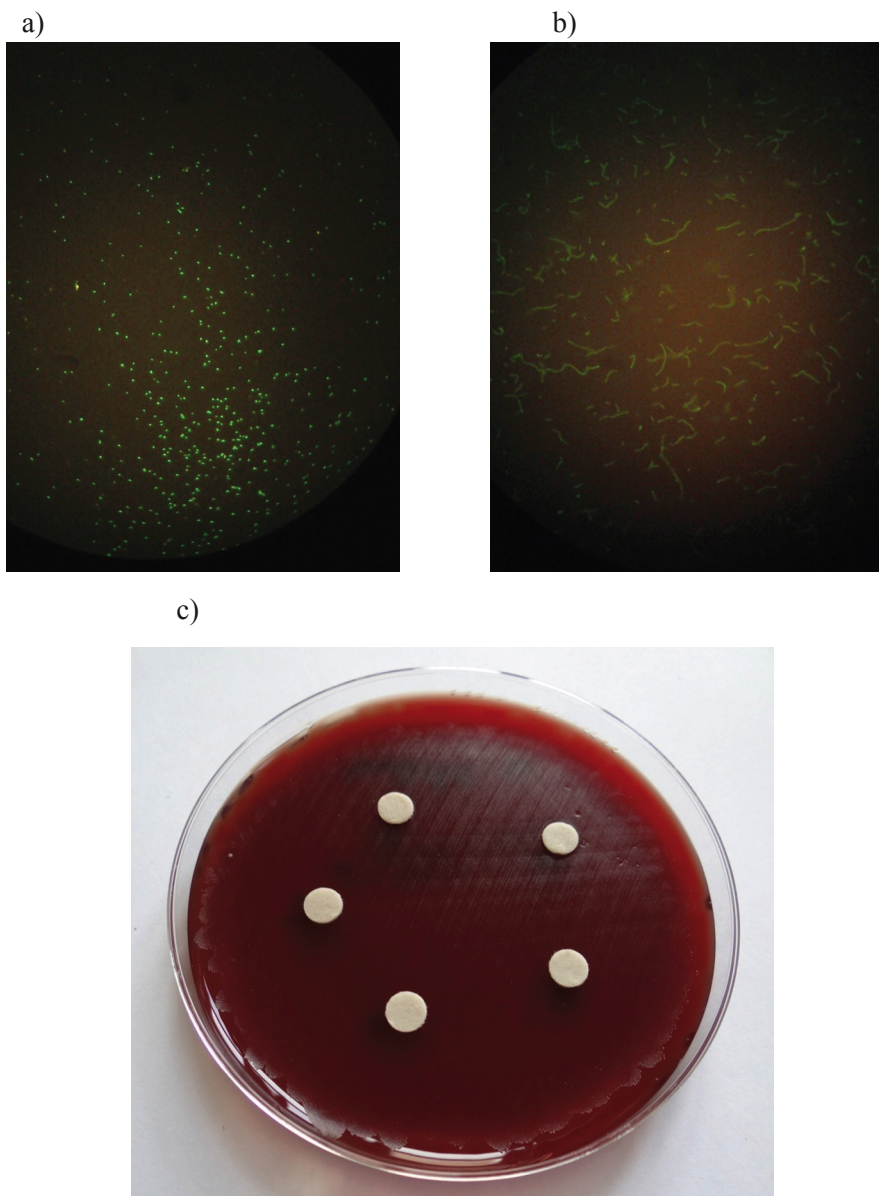
Fot. 11. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Listeria monocytogenes*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap (pow. 400 x), c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.



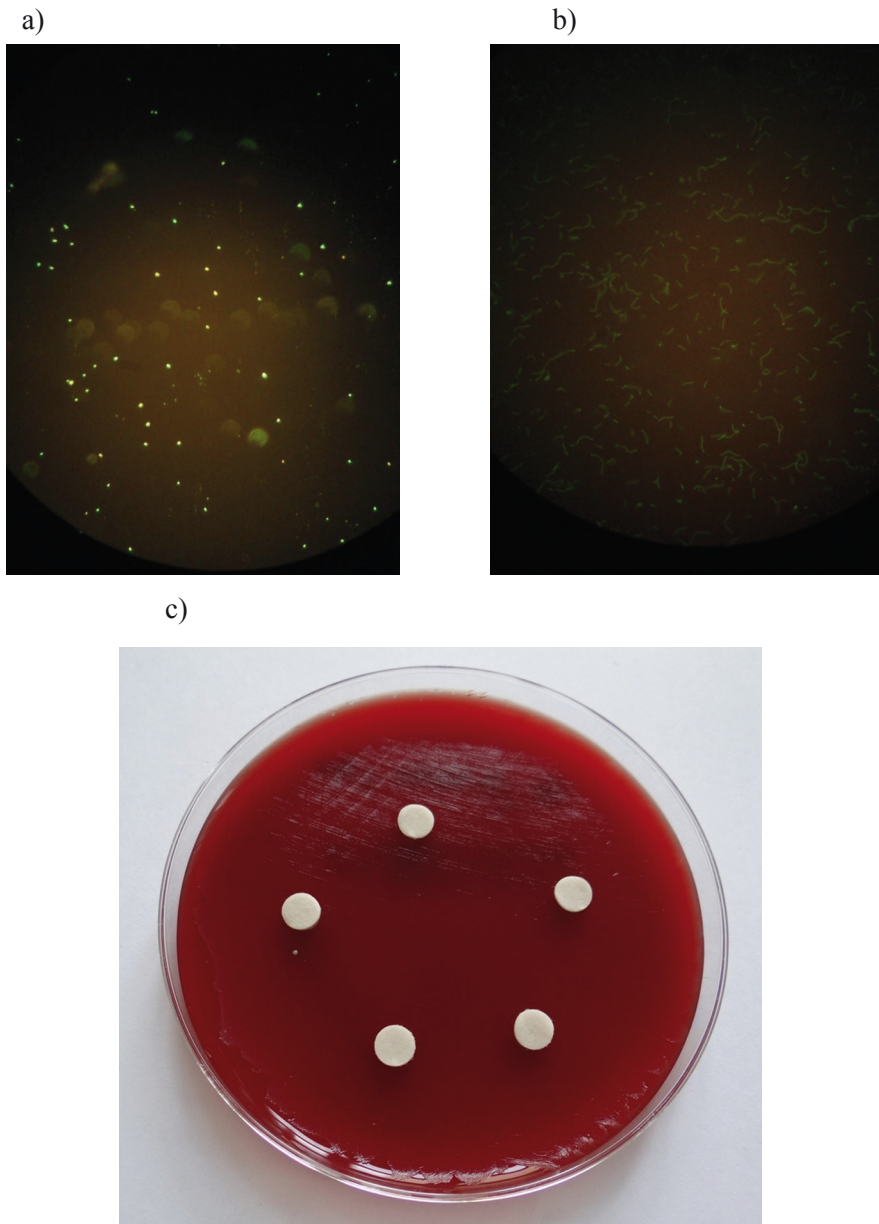
Fot. 12. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Staphylococcus aureus*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap, c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.



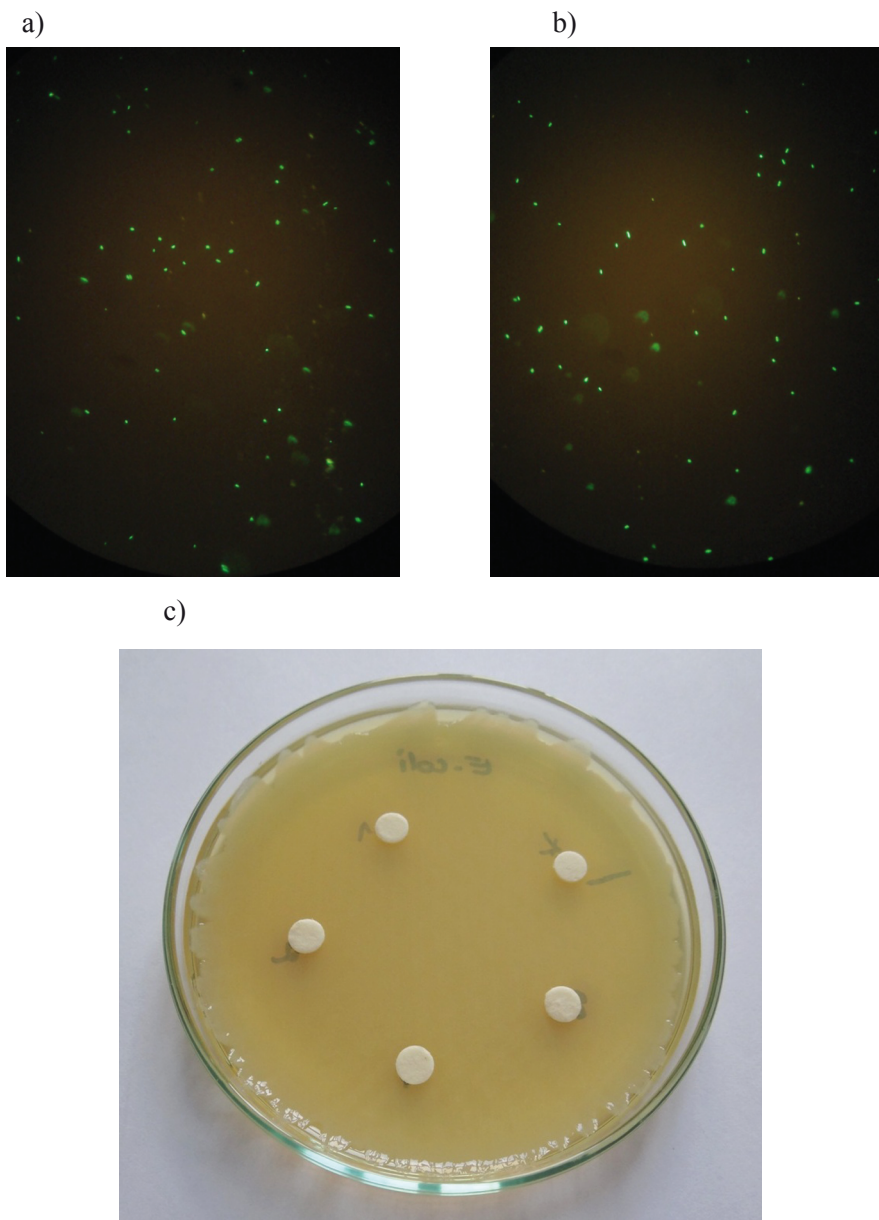
Fot. 13. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Enterococcus faecalis*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap, c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.



Fot. 14. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Streptococcus pyogenes*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap, c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.



Fot. 15. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Streptococcus agalactiae*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap, c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.



Fot. 16. Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej peptydu Entap wobec szczepu *Escherichia coli*: a) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt w czasie zerowym, b) fluorescencyjny test żywotności bakterii, odczyt po 24 h inkubacji z peptydem Entap, c) metoda dyfuzyjno-krażkowa, hodowla 24 h.

4.5. Aktywność antyproliferacyjna izolowanego peptydu Entap

W serii wstępnych doświadczeń z użyciem podłoża RPMI-1460 oraz podłoża RPMI-1460 wzbogaconego 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) nie stwierdzono wpływu FBS na aktywność proliferacyjną komórek. W badaniach doświadczalnych *in vitro* wykazano silne działanie antyproliferacyjne izolowanego peptydu Entap wobec ludzkich komórek nowotworowych: gruczolakoraka żołądka AGS (ATCC CRL-1739), gruczolakoraka szyjki macicy HeLa (ATCC CCL-2), gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), raka prostaty 22Rv1 (ATCC CRL-2505) oraz gruczolakoraka okrężnicy HT-29 (ATCC HTB-38).

Tabela 12. Aktywność antyproliferacyjna peptydu Entap wobec komórek rakowych

Badane komórki rakowe	Aktywność proliferacyjna komórek – średnia wartość $OD_{570} \pm SD$ (Kontrola)	Aktywność proliferacyjna komórek po inkubacji z uzyskanym peptydem Entap – średnia wartość $OD_{570} \pm SD$	% redukcji aktywności proliferacyjnej w obecności peptydu Entap – średnia $\pm SD$	istotność statystyczna p
AGS (ATCC CRL-1739)	A. $1,431 \pm 0,053$	C. $1,074 \pm 0,073$	$35,6 \pm 8,0 \%$	A vs. C $p < 0,0001$
	B. $1,427 \pm 0,042$			B vs. C $p < 0,0001$
HeLa (ATCC CCL-2)	A. $1,418 \pm 0,090$	C. $1,127 \pm 0,099$	$29,1 \pm 3,3 \%$	A vs. C $p < 0,0001$
	B. $1,423 \pm 0,063$			B vs. C $p < 0,0001$
MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)	A. $1,799 \pm 0,098$	C. $1,428 \pm 0,109$	$38,4 \pm 3,3 \%$	A vs. C $p < 0,0001$
	B. $1,775 \pm 0,071$			B vs. C $p < 0,0001$
22Rv1 (ATCC CRL-2505)	A. $1,269 \pm 0,090$	C. $0,918 \pm 0,060$	$35,0 \pm 6,0 \%$	A vs. C $p < 0,0001$
	B. $1,240 \pm 0,089$			B vs. C $p < 0,0001$
HT-29 (ATCC HTB-38)	A. $1,288 \pm 0,114$	C. $0,967 \pm 0,136$	$32,0 \pm 4,3 \%$	A vs. C $p < 0,0001$
	B. $1,279 \pm 0,096$			B vs. C $p < 0,0001$

A – Badanie kontrolne, B – Badanie kontrolne po inkubacji z 50 μ l soli fizjologicznej PBS, C – Badanie działania peptydu Entap na komórki nowotworowe po 2h inkubacji (temp. 37°C).

Procent redukcji aktywności proliferacyjnej powyższych linii komórkowych w obecności peptydu Entap wynosił 29,1–38,4%. Jednocześnie stwierdzono słabą

be oddziaływanie wobec komórek białaczkowych K-562 (ATCC CCL-243); procent redukcji aktywności proliferacyjnej wynosił 5,3%. W przypadku ludzkich linii komórek zdrowych: komórek endotelialnych żyły pępowinowej HUV-EC-C (ATCC CRL-1730), fibroblastów płuc MRC-5 (ATCC CCL-171), komórek nabłonka okrężnicy CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790) oraz komórek nabłonka pęcherza moczowego HU-609 (Fibiger Institute) wykazano bardzo słabe działanie antyproliferacyjne Entap. Procent redukcji aktywności proliferacyjnej powyższych linii komórkowych w obecności peptydu Entap wynosił 3,1–3,9%. Wyniki te nie różniły się istotnie od wyników kontrolnych (w obecności PBS) Wyniki badań aktywności antyproliferacyjnej peptydu Entap przedstawiono w tabelach 12. i 13. Uzyskane wartości redukcji aktywności proliferacyjnej komórek rakowych pod wpływem Entap różniły się istotnie ($p < 0,0001$) względem wartości redukcji aktywności proliferacyjnej komórek zdrowych.

