

Ekstraselüler Mikrobiyal Enzimlerin İmmünomodülatör Etkileri

IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF EXTRACELLULAR MICROBIAL ENZYMES

Dolunay GÜLMEZ*

* Arş.Gör.Dr., Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, ANKARA

Özet

İmmün sistem karmaşık ve çok bileşenli bir sistemdir. Tüm bileşenlerin birbiriyle etkileşim halinde olmasının yanısıra dışarıdan gelen uyarılara da açıktır. Bu uyarılardan biri de ekstraselüler mikrobiyal enzimlerdir. Mikroorganizmalar konağın savunma mekanizmalarını düzenleyerek immün yanıtı kendi yararlarına değiştirmeye çalışmaktadırlar. Proteazlar, glikan hidrolazlar, NAD glikohidrolazlar, fosfolipazlar, süperoksit dismutazlar, katalazlar gibi mikrobiyal enzimlerin immün sistemi etkileyebildikleri bilinmektedir. Bu derlemede, ekstraselüler mikrobiyal enzimlerin immün sistemi etkileme mekanizmaları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal enzimler, İmmün sistem

T Klin Mikrobiyoloji-Enfeksiyon 2004, 3:39-46

Summary

Immune system is a complicated system with many components. All components interact with each other. The stimuli from the outside environment also have effects on the immune system. Extracellular microbial enzymes are one of these stimuli. Microorganisms try to benefit from the immune response via modification of the host protection mechanisms. Microbial enzymes like proteases, glycan hydrolases, NAD glycohydrolases, phospholipases, superoxide dismutases and catalases are able to effect the immune response. In this article, effects of extracellular microbial enzymes on the immune system are reviewed.

Key Words: Microbial enzymes, Immune system

T Klin J Microbiol-Infec 2004, 3:39-46

İmmün sistem oldukça karmaşık, çok bileşenli bir sistemdir. İşleyişini daha iyi kavrayabilmek için doğal ve kazanılmış immünite, humoral ve hücreli immünite gibi bölümlere ayrılmaktadır. Aslında, tüm bileşenleri birbiriyle etkileşim içindedir. Ayrıca işlev gereği yabancı moleküllere tepki vermek üzere evrimleşmiş olduğundan, mikrobiyal uyarılara da açıktır (1). Bu uyarılardan biri de hücre dışı mikrobiyal enzimlerdir.

Mikroorganizmalar, hücre dışına çeşitli enzimler salgılamaktadırlar. Yabancı moleküller olan bu enzimlerin konak savunma sistemiyle karşı karşıya gelmeleri kaçınılmazdır. Bu enzimlerin bir kısmı immün sisteme müdahale ederek, savunma aktivitelerini mikroorganizmanın lehine çevirmeye çalışmaktadırlar. Burada immün sisteme etkileri gösterilmiş ekstraselüler mikrobiyal enzimlerden söz edilecektir. Üzerinde en çok çalışılmış enzim grubu proteinazlardır. Glikan hidrolazlar, NAD gliko-

hidrolazlar, fosfolipazlar, süperoksit dismutazlar, katalazlar gibi pek çok enzim de immün sistemi etkileyebilmektedir. Etki, immünoglobülinler (Ig), kompleman sistem, immün sistem hücreleri ya da sitokinler gibi immün sistemin herhangi bir bileşeni üzerinden olabilmektedir (2).

Proteinazlar

Mikroorganizmalar birden fazla sayıda ve işlevde proteinazlar sentezleyebilmektedirler. Bunlar, makromolekülleri parçalayarak besinden fakir ortamlarda mikroorganizmaya avantaj sağlamaktadırlar. Patojen mikroorganizmalarda, proteinazların patogenezdaki rolleri daha ön plana çıkmaktadır. Proteinazların etkileri aşağıdaki şekilde gruplanabilir (2):

1. Doğrudan doku hasarı, proteinazların konağa ait hücreli ve hücreler arası matriks proteinlerini parçalaması sonucu oluşmaktadır. Doku hasarı invazyonu kolaylaştırmaktadır.

2. Dolaylı yoldan doku hasarı iki şekilde gelişebilmektedir. Bunlardan ilki, mikrobiyal proteinazın konağın proenzim olarak salgıladığı enzimleri aktif formuna çevirerek doku hasarını başlatmasıdır. Örneğin fibroblastlardan salgılanan prokollagenazın aktive edilmesi bağ doku yıkımına neden olabilmektedir. İkinci yol da inflamasyonun tetiklenmesidir. Bilinen tüm bakteriyel proteinazlar bradikinin kaskadını uyararak proinflamatuvar etki göstermektedirler. Bu etki bakteriyel proteinazlarla sınırlı değildir.

3. Bakteriyel toksinleri aktive edebilmektedirler. Difteri, şarbon gibi bakteriyel toksinlerin çoğu proteinazlarca aktif forma dönüştürülmektedirler.

4. Bazı bakteriyel toksinler doğrudan sitotoksik etki gösterebilmektedirler. Proteinaz, alfa-makroglobülin gibi bir proteinaz inhibitörü ile birleşmektedir. Oluşan enzim/inhibitör kompleksi makrofajlar, fibroblastlar ve bazı tümör hücrelerinin yüzeylerindeki alfa-makroglobülin reseptörlerine tutunarak hücre içine alınmaktadır. Bazı proteazlar, inhibitör aktiviteyi engelleyip fagozomdan kaçabilmektedirler. Hücre içinde serbest kalan proteinazın etkisi hücrenin lizisine kadar ilerleyebilmektedir.

5. Bazı proteazlar koagülasyon sistemini aktive edebilmektedirler. Bu enzimler, protrombini trombine dönüştürerek fibrinojeni fibrine çevirmektedirler. Bu durum, yaygın damar içi pıhtılaşmaya (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) yol açabilmektedir.

6. Bazı enzimler fibrinolizisi başlatabilmektedir. Etki, kallikrein üzerinden plazminojenin plazmine dönüşümünü sağlayarak fibrinolizise neden olmaktadır. Fibrinolizis bakterinin yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

7. İmmün sistem komponentlerini doğrudan hedef alan proteinazlar da bulunmaktadır. Yukarıda sözü edilen tüm mekanizmaların bir şekilde immün sistemi etkilediği söylenebilir. Ancak immünoglobülinler, kompleman sistem üyeleri, defensinler gibi immün sisteme özgü bazı moleküllere doğrudan etkisi olan enzimler de bulunmaktadır. Bu gruptan daha ayrıntılı olarak söz edilecektir.

Ig proteazlar: İmmünoglobülinler, yabancı (non-self) olarak tanımlanan bir antijenin sunulması sonucu B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşerek salgıladıkları, antijen ile özgül olarak birleşebilen glikoprotein yapıda moleküllerdir. Antijen ile birleşerek kompleks oluşturmaktadırlar. Bu kompleks, fagositer hücre yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanarak fagositozu indükleyebilmekte ya da kompleman sistemi aktive ederek mikrobiyal hücrenin lizise gitmesini sağlayabilmektedir. İmmünoglobülinler ayrıca toksinleri nötralize edebilmekte, zararlı maddelerin gastrointestinal sistemden emilimini engelleyebilmekte ve antikora bağımlı hücrel immüniteyi tetikleyebilmektedirler. Salgısal IgA adherens ve kolonizasyonun önlenmesinde rol oynamaktadır (3).

Ig yapısı iki ağır ve iki hafif zincirden oluşmaktadır. İki zincirin de antijene bağlanan değişken ve reseptörlere bağlanabilen sabit kısımları bulunmaktadır. Zincirler birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlıdır. Ig molekülünün antijen bağlarken açılıp kapandığı esnek kısım menteşe bölgesi olarak isimlendirilmektedir. Ig molekülü papainle muamele edildiğinde menteşe bölgesinden kesilerek 2 Fab, bir Fc parçasına ayrılmaktadır. Fab antijene bağlanabilen parçadır. Fc parçası ise fagositer hücre yüzeylerindeki Fc reseptörüne bağlanmaktadır (3).

Pek çok proteaz Ig'leri parçalayarak işlevini engelleyebilmektedir. Burada özgül olarak Ig'leri hedef alan mikrobiyal enzimlere örnekler verilecektir.

IgA proteazlar: IgA salgısal olarak biyolojik bariyerlerde bulunabilmektedir. Mukozal kolonizasyon ve invazyona karşı savunmada ön plana çıkmaktadır. Üst solunum yoluna salgılanan IgA'nın %90'ı IgA1 alttipidir. Bakteriyel polisakaritler de daha çok IgA1 yapımını uyarmaktadırlar (4). Mukozalarda kolonizasyon sonrası invaze olarak hastalığa neden olan patojenlerin bu savunmayı aşmaları gerekmektedir.

Streptococcus pneumoniae: Tipe özgül IgA ve IgG'nin pnömokokların fagositer hücreler ve kompleman sistem tarafından öldürülmesini kolaylaştırdığı, ve sIgA'nın adherens ve kolonizasyonu

engellediği bilinmektedir. Ancak bazı durumlarda baskın pnömokok yüzeyel antijeni olan kapsüller polisakkaritlere karşı gelişen antikörlerin nazofaringeal kolonizasyonu önleyemediği gözlenmiştir.

Bazı *S. pneumoniae* suşları IgA1'i özgül olarak menteşe bölgesindeki prolin-threonil ya da prolin-seril bağlarından kesen bir IgA1 proteaz salgılamaktadırlar. Bu hassas bölge, IgA2'de, diğer insan Ig'lerinde ve yüksek primatlar dışındaki türlerin IgA'larında bulunmamaktadır. Enzim, IgA1 molekülünü papaine benzer şekilde keserek işlevsel Fab ve Fc parçaları oluşturmaktadır. Oluşan Fab, bakteri yüzeyindeki antijenlere bağlanarak onları maskeleymektedir. Ek olarak, pozitif yüklü Fab parçasının yüzeyine bağlanması bakterinin negatif yüklü epitel yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırarak adherense katkıda bulunmaktadır. Böylece bakteri konağın savunma mekanizmasını kendi lehine çevirmektedir. IgA1 proteaz sentezleyemeyen mutantlarda IgA1'in adherens önleyici etkisinin gösterilmesi ve pnömokokların papainle elde edilen Fab parçalarıyla inkübasyonunun adherensi artırdığı da gözlenmesi proteazın virülansa etkisini desteklemektedir (5).

Neisseria: *Neisseria* türlerinde de *S. pneumoniae*'ninkine benzer bir IgA1 proteaz saptanmıştır.

N. meningitidis'te yapılan bir çalışmada invaziv enfeksiyon yapan suşların %98'inde ve kolonizasyon yapmış suşların ise %92'sinde IgA1 proteaz geni saptanmıştır. Aynı suşlarda IgA1 proteaz aktivitesine bakıldığında ise invaziv suşlardaki aktivitenin kolonizasyon yapanlara göre anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür. Gen gösterilemeyen suşlarda da enzim aktivitesinin gösterilmiş olması, primerlerden ya da DNA ekstraksiyonundan kaynaklanan yanlış negatif sonuçlara işaret etmektedir. Büyük olasılıkla proteaz geni tüm suşlarda bulunmakta ama ekspresyonu değişkenlik göstermektedir. Bu da suşun invazyon kapasitesini etkilemektedir (6).

IgA1 proteazın tek hedefi IgA1 değildir. *Neisseria gonorrhoeae*'da yapılan bir çalışma, enzimin h-LAMP-1'i (human lysosomal associated

protein-1) parçaladığını göstermiştir. Bu sayede fagolizozomun koruyucu örtüsüne hasar veren bakteri hücre içinde hayatta kalabilmektedir (7). IgA1'in olası başka hedefleri arasında makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörü, sitokin reseptörü ortak beta zinciri, interlökin -11, interlökin-1 reseptörü ilişkili kinaz sayılabilir (8).

Haemophilus influenzae: Tiplendirilemeyen *H. influenzae* suşlarında IgA1 proteaz aktivitesi incelenmiştir. Hastalık etkeni olan suşlar ile kolonize olan suşlar karşılaştırıldığında hastalık etkeni olanlarda enzim aktivitesi anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Tüm suşların % 97'sinde gen varlığı gösterilebildiğinden farkın genin ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (9).

IgG proteazlar: IgG plazmada en yüksek oranda bulunan Ig tipidir ve daha önce karşılaşılmış antijenlere karşı bağışıklıkta ön plandadır (3). Patojen mikroorganizmaların çoğu IgG'yi parçalayan enzimler salgırlar. Ancak özgül olarak IgG'yi kesen enzimler IgA proteazlara göre daha az çalışılmıştır. Bunlar örnek olarak sık görülen patojenlerden *Streptococcus pyogenes* ve bir helmint olan *Paragonimus westermani* verilecektir.

S. pyogenes: İki ayrı Ig parçalayan proteaz varlığı bilinmektedir:

SpeB: Streptokokkal pirojenik eritrojenik toksin B olarak bilinen bu sistein proteinaz 1940'lardan beri çalışılmaktadır. Birden fazla immünomodülatör etkisi vardır:

1. IgG'nin menteşe bölgesinden kesebilmektedir.
2. IgA, IgM, IgD ve IgE ağır zincirlerinin yıkabilmektedir
3. Bradikinin kaskadını uyarabilmektedir.
4. IL-1'i aktive edebilmektedir.
5. Dekorinden dermatan sülfatın serbestleştirebilmektedir.
6. Antibakteriyel peptid LL-37'yi parçalayabilmektedir.
7. Mast hücrelerinden histamin salınımını uyarabilmektedir (10).

SpeB, proenzim olarak salgılanmaktadır. Otokatalitik aktivite ile ya da diğer proteazların yardımıyla aktif bölgedeki histidin kalıntısını uzaklaştırarak aktif forma dönüşmektedir. Papaininkine benzeyen bir kıvrımı vardır, IgG molekülünü menteşe bölgesinden, papaininkinden farklı olarak glisin-glisin bağından kesmektedir (11). SpeB'