

STRESZCZENIE

Ważną rolę w oddziaływaniach gospodarz-patogen odgrywają enzymy proteolityczne i ich inhibitory. Metaloproteiny wydzielane są przez drobnoustroje patogenne jako czynniki wirulencji, w celu niszczenia nie tylko tkanek gospodarza, ale także jego białek odpornościowych. Dlatego inhibitory tych enzymów mogą służyć jako skuteczne środki terapeutyczne, co jest szczególnie ważne ze względu na rosnącą liczbę drobnoustrojów opornych na znane antybiotyki. W niniejszej pracy opisano rolę metaloproteaz wytwarzanych głównie przez bakterię pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* w zasiedleniu organizmu gospodarza. Zwrócono również uwagę na udział inhibitorów tych enzymów w reakcjach obronnych i podkreślono ich potencjalną rolę w hamowaniu rozwoju infekcji.

WPROWADZENIE

Enzymy proteolityczne, zwane proteazami lub peptydazami są enzymami należącymi do klasy hydrolaz, które mają zdolność rozrywania wiązania peptydowego wykorzystując przy tym cząsteczkę wody. Proteazy mogą rozcinać łańcuchy polipeptydowe i przez tak zwaną ograniczoną proteolizę aktywować zymogeny, receptory, uczestniczyć w translokacji białek przez błony biologiczne; mogą również trawić białka do ich aminokwasowych monomerów. Są czynnikami niezbędnymi w utrzymaniu homeostazy, zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Szczególną grupę wśród tych enzymów stanowią zewnętrzkomórkowe proteazy bakteryjne, wytwarzane przede wszystkim przez oportunistyczne patogeny, które mogą funkcjonować jako czynniki wirulencji [1].

Pojawienie się dodatkowej puli proteaz przyczynia się do zachwiania równowagi w organizmie gospodarza pomiędzy proteazami a ich inhibitorami. Udział proteaz bakteryjnych zaznacza się niemal na każdym etapie procesu patogenezy. Aktywność enzymów niezbędna jest już podczas kolonizacji, zarówno w przypadku infekcji bakterią Gram-dodatnią, kiedy dochodzi do oddziaływania adhezyn bakteryjnych z macierzą zewnątrzkomórkową gospodarza, czy też w przypadku bakterii Gram-ujemnych ulegających adhezji bezpośrednio do tkanek. Proteazy bakteryjne „wspomagają” patogen w inwazji, poprzez trawienie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także błony podstawnej narządów i tkanek gospodarza. Ponadto, działanie proteaz polega na przełamaniu barier immunologicznych gospodarza, poprzez degradowanie przeciwciał i receptorów komórek immunologicznych. Proteazy bakteryjne interferują z działaniem kaskad proteolitycznych gospodarza m. in. z układem dopełniacza, krzepnięcia, fibrynolizy i kalikreiny-kininogenu [2-4]. W niniejszej pracy skupimy się na przybliżeniu informacji na temat roli metaloproteaz bakteryjnych w procesie patogenezy, na przykładzie patogennej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Ponadto, omówione zostaną białkowe inhibitory proteaz, a w szczególności metaloproteaz, ich mechanizmy działania oraz możliwości praktycznego wykorzystania.

KLASYFIKACJA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Komitet Nazewnictwa (ang. *Nomenclature Committee*) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB) w 1984 roku nadał każdemu enzymowi nazwę oraz czteroczęściowy numer. System według numeracji EC (ang. *Enzyme Commission*) oparty jest na typie reakcji katalizowanej przez dany enzym i dzieli je na sześć klas: oksydoreduktazy (1), transferazy (2), hydrolazy (3), liazy (4), izomerazy (5) i ligazy (6). Na przykład, EC 3.4.xx; cyfra 3 oznacza klasę hydrolaz, a cyfra 4 podklasę peptydaz [5]. Natomiast drugi system to MEROPS, który jest oparty na podziale proteaz na kłany i rodziny, a także zawiera klasyfikację ich substratów i inhibitorów. W tym przypadku, enzymy proteolityczne ze względu na rodzaj

Anna Siemińska-Kuczer✉

Lidiia Vertyporokh

Mariola Andrejko

Iwona Wojda

Sylwia Stączek

Agnieszka Zdybicka-Barabas

Katarzyna Grygorczuk

Małgorzata Cytryńska

Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, Lublin

✉Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, tel.: (81) 537 50 50, e-mail: asieminska.bio@gmail.com

Artykuł otrzymano 30 października 2017 r.
Artykuł zaakceptowano 14 listopada 2017 r.

Słowa kluczowe: metaloproteiny, inhibitory metaloproteaz, *Pseudomonas aeruginosa*, owadzi inhibitor metaloproteaz

Wykaz skrótów: ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*) - adamalizyna; ADAMTS (ang. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) - adamalizyna z motywem trombospondyny; AMPs (ang. *antimicrobial peptides*) - peptydy odpornościowe; IMPI (ang. *insect metalloproteinase inhibitor*) - owadzi inhibitor metaloproteaz (endometaloproteaz); LasA - elastaza A; LasB - elastaza B; MMPs (ang. *matrix metalloproteinases*) - metaloproteiny macierzy pozakomórkowej; TIMPs (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) - tkankowe inhibitory metaloproteaz

centrum aktywnego zostały podzielone na: proteazy asparaginianowe (aspartylowe), proteazy asparaginowe, proteazy cysteinowe, proteazy glutaminianowe (glutamylowe), metaloproteazy, proteazy serynowe, proteazy treoninowe i proteazy o nieznanym mechanizmie działania [6].

METALOPROTEAZY JAKO CZYNNIKI WIRULENCJI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Patogenne szczepy bakterii charakteryzują się szeregiem czynników i mechanizmów warunkujących zjadliwość mikroorganizmu, do których zalicza się metaloproteazy (EC 3.4.24.) należące do tzw. „cynkowej superrodziny” posiadające charakterystyczną sekwencję HEXXH (X – reszta dowolnego aminokwasu). Kluczową rolę w mechanizmie katalizy dokonywanej przez metaloproteazy odgrywa jon cynku (Zn^{2+}), który aktywuje cząsteczkę wody, co umożliwia jej atak nukleofilowy na grupę karbonylową wiązania peptydowego. Bakteryjne metaloproteazy obejmują trzy rodziny: termolizyny, serralizyny i neurotoksyny. Typowymi przedstawicielami mikroorganizmów syntetyzujących enzymy z wyżej wymienionych rodzin są odpowiednio bakterie *Bacillus thermoproteolyticus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium botulinum* lub *C. tetani* [7].

Do drobnoustrojów wytwarzających proteazy jako czynniki wirulencji należy pałeczka rosy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteria jest patogenem oportunistycznym, co oznacza, że może wywoływać zakażenia u ludzi z obniżoną odpornością (choroby nowotworowe, AIDS). Ponadto, odpowiedzialna jest za rozwój chronicznych infekcji układu oddechowego u chorych na mukowiscydozę oraz infekcji skóry u pacjentów z rozległymi oparzeniami. Oprócz tego jest częstym czynnikiem etiologicznym w zakażeniach dróg moczowych (np. na skutek stosowania cewników), ucha zewnętrznego i środkowego oraz rogówki oka. Pałeczki *Pseudomonas* mogą wytwarzać trzy zewnątrzkomórkowe metaloproteazy: elastazę B (LasB), elastazę A (LasA) oraz alkaliczną proteazę [8,9].

ELASTAZA B

Elastaza B (LasB; EC 3.4.24.26.) zwana pseudolizyną, to metaloproteaza o masie 33 kDa należąca do rodziny termolizyn M4, endopeptydaz cynkowych zależnych od jonów wapnia. Posiada zdolność do hydrolizy wiązania peptydowego po stronie aminowej proliny [10]. Jest kodowana przez chromosomowy gen *lasB* w postaci preproelastazy składającej się z 498 aminokwasów tworzących 3 domeny, z których trzecia odpowiada za właściwości katalityczne [11]. Enzym wydzielany jest do przestrzeni międzykomórkowej przez system sekrecji typu II [12]. Elastaza jest jednym z czynników wirulencji *P. aeruginosa*, którego ekspresja regulowana jest przez mechanizm *quorum sensing* (QS), czyli sposób „porozumiewania się bakterii” [13].

U ludzi aktywność elastazy B jest szczególnie ważna w infekcjach dróg oddechowych, moczowych, zakażeniach rogówki, tkanki łącznej i skóry po oparzeniach [7]. Uszkodzenie tkanek gospodarza przez LasB jest związane z degradacją białek strukturalnych tkanki łącznej m.in. elastyny oraz kolagenu typu III i IV [14,15], jak również z aktywa-

cją tkankowych metaloproteinaz (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*). Wykazano również, że elastaza B hamuje wzrost fibroblastów [16,17].

Ważnym elementem wrodzonych mechanizmów odporności immunologicznej jest układ dopełniacza, uczestniczący w obronie organizmu gospodarza przed różnymi czynnikami, np. drobnoustrojami, poprzez wspomaganie fagocytozy, czy też wzmocnienie toczącej się reakcji zapalnej. Elastaza B jest zdolna do inaktywacji kluczowych elementów układu dopełniacza takich jak C1 i C3 oraz C5, C8 i C9 [18].

Ponadto zaobserwowano, że LasB katalizuje proteolityczną degradację peptydów przeciwbakteryjnych tj. α -defensyn oraz katelicydiny (LL-37), zainfekowanego gospodarza [19]. Peptydy te należą do dwóch głównych rodzin peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs, ang. *antimicrobial peptides*) znalezionych u ssaków i wielu innych gatunków. Peptydy odpornościowe stanowią pierwszą linię obrony organizmu jako efekторы odpowiedzi nieswoistej. Charakteryzują się szerokim zakresem działania, chronią m.in. przed bakteriami Gram-ujemnymi, Gram-dodatnimi, wirusami, z tego powodu nazywane są często peptydowymi lub naturalnymi „antybiotykami” [20].

Elastaza B *P. aeruginosa* może wpływać na funkcjonowanie receptorów aktywowanych przez proteazy (PARs, ang. *proteinase-activated receptors*), na przykład receptora PAR2. Należą one do dużej rodziny receptorów określanych jako receptory związane z białkami G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*), które regulują wiele mechanizmów związanych z odpowiedzią immunologiczną. Aktywacja PAR2 prowadzi do uruchomienia różnych reakcji, takich jak wydzielanie prostanoidów, cytokin i metaloproteinaz. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych wskazują, że elastaza B powoduje cięcie proteolityczne w obrębie zewnętrznej domeny receptora PAR2, co zapobiega uruchomieniu odpowiedzi immunologicznej poprzez zachowanie niskiego poziomu interleukiny 8 (IL-8) oraz prostaglandyny E2 (PGE2) [21].

Bakteria *P. aeruginosa* zakłóca prawidłowe działanie komórek nabłonka wyściełającego górne partie układu oddechowego, jest bowiem najczęstszą przyczyną chronicznych zakażeń dróg oddechowych. Podczas infekcji, istotną rolę pełni LasB, która hydrolizuje wiązania peptydowe białek surfaktantu A i D (SP-A i SP-D) [22]. Są to stosunkowo liczne, hydrofilne, strukturalnie pokrewne białka należące do rodziny lektyn zależnych od wapnia. Molekuły te mają zdolność do wiązania węglowodanów na powierzchni bakterii, wirusów i innych patogenów kolonizujących płuca. Tak więc działają jak opsoniny oraz aktywują pęcherzykowe makrofagi, odgrywając istotną rolę w mechanizmach obronnych organizmu w obrębie płuc [23].

Elastazie B przypisuje się rolę czynnika odpowiedzialnego za stany zapalne rogówki, szczególnie u osób noszących soczewki kontaktowe. Infekcje te mogą przebiegać bardzo szybko i powodować trwałą utratę wzroku [24]. Wykazano, że LasB rozkłada kolagen zrębu rogówki, jak również aktywuje proMMPs uwolnione z keratocytów, efektem czego

jest potęgowanie proteolitycznej degradacji rogówki [16]. Warto w tym miejscu dodać, że wyniki badań prowadzonych przez Kessler'a i współpracowników (1984) wykazały, że fosforamidon, który jest specyficznym inhibitorem elastazy, skutecznie chronił rogówki królików przed uszkodzeniem przez tę metaloproteinazę [25].

Jak wynika z wielu przeprowadzonych badań LasB bierze udział w modulacji mechanizmów odpornościowych gospodarza poprzez degradację immunoglobulin IgA i IgG. W konsekwencji patogen unika fagocytozy i z powodzeniem namnaża się w organizmie. Wytwarzanie immunoglobulin A jest podstawowym mechanizmem odpornościowym w obrębie błon śluzowych, natomiast immunoglobuliny IgG stanowią główny typ przeciwciał biorących udział w nabytej odpowiedzi immunologicznej na dany patogen [26].

ELASTAZA A

Elastaza A (LasA; M23.002) *P. aeruginosa*, zwana stafilolizyną, jest metaloproteinazą zaliczaną do podgrupy A rodziny M23 obejmującej stafilolityczne lub β -lityczne metaloendopeptydazy [6]. Enzym syntetyzowany jest w formie preproenzymu o masie cząsteczkowej wynoszącej około 40 kDa, który podlega sekrecji typu II. Dojrzewanie LasA to proces wieloetapowy, zachodzący na zewnątrz komórki bakterii, w którym do rozszczepienia propeptydu niezbędne są inne endopeptydazy produkowane przez pałeczkę ropy błękitnej (elastaza B i alkaliczna proteaza). Dojrzała forma LasA ma masę cząsteczkową 24 kDa [15].

Elastaza A charakteryzuje się niską aktywnością elastolityczną, natomiast znacznie wzmacnia aktywność elastazy B w procesie degradacji elastyny, poprzez modyfikację substratu [12]. Ponadto, enzym zwiększa aktywność niektórych elastaz występujących w organizmie gospodarza (m. in. ludzkiej elastazy leukocytów, czy elastazy neutrofilii). Dzięki tym właściwościom LasA może mieć znaczenie w rozwoju infekcji rogówki oka oraz przewlekłych infekcjach układu oddechowego.

Omawiana metaloproteinaza wykazuje również aktywność stafilolityczną, powodując lizę peptydoglikanu ścian komórkowych bakterii *Staphylococcus aureus*. W warunkach fizjologicznych, ta charakterystyczna dla LasA aktywność jest prawdopodobnie jednym ze sposobów obrony stosowanym przez bakterie *P. aeruginosa* w celu uzyskania znacznej przewagi nad innymi mikroorganizmami, które mogą stanowić konkurencję, podczas zakażenia płuc u chorych na mukowiscydozę [26].

ALKALICZNA PROTEAZA

Kolejną zewnątrzkomórkową metaloproteinazą *P. aeruginosa* dobrze charakteryzowaną pod względem genetycznym i biochemicznym jest alkaliczna proteaza (EC 3.4.24.40.). Enzym ten zwany również aeruginolizyną należy do rodziny serralizyn (M10 A). Masa cząsteczkowa enzymu wynosi około 50 kDa, w zależności od badanego szczepu bakteryjnego. Analiza strukturalna peptydazy wykazała homologię do 50-kDa metaloproteinazy wytwarzanej przez *Serratia marcescens* oraz *Dickeya dadantii*. Alkaliczna proteaza

składa się z 470 reszt aminokwasowych ułożonych w dwie domeny. N-końcowa domena pełniąca funkcję katalityczną jest zbudowana z α -helisy i posiada strukturę III-rzędową [27,28]. Domena ta jest podobna do tkankowych metaloproteinaz (MMPs) występujących u ludzi [29]. Natomiast część C-końcowa enzymu stanowiąca sygnał do sekrecji i wiążąca jony wapnia, zbudowana jest z β -karktek [28]. Charakterystyczny dla domeny C-końcowej jest motyw RTX (ang. *repeat in toxin*), zawierający nonapeptydowe powtórzenia reszt glicyny i kwasu asparaginowego. Motyw RTX jest obecny w białkach wydzielanych przez system sekrecji typu I bakterii Gram-ujemnych. Do działania tej metaloproteinazy niezbędna jest obecność 8 jonów Ca^{2+} przypadających na jedną cząsteczkę enzymu. Jony związane są wewnątrznie przez motyw GGXGXDXUX (X oznacza resztę dowolnego aminokwasu, U – resztę hydrofobową aminokwasowu) [30].

W wyniku ekspresji genu *aprA* powstaje nieaktywne białko, które zostaje wydzielone poza komórkę bakteryjną przy udziale trzech białek błonowych: AprD, AprE i AprF [26]. Następnie po translokacji transmembranowej enzym poddawany jest procesowi dojrzewania, czyli odcinania części N-końcowej białka i ulega fałdowaniu. Sekrecja alkalicznej proteazy jest wydajna w obecności domeny C-końcowej o niezmięnionej konformacji i przy wysokim stężeniu wapnia w podłożu. Wydajność tego procesu spada w przypadku mutacji w domenie RTX [30]. Działanie tego enzymu polega na hydrolizie wiązania peptydowego białka po stronie karboksylowej reszty proliny [12].

Enzym ten podobnie jak i pozostałe opisywane tu metaloproteinazy, odgrywa ważną rolę w przypadku bakteriemii, podczas infekcji oka, zapalenia ucha środkowego oraz u chorych na mukowiscydozę [8]. Trawienie białek gospodarza przez aeruginolizynę może prowadzić do destrukcji tkanek i ułatwia bakterii rozprzestrzenianie się w zakażonym organizmie. Podobnie, jak w przypadku LasB, aktywność alkalicznej proteazy prowadzi do upośledzenia swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza, poprzez rozkład cytokin, rozregulowanie kaskady dopełniacza, niszczenie receptorów komórek immunologicznych i przeciwciał [4]. Dowiedziono, że alkaliczna proteaza degraduje ważne immunologicznie cząsteczki tj. składnik C3 i C1q dopełniacza. Co więcej, w 2011 roku wykazano, że mechanizm hamowania układu dopełniacza w obecności alkalicznej proteazy polega na cięciu składnika C2 dopełniacza. W ten sposób dochodzi do zakłócenia klasycznego i lektynowego szlaku aktywacji dopełniacza [31]. Oprócz tego, metaloproteinaza w warunkach *in vitro* powoduje lizę fibryny i fibrynogeny. Alkaliczna proteaza i elastaza B są zaangażowane w niszczenie cytokin, na przykład interferonu (INF- γ), czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) oraz interleukiny 2 (IL-2). Dodatkowo, aeruginolizyna odpowiedzialna jest za degradację interleukiny 6 (IL-6).

Wykazano, że degradacja proteolityczna lamininy, syntetyzowanej przez komórki nabłonkowe, może prowadzić do powstania martwicy krwotocznej. Tymczasem zaburzona chemotaksja neutrofilii wywołana działaniem proteazy może prowadzić do „ucieczki” drobnoustroju przed fagocytozą. Podobnie, w przypadku leukocytów trawienie miejsc receptorowych na powierzchni komórki zakłóca pro-

Tabela 1. Funkcje metaloproteinaz *Pseudomonas aeruginosa* jako czynników wirulencji.

Substraty dla metaloproteinaz <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Elastaza B	Elastaza A	Alkaliczna proteaza
C1, C3, C5, C8, C9		C1q, C2, C3
Elastyna		Fibrynogen
Kolagen typu III i IV		Fibryna
Fibryna	Elastyna	Laminina
IgA i IgG	Peptydoglikan <i>Staphylococcus</i>	INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-6
INF- γ , TNF- α , IL-2		MCP-1
Peptydy przeciwbakteryjne		ENA-78
Białka surfaktantu SP-A i SP-D		RANTES
Inhibitory proteaz		

ces fagocytozy. Takie cięcie receptorów ma również miejsce w przypadku komórek NK (ang. *natural killers*), czego skutkiem jest utrudnione wiązanie z komórką docelową [12, 26].

Zauważono również udział enzymu w inaktywacji białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1, ang. *monocyte chemotactic protein-1*), peptydu aktywującego neutrofile nabłonkowe (ENA-78) oraz chemokiny β syntetyzowanej przez limfocyty (RANTES, ang. *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*). Substratami dla alkalicznej proteazy mogą być także inhibitory proteaz serynowych (α -1-antychymotrypsyna i serpiny np. inhibitor C1) oraz immunoglobuliny IgG [26].

Wykazano, że alkaliczna proteaza może chronić bakterie *P. aeruginosa* przed wykryciem, poprzez rozkład monomerów flageliny, uniemożliwiając sygnalizację TLR5 gospodarza (ang. *Toll-like receptor 5*), podczas gdy potrzebne do poruszania się drobnoustrojów polimery flageliny nie są degradowane dzięki obecności inhibitora AprI [32]. W tabeli poniżej zostały zestawione funkcje metaloproteinaz *P. aeruginosa* jako czynników wirulencji.

ODDZIAŁYWANIA METALOPROTEINAZ *P. AERUGINOSA* Z BIAŁKAMI I PEPTYDAMI ODPORNOŚCIOWYMI OWADA

Warunkiem efektywnego leczenia zakażeń spowodowanych bakterią *P. aeruginosa* jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za chorobotwórczość tej bakterii. W badaniach procesu patogenezy i czynników wirulencji tego drobnoustroju, jako alternatywny organizm modelowy coraz częściej wykorzystywany jest barciak większy *Galleria mellonella*. Jest to uzasadnione, ponieważ występuje znaczące podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy licznymi elementami wrodzonej odporności owadów i ssaków. Owady jako model w badaniach zakażeń bakteryjnych mogą stanowić narzędzie do diagnostyki mikrobiologicznej i charakterystyki bakteryjnych czynników wirulencji [33,34].

Owady mają bardzo sprawnie działający układ immunologiczny, składający się z zewnętrznych barier ochronnych oraz wewnętrznych mechanizmów odporności wrodzonej, do których należą odpowiedź komórkowa i humoralna. Ta druga związana jest z działaniem białek i peptydów hemolimfy m.in. układu oksydazy fenolowej, lizozymu, peptydów odpornościowych [20].

O istotnym znaczeniu proteaz wytwarzanych przez *P. aeruginosa* podczas zakażenia świadczą wyniki badań, w których zaobserwowano, że szczepy tej bakterii różniące się profilem enzymów proteolitycznych mają odmienny wpływ na poszczególne elementy układu odpornościowego owada.

Do tej pory wykazano, że enzymy proteolityczne *Pseudomonas* w początkowej fazie infekcji powodują aktywację odpowiedzi immunologicznej owada, na przykład poprzez zwiększenie syntezy lizozymu, czy też indukcję syntezy peptydów odpornościowych. Zmiany te powodują zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy zakażonego owada. Natomiast w miarę rozwoju bakteriemii enzymy proteolityczne są zdolne przełamywać barierę w postaci humoralnej odpowiedzi gospodarza, hamując aktywność oksydazy fenolowej, czy też powodując degradację peptydów odpornościowych. Należy zaznaczyć, że poszczególne proteazy wykazują zróżnicowane działanie, na przykład elastaza B bardzo efektywnie degraduje peptydy, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, podczas gdy alkaliczna proteaza tylko w niewielkim stopniu. Alkaliczna proteaza ma natomiast zdecydowanie większy udział w proteolizie lizozymu. Zaobserwowano, że po iniekcji gąsienicom LasB dochodzi do indukcji syntezy inhibitorów hamujących aktywność metaloproteinaz na poziomie porównywalnym do iniekcji termolizyny [9,35-37]. Więcej informacji na temat inhibitorów zostało zamieszczonych w podrozdziale - Owadzi inhibitor metaloproteinaz. Przytoczone wyniki badań wskazują, że barciak większy wydaje się być bardzo użytecznym organizmem w badaniach mechanizmów patogenezy *P. aeruginosa*, ze szczególnym uwzględnieniem metaloproteinaz jako czynników wirulencji.

METALOPROTEINAZY MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Poza wcześniej opisanymi metaloproteinazami pochodzenia bakteryjnego istotną rolę w przebiegu zakażenia odgrywają metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej. MMPs kontrolują procesy fizjologiczne, tj. przebudowę tkanek, proces rozwoju embrionalnego (embriogenezę) oraz tworzenie naczyń włosowatych (angiogenezę). Główną ich rolą jest trawienie komponentów macierzy pozakomórkowej, np. lamininy, kolagenu czy fibronektyny. Ponadto, degradują liczne receptory na powierzchni komórek oraz cząsteczki uwalniane z błony komórkowej, przez co mogą aktywować i inaktywować wiele czynników wzrostu, cytokin i chemokin. Odpowiedzialne są za rozwój choroby nowotworowej, poprzez umożliwienie migracji komórek nowotworowych do innych tkanek, dzięki zdolności degradacji tkanki łącznej występującej, np. w zewnętrznej warstwie naczyń krwionośnych. W stanach patologicznych metaloproteinazy te biorą również udział w chorobach sercowo-naczyniowych, w chorobie Alzheimera oraz w chorobach autoimmunologicznych [38].

BIAŁKOWE INHIBITORY PROTEAZ

Ze względu na fakt, że działanie proteaz jest nieodwracalne, organizmy musiały wykształcić złożony system regulacji aktywności tych enzymów, polegający między innymi, na syntezie białkowych inhibitorów proteaz. Podobnie jak opisane powyżej enzymy proteolityczne, ich inhibitory są także niezwykle istotnym elementem oddziaływań pasożyt-gospodarz: inhibitory wykorzystywane są zarówno przez pasożyty, na przykład owady krwiopijne, w celu hamowania krzepnięcia krwi, jak i przez gospodarzy do obrony przed proteazami pasożytów czy patogenów, niszczącymi tkanki zainfekowanego organizmu. Inhibitory proteaz znajdują zastosowanie, np. w badaniach laboratoryjnych oraz w medycynie do leczenia szeregu chorób związanych z dysfunkcją endoproteaz oraz leczenia zakażeń bakteryjnych i wirusowych, w tym HIV [39-41], w rolnictwie jako środek ochrony roślin przeciwko pasożytom [42].

KLASYFIKACJA INHIBITORÓW PROTEAZ

W chwili obecnej do klasyfikacji inhibitorów proteaz stosuje się system zaproponowany w 2004 roku [43]. Polega on na podziale inhibitorów na rodziny, biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji reszt aminokwasowych w domenach inhibitorowych oraz na tzw. klany na podstawie ich struktur trójwymiarowych. Obecnie rozróżnia się 99 rodzin oraz 39 klanów. Nazwa rodziny składa się z litery „I” oraz numeru (zaczynając od jedynki); nazwa klanu z litery „I” oraz drugiej litery, przyswajanej w kolejności alfabetycznej. Kiedy został opisany klan IZ, litera „I” była zamieniona na „J” i następne klany otrzymywały nazwy JA, JB i tak dalej. Na przykład, ludzka $\alpha 2$ -makroglobulina (inhibitor zdolny do hamowania aktywności różnorodnych proteaz, w tym metaloproteaz [44]) jest inhibitorem z rodziny I39, klanu IL; jej identyfikator to I39.001, gdzie pierwsze trzy znaki to symbol rodziny (z dodatkiem zero w razie potrzeby, to znaczy członek rodziny II będzie oznakowany jako I01.xxx), ostatnie trzy znaki to numer seryjny. Dane o inhibitorach dostępne są w bazie danych peptydaz MEROPS: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>. Oprócz tego nadal używane są nazwy rodzin utworzone od nazwy proteazy docelowej (na przykład, serpiny, ang. *serine protease inhibitors*) [45] lub nazwiska badacza, który po raz pierwszy opisał dany inhibitor (na przykład, rodzina Bowman-Birk [46]).

MECHANIZM DZIAŁANIA INHIBITORÓW PROTEAZ

Większość inhibitorów proteaz to inhibitory konkurencyjne, to znaczy wiążą się one do miejsca aktywnego enzymu zamiast substratu docelowego (hamowanie kompetycyjne). Ponieważ miejsca aktywne różnych proteaz często wykazują wysoką homologię, inhibitory kompetycyjne z reguły są mało specyficzne. Potwierdza to fakt, że średnio na jeden znany ludzki inhibitor przypada pięć znanych ludzkich proteaz [47]. Według tzw. modelu standardowego, inhibitor wiąże się do centrum aktywnego enzymu tak jak substrat (model klucza i zamka). Następnie ulega on hydrolizie, ale jest to proces na tyle wolny, że substrat nie jest uwalniany i wiązanie peptydowe tworzy się ponownie. Powyższy mechanizm inhibicji wykorzystywany jest przez inhibitory z rodziny Kazal, Kunitz i Bowman-Birk [48]. Inne

inhibitory kompetycyjne wiążą się do centrum aktywnego lub też innego, w sposób niekatalityczny. Interakcja inhibitora z centrum aktywnym uniemożliwia przyłączenie substratów i katalizę. Mechanizm ten jest także niskospecyficzny. Przykładami inhibitorów o takim mechanizmie działania są cystatyny, które hamują aktywność papaino-podobnych proteaz cysteinowych oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMPs) [49,50]. Warto również wspomnieć, że niektóre inhibitory kompetycyjne, poza centrum katalitycznym, wiążą się także dodatkowo do innych miejsc enzymu (tzw. *exosite*). Takie wiązanie inhibitorów do wtórnych miejsc jest rozpowszechnione i służy zwiększaniu powierzchni interakcji między białkami, a tym samym zwiększania specyficzności inhibitora [47,49]. Oprócz inhibitorów, których mechanizm oparty jest na inhibicji kompetycyjnej, istnieją nieliczne inhibitory znane jako tzw. substraty samobójcze. Do pełnienia swojej funkcji muszą one ulegać aktywacji poprzez proteolizę z udziałem enzymu docelowego, po czym wiązane są kowalencyjnie do enzymu. Taki mechanizm inhibicji, w odróżnieniu od wcześniej wspomnianych, jest nieodwracalny. Przykładem takich inhibitorów są serpiny – inhibitory proteaz serynowych [45]. Więcej szczegółowych informacji dotyczących mechanizmu działania inhibitorów proteaz znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej [47].

TKANKOWE INHIBITORY METALOPROTEINAZ

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) regulują aktywność metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej oraz metaloproteinaz zawierających domenę dezintegryny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*) oraz ADAMTS (ang. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) [51]. Rodzina TIMP ewolucyjnie powstała bardzo wcześnie i opisana jest nie tylko u ssaków, lecz również u ptaków, ryb, owadów, nicieni, mięczaków i innych organizmów. U człowieka znane są cztery homologi TIMP, oznaczone jako TIMP1, TIMP2, TIMP3 oraz TIMP4. Są to cząsteczki o masie 21-28 kDa, stabilizowane sześcioma wiązaniami disiarczkowymi. Część N-końcowa jest domeną inhibitorową, która wiąże się z aktywnym miejscem MMPs, przy czym utworzony kompleks nie zawiera wiązań kowalencyjnych. Wszystkie cztery TIMP są podobne pod względem struktury, ale różnią się stopniem powinowactwa oraz profilem ekspresji, która jest tkankowo specyficzna; konstytutywna lub indukowana. Ich aktywność jest regulowana cytokinami i czynnikami wzrostu. TIMP 2-4 hamują wszystkie znane ludzkie proteazy macierzy zewnątrzkomórkowej, w przeciwieństwie do TIMP1 nieaktywnego w stosunku do czterech z nich. TIMP3 dodatkowo hamuje aktywność szeregu enzymów z rodzin ADAM i ADAMTS, podczas gdy pozostałe (TIMPs 2-4), po jednym przedstawicielu rodziny ADAM. Jak wcześniej wspomniano, TIMP regulują aktywność metaloproteinaz tkankowych i macierzy pozakomórkowej [29,51-53].

Uważa się, że cztery homologi TIMP ssaków, wykazujące 40% idencyjność, to wynik duplikacji jednego genu. U owadów znany jest jeden gen *timp*: po raz pierwszy zidentyfikowany w 1999 roku u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [54]. TIMP *D. melanogaster* wykazuje aktywność przeciwko testowanym ludzkim MMPs i ma wysoką

homologię do TIMP3. Z tego względu uważa się, że TIMP3 człowieka jest najbardziej zbliżony do pradawnego białka.

OWADZI INHIBITOR METALOPROTEINAZ

Szczególną rolę w oddziaływaniu gospodarz-patogen odgrywa owadzi inhibitor metaloproteinaz IMPI (ang. *insect metalloproteinase inhibitor*). Został on wyizolowany z larw barciaka większego *G. mellonella* w 1998 roku [55]. Jest to nie tylko pierwszy, ale do dnia dzisiejszego jedyny znany specyficzny inhibitor metaloproteinaz drobnoustrojów, znany u zwierząt. IMPI nie wykazuje homologii z żadną ze znanych protein, również z TIMP, wykazuje on jedynie homologię z domeną TIL (ang. *trypsin inhibitor-like cysteine-rich domain*). Owadzi inhibitor metaloproteinaz jest cząsteczką o masie 8,3 kDa (znacznie mniejszej niż masa TIMP) odporną na działanie wysokiej temperatury oraz kwasów, dzięki pięciu wiązaniom disiarczkowym. IMPI został zaliczony do rodziny I8 (ang. *cysteine-rich trypsin inhibitor-like family*) klanu IA. Wykazano, że gen *impi* koduje dwa polipeptydy, których rekombinowane formy oczyszczono i nazwano rIMPI-1 oraz rIMPI-2 [55]. Pierwsze białko rIMPI-1 odpowiada natywnemu IMPI izolowanemu z hemolimfy owada. Jest on aktywny specyficznie przeciwko metaloproteinazom zawierającym cynk, podobnym do termolizyny (rodzina M4), takim jak aureolizyna, pseudolizyna oraz bacillolizyna. Testy z różnymi metaloproteinazami macierzy człowieka wykazały, że rIMPI-1 jest aktywny przeciwko MMP1 i MMP3, jednak w stężeniu ponad stukrotnie wyższym niż stężenie TIMP2 potrzebne do inhibicji danych metaloproteinaz. Z kolei rIMPI-2 nie hamuje aktywności bakteryjnych metaloproteinaz, jednak jest aktywny przeciwko niektórym ludzkim metaloproteinazom macierzy, przy czym nie wykazuje on homologii z TIMP [55]. Pierwotny produkt białkowy genu *impi* ulega rozcięciu furyną i tworzy dwa produkty końcowe: produkt N-końcowy – IMPI uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej, zaś rIMPI-2 jest prawdopodobnie zaangażowany w regulację endogennych MMPs podczas metamorfozy. Substraty rIMPI-2 jednak wciąż nie są poznane [55-57].

Na szczególną uwagę zasługuje regulacja ekspresji genu *impi*. Otóż wykazano, że metaloproteinazy bakteryjne, wydzielane podczas infekcji w ciele owadów, powodują degradację polipeptydów gospodarza, w tym białek o znaczeniu immunologicznym, co jest częścią ich mechanizmu wirulencji. Niskocząsteczkowe produkty takiej degradacji o masie poniżej 3 kDa, tzw. protfrags, stymulują ekspresję genów kodujących peptydy odpornościowe, ale także genu *impi*. Tym samym, stymulowane zakażeniem pojawienie się inhibitora metaloproteinaz ma miejsce równoległe z pojawieniem się peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz zwiększeniem poziomu lizozymu, chroniąc cząsteczki odpornościowe zainfekowanego gospodarza przed metaloproteinazami bakteryjnymi, wydzielanymi jako czynniki wirulencji [56,58].

ZASTOSOWANIE INHIBITORÓW PROTEAZ

Inhibitory proteaz, zarówno chemiczne, jak i pochodzenia biologicznego wykorzystywane są m. in. w badaniach laboratoryjnych oraz jako środki terapeutyczne w medycynie.

Można je wykorzystywać do badania funkcji proteaz w przebiegu wybranych chorób. Ich zastosowanie w badaniach laboratoryjnych może być uzupełnieniem badań wykorzystujących np. zmutowane organizmy (zarówno gospodarza, jak i patogenu), to jest takie, którym usunięto geny kodujące wybrane proteazy (tzw. *knockout*) [29]. Znaczącą rolę proteaz w przebiegu chorób infekcyjnych człowieka oraz mechanizmy wirulencji patogennych mikroorganizmów, warto zastanowić się nad zastosowaniem inhibitorów proteaz w celach terapeutycznych.

Należy podkreślić, że niektóre inhibitory znalazły zastosowanie w leczeniu różnorodnych chorób [39,40]. Wielkim sukcesem okazało się przekształcenie zakażenia HIV w długotrwałą chroniczną chorobę [41]. Z innej strony, pomimo ciągle rosnących danych o roli MMPs w stanach zapalnych, w przebiegu sepsy oraz zakażeniach wirusowych [29,50], prototypy leków na podstawie inhibitorów endometaloproteaz jak do tej pory nie spełniają kryteriów testów klinicznych [50,59]. Wynika to z wielofunkcyjności TIMPs, czego skutkiem jest wiele efektów ubocznych po ich zastosowaniu w celach terapeutycznych. Jedyny lek działający jako inhibitor MMPs dopuszczony na rynek to Periostat, czyli doksycyklina (chemicznie zmodyfikowana tetracyklina, a więc inhibitor niebiałkowy). Substancja ta, stosowana jako antybiotyk, w niskiej dawce działa hamująco na MMPs w sposób niezależny od jej właściwości przeciwbakteryjnych. Lek ten stosowany jest do leczenia chronicznych stanów zapalnych przyzębia [59,60]. Inhibitory proteaz mogą być wykorzystane do hamowania działania pasożytniczych proteaz, do ochrony opsonin i receptorów przed degradacją proteolityczną, do kontroli przekształcenia prekursorów peptydów odpornościowych w aktywne peptydy albo bezpośrednio do niszczenia mikroorganizmów [40].

PODSUMOWANIE

Zewnątrzkomórkowe metaloproteinazy są bardzo skutecznymi czynnikami wirulencji mikroorganizmów patogennych, o czym pisano w pierwszej części niniejszego artykułu. Niszczą one tkanki zainfekowanego organizmu, degradują polipeptydy o charakterze odpornościowym, „wytrącając” gospodarzowi broń jaką jest skuteczna aktywacja mechanizmów obronnych. Niewiele jest informacji dotyczących innych niż TIMP białkowych inhibitorów metaloproteinaz. Odkrycie owadziego inhibitora metaloproteinaz (IMPI) otwiera nowe możliwości w walce z czynnikami wirulencji ludzkich patogenów jakimi są wydzielane na zewnątrz metaloproteinazy. Być może w przyszłości owadzi IMPI stosowany będzie obok antybiotyków lub nawet zamiast nich, jako lek zwalczający zakażenia wewnątrzszpitalne, spowodowane m.in. przez pałeczkę ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa*.

PIŚMIENNICTWO

1. Travis J, Potempa J, Maeda H (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? Trends Microbiol 3: 405-407
2. Potempa J, Travis J (2000) Proteinases as virulence factors in bacterial diseases and as potential targets for therapeutic interventions with proteinase inhibitors. W: van der Helm K, Korant BD, Cheronis JC (red) Handbook of experimental pharmacology, Berlin, Springer Verlag, str. 159-188

3. Travis J, Potempa J (2000) Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1477: 35-50
4. Kawalec M, Jakubczak A (2006) Proteinases of *Enterococcus faecalis* and their role in pathogenicity. *Advan Clin Exp Med* 15: 857-869
5. <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>
6. <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?id=M23.002>
7. Miyoshi S-I, Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microb Infect* 2: 91-98
8. Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, O'Callaghan RJ (2001) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal Biochem* 290: 330-337
9. Andrejko M (2016) Modulacja humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic *Galleria mellonella* przez enzymy proteolityczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. *Post Microbiol* 55: 255-267
10. <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/24/26.html>
11. Thayer MM, Flaherty KM, Mc Kay DB (1991) Tree-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* AT 1.5-A resolution. *J Biol Chem* 266: 2864-2871
12. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36: 78-91
13. Williams P, Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12: 182-191
14. Heck L, Morihara K, McRae WB, Miller EJ (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 51: 115-118
15. Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE (1998) Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J Biol Chem* 273: 30225-30231
16. Matsumoto K, Shams NB, Hanninen LA, Kenyon KR (1993) Cleavage and activation of corneal matrix metalloproteases by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1945-1953
17. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L (2003) Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblast, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog* 34: 47-55
18. Schultz DR, Miller KD (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun* 10: 128-135
19. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 46:157-168
20. Cytryńska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T (2007) Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 28: 533-546
21. Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D'Alayer J, Hansen KK, Bunnett NW, Hollenberg MD, Pidard D, Chignard M (2005) *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Mol Biol* 32: 411-419
22. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR (2003) *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 528-537
23. Gach M, Duda K (2002) Rola białek czynnika powierzchniowego w patogenezie zespołu ostrej niewydolności oddechowej *Anest Intens Ter* 4: 281-284
24. Hazlett LD (2004) Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Prog Retin Eye Res* 23: 1-30
25. Kessler E, Spierer A (1984) Inhibition by phosphoramidon of *Pseudomonas aeruginosa* elastase injected intracorneally in rabbit eyes. *Curr Eye Res* 3: 1075-1078
26. Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, Wilhelm S (2010) Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, W: Méndez-Vilas A (red) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Bada-joz: Formatex Research Center, str. 383-395
27. Okuda K, Morihara K, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, Kawasaki H, Suzuki K, Fukushima J (1990) Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3455. *Infect Immun* 58: 4083-4088
28. Miyatake H, Hata Y, Fujii T, Hamada K, Morihara K, Katsube Y (1995) Crystal structure of the unliganded alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 and its conformational changes on ligand binding. *J Biochem* 118: 474-479
29. Vandenbroucke R, Libert C (2014) Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* 13: 904-927
30. Zhang L, Conway JF, Thibodeau PH (2012) Calcium-induced folding and stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *J Biol Chem* 287: 4311-22
31. Laarman A, Bardool B, Ruyken M, Fernie J, Milder F, Strijp J, Rooijackers S. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol* 188: 386-393
32. Bardool B, Ent S, Pel M, Tommassen J, Pieterse C, Kessel K, Strijp J (2012) *Pseudomonas evades* immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog* 7: 1-11
33. Kavanagh K, Reeves EP (2004) Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28:101-112
34. Wojda I (2016) Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci* 24: 327-357
35. Andrejko M, Mizerska-Dudka M, Jakubowicz T (2008) Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Folia Microbiol* 53: 147-151
36. Andrejko M., Mizerska-Dudka M. (2011) Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 107: 16-26
37. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M (2014) Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Invertebr Pathol* 115: 14-25
38. Lipka D, Boratynski J (2008) Metaloproteinazy MMP. *Struktura i funkcja Postepy Hig Med Dosw* 62: 328-336
39. Shamsi TN, Parveen R, Fatima S (2016) Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int J Biol Macromol* 91: 1120-1133
40. Haq SK, Rabbani G, Ahmad E, Atif SM, Khan RH (2010) Protease Inhibitors: A Panacea? *J Biochem Mol Toxicol* 24: 270-277
41. Lv Z, Chu Y, Wang Y (2015) HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl)* 7: 95-104
42. Habib H, Fazili KM (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2: 068-085
43. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett A (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378: 705-716
44. Cuellar JM, Cuellar VG, Scuderi GJ (2016) α 2-Macroglobulin: Autologous Protease Inhibition Technology. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 27: 909-918
45. Law RHP, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC (2006) An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 7: 216
46. Frattali V (1969) Soybean Inhibitors. III. Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 244: 274-280
47. Farady CJ, Craik CS (2010) Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *ChemBiochem* 11: 2341-2346
48. Laskowski M, Kato I (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49: 593-626
49. Bode W, Huber R (2000) Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* 1477: 241-252
50. Levin M, Udi Y, Solomonov I, Sagi I (2017) Next generation matrix metalloproteinase inhibitors - Novel strategies bring new prospects. *Biochim Biophys Acta* 1864: 1927-1939

51. Brew K, Nagase H (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 1803: 55-71
52. Murphy G (2011) Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 12: 1-7
53. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010) Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 20: 161-168
54. Pohar N, Godenschwege TA, Buchner E (1999) Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* 57: 293-296
55. Wedde M, Weise C, Nuck R, Altincicek B, Vilcinskas A (2007) The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biol Chem* 388: 119-127
56. Vilcinskas A, Wedde M (2002) Insect Inhibitors of Metalloproteinases. *Life* 54: 339-343
57. Clermont A, Wedde M, Seitz V, Podsiadloski L, Lenze D, Hummel M, Vilcinskas A (2004) Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *Biochem J* 382: 315-322
58. Griesch J, Wedde M, Vilcinskas A (2000) Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Bioch Mol Biol* 30: 461-472
59. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J (2015) Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis* 2: 26-34
60. Dufour A, Overall CM (2013) Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 34: 233-242

Metalloproteases and their inhibitors: role in pathogenesis of selected examples

Anna Siemińska-Kuczer✉, Lidiia Vertyporokh, Mariola Andrejko, Iwona Wojda, Sylwia Stączek, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Katarzyna Grygorczuk, Małgorzata Cytryńska

Department of Immunology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, UMCS, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

✉ e-mail: asieminska.bio@gmail.com

Key words: metalloproteases, metalloprotease inhibitor, *Pseudomonas aeruginosa*, insect metalloproteinase inhibitor

ABSTRACT

Proteolytic enzymes and their inhibitors are crucial in host-pathogen interaction. Metalloproteases secreted by pathogenic microbes play an important role in destroying not only host tissues but also their immune proteins. Metalloproteinase inhibitors, in contrast, may serve as effective therapeutic agents, which is especially important because of the increasing number of microorganisms resistant to known antibiotics. The role of metalloproteases produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in the colonization of the host organism is described. Attention has also been paid to the role of inhibitors of these enzymes in defense responses and underlined their potential role in inhibiting the development of infection.