Tabela 13. Aktywność antyproliferacyjna peptydu Entap wobec komórek białaczkowych oraz komórek zdrowych człowieka

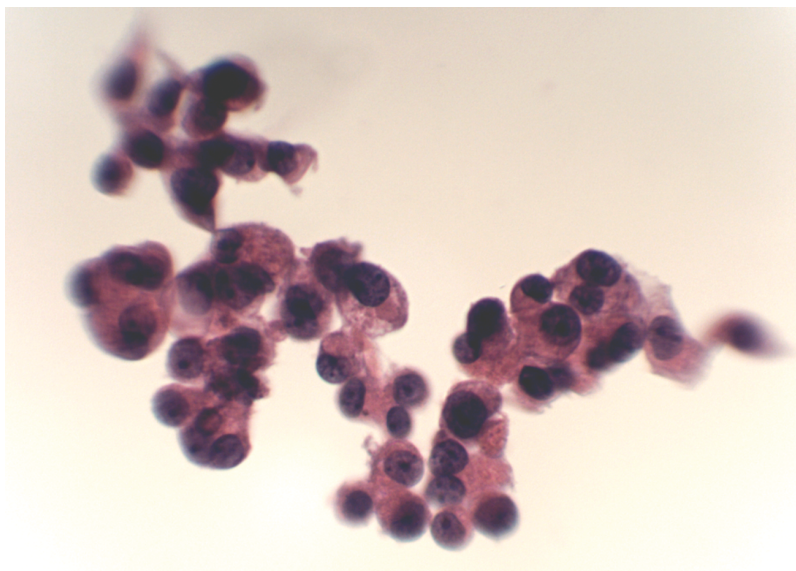
Badane komórki nierakowe	Aktywność proliferacyjna komórek – średnia wartość $OD_{570} \pm SD$ (Kontrola)	Aktywność proliferacyjna komórek po inkubacji z uzyskanym peptydem Entap – średnia wartość $OD_{570} \pm SD$	% redukcji aktywności proliferacyjnej w obecności peptydu Entap – średnia $\pm SD$	istotność statystyczna p
K-562 (ATCC CCL-243)	A. $1,122 \pm 0,073$	C. $1,069 \pm 0,058$	$5,3 \pm 1,4 \%$	A vs. C $p = 0,0900$
	B. $1,063 \pm 0,084$			B vs. C $p = 0,8550$
HUV-EC-C (ATCC CRL-1730)	A. $1,012 \pm 0,056$	C. $0,982 \pm 0,062$	$3,1 \pm 1,6 \%$	A vs. C $p = 0,2719$
	B. $1,024 \pm 0,051$			B vs. C $p = 0,2245$
MRC-5 (ATCC CCL-171)	A. $1,047 \pm 0,081$	C. $1,008 \pm 0,073$	$3,9 \pm 1,1 \%$	A vs. C $p = 0,2737$
	B. $1,040 \pm 0,073$			B vs. C $p = 0,3400$
CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790)	A. $0,972 \pm 0,103$	C. $0,939 \pm 0,105$	$3,4 \pm 1,5 \%$	A vs. C $p = 0,4876$
	B. $0,982 \pm 0,095$			B vs. C $p = 0,3504$
HU-609 (Fibiger Institute)	A. $0,946 \pm 0,084$	C. $0,908 \pm 0,069$	$3,8 \pm 1,7 \%$	A vs. C $p = 0,2844$
	B. $0,928 \pm 0,076$			B vs. C $p = 0,5460$

A – Badanie kontrolne, B – Badanie kontrolne po inkubacji z 50 μ l soli fizjologicznej PBS, C – Badanie działania peptydu Entap na komórki po 2h inkubacji (temp. 37°C).

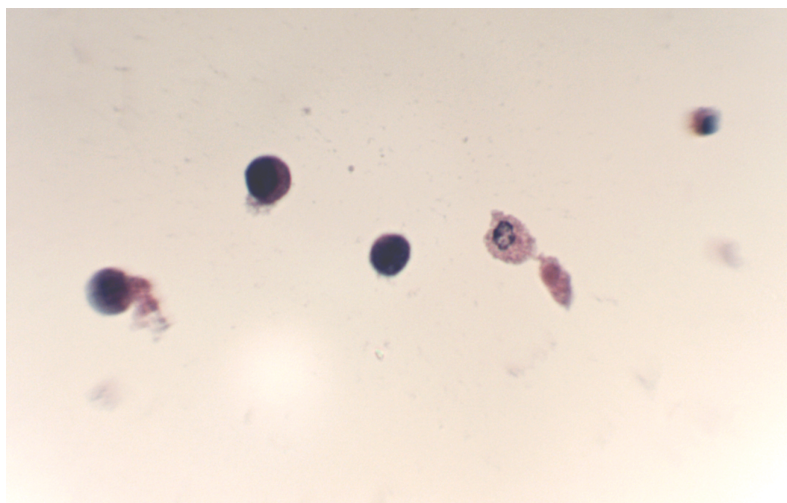
4.6. Ocena badanych komórek rakowych w mikroskopii optycznej

W barwieniu H+E badane komórki AGS, HeLa, MDA-MB-231, 22Rv1 i HT-29, w badaniach kontrolnych, wykazują cechy charakterystyczne dla komórek rakowych. Widoczne są formy podziału, wielojądrowość, polimorfizm jąder komórkowych, jąderka, ziarnista chromatyna, a w cytoplazmie drobne wodniczki. W powyższych komórkach inkubowanych z peptydem Entap pojawiają się cechy apoptozy.

A)



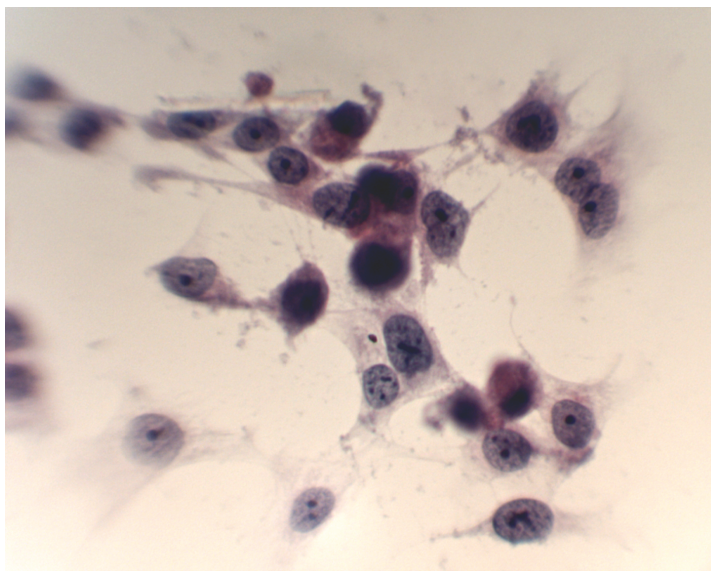
B)



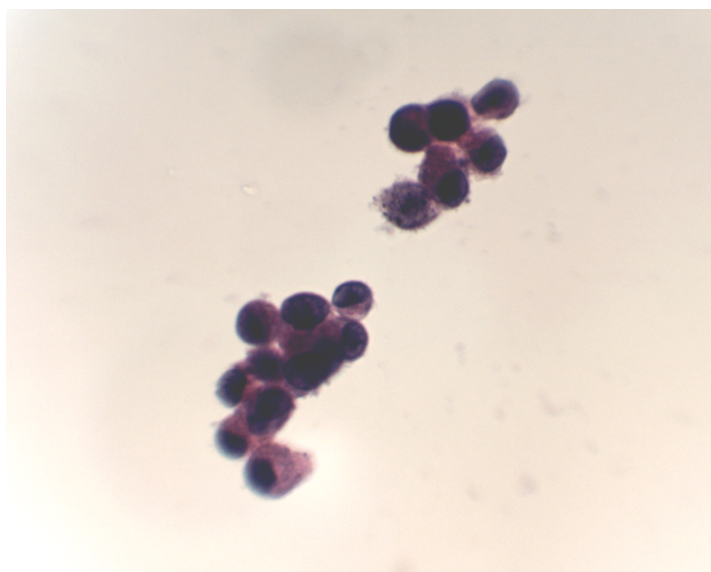
Fot. 17. Komórki gruczolakoraka żołądka w hodowli 20 h – AGS (pow. 600 x):
A) kontrola, B) po preinkubacji 2 h z Entap.

W komórkach gruczolakoraka żołądka AGS (Fot. 17.), gruczolakoraka szyjki macicy HeLa (Fot. 18.) oraz gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 (Fot. 19.) dochodzi do zmniejszenia rąbka cytoplazmy lub jego braku, jądra komórkowe stają się mniejsze, jednocześnie o większej gęstości (bardziej homogenne), w porównaniu z kontrolą. Obecne są komórki, które uległy degradacji.

A)

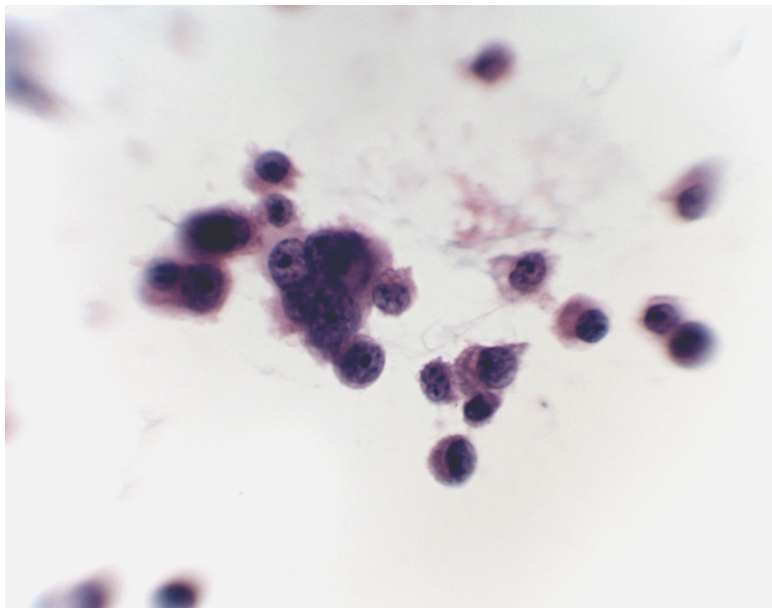


B)

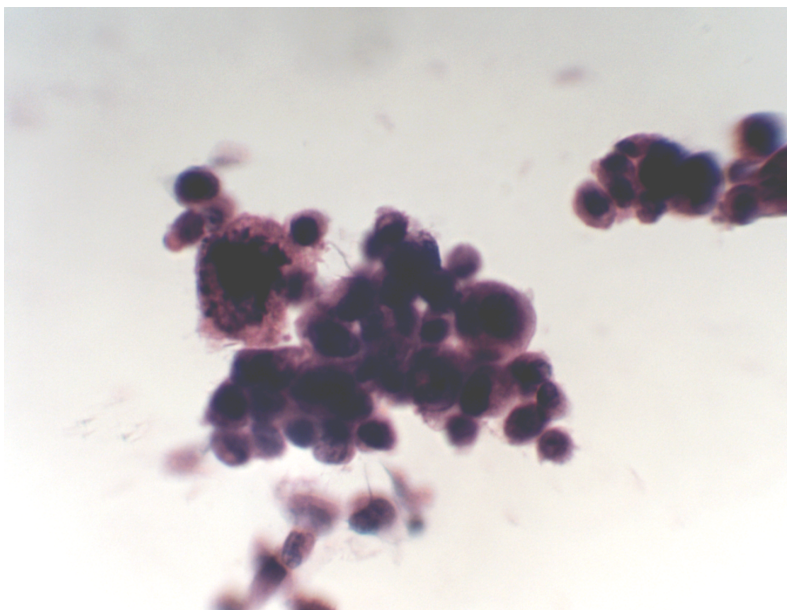


Fot. 18. Komórki gruczolakoraka szyjki macicy w hodowli 20 h – HeLa (pow. 600 x): A) kontrola, B) po preinkubacji 2 h z Entap.

A)



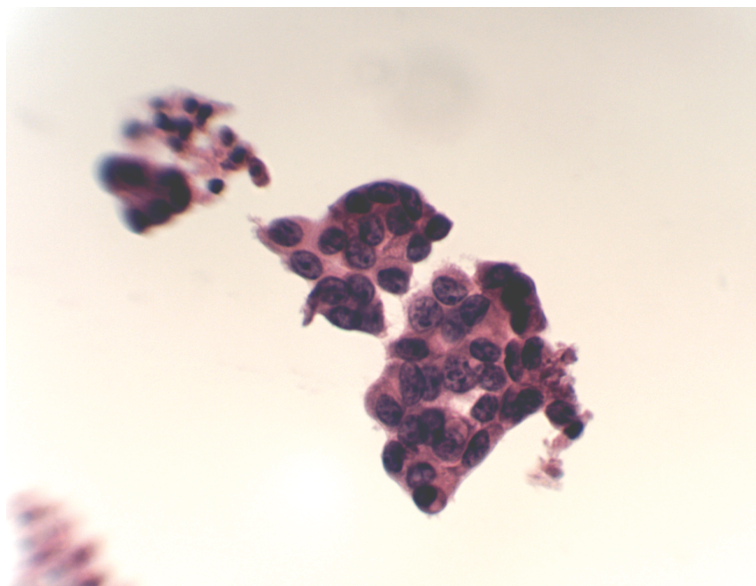
B)



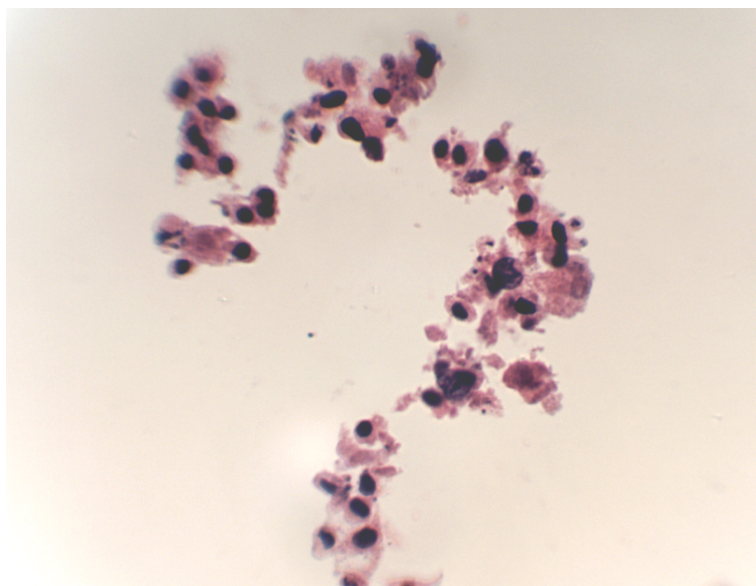
Fot. 19. Komórki gruczolakoraka gruczołu piersiowego w hodowli 20 h – MDA-MB-231 (pow. 600 x): A) kontrola, B) po preinkubacji 2 h z Entap.

W komórkach gruczolakoraka okrężnicy HT-29 (Fot. 20.) oraz komórkach raka prostaty 22Rv1 (Fot. 21.) inkubowanych z peptydem Entap, w porównaniu z kontrolą, dochodzi do zmniejszenia rąbka cytoplazmy lub jego braku, jądra komórkowe stają się pyknotyczne, brak jest widocznych jąderek. Obecne są liczne komórki, które uległy degradacji.

A)

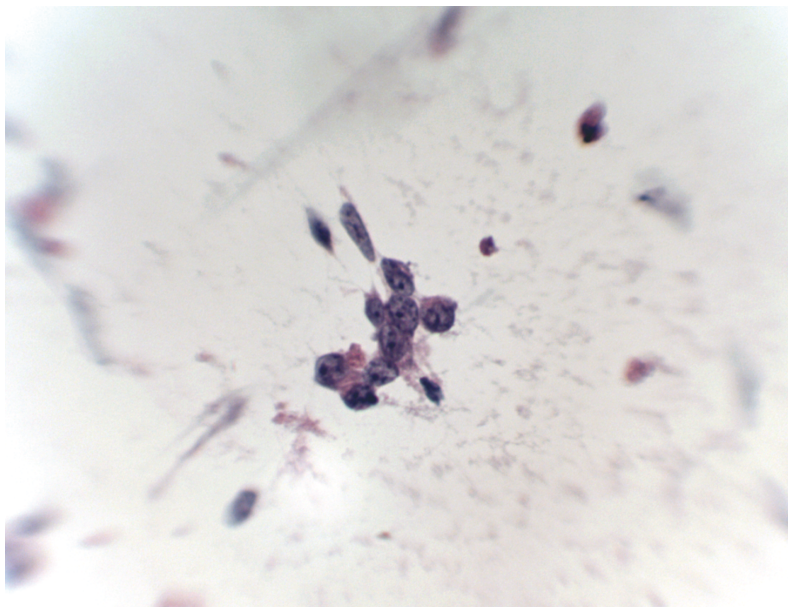


B)

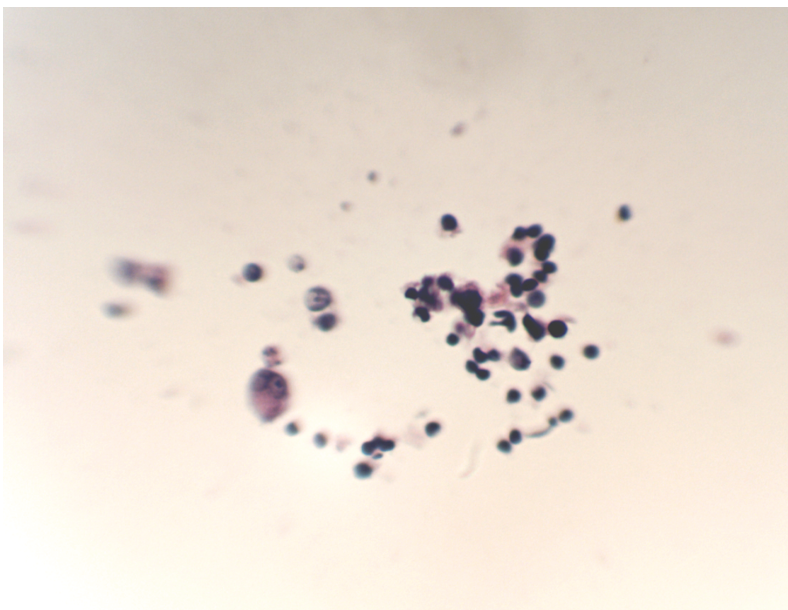


Fot. 20. Komórki gruczolakoraka okrężnicy w hodowli 20 h – HT-29 (pow. 600 x):
A) kontrola, B) po preinkubacji 2 h z Entap.

A)



B)



Fot. 21. Komórki raka prostaty w hodowli 20h – 22Rv1 (pow. 600 x): A) kontrola, B) po preinkubacji 2 h z Entap.

4.7. Ocena badanych komórek rakowych w transmisyjnej mikroskopii elektronowej

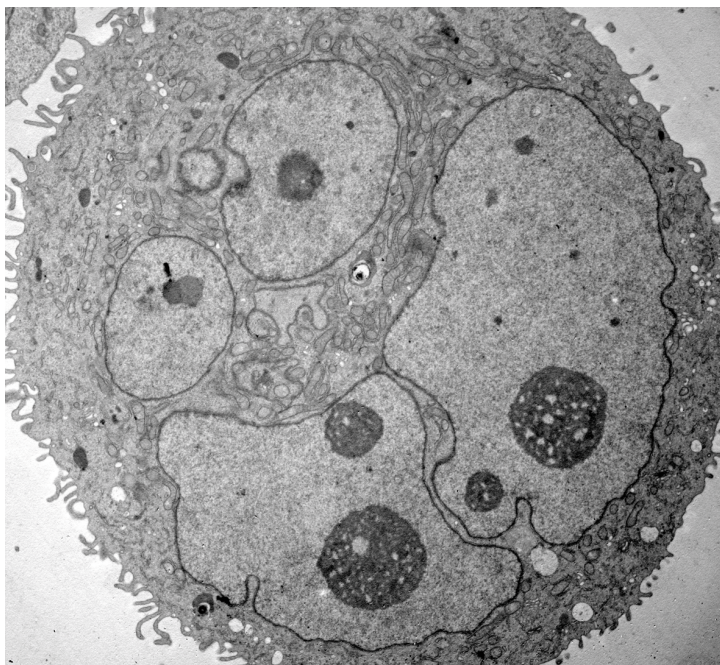
W obrazie mikroskopowo-elektronowym komórki gruczolaka żołądka AGS (kontrola) charakteryzują się obecnością form podziału, wielojądrowością i polimorfizmem jąder komórkowych. Komórki posiadają liczne mikrokosmkowate wypustki. Cytoplazma komórkowa zawiera kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego, kanały gładkie i rozproszone polirybosomy. Mitochondria komórkowe mają regularny układ grzebieni i jasną macierz. Jądra komórkowe zawierają aktywne jąderka. W cytoplazmie obecne są drobne wodniczki (Fot. 22. A i B).

W komórkach gruczolaka żołądka AGS, po inkubacji 2 h z Entap, pojawiają się wykładniki apoptozy, jak: zmniejszenie wymiaru komórek, kondensacja chromatyny i cytoplazmy, struktury odpowiadające autofagosomom (Fot. 23. A i B).

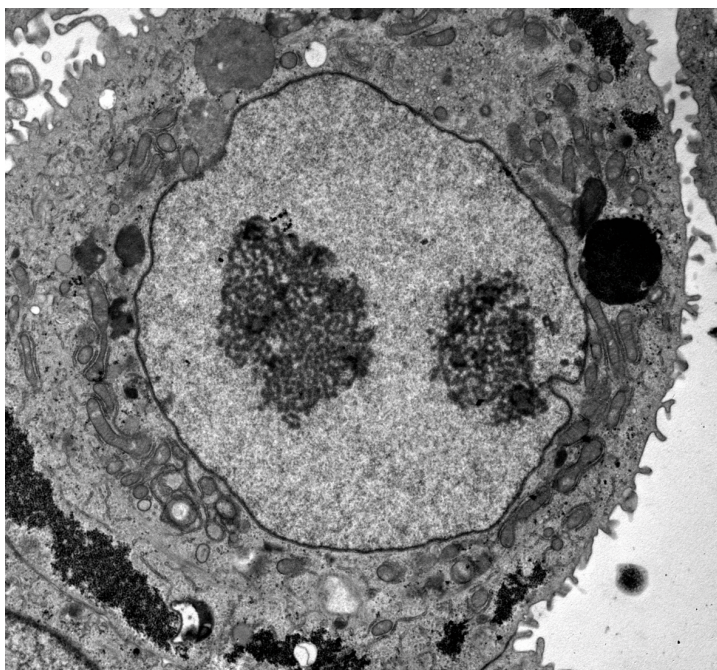
Fotomikrografie elektronowe prezentują:

- Fot. 23A. Komórka obrzeżona mikrokosmkowatymi wypustkami. Cytoplazma komórkowa zawiera kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego i kanały gładkie. Polirybosomy występują w rozproszeniu. W cytoplazmie struktury odpowiadające autofagosomom zawierające materiał drobnowłókienny.
- Fot. 23B. Komórka uległa pełnej degradacji. W cytoplazmie i na obrzeżu komórki występują liczne wakuole oraz struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom, brak polirybosomów. Występuje obrzęk mitochondriów. W jądrze komórkowym poszerzone pory jądrowe.

A)

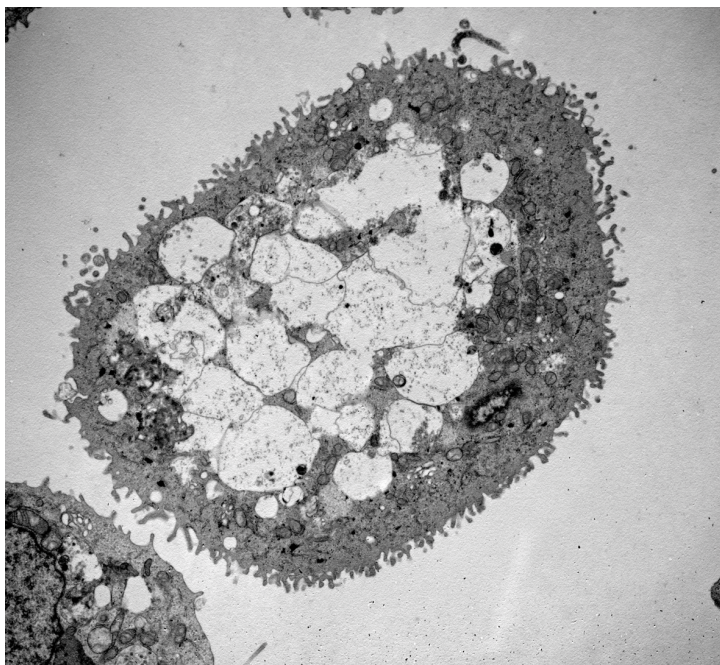


B)

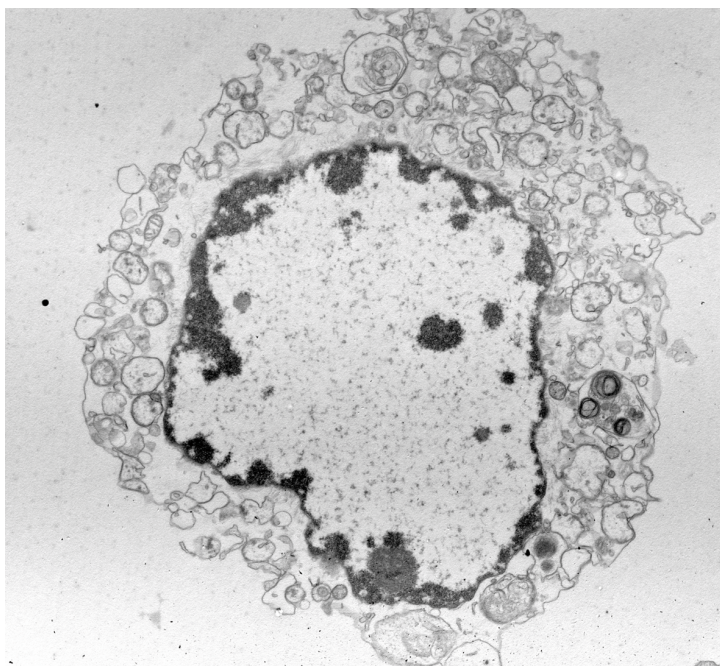


Fot. 22. Komórki gruczolakoraka żołądka AGS w hodowli 20 h – kontrola (pow. ok. 26250 x).

A)

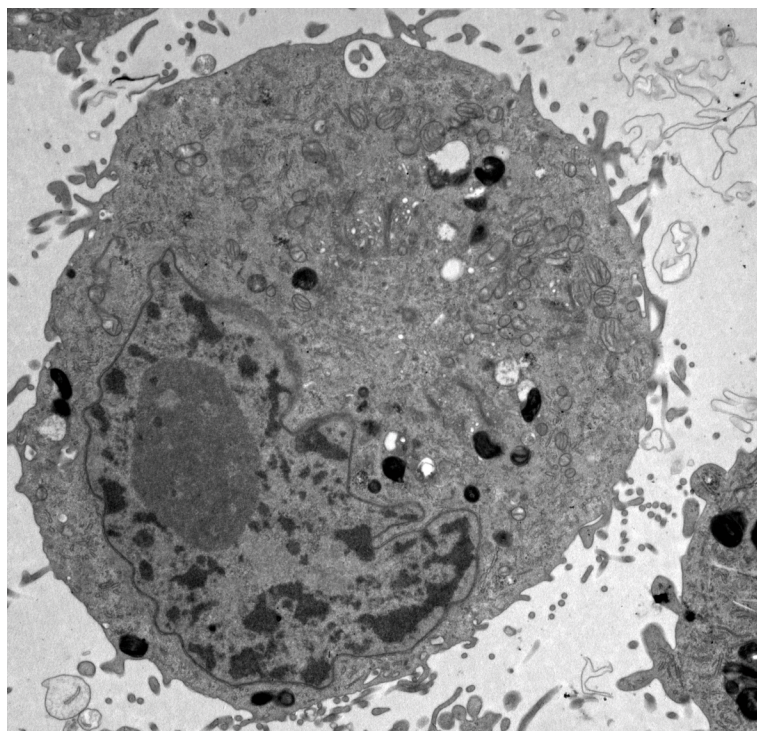


B)



Fot. 23. Komórki gruczolakoraka żołądka AGS w hodowli 20 h – po preinkubacji 2 h z Entap (pow. ok. 26250 x).

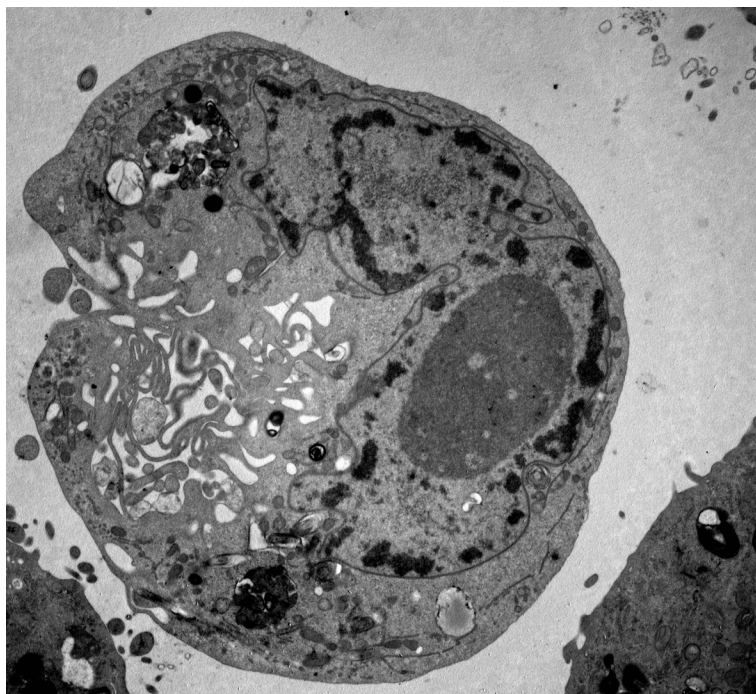
W obrazie z mikroskopu elektronowego komórki gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 (kontrola) na powierzchni bocznej posiadają liczne mikrokosmkowate wypustki. Cytoplazma komórkowa zawiera kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego, kanały gładkie i rozproszone polirybosomy. Mitochondria komórkowe mają regularny układ grzebieni i jasną macierz. W cytoplazmie obecne drobne lizosomy (Fot. 24.).



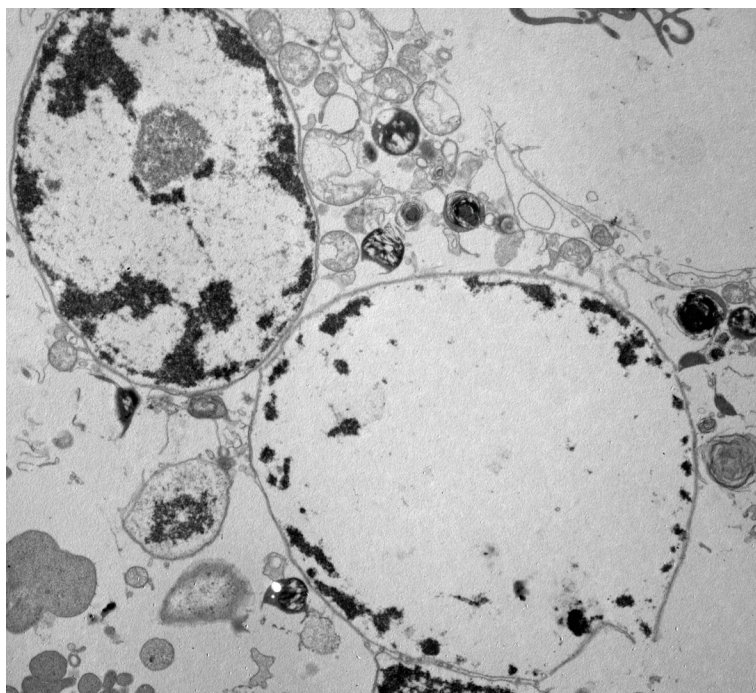
Fot. 24. Komórki gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 w hodowli 20 h – kontrola (pow. ok. 21000 x).

W komórkach gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231, po inkubacji 2 h z peptydem Entap, pojawiają się wykładniki apoptozy, jak: zmniejszenie wymiaru komórek, kondensacja chromatyny i cytoplazmy, uszkodzenie błony jądrowej, struktury odpowiadające autofagosomom (Fot. 25 A i B).

A)



B)

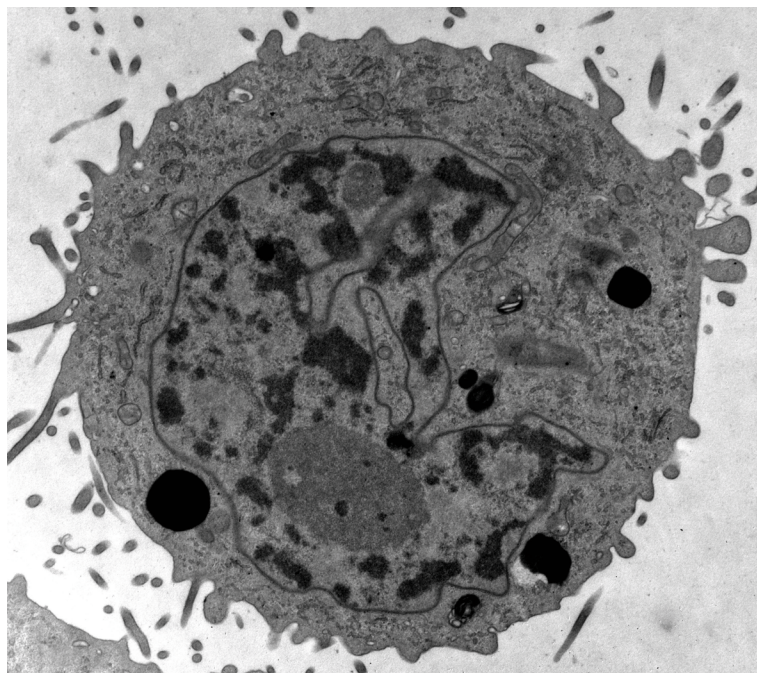


Fot. 25. Komórki gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 w hodowli 20 h – po preinkubacji 2 h z Entap (pow. ok. 21000 x).

Fotomikrografie elektronowe prezentują:

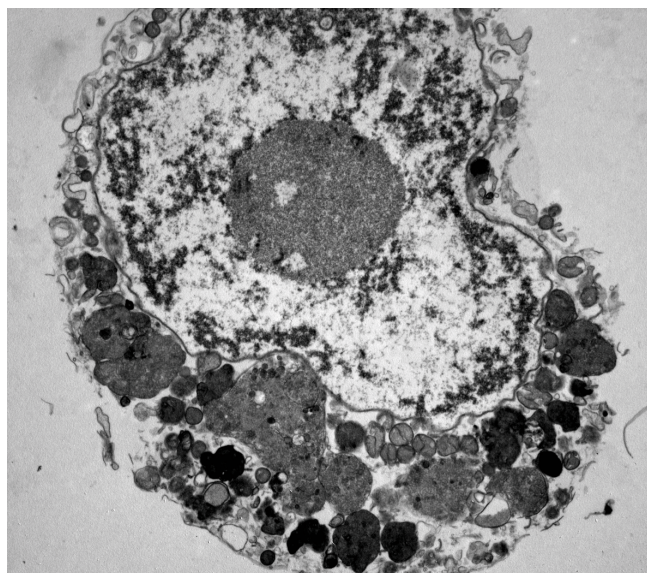
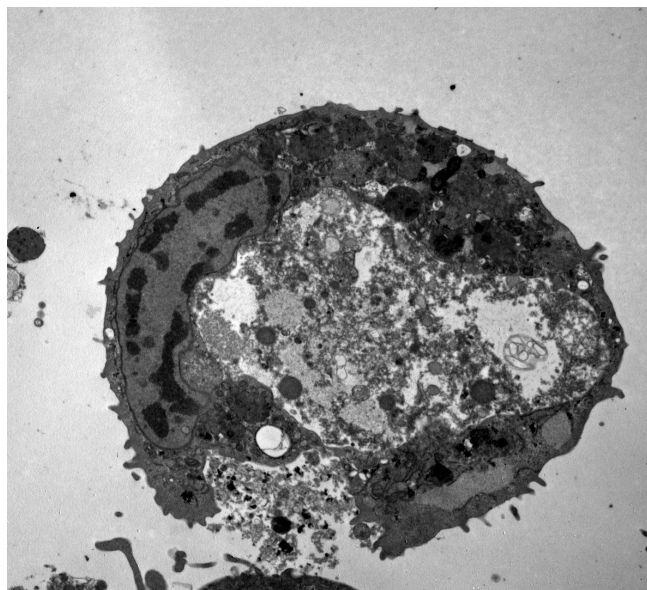
- Fot. 25 A. Komórka nie posiada wypustek. Cytoplazma komórkowa zawiera kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego, nieliczne polirybosomy i mitochondria. W cytoplazmie znajduje się wewnątrzcytoplazmatyczne światło, do którego wystają długie, cienkie filopodia. Obecne są również struktury odpowiadające autofagosomom oraz dwa duże autolizosomy zawierające mitochondria i ziarniste złoże.
- Fot. 25 B. Komórka uległa pełnej degradacji. W cytoplazmie i na obrzeżu komórki występują liczne struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom. W cytoplazmie brak polirybosomów, obecne pojedyncze puste wakuole. Widoczny obrzęk mitochondriów.

W obrazie z mikroskopu elektronowego komórki gruczolaka okrężnicy HT-29 (kontrola) na powierzchni bocznej posiadają liczne mikrokosmkowate wypustki. Cytoplazma komórkowa zawiera kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego, kanały gładkie i rozproszone polirybosomy. Mitochondria komórkowe mają regularny układ grzebieni i jasną macierz. W cytoplazmie obecne są lizosomy (Fot. 26.).



Fot. 26. Komórki gruczolaka okrężnicy HT-29 w hodowli 20 h – kontrola (pow. ok. 26250 x).

W komórkach gruczolakoraka okrężnicy HT-29, po inkubacji 2 h z peptydem Entap, pojawiają się wykładniki apoptozy, jak: zmniejszenie wymiaru komórek, kondensacja chromatyny i cytoplazmy, uszkodzenie błony jądrowej, struktury odpowiadające autofagosomom oraz autolizosomom (Fot. 27A i B).



Fot. 27. Komórki gruczolakoraka okrężnicy HT-29 w hodowli 20 h – po preinkubacji 2 h z Entap (pow. ok. 26250 x).

Fotomikrografie elektronowe prezentują:

- Fot. 27 A. Komórka okala szerokie, wewnątrzcytoplazmatyczne światło, do którego uwolnione zostały mitochondria, fragmenty błon retikulum endoplazmatycznego i materiał drobnowłókienny. Komórka na powierzchni posiada nieliczne mikrokosmkowate wypustki. Cytoplazma komórkowa zawiera krótkie kanały szorstkie retikulum endoplazmatycznego, złogi polirybosomów oraz struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom zawierające resztki błon retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów oraz gęste ziarniste złogi.
- Fot. 27 B. Komórka uległa pełnej degradacji. W cytoplazmie i na obrzeżu komórki występują liczne wakuole oraz struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom zawierające gęsty materiał drobnoziarnisty. Nieliczne mitochondria charakteryzują się obręczką. W nieregularnym jądrze komórkowym liczne ziarnistości.

4.8. Analiza ekspresji wybranych genów w badanych komórkach rakowych

W dokonanej analizie ekspresji wybranych genów we wszystkich komórkach rakowych, pod wpływem działania peptydu Entap, wykazano istotnie statystycznie ($p < 0,05$) zmiany w ekspresji genów związanych z proliferacją i apoptozą (Tabela 14.). Nastąpiło zmniejszenie ekspresji genów cykliny D1 – CCND1 ($p = 0,0217$) cykliny E2 – CCNE2 ($p = 0,0082$) i fosfatazy Cdc25A – CDC25A ($p = 0,0141$), przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji genu NFKB1 ($p = 0,0112$) i genu kinazy związanej ze śmiercią (DAPK1) ($p = 0,0169$). W komórkach gruczolakoraka gruczołu piersiowego MDA-MD-231, pod wpływem peptydu Entap, doszło dodatkowo do wzrostu ekspresji genów kodujących cytokiny IL-8 ($p < 0,0001$) i IL-6 ($p = 0,0023$) oraz genów kodujących receptory dla TNF ($p = 0,0015$) oraz dla chemokin CXCL3 ($p < 0,0001$) i CXCL2 ($p < 0,0001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 15. W badaniach nie wykazano zmian ekspresji genu dla białka p53 ($p = 0,1036$) oraz dla genów kodujących kaspazy: kaspazę 3 ($p = 0,7373$), kaspazę 6 ($p = 0,5342$), kaspazę 7 ($p = 0,5672$), kaspazę 8 ($p = 0,1775$), kaspazę 9 ($p = 0,7574$) i kaspazę 10 ($p = 0,3486$).

W badaniach wykazano również zmiany w ekspresji genu dla białka związanego z opornością na cisplatynę (gen *Crop*). W komórkach gruczolakoraka żołądka AGS i gruczolakoraka szyjki macicy HeLa nastąpił nieznaczny wzrost ekspresji tego genu, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. W komórkach 22Rv1, HT-29 oraz MDA-MB-231 nastąpiło istotnie statystycznie ($p < 0,01$) zmniejszenie ekspresji genu *Crop* (Tabela 16.).

Tabela 14. Wpływ wyizolowanego peptydu (Entap) na zmianę poziomu ekspresji genów związanych z proliferacją i apoptozą badanych komórek rakowych po 2 h inkubacji z Entap

Badany gen	Funkcja w cyklu komórkowym	Średni poziom zmiany ekspresji
CCND1	Kodowana cyklina D1 – zapewnia aktywność kinaz Cdk; jej zmniejszenie uwalnia inhibitor p21 zatrzymujący cykl komórkowy w fazie G1	↓ 1,79 (–44%) zmniejszenie ekspresji
CCNE2	Kodowana cyklina E2 – jest konieczna do aktywacji kinazy Cdk2/E włączającą fazę S (synteza DNA)	↓ 2,24 (–55%) zmniejszenie ekspresji
CDC25A	Kodowana fosfataza Cdc25A – aktywuje kinazę Cdk2/E włączającą fazę S (synteza DNA)	↓ 1,95 (–49%) zmniejszenie ekspresji
NFKB1	Kodowany NFKB1 – ulega zwiększonej aktywacji	↑ 2,20 (+120%) wzrost ekspresji
DAPK1	Stanowi tzw. gen supresorowy guza; kodowana kinaza DAP – indukuje apoptozę komórek	↑ 1,84 (+84%) wzrost ekspresji

Tabela 15. Wpływ wyizolowanego peptydu (Entap) na zmianę poziomu ekspresji genów związanych z proliferacją i apoptozą komórek MDA-MB-231 po 2 h inkubacji z Entap

Badany gen	Funkcja	Średni poziom zmiany ekspresji
IL8	Koduje IL-8	↑ 10,4 (+1040%) wzrost ekspresji
IL6	Koduje IL-6	↑ 3,5 (+350%) wzrost ekspresji
CXCL3	Gen receptora dla chemokin	↑ 4,5 (+450%) wzrost ekspresji
CXCL2	Gen receptora dla chemokin	↑ 4,4 (+440%) wzrost ekspresji
TNFRSF9	Gen receptora dla TNF	↑ 3,0 (+300%) wzrost ekspresji

Tabela 16. Wpływ wyizolowanego peptydu (Entap) na zmianę poziomu ekspresji genu dla białka związanego z opornością na cisplatynę (gen *Crop*) w badanych komórkach po 2 h inkubacji z Entap

Badane komórki rakowe	Średni poziom zmiany ekspresji genu <i>Crop</i>
AGS (ATCC CRL-1739)	↑ 1,20 (+20%) wzrost ekspresji
HeLa (ATCC CCL-2)	↑ 1,27 (+27%) wzrost ekspresji
MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)	↓ 2,70 (-69%) zmniejszenie ekspresji
22Rv1 (ATCC CRL-2505)	↓ 1,92 (-48%) zmniejszenie ekspresji
HT-29 (ATCC HTB-38)	↓ 1,75 (-42%) zmniejszenie ekspresji

5. DYSKUSJA

Enterokoki są ważnymi patogenami człowieka. Gatunki *E. faecalis* i *E. faecium* są odpowiedzialne za 25–33% zakażeń szpitalnych. Jednocześnie zwiększa się liczba szczepów enterokoków opornych na aminoglikozydy i glikopeptydy. W Polsce oporność na wankomycynę stwierdza się u około 10% szczepów klinicznych *E. faecalis*, natomiast na teikoplaninę – u około 5% szczepów klinicznych *E. faecalis* (szczepy VRE) [101]. W 1993 roku opisano, po raz pierwszy, szczepy kliniczne enterokoków zależne od wankomycyny (VDE – *vancomycin-dependent enterococci*) [193]. Szczepy VDE posiadają geny oporności na glikopeptydy typu VanA lub VanB, przy czym ligaza D-alanylo-D-alaninowa tych szczepów jest nieaktywna. Prowadzi to do niezdolności szczepów VDE do wzrostu w środowisku nie zawierającym wankomycyny [22].

W prezentowanej pracy izolowane szczepy *Enterococcus* były szczepami pozaszpitalnymi, od pacjentów zgłaszających się do badań bakteriologicznych, wrażliwymi na wankomycynę i teikoplaninę (szczepy VSE). Wykazano obecność 2 (8%) szczepów *E. faecalis* oraz 2 (50%) *E. faecium* charakteryzujących się opornością wysokiego stopnia na aminoglikozydy (szczepy HLAR). W Polsce oporność wysokiego stopnia na aminoglikozydy posiada około 50% szczepów *E. faecalis*, natomiast wśród *E. faecium* zakres odsetkowy szczepów HLAR jest szeroki i wynosi 28–80% [110, 153, 160].

Najnowsze, interesujące wyniki uzyskali Tyrrell i wsp. [184] wskazując na występowanie odwrotnej zależności pomiędzy zjadliwością i wielolekoopornością bakterii. Oznacza to, że u szczepów klinicznych hiperwirulencja nie jest związana z wielolekoopornością.

W przedstawionych badaniach wykazano, że Entap powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji genu dla białka związanego z opornością na cisplatynę (gen *Crop*) w komórkach raka prostaty 22Rv1, gruczolaka okrężnicy HT-29 oraz gruczolaka gruczołu piersiowego MDA-MB-231. Efekt ten może skutkować zwiększoną wrażliwością komórek raka prostaty, okrężnicy i gruczołu piersiowego na leczenie cisplatyną. Cisplatyna jest chemioterapeutyką swoistą dla cyklu komórkowego. Jej działanie polega na tworzeniu wiązań krzyżowych pomiędzy sąsiadującymi niemi DNA oraz w obrębie tej samej nici. Tworzenie tych poprzecznych wiązań uniemożliwia replikację DNA i podział komórki. Cisplatyna wywiera też wpływ na funkcje metaboliczne, uruchamiając proces apoptozy komórki [23, 156]. Uzyskanie tych danych może być zatem przydatne przyszłościowo w programowaniu personalizowanej terapii przeciwnowotworowej, uwzględniając zastosowanie Entap.

Wyizolowany, nowy peptyd – Entap, o masie cząsteczkowej 6247,2 Da, będący produktem badanych szczepów *Enterococcus*, posiada unikalną budowę wynikającą ze składu aminokwasowego. Właściwości Entap, takie jak masa

cząsteczkowa, struktura globularna, termostabilność oraz dominacja aminokwasów hydrofobowych, upodabniają go do bakteriocyn/enterocyn klasy II, co zestawiono w tabeli 17. Bakteriocyny, np. propionicyna PLG-1 [126], posiadają dodatkowo tendencję do tworzenia agregatów, co również charakteryzuje Entap. Jednak bakteriocyny wykazują aktywność przeciwbakteryjną, zazwyczaj wobec gatunków blisko spokrewnionych z wytwarzającym drobnoustrojem [21, 31]. Entap nie posiada aktywności przeciwbakteryjnej. Brak tej ważnej właściwości, a także brak aminokwasów siarkowych wyklucza przynależność tego peptydu do bakteriocyn.

Tabela 17. Cechy wyróżniające peptyd Entap

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Masa cząsteczkowa 6247,2 Da 2. Struktura globularna 3. Termostabilność 4. Dominacja aminokwasów hydrofobowych 5. Brak aminokwasów siarkowych 6. Tworzenie agregatów 7. Brak aktywności przeciwbakteryjnej 8. Aktywność antyproliferacyjna wobec ludzkich komórek rakowych |
|---|

Wyjątkową cechą Entap jest aktywność antyproliferacyjna wobec ludzkich komórek rakowych. W prezentowanych badaniach doświadczalnych *in vitro* wykazano silne działanie antyproliferacyjne izolowanego peptydu Entap względem ludzkich komórek nowotworowych: gruczolakoraka żołądka (AGS), gruczolakoraka szyjki macicy (HeLa), gruczolakoraka gruczołu piersiowego (MDA-MB-231), raka prostaty (22Rv1) oraz gruczolakoraka okrężnicy (HT-29). Jednocześnie, stwierdzono bardzo słabe oddziaływanie Entap wobec komórek zdrowych, które jednak nie różniło się istotnie od wyników kontrolnych (w obecności PBS). W przypadku białek pochodzenia bakteryjnego stwierdzono, że wiele z nich ma działanie toksyczne względem komórek gospodarza, co uniemożliwia lub utrudnia ich zastosowanie terapeutyczne. Jednak Entap, wykazując wybiórczą aktywność skierowaną przeciwko komórkom rakowym, stwarza nadzieję na jego zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Oceny aktywności proliferacyjnej komórek dokonywano przy użyciu testu z bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenyloetrazoliowym (MTT). Zasada testu opiera się na reakcji, która zachodzi w żywych komórkach i polega na redukcji żółtego MTT do błękitnego formazanu. MTT jest powszechnie stosowany do oceny aktywności proliferacyjnej komórek [61, 90, 144, 186]. Inną substancją stosowaną w badaniach proliferacji komórek jest 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU). W teście z MTT badana jest aktywność mitochondrialnych dehydrogenaz w żywych komórkach, natomiast w teście z BrdU dochodzi do

inkorporacji czynnika z DNA, co pozwala na ocenę syntezy DNA. W badaniach porównawczych Lappalainen i wsp. wykazali, że uzyskane wyniki cytotoksyczności oraz oceny proliferacji, przy zastosowaniu testów z MTT lub BrdU, były podobne [113]. Jednocześnie, Levkoff i wsp. wykazali, że BrdU hamuje proliferację komórek rakowych *in vitro* i *in vivo* [120]. Działanie takie może mieć wpływ na wartość otrzymanych wyników oceny proliferacji. Z tego powodu w przedstawionych badaniach użyto test z MTT, który jednocześnie powszechnie stosuje się w ocenie działania preparatów na komórki nowotworowe.

Próby zastosowań bakterii lub ich produktów w leczeniu chorób nowotworowych sięgają przełomu XIX i XX wieku. Chirurg nowojorski – William Coley [36] w leczeniu chorych z nieoperacyjnymi guzami stosował kurację nadsączami z hodowli bakterii *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens*. Preparat ten nazwany toksynami Coley’a zastosowano u około 1200 chorych na nowotwór złośliwy, często uzyskując regresję guza, a u 30 pacjentów, jakoby – całkowite wyleczenie. Obecnie przyjmuje się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za lecznicze działanie toksyn Coley’a była indukcja wzmożonej sekrecji czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) w organizmie pacjenta. Skuteczność przeciwnowotworową TNF- α potwierdzono na modelu zwierzęcym, obserwując zahamowanie wzrostu, a nawet całkowitą regresję guza [20, 75]. Ponadto, w niektórych badaniach wykazano, że drobnoustroje chorobotwórcze mogą namnażać się w obrębie hipoksyjnych zmian nowotworowych, jednocześnie stymulując układ odpornościowy gospodarza podczas infekcji, co z kolei prowadzi do zahamowania progresji choroby nowotworowej. Przykładem może być szczep szczepionkowy BCG (*Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin), stosowany w leczeniu powierzchownego raka pęcherza moczowego [5]. Stwierdzono, że atenuowane bakterie *Salmonella* Typhimurium podane myszom posiadającym zmiany nowotworowe prowadzą do zwiększonej regresji nowotworów [151]. Podobnie, regresję nowotworów u myszy wykazano stosując bakterie beztlenowe z rodzaju *Clostridium* w połączeniu z wybranymi chemioterapeutykami i lekami hamującymi waskularyzację [40]. Aktualnie uznaje się, że zakażenie wybranymi drobnoustrojami może prowadzić do aktywacji makrofagów i limfocytów, w wyniku czego dochodzi do produkcji czynników cytotoksycznych, głównie TNF- α , o aktywności przeciwnowotworowej [40, 150].

Burzliwy rozwój proteomiki w ostatnich 20 latach umożliwił identyfikację wytwarzanych przez drobnoustroje białek, które toksycznie oddziałują na komórki nowotworowe. Jednym z białek bakteryjnych, z którym wiąże się nadzieję w leczeniu nowotworów jest azuryna, mająca m. cz. 14 kDa, produkowana przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [187]. Yamada i wsp. przeprowadzili badania, w których przez 22 dni myszom z obniżoną odpornością i przeszczepionymi komórkami ludzkiego czerniaka (melanoma UISO-Mel-2) podawano azurynę. Stwierdzono, że u myszy leczonych azuryną doszło do zmniejszenia rozmiarów guzów w porównaniu z myszami nie poddanymi leczeniu; nie odnotowano

żadnego przypadku śmiertelnego. Zdolność azuryny do niszczenia komórek rakowych wydaje się polegać na stabilizacji białka p53, które hamuje rozwój procesu nowotworowego poprzez zatrzymywanie podziałów komórek lub indukcję apoptozy. Stwierdzono, że azuryna w jądrze komórki nowotworowej oddziałuje z p53, chroniąc je przed zniszczeniem. Konsekwencją tego jest zapoczątkowanie mitochondrialnej drogi apoptozy [187, 198, 199]. Vasu i wsp. wykazali, że azuryna działa silnie cytotoksycznie względem linii komórkowej raka gruczołu piersiowego MCF-7 powodując ponad 50% wzrost nasilenia apoptozy. Natomiast w komórkach raka gruczołu piersiowego MDA-MB-157, MDD2 i MDA-MB-231 wzrost nasilenia apoptozy wynosił 15–18% [187].

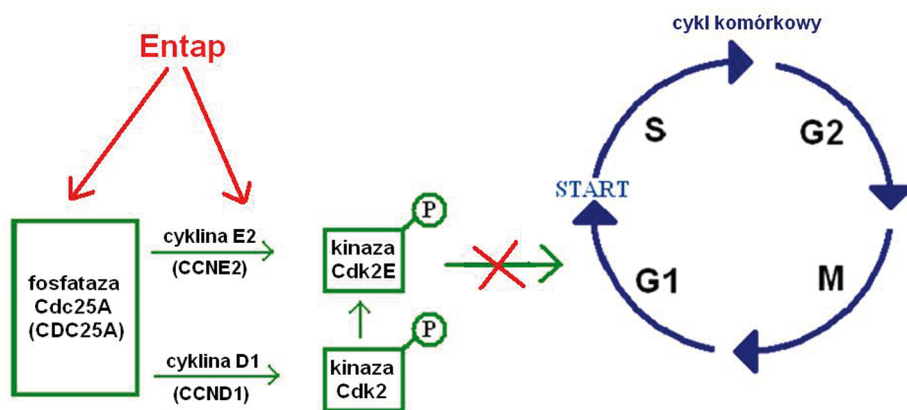
Innym opisanym peptydem pochodzenia bakteryjnego, o aktywności przeciwnowotworowej jest Pep27anal2, będący analogiem Pep27. Pep27 jest peptydem sygnałowym, produkowanym przez bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Inicjuje on program śmierci tych bakterii, a także ma właściwości przeciwdrobnoustrojowe [176]. Lee i wsp. zsyntetyzowali analog peptydu Pep27, nazwany Pep27anal2, zbudowany z 27 aminokwasów. Uzyskany analog Pep27anal2 okazał się cząsteczką bardziej hydrofobową w porównaniu do peptydu wyjściowego. Stwierdzono ponadto, że posiada właściwości przeciwnowotworowe. Badacze, stosując test z MTT, wykazali redukcję proliferacji komórek białaczkowych (AML-2, HL-60, Jurkat), komórek raka żołądka (SNU-601) i komórek raka gruczołu piersiowego (MCF-7). Jednocześnie stwierdzono, że Pep27anal2 wnika do błony komórkowej, a następnie indukuje apoptozę niezależną od kaspaz i niezależną od cytochromu c. Autorzy sugerują, że ważną rolę w permeabilizacji błony, jak i w aktywności przeciwnowotworowej, odgrywa hydrofobowość peptydu [117]. Huang i wsp. uważają, że hydrofobowość peptydów odgrywa zasadniczą rolę w mechanizmie działania przeciwko komórkom rakowym, co powinno być uwzględniane w projektowaniu potencjalnych peptydowych leków przeciwnowotworowych [90].

Entap, podobnie jak Pep27anal2, jest peptydem silnie hydrofobowym. Ponadto Entap, Pep27anal2 oraz azuryna charakteryzują się niską masą cząsteczkową. Te cechy wydają się być ważne dla etapu wnikania tych peptydów do komórek, szczególnie komórek nowotworowych, których powierzchnia różni się pod względem niektórych cech od komórek prawidłowych. Błona komórkowa komórek nowotworowych, w przeciwieństwie do błony komórek prawidłowych, jest bogata w kwas sjałowy [136]. Jednocześnie komórki prawidłowe, w porównaniu do nowotworowych, mają na swojej powierzchni znacznie mniej cząsteczek naładowanych ujemnie. Prawdopodobnie ujemnie naładowana błona komórek nowotworowych zmniejsza ich wzajemne przyleganie, co uwrażliwia je na działanie powyższych peptydów. Komórki nowotworowe posiadają również dużą liczbę wypustek, przez co charakteryzują się większą powierzchnią. Pozwala to na wiązanie się z błoną większej liczby cząsteczek peptydów oraz selektywne przyleganie peptydów kationowych [24, 87]. Budowa błon komór-

kowych komórek nowotworowych, a także ich duża powierzchnia mogą powodować, że komórki nowotworowe ulegają penetracji przez peptydy z większą wybiórczością niż komórki prawidłowe [170].

Obecnie wiadomo, że niektóre peptydy, znane dotychczas ze swoich właściwości przeciwbakteryjnych, mogą również działać przeciwnowotworowo. Należą do nich m.in. niskocząsteczkowe peptydy, zbudowane z 20–50 aminokwasów, posiadające region hydrofobowy: BMAP-27, BMAP-28, cekropina A i B, LL-37, magaininy oraz defensyny [24, 87, 127, 131, 132].

W prezentowanych w tej pracy badaniach ekspresji genów wykazano, że Entap powoduje w wybranych komórkach rakowych zmniejszenie ekspresji genów cykliny D1, cykliny E2 i fosfatazy Cdc25A. Działanie Entap prowadzi najprawdopodobniej do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 (Ryc. 14.).



Ryc. 14. Schemat podstawowego mechanizmu odpowiedzialnego za rozpoczęcie fazy S cyklu komórkowego i jej blokowania przez Entap.

Cykl komórkowy jest procesem bardzo złożonym. Szczególne znaczenie ma prawidłowa regulacja cyklu komórkowego przy przejściu z fazy G1 do S i z fazy G2 do M, a także podczas mitozy przy tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego i rozdziale chromatyd do komórek potomnych. W regulacji cyklu komórkowego uczestniczy wewnętrzny mechanizm składający się z trzech grup białek: kinaz białkowych zależnych od cyklin (cyklin-dependent kinases – Cdk), ich endogennych regulatorów (rodzin białek INK4 i białek CIP/KIP) oraz cyklin [70, 84]. W punkcie kontrolnym w fazie S dodatkowe znaczenie kontrolne ma fosfataza Cdc25A, enzym odpowiedzialny za aktywację kinaz Cdk. Fosfataza Cdc25A działa przede wszystkim w komórkach będących w fazach S, G2 oraz we wczesnej fazie G1 [62]. Aktywność fosfatazy Cdc25A determinuje poziom

ufosforylowania jej domeny regulatorowej przez liczne kinazy białkowe, w tym kinazy Cdk, aktywowane w warunkach stresu, zwłaszcza po uszkodzeniach DNA [52, 85]. Zaobserwowano, że ekspresję genu CDC25A w keratynocytach obniża TGF- β . [91]. Fosfataza Cdc25 jest jednym z głównych regulatorów cyklu komórkowego i posiada trzy izoformy: A, B i C. Fosfataza Cdc25A działa w fazach G1 i S i aktywuje kinazę Cdk2/cykлина E; fosfatazy Cdc25B i Cdc25C działają w fazie G2 i aktywują przede wszystkim kinazy Cdk2 i Cdk1, których aktywność regulują cykliny mitotyczne A i B [67, 100].

W komórkach ssaków działanie kinaz (Cdk4, Cdk6, Cdk2 i Cdc2) jest powiązane z aktywnością cyklin (cyklina D, E, A i B). Cykliną wytwarzaną w fazie G1 cyklu komórkowego, w odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe (np. czynniki wzrostowe), jest cyklina D, tworząca kompleks z cyklino-zależnymi kinazami Cdk4 i Cdk6. Pod koniec trwania fazy G1 aktywny jest również kompleks Cdk2-cyklina E [125, 138, 157]. Zatrzymanie cyklu w końcu fazy G1 np. przez białko p21 prowadzi do zahamowania aktywności cyklino-zależnych kinaz Cdk, których podjednostkami regulatorowymi są cykliny z rodziny D oraz cyklina E. W następstwie tego nie dochodzi do uruchomienia transkrypcji genów, których produkty są konieczne do rozpoczęcia syntezy DNA w fazie S i komórki pozostają w fazie G1 [50, 76].

W prezentowanych badaniach wykazano, że Entap prowadzi do istotnego zmniejszenia ekspresji genów fosfatazy Cdc25A (CDC25A), cykliny D1 (CCND1) i cykliny E2 (CCNE2) w komórkach rakowych. Wskutek zmniejszenia syntezy fosfatazy Cdc25A, jak również cyklin D1 i E2, najprawdopodobniej nie dochodzi do optymalnej aktywacji kinazy Cdk2 i tworzenia kompleksu Cdk2/cyklina E. Kompleks Cdk2/cyklina E konieczny jest do rozpoczęcia syntezy DNA w fazie S cyklu komórkowego. Tak więc, następstwem działania Entap jest najprawdopodobniej zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (Ryc. 13.). Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 związane z inaktywacją cykliny D1 występuje m.in. w wyniku napromieniowania lub po podaniu cisplatyny [1].

W prezentowanych badaniach wykazano, że Entap prowadzi do apoptozy komórek rakowych. Cechy morfologiczne apoptozy wykazano w badaniach histologicznych, natomiast w badaniach ultrastrukturalnych stwierdzono dodatkowo obecność struktur odpowiadających autofagosomom i autolizosomom. Ponadto, badania ekspresji genów potwierdziły, że mechanizm indukcji apoptozy, wywołanej przez Entap, nie jest zależny od kaskady kaspaz.

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki została opisana w 1972 roku [112]. Dobrze już udokumentowano, że mechanizm śmierci komórek w przebiegu apoptozy związany jest z aktywnością kaspaz. Sygnałem do rozpoczęcia procesu może być uszkodzenie DNA, aktywacja onkogenów, stymulacja specyficznych receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowych, obecność wolnych rodników lub promieniowanie jonizujące. W procesie programowanej śmierci

komórki można wyróżnić trzy podstawowe etapy: inicjację, fazę efektorową i destrukcję.

Czynniki inicjujące apoptozę można podzielić na trzy grupy:

- 1) prowadzące do aktywacji tzw. receptorów śmierci,
- 2) stanowiące zawartość granulosomów komórek cytotoksycznych,
- 3) uszkadzające bezpośrednio [8, 171].

W pierwszym etapie apoptozy podejmowana jest decyzja o śmierci komórki pod wpływem działających czynników. W kolejnym etapie dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – kaspaz, bezpośrednio odpowiedzialnych za śmierć komórki. Kaspazy należą do proteaz cysteinowych syntetyzowanych w formie nieaktywnych proenzymów. Aktywacja prokaspaz przebiega według mechanizmu homoaktywacji lub heteroaktywacji. W pierwszym z nich dochodzi do aktywacji kaspaz inicjujących (np. kaspazy -8/-10, -9) oraz powstawania kompleksów: DISC w szlaku receptorowym i apoptosomu w szlaku mitochondrialnym apoptozy. Aktywacja kaspaz prowadzi do proteolizy kolejnych kaspaz, a proces ten nazywany jest kaskadą kaspaz. Heteroaktywacja natomiast prowadzi do katalitycznego ataku kaspaz inicjujących bądź innych proteaz (np. granzymu B, kalpainy) na kaspazy wykonawcze (kaspazy -3, -6, -7). W ostatnim etapie apoptozy – w fazie degradacji – kaspazy wykonawcze dokonują proteolizy ponad 60 białkowych substratów komórkowych, co prowadzi do uszkodzenia struktury i funkcji komórek oraz ich śmierci. Istotną rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywa białko p53, będące regulatorem transkrypcji DNA. Białko p53, wiążąc się z DNA, rozpoznaje uszkodzenia w DNA i pośredniczy w procesie zahamowania cyklu komórkowego [57, 103, 196].

W komórce eliminowanej na drodze apoptozy dochodzi do następujących zmian morfologicznych: obkurczenia i zmniejszenia objętości komórki wskutek utraty wody, kondensacji chromatyny, fragmentacji jądrowego DNA, tworzenia ciałek apoptotycznych – pęcherzyków zawierających fragmenty DNA, otoczonych błoną cytoplazmatyczną [51].

W badaniach przeprowadzonych w tej pracy nie wykazano zmian w ekspresji genu kodującego białko p53 oraz genów kodujących kaspazy. Natomiast stwierdzono istotne zwiększenie ekspresji genu dla kinazy związanej ze śmiercią (DAPK). Te dane wskazują, że Entap może indukować tzw. programowaną śmierć komórki II typu, czyli apoptozę autofagową. Wniosek ten uwiarygadniają wyniki badań ultrastrukturalnych, wskazując na obecność struktur odpowiadających autofagosomom i autolizosomom.

Apoptoza II typu, zwana też autofagową śmiercią komórki lub II typem programowanej śmierci komórki, stanowi mechanizm degradacji wewnątrzkomórkowej, zależnej od lizosomów. Obecnie wiadomo, że zjawisko to może prowadzić do supresji nowotworów. Apoptoza II typu związana jest ściśle z autofagią, w szczególności z makroautofagią [197]. Makroautofagia jest czteroe etapowym procesem obejmującym kolejno następujące fazy:

- 1) indukcję, podczas której dochodzi do wytworzenia fagoforu – „woreczka” tworzonego z błony białkowej, otaczającego struktury komórkowe przeznaczone do degradacji;
- 2) tworzenie autofagosomu wskutek zamknięcia się brzegów fagoforu;
- 3) dojrzewanie autofagosomu i utworzenie autofagolizosomu (autolizosomu) poprzez fuzję z lizosomem;
- 4) degradację zawartości cytozolu w autofagolizosomie przez enzymy lizosomalne i w następstwie śmierć komórki [119, 197].

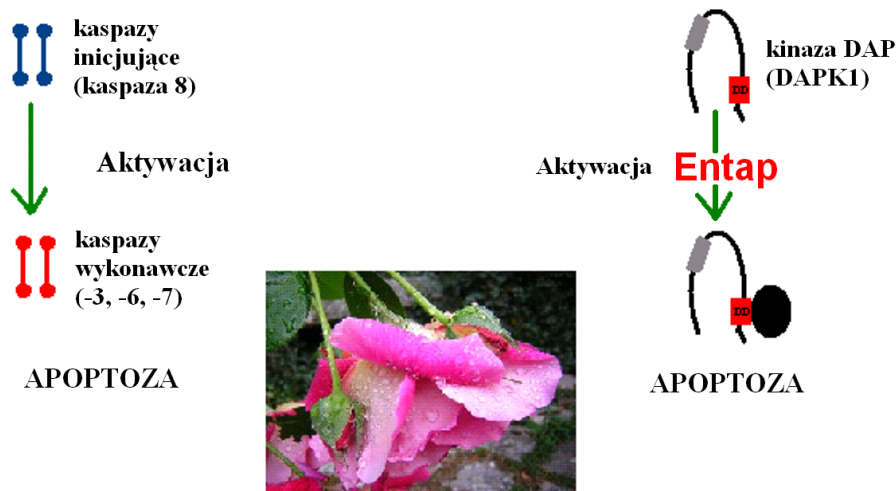
W kontroli procesu makroautofagii biorą udział produkty rodziny genów Atg. Powstanie fagoforu inicjowane jest najprawdopodobniej w retikulum endoplazmatycznym (ER), pozostającym w dynamicznej równowadze z aparatem Golgiego i późnymi endosomami [105, 119].

Autofagowa śmierć komórki charakteryzuje się morfologicznie obecnością autofagowych wakuoli cytoplazmatycznych, autofagosomów i autolizosomów, obrzękiem mitochondrialnym, poszerzeniem retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego, uwypukleniami błony komórkowej z wytworzeniem pęcherzyków (ang. *blebbing*) oraz kondensacją jądra. Ponadto, w komórkach obserwuje się również cechy charakterystyczne dla apoptozy I typu, jak: pyknoza jąder, uszkodzenia błon komórkowych i fragmentacja DNA. Apoptoza I typu i autofagowa śmierć komórki nie wykluczają się wzajemnie i mogą występować wspólnie *in vivo*, w poszczególnych tkankach lub hodowlach komórkowych [33, 93, 104]. Ponadto, apoptoza I typu i apoptoza autofagowa mogą mieć udział w takich mechanizmach i zmianach, jak utrata przepuszczalności błony mitochondrialnej oraz utrata potencjału błonowego [56].

Aktualnie uznaje się, że za autofagową śmierć komórki odpowiada kinaza związana ze śmiercią (DA PK) [73, 74]. DAPK jest kinazą serynowo-treoninową, regulowaną przez wapń i kalmodulinę. W swojej budowie posiada domenę kinazy, segment regulowany przez kalmodulinę, 8 powtórzeń ankirynowych, region wiążący cytoszkielet oraz domenę śmierci. DAPK odgrywa rolę pozytywnego mediatora w odpowiedzi na różne czynniki prowadzące do apoptozy, m.in. IFN- γ , TNF- α , TGF- β . [15, 43, 97, 106, 112]. Kinaza związana ze śmiercią wydaje się funkcjonować jako czujnik inicjujący apoptozę [92]. Dodatkowo, DAPK działa jako supresor guza, gdyż spadek ekspresji DAPK jest związany z powstawaniem nowotworu [59]. Jednocześnie odgrywa istotną rolę w powstawaniu uwypukleń błony komórkowej z wytworzeniem pęcherzyków (*blebbing*) [92].

W prezentowanych badaniach wykazano, że po inkubacji 2 h z peptydem Entap, w komórkach rakowych obecne są wykładniki apoptozy II typu, w tym struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom. Obserwowany obrzęk mitochondriów oraz wakuolizacja komórek są cechami charakterystycznymi dla apoptozy niezależnej od kaspaz [19, 41]. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono zmian w ekspresji genu kodującego białko p53 oraz genów kodujących kaspazy, ważnych dla procesu apoptozy I typu. Jednocześnie

wykazano znaczną ekspresję genu dla kinazy związanej ze śmiercią (DAPK) (Ryc. 15.). Stwierdzone zatem wykładniki zmian ultrastruktury w komórkach rakowych, a także znaczna ekspresja genu DAPK dowodzą występowanie indukcji programowanej śmierci komórki II typu, określanej apoptozą autofagową.



Ryc. 15. Mechanizmy wykonawcze apoptozy.

Reasumując, przedstawione tu dane dokumentują, że szczepy kliniczne wankomycynowrażliwych bakterii z rodzaju *Enterococcus* (VSE), produkują peptyd (Entap) o m.c. 6247,2 Da, wykazujący aktywność antyproliferacyjną wobec komórek rakowych, natomiast nie posiadający aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Entap charakteryzuje się termostabilnością oraz wysoką zawartością aminokwasów hydrofobowych, co determinuje unikalny charakter jego cząsteczki. Zidentyfikowanie peptydu Entap i określenie jego właściwości wydaje się mieć istotne znaczenie kliniczne, gdyż stwarza nadzieję na jego zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

6. WNIOSKI

1. Szczepy kliniczne *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* i *E. durans*, izolowane od ludzi, wytwarzają w fazie wykładniczego wzrostu różne peptydy/białka, w tym termostabilny peptyd – Entap, o m.cz. 6247,2 Da.
2. Szczepy kliniczne *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* i *E. durans*, izolowane od ludzi, produkujące Entap wykazują wrażliwość na wankomycynę (szczepy VSE), przy czym niektóre z nich charakteryzują się opornością wysokiego stopnia na aminoglikozydy (szczepy HLAR).
3. Izolowany peptyd – Entap charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów hydrofobowych, co determinuje unikalny charakter cząsteczki.
4. Wytwarzany przez szczepy kliniczne *Enterococcus* peptyd – Entap nie wykazuje aktywności przeciwbakteryjnej.
5. Wytwarzany przez szczepy kliniczne *Enterococcus* peptyd – Entap, wykazuje aktywność antyproliferacyjną wobec komórek rakowych.
6. Aktywność antyproliferacyjna Entap, wobec komórek rakowych, wyraża się hamowaniem ich cyklu komórkowego w fazie G1 oraz indukcją apoptozy autofagowej.

7. PIŚMIENNICTWO

- [1] Agami R, Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell* 2000; 102(1): 55-66.
- [2] Aguilar FJC, Serrano DG, Llorente BP, i wsp. Colonic carcinoma disclosed by endocarditis caused by *Enterococcus gallinarum*. *Eur J Inter Med.* 2008; 19S: S49-S50.
- [3] Al Benwan K, Al Mulla A, Rotimi VO. A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *J Infect Public Health* 2012; 5(1): 1-8.
- [4] Alangaden GJ. Urinary tract infections in renal transplant recipients. *Curr Infect Dis Reports* 2007; 9(6): 475-479.
- [5] Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, i wsp. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999; 353: 1689-1694.
- [6] Allison GE, Fremaux C, Klaenhammer TR. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J Bacteriol.* 1994; 176(8): 2235-2241.
- [7] Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, i wsp. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol.* 2002; 153(2): 75-80.
- [8] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
- [9] Aymerich T, Holo H, Hlvarstein LS, i wsp. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(5): 1676-1682.
- [10] BACTIBASE, Database dedicated to bacteriocins. <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>
- [11] Barefoot SF, Klaenhammer TR. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 26(3): 328-334.
- [12] Barranco SC, Townsend CM, Casartelli C, i wsp. Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1983; 43: 1703-1709.
- [13] Basanta A, Sánchez J, Gómez-Sala B, i wsp. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocin L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int J Food Microbiol.* 2008; 125(3): 293-307.
- [14] Bellomo G, Mangiale A, Nicastro L, i wsp. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment diarrhoea in pediatrics. *Curr Ther Res.* 1980; 28: 927-934.
- [15] Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 189-210.
- [16] Birri DJ, Brede DA, Forberg T, i wsp. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(2): 483-492.

- [17] Boyce JM, Opal SM, Potter-Bynoe G, i wsp. Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob Chemother.* 1992; 36: 1032-1039.
- [18] Brandl K, Plitas G, Mihu CN, i wsp. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* 2008; 455: 804-807.
- [19] Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3155-3162.
- [20] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, i wsp. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.
- [21] Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, i wsp. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.* 1997; 143(Pt 7): 2287-2294.
- [22] Centikaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 686-707.
- [23] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, i wsp. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007; 7(1): 3-18.
- [24] Chan SC, Hui L, Chen HM. Enhancement of the cytolytic effect of antibacterial cecropin by the microvilli of cancer cells. *Anticancer Res.* 1998; 18: 4467-4474.
- [25] Chandler JR, Hirt H, Dunny GM. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 15617-15622.
- [26] Cheigh C-I, Pyun Y-R. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett.* 2005; 27: 1641-1648.
- [27] Chen Y, Shapira R, Eisenstein M, i wsp. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(2): 524-531.
- [28] Chow JW, Thal LA, Perri MB, i wsp. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(11): 2474-2477.
- [29] Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis.* 2000; 31: 586-589.
- [30] Christakis GB, Perlorentzou SP, Aslanidou M, i wsp. Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* and *Enterococcus faecalis* in a patient with colon cancer. *J BUON* 2007; 12: 287-290.
- [31] Cintas LM, Casaus P, Fernández MF, i wsp. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA01, nisin A and lactocin S against spoilage and food-borne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 1998; 15: 289-298.
- [32] Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, i wsp. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and *in vitro* activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9): 2819-2828.
- [33] Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl.).* 1990; 181(3): 195-213.
- [34] Clewell DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9(2): 90-102.
- [35] Coburn PS, Pillar CM, Jett BD, i wsp. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science.* 2004; 306(5705): 2270-2272.

- [36] Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipclatis* and *Bacillus prodigiousus*). Proc R Soc Med Surg. 1909; 3: 1-48.
- [37] Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. Int J Med Microbiol. 2005; 294: 479-486.
- [38] Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 2006; 42: S25-34.
- [39] Cox CR, Coburn PS, Gilmore MS. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. Curr Protein Pept Sci. 2005; 6: 77-84.
- [40] Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, i wsp. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(26): 15155-15160.
- [41] Daniels I, Abulayha AM, Thomson BJ, i wsp. Caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. Apoptosis 2006; 11: 1013-1023.
- [42] de Carvalho KG, Bambirra FHS, Kruger MF, i wsp. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010; 37: 381-390.
- [43] Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, i wsp. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon- γ , Fas/APO-1, and TNF- α . EMBO J. 1996; 15: 3861-3870.
- [44] Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, i wsp. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 193-202.
- [45] Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, i wsp. The vanG glycopeptides resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. Mol Microbiol. 2003; 50: 931-948.
- [46] Desai PJ, Pandit D, Mathur M, i wsp. Prevalence, identification and distribution of various species of enterococci isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. Indian J Med Microbiol. 2001; 19: 132-137.
- [47] Diep DB, Hlvstein LS, Nes IF. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. Mol Microbiol. 1995; 18(4): 631-639.
- [48] Domann E, Hain T, Ghai R, i wsp. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. Int J Med Microbiol. 2007; 297: 533-539.
- [49] Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, i wsp. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. N Engl J Med. 2000; 343: 1925-1932.
- [50] Dotto GP. p21^{WAF1/Cip1}: more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta 2000; 1471: M43-M56.
- [51] Drewa T, Olszewska D, Woźniak A. Znaczenie zaprogramowanej śmierci komórki w patogenezie procesów chorobowych. Pol Merk Lek. 2002; 12(70): 336-341.
- [52] Dubravka D, Scott DW. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. Cell Res. 2000; 10: 1-16.
- [53] Dupton H, Montravers P, Mohler J, i wsp. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat model. Infect Immun. 1998; 66(6): 2570-2575.

- [54] Dzierżanowska D, Pawińska A, Kamińska W, i wsp. Lekooporne drobnoustroje w zakażeniach szpitalnych. *Post Mikrobiol.* 2004; 42(1): 81-105.
- [55] Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(4): 1628-1635.
- [56] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, i wsp. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 966-975.
- [57] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
- [58] El-Zimaity HM, Ramchatesingh J, Clarridge JE, i wsp. *Enterococcus* gastritis. *Hum Pathol.* 2003; 34(9): 944-945.
- [59] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, i wsp. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999; 59: 67-70.
- [60] EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, valid from 2012-01-01. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v_2.0_120101.pdf
- [61] Fadnes B, Rekdal R, Uhlin-Hansen L. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparin sulfate of the surface of the tumor cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 183.
- [62] Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, i wsp. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001; 410: 842-847.
- [63] Felmingham D, Wilson AP, Quintana AI, i wsp. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 1992; 15(2): 295-301.
- [64] Feng G, Guron GKP, Churey JJ, i wsp. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(17): 5708-5713.
- [65] Fernandez-Guerrero ML, Goyenechea A, Verdejo C. Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospital-acquired infections as a major determinant of outcome. *Medicine* 2007; 86(6): 363-377.
- [66] Fernandez-Guerrero ML, Jiménez Rodríguez A, de Julián Jiménez A, i wsp. Recurrent fever as presenting from of colon carcinoma. *Rev Clin Esp.* 2002; 202(11): 592-595.
- [67] Forrest ARR, McCormack AK, DeSouza CPC, i wsp. Multiple splicing variants of cdc 25B regulate G2/M progression. *Biochim Biophys Res Commun.* 1999; 260: 510-515.
- [68] Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, i wsp. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 293-310.
- [69] Gálvez A, Valdivia E, Abriouel H, i wsp. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch Microbiol.* 1998; 171: 59-65.
- [70] Gillett CE, Barnes DM. Cell cycle. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1998; 51: 310-316.

- [71] Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, i wsp. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet* 2001; 14(357): 1179.
- [72] González B, Arca P, Mayo B, i wsp. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(6): 2158-2163.
- [73] Gozuacik D, Bialik S, Reveh T, i wsp. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 1875-1886.
- [74] Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2006; 2: 74-79.
- [75] Gratia A, Linz R. Le phénomène de Schwartzmann dans le sarcome du Cobaye. *C R Séances Soc Biol Paris* 1931; 108: 427-428.
- [76] Grzelakowska-Sztabert B. Regulacja cyklu komórkowego – udział białkowych inhibitorów kinaz cyklozależnych. *Post Biochem.* 1995; 41: 80-93.
- [77] Gwiazdowska D, Trojanowska K. Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia* 2005; 1(68): 114-130.
- [78] Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, i wsp. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 22.
- [79] Hanczyc P, Matczyszyn K, Pawlik K, i wsp. Spontaneous formation of liquid crystalline phases and phase transitions in highly concentrated plasmid DNA. *Liquid Crystals* 2011; 38(4): 461-468.
- [80] Hastings JW, Sailer M, Johnson K, i wsp. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol.* 1991; 173(23): 7491-7500.
- [81] Hendrickx AP, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, i wsp. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesion implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesions of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun.* 2009; 77: 5097-5106.
- [82] Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, i wsp. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol.* 2009; 17: 423-430.
- [83] Hill EE, Herijgers P, Claus P, i wsp. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 2007; 28: 196-203.
- [84] Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 86: 841-854.
- [85] Hoffmann I. The role of Cdc25 phosphatases in cell cycle checkpoints. *Protoplasma* 2000; 211: 8-11.
- [86] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, i wsp. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- [87] Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 357-375.
- [88] Hu CB, Malaphan W, Zendo T, i wsp. Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(13): 4542-4545.

- [89] Hu CB, Zendo T, Nakayama J, i wsp. Description of Durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. J Appl Microbiol. 2008; 105(3): 681-690.
- [90] Huang Y-B, Wang X-F, Wang H-Y, i wsp. Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. Mol Cancer Ther. 2011; 10: 416-426.
- [91] Iavarone A, Massague J. E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. Mol Cell Biol. 1999; 19: 916-922.
- [92] Inbal B, Bialik S, Sabanay I, i wsp. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. J Cell Biol. 2002; 157(3): 455-468.
- [93] Inbal B, Shani G, Cohen O, i wsp. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. Mol Cell Biol. 2000; 20: 1044-1054.
- [94] I-TASSER server for protein structure and function prediction <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- [95] Izquierdo E, Wagner C, Marchioni E, i wsp. Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(13): 4273-4276.
- [96] Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol Rev. 1995; 59(2): 171-200.
- [97] Jin Y, Blue EK, Gallagher PJ. Control of death-associated protein kinase (DAPK) activity by phosphorylation and proteosomal degradation. J Biol Chem 2006; 28: 39033-39040.
- [98] Joerger MC, Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J Bacteriol. 1986; 167(2): 439-446.
- [99] Joyanes P, Pascual A, Martínez-Martínez L, i wsp. *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. Clin Microbiol Infect. 1999; 5(6): 382-386.
- [100] Karlsson C, Katich S, Hagting A, i wsp. Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. J Cell Biol. 1999; 146: 573-584.
- [101] Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, i wsp. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 893-901.
- [102] Kayaoglu G, Rrstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(5): 308-320.
- [103] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
- [104] Kim R, Emi M, Tanabe K, i wsp. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. J Pathol. 2006; 208: 319-326.
- [105] Kim R, Emi M, Tanabe K, i wsp. The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. EJSO 2006; 32: 269-277.
- [106] Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, i wsp. Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon- α -induced cell death. J Biol Chem. 1995; 270: 27932-27936.

- [107] Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 1993; 12: 39-86.
- [108] Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, i wsp. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace, mediates attachment to particulate dentin. J Endod. 2006; 32: 634-637.
- [109] Kozłowicz BK, Dworkin M, Dunny GM. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? Int J Med Microbiol. 2006; 296: 141-147.
- [110] Kuch A, Willems RJL, Werner G, i wsp. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 551-558.
- [111] Kuch A, Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp. Krajowy ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Warszawa, 2009: stron 12. <http://www.korl.d.edu.pl/pdf/04-Rek2009-Enterokoki.pdf>
- [112] Kuo JC, Wang WJ, Yao CC, i wsp. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. J Cell Biol. 2006; 172(4): 619-631.
- [113] Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, i wsp. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. Pharm Res. 1994; 11(8): 1127-1131.
- [114] Leavis H, Top J, Shankar N, i wsp. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. J Bacteriol. 2004; 186: 672-682.
- [115] Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, i wsp. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2011. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x
- [116] Leclercq R, Dutka-Malen S, Brisson-Noël A, i wsp. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. Clin Infect Dis. 1992; 15: 495-501.
- [117] Lee DG, Hahn K-S, Park Y, i wsp. Functional and structural characteristics of anticancer peptide Pep27 analogues. Cancer Cell Int. 2005; 5: 21.
- [118] Leer RJ, van der Vossen JMBM, van Giezen M, i wsp. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol. 1995; 141: 1629-1635.
- [119] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 2008; 132: 27-42.
- [120] Levkoff LH, Marshall GP, Ross HH, i wsp. Bromodeoxyuridine inhibits cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Neoplasia 2008; 10(8): 804-816.
- [121] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell 2006; 124: 837-848.
- [122] Lim S-K, Tanimoto K, Tomita H, i wsp. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(10): 6544-6553.
- [123] Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesions from some oral streptococci. Infect Immun. 1995; 63: 703-706.

- [124] Lozano JCN, Meyer JN, Sletten K, i wsp. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Gen Microbiol. 1992; 138: 1985-1990.
- [125] Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. Mol Cell Biol. 1998; 18: 753-761.
- [126] Lyon WJ, Glatz BA. Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(1): 83-88.
- [127] Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. Expert Opin Investig Drugs 2006; 15(8): 933-946.
- [128] Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(10): 4425-4430.
- [129] Mathai D, Jones RN, Pfaller MA, i wsp. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 40(3): 129-136.
- [130] McCoy WC, Mason JM. Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid: report of a case. J Med. Assoc Alabama 1951; 21: 162.
- [131] McNicholas S, O'Gorman J, FeTalent A, i wsp. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates causing bloodstream infection to the antimicrobial peptide LL-37. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(s3): 62.
- [132] Meyer JE, Harder J. Antimicrobial peptides in oral cancer. Curr Pharm Des. 2007; 13(30): 3119-3130.
- [133] Milbrandt E. A novel source of enterococcal endocarditis. Clin Cardiol. 1998; 21: 123-126.
- [134] Moellering RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis. 1992; 14: 1173-1176.
- [135] Moll GN, Konings WN, Driessen AJM. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie van Leeuwenhoek. 1999; 76: 185-198.
- [136] Monk BC, Harding DR. Peptide motifs for cell-surface intervention: application to anti-infective and biopharmaceutical development. BioDrugs 2005; 19: 261-278.
- [137] Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 513-522.
- [138] Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell 2004; 116: 221-234.
- [139] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990; 3: 46-65.
- [140] Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. N Engl J Med. 2001; 245: 1318-1330.
- [141] Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, i wsp. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect Immun. 2000; 68: 5218-5224.
- [142] Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, i wsp. Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. Infect Immun. 2000; 68: 5210-5217.

- [143] Nes IF, Diep DB, Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J Bacteriol. 2007; 189(4): 1189-1198.
- [144] Nickleleit I, Zender S, Sasse F, i wsp. Argryrin A reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27^{kpl} in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. Cancer Cell 2008; 14: 23-35.
- [145] Nilsen T, Ingolf FN, Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(5): 2975-2984.
- [146] Nissen-Meyer J, Holo H, Hívarstein LS, i wsp. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J Bacteriol. 1992; 174(17): 5686-5692.
- [147] Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegård C, i wsp. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Curr Pharm Biotechnol. 2009; 10: 19-37.
- [148] Oppergård C, Rogne P, Emanuelsen L, i wsp. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. J Mol Microbiol Biotechnol. 2007; 13: 210-219.
- [149] Oscáriz JC, Pisabarro AG. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. J Appl Microbiol. 2000; 89: 361-369.
- [150] Patyar S, Joshi R, Prasad Byrav DS, i wsp. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. J Biomed Sci. 2010; 17: 21.
- [151] Pawelek J, Low K, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. Cancer Res. 1997; 57(20): 4537-4544.
- [152] Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait. 1992; 72: 113-142.
- [153] Piekarska K, Ławrynowicz-Paciorek M, Magdziak A, i wsp. Lekowrażliwość szczepów *Enterococcus* sp. izolowanych z materiału klinicznego oraz od osób zdrowych. Med. Dośw Mikrobiol. 2002; 54: 305-315.
- [154] Przybylski M. Enterokoki oporne na wankomycynę. I. Chorobotwórczość. Post Mikrobiol. 2007; 46(4): 301-316.
- [155] Przybylski M. Enterokoki oporne na wankomycynę. II. Mechanizmy oporności, epidemiologia. Post Mikrobiol. 2007; 46(4): 317-334.
- [156] Rebillard A, Lagadic-Gossman D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. Curr Med Chem. 2008; 15(26): 2656-2663.
- [157] Roberts JM. Evolving ideas about cyclins. Cell 1999; 98: 129-132.
- [158] Roses DF, Richman H, Localio SA. Bacterial endocarditis associated with colorectal carcinoma. Ann Surg. 1974; 179: 190-191.
- [159] Ross KF, Ronson CW, Tagg JR. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3. Appl Environ Microbiol 1993; 59(7): 2014-2021.
- [160] Rudy M, Zientara M, Bek T, i wsp. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. Pol J Microbiol. 2005; 54(1): 77-80.
- [161] Sánchez J, Diep DB, Herranz C, i wsp. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hirancin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). FEMS Microbiol Lett. 2007; 270(2): 227-236.

- [162] Sánchez-Hidalgo M, Montalbán-López M, Cebrián R, i wsp. AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(17): 2845-2857.
- [163] Sartingen S, Rozdzinski E, Musscholl-Silberhorn A, i wsp. Aggregation substance increases adherence and internalization but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun.* 2000; 68: 6044-6047.
- [164] Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 533-540.
- [165] Schillinger U, Geigen R, Holzapfel WH. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci Technol.* 1996; 7(5): 158-164.
- [166] Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, i wsp. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun.* 1998; 66: 218-223.
- [167] Shankar N, Lockatell V, Baghdayan AS, i wsp. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun.* 2001; 69: 4366-4372.
- [168] Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, i wsp. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun.* 1999; 67(1): 193-200.
- [169] Shelburne CE, An FY, Dholpe V, i wsp. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 297-300.
- [170] Smolarczyk R, Cichoń T, Szala S. Peptydy – nowa klasa leków przeciwnowotworowych. *Postępy Hig Med. Dośw.* 2009; 63: 360-368.
- [171] Solart E, Plenchette S, Sordet O, i wsp. Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents. *Therapiae* 2001; 5: 511-518.
- [172] Sood S, Malhotra M, Das BK, i wsp. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med. Res.* 2008; 128: 111-121.
- [173] Stiefel U, Pultz NJ, Helfand MS, i wsp. Increased susceptibility to vancomycin-resistant *Enterococcus* intestinal colonization persists after completion of anti-aerobic antibiotic treatment in mice. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25: 373-379.
- [174] Strzelecki J, Sadowy E, Hryniewicz W. Białka powierzchniowe enterokoków odpowiedzialne za oddziaływanie z tkankami gospodarza. *Post Mikrobiol.* 2011; 50(1): 31-42.
- [175] Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1: 101-114.
- [176] Sung WS, Park Y, Choi CH, i wsp. Mode of antibacterial action of a signal peptide, Pep27 from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363(3): 806-810.
- [177] Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, i wsp. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.* 2000; 68: 4900-4906.

- [178] Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Gamian A, i wsp. Identification of carcinoma suppressive factor produced by bacteria of *Enterococcus* genus. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(s3): 355.
- [179] Szkaradkiewicz A. 2011. Rodzina: *Enterococcaceae*. [W:] Mikrobiologia lekarska. Repetytorium z bakteriologii. UMP, Poznań: 25-28.
- [180] Teitz S, Guidetti-Sharon A, Manor H, i wsp. Pyogenic liver abscess: warning indicator of silent colonic cancer. Report of a case and review of the literature. Dis Colon Rectum 1995; 38(11): 1220-1223.
- [181] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. 2005; 187: 6213-6222.
- [182] Tichaczek PS, Vogel RF, Hammes WP. Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. Arch Microbiol. 1993; 160: 279-283.
- [183] Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, i wsp. The enterococcal protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 4538-4545.
- [184] Tyrrell J, Warn P, Payne L, i wsp. Inverse relationship between pathogenicity and NDM-1 carriage in *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(s3): 258.
- [185] van Belkum MJ, Stiles ME. Nonantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Nat Prod Rep. 2000; 17: 323-365.
- [186] van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, i wsp. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantite human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. J Immunol Methods 1994; 174: 311-320.
- [187] Vasu P, Bhattacharyya S, Saint-Dic D, i wsp. Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. Oncogene 2004; 23: 2367-2378.
- [188] Venema K, Abee T, Haandrikman AJ, i wsp. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(4): 1041-1048.
- [189] Venugopal H, Edwards PJB, Schwalbe M, i wsp. Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. Biochem. 2011; 50(14): 2748-2755.
- [190] Vignolo G, Fadda S, de Kairuz MN, i wsp. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. Int J Food Microbiol 1996; 29(2-3): 397-402.
- [191] Werner G, Coque TM, Hammerum AM, i wsp. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Eurosurveill. 2008; 13(47): 1-11.
- [192] Wiczyńska J, Kamińska W, Dzierżanowska D. Enterokoki – patogeny XXI wieku. Post Mikrobiol. 2001; 3: 257-278.
- [193] Wilks M. Vancomycin-dependent enterococcus. Lancet 1997; 349: 429.
- [194] Wirawan RE, Swanson KM, Kleffmann T, i wsp. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. Microbiol. 2007; 153: 1619-1630.
- [195] Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptides resistance in enterococci. Microb Drug Resist. 2001; 7: 229-236.

- [196] Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol.* 2010; 42(1): 4-9.
- [197] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biol.* 2007; 9(10): 1102-1109.
- [198] Yamada T, Goto M, Punj V, i wsp. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *PNAS* 2002; 99(22): 14098-14103.
- [199] Yamada T, Goto M, Punj V, i wsp. The bacterial redox protein azurin induces apoptosis in J774 macrophages through complex formation and stabilization of the tumor suppressor protein p53. *Infect Immun.* 2002; 70(12): 7054-7062.

8. STRESZCZENIE

Nowy peptyd (Entap) o aktywności antyproliferacyjnej produkowany przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* należą do prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Jednocześnie są one obecnie bardzo ważnymi patogenami szpitalnymi, określanymi jako patogeny XXI wieku lub super-zarazki. W materiale klinicznym, pobranym od ludzi, najczęściej występuje gatunek *E. faecalis*, do którego należy 80–90% wszystkich izolatów enterokoków. Na drugim miejscu znajduje się *E. faecium* stanowiący 10–15% ogółu enterokoków.

Dobrze już udokumentowano występowanie endogennych zakażeń bakteriami z rodzaju *Enterococcus* w przebiegu chorób nowotworowych, głównie przewodu pokarmowego. Wykazano, że zakażenia wywołwane enterokokami towarzyszą zarówno objawowym, jak i wczesnym bezobjawowym postaciom raka jelita grubego. Z raportów klinicznych wynika, że zakażenie enterokokowe może stanowić jeden z czynników toczącego się procesu nowotworowego. We wstępnych badaniach, przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, stwierdzono, że szczepy gatunków *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans* mogą oddziaływać na wzrost komórek rakowych poprzez wytwarzanie czynnika o właściwościach antyproliferacyjnych.

Celem niniejszej pracy było dokonanie identyfikacji fizyko-chemicznej oraz zanalizowanie wybranych właściwości czynnika antyproliferacyjnego, wytwarzanego przez szczepy bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Cel ten był realizowany w następujących zadaniach badawczych:

1. Izolacja nowego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus* i określenie jego natury biochemicznej.
2. Dokonanie oceny lekowrażliwości szczepów z rodzaju *Enterococcus* w kontekście izolowanego czynnika.
3. Oznaczenie masy cząsteczkowej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
4. Dokonanie analizy aktywności przeciwbakteryjnej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
5. Dokonanie oceny aktywności antyproliferacyjnej izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.
6. Dokonanie oceny histologicznej wybranych linii komórek rakowych i ekspresji ich genów pod wpływem izolowanego czynnika wytwarzanego przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*.

Materiał badawczy stanowiło 30 szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, izolowanych od pacjentów, z zakażeniami dróg moczowych (24 szczepy) lub zakażeniami ran skóry (6 szczepów). Identyfikacji gatunkowej dokonywano na

podstawie cech biochemicznych, stosując test rapid ID32 STREP (bioMerieux). Jednocześnie określano cechy fenotypowe, jak zdolność do wytwarzania hemolizy i wrażliwość na wybrane antybiotyki.

Z supernatantów hodowli bakterii z rodzaju *Enterococcus* izolowano i oczyszczano czynnik antyproliferacyjny, stosując elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE oraz sączenie molekularne w systemie FPLC. Skład czynnika określono stosując chromatografię gazowo-cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową. Badania aktywności antyproliferacyjnej izolowanego peptydu przeprowadzono na następujących liniach komórkowych: gruczolakoraka żołądka – AGS (ATCC CRL-1739), gruczolakoraka szyjki macicy – HeLa (ATCC CCL-2), gruczolakoraka gruczołu piersiowego – MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), raka prostaty – 22Rv1 (ATCC CRL-2505), gruczolakoraka okrężnicy – HT-29 (ATCC HTB-38), przewlekłej białaczki mieloblastycznej – K-562 (ATCC CCL-243), endotelium – HUV-EC-C (ATCC CRL-1730), fibroblastów – MRC-5 (ATCC CCL-171), nabłonka okrężnicy – CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790) i nabłonka pęcherza moczowego – HU-609 (Fibiger Institute). Oceny aktywności proliferacyjnej komórek dokonywano stosując test proliferacji komórek (TACS MTT Cell Proliferation Assay, Trevigen).

W ocenie aktywności przeciwbakteryjnej izolowanego peptydu zastosowano metodę dyfuzyjno-krażkową oraz fluorescencyjną metodę oceny żywotności bakterii. Dokonano również oceny histologicznej, wybranych linii komórek rakowych w obecności izolowanego peptydu. Ponadto, wykonano badania ekspresji wybranych genów w powyższych komórkach rakowych w następstwie oddziaływania izolowanego peptydu.

Spośród 30 szczepów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, izolowanych od pacjentów, 25 należało do gatunku *E. faecalis*, 4 do gatunku *E. faecium* i 1 do *E. durans*. Wszystkie izolowane szczepy były wrażliwe na wankomycynę i teikoplaninę. Z kolei, 2 szczepy *E. faecium* oraz 2 szczepy *E. faecalis* charakteryzowały się opornością wysokiego stopnia na aminoglikozydy (szczepy HLAR).

Wykazano, że w warunkach hodowli, wszystkie badane szczepy *Enterococcus* wytwarzają peptyd o właściwościach antyproliferacyjnych. Peptyd ten jest wydzielany do podłoża w fazie wzrostu bakterii, począwszy od około 3 godziny, aż do wczesnej fazy stacjonarnej. W przeprowadzonych badaniach wykazano obecność aktywnego peptydu o masie cząsteczkowej 6247,2 Da. Peptyd jest termostabilny w temperaturze 75°C przez 0,5 godziny. Charakteryzuje się on unikalną hydrofobową budową wynikającą ze składu aminokwasowego. Jednocześnie peptyd ten wykazuje tendencję do tworzenia agregatów. W związku z aktywnością antyproliferacyjną izolowany peptyd nazwano – Entap (*Enterococcal antiproliferative peptide*). W przeprowadzonych badaniach nie wykazano działania przeciwbakteryjnego Entap wobec: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*

agalactiae i *Escherichia coli*, zarówno przy zastosowaniu metody dyfuzyjno-kraężkowej, jak i fluorescencyjnego testu żywotności bakterii.

W badaniach doświadczalnych *in vitro* wykazano silne działanie antyproliferacyjne izolowanego peptydu Entap wobec ludzkich komórek nowotworowych: gruczolakoraka żołądka (AGS), gruczolakoraka szyjki macicy (HeLa), gruczolakoraka gruczołu piersiowego (MDA-MB-231), raka prostaty (22Rv1) i gruczolakoraka okrężnicy (HT-29). Procent redukcji aktywności proliferacyjnej powyższych linii komórkowych w obecności Entap wynosił 29,1–38,4%. Jednocześnie stwierdzono słabe oddziaływanie Entap wobec komórek K-562 oraz komórek zdrowych – procent redukcji aktywności proliferacyjnej wynosił w zakresie 3,1–5,3%. Uzyskane wyniki redukcji aktywności proliferacyjnej komórek rakowych pod wpływem Entap różniły się istotnie ($p < 0.0001$) względem wyników redukcji aktywności proliferacyjnej komórek zdrowych.

W badaniach ultrastrukturalnych komórek rakowych, inkubowanych z Entap, stwierdzono wykładniki degradacji, cechy apoptozy autofagowej: w cytoplazmie – liczne wakuole oraz struktury odpowiadające autofagosomom i autolizosomom.

W dokonanej analizie ekspresji wybranych genów we wszystkich komórkach rakowych w obecności Entap wykazano istotne statystycznie zmiany w ekspresji genów związanych z proliferacją i apoptozą autofagową. Nastąpiło zmniejszenie ekspresji genów cykliny D1, cykliny E2 i fosfatazy Cdc25A, przy jednoczesnym wzroście ekspresji genu kinazy związanej ze śmiercią (DAPK1). Jednocześnie wykazano zróżnicowanie ekspresji genu dla białka związanego z opornością na cisplatynę (gen *Crop*); wyraźne zmniejszenie ekspresji *Crop* stwierdzono pod wpływem Entap w komórkach 22Rv1, HT-29 oraz MDA-MB-231.

Uzyskane wyniki dokumentują, że szczepy kliniczne wankomycynowrażliwych bakterii z rodzaju *Enterococcus* (VSE), produkują peptyd (Entap) o m.c. 6247,2 Da, wykazujący aktywność antyproliferacyjną wobec komórek rakowych, natomiast nie posiadający aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Aktywność antyproliferacyjna Entap wobec komórek rakowych wyraża się hamowaniem ich cyklu komórkowego w fazie G1 oraz indukcją apoptozy autofagowej. Entap charakteryzuje się termostabilnością oraz wysoką zawartością aminokwasów hydrofobowych, co determinuje unikalny charakter jego cząsteczki. Zidentyfikowanie peptydu Entap i określenie jego właściwości wydaje się mieć istotne znaczenie kliniczne, gdyż stwarza nadzieję na jego zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

9. SUMMARY

Bacteria of *Enterococcus* genus belong to normal microflora of alimentary tract in humans and animals. In parallel, they also are serious hospital pathogens, termed the pathogens of 21st century or super-bugs. Clinical material, sampled from humans, most frequently contains the species of *E. faecalis*, comprising 80-90% of all enterococcal isolates. It is followed by *E. faecium* comprising 10-15% of all enterococcal isolates.

Manifestation of endogenous infections with bacteria of *Enterococcus* genus was well documented in the course of neoplastic diseases, particularly those of alimentary tract. Infections induced by *Enterococcus* were shown to accompany both symptomatic and early asymptomatic stages of colorectal carcinoma. Clinical reports indicate that enterococcal infection may represent one of exponents of an ongoing neoplastic process. In preliminary studies conducted in the Chair and Department of Medical Microbiology, Poznań University of Medical Sciences strains of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans* species were found to be capable of affecting growth of cancer cells due to their production of an anti-proliferative agent.

This study aimed at physicochemical identification and analysis of selected properties manifested by anti-proliferative agent produced by bacteria of *Enterococcus* strains. The study was implemented in the following investigative stages:

1. Isolation of the new agent produced by bacteria of *Enterococcus* genus and determination of its biochemical nature;
2. Evaluation of drug sensitivity manifested by strains of *Enterococcus* genus in the context of the isolated agent;
3. Determination of molecular weight of the isolated agent produced by bacteria of *Enterococcus* genus;
4. Analysis of anti-bacterial activity shown by the isolated agent, produced by bacteria of *Enterococcus* genus;
5. Evaluation of anti-proliferative activity manifested by the isolated agent, produced by bacteria of *Enterococcus* genus;
6. Histological appraisal of selected cancer cell lines and expression of their genes under effect of the isolated agent produced by bacteria of *Enterococcus* genus.

The investigated material included 30 bacterial strains of *Enterococcus* genus, isolated from patients with infection of urinary tract (24 strains) or with infected dermal wounds (6 strains). Identification of species was performed on the basis of biochemical traits, using rapid ID 32 STREP test (bioMerieux). In parallel, phenotypic traits were examined, such as ability to induce haemolysis and sensitivity to selected antibiotics.

The anti-proliferative agent was isolated from supernatants of bacterial cultures and purified using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and molecular sieving in the FPLC system. Composition of the agent was defined using gas-fluid chromatography coupled to mass spectrometry. Studies on anti-proliferative activity of the isolated peptide were performed on the following cell lines: cells of gastric adenocarcinoma - AGS (ATCC CRL-1739), cells of uterine cervix adenocarcinoma - HeLa (ATCC CCL-2), adenocarcinoma of mammary gland - MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), prostate carcinoma - 22Rv1 (ATCC CRL-2505), colon adenocarcinoma - HT-29 (ATCC HTB-38), chronic myeloblastic leukaemia - K-562 (ATCC CCL-243), endothelial cells - HUV-EC-C (ATCC CRL-1730), fibroblasts - MRC-5 (ATCC CCL-171), colon epithelium - CCD 841 CoN (ATCC CRL-1790) and epithelium of urinary bladder - HU-609 (Fibiger Institute). Cell proliferative activity was estimated using cell proliferation test (TACS MTT Cell Proliferation Assay, Trevigen).

In evaluation of anti-bacterial activity manifested by the isolated peptide the disc-diffusion technique was used and fluorescent technique for estimation of bacterial viability. Histological appraisal was also performed of selected cancer cell lines, exposed to the isolated peptide. Moreover, expression of selected genes was examined in the cancer cell lines, as affected by exposure to the isolated peptide.

Among 30 bacterial strains of *Enterococcus* genus, isolated from patients, 25 represented the species of *E. faecalis*, 4 represented the species of *E. faecium* and 1 represented the species of *E. durans*. All the isolated strains were sensitive to vancomycin and teicoplanin. In turn, 2 strains of *E. faecium* and 2 strains of *E. faecalis* proved to be highly resistant to aminoglycosides (HLAR strains).

In culture all the studies strains of *Enterococcus* were found to produce peptide of anti-proliferative properties. The peptide was produced to medium at the stage of bacterial growth, beginning at around third hour of the culture up to early stationary phase. Our studies demonstrated presence of an active peptide of 6247.2 Da molecular weight, thermostable at the temperature of 75°C for 0.5 hour. The peptide manifested a unique hydrophobic structure, resulting from its amino acid composition. In parallel, the peptide manifested a tendency to form aggregates. In view of its anti-proliferative activity the isolated peptide was termed Entap (Enterococcal anti-proliferative peptide). The conducted experiments failed to demonstrate anti-bacterial activity of Entap toward *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*, using either the disc-diffusion technique or the fluorescent test for bacterial viability.

In *in vitro* experiments a pronounced anti-proliferative activity of the isolated Entap was documented targeted at human neoplastic cell lines, including cells of gastric adenocarcinoma (AGS), adenocarcinoma of uterine cervix (HeLa), adenocarcinoma of mammary gland (MDA-MB-231), prostate cancer

(22Rv1) or adenocarcinoma of colon (HT-29). Proliferative activity of the cell lines exposed to Entap was found to be reduced by 29.1-38.4%. In parallel, Entap weakly acted on K-562 cells and healthy cells reducing their proliferative activity by 3.1-5.3%. The difference in reduction of proliferative activity under effect of Entap between cancerous cells and normal cells proved to be highly significant ($p < 0.0001$).

Ultrastructural studies on cancer cells exposed to Entap disclosed exponents of decomposition, traits of autophagous apoptosis: the cytoplasm contained numerous vacuoles and structures corresponding to autophagosomes and autolysosomes.

In the conducted analysis of selected genes in all cancer cells exposed to Entap significant alterations were disclosed in expression of genes linked to proliferation and autophagous apoptosis. Expression of cyclin D1, cyclin E2 and phosphatase Cdc25A genes was reduced while expression of death of cell-associated phosphokinase 1 (DAPK1) was found to be increased. In parallel, a differentiation was noted in expression of gene coding for the protein linked to resistance to cisplatin (*Crop* gene): a clearly decreased expression of *Crop* under effect of Entap was disclosed in cells of 22Rv1, HT-29 and MDA-MB-231.

The obtained results demonstrate that clinical strains of vancomycin-sensitive bacteria of *Enterococcus* genus (VSE), produce a peptide (Entap) of 6247.2 Da molecular weight, manifesting an anti-proliferative activity toward cancerous cells but free of anti-microbial activity. The anti-proliferative activity of Entap toward cancerous cells is manifested by inhibition of their cell cycle in G1 phase and by induction of autophagous apoptosis. Entap manifests thermal stability and high content of hydrophobic amino acids, which determines a unique character of its molecule. Identification of the new peptide - Entap and determination of its properties seems to carry a high clinical significance as it opens prospects for its application in therapy of tumours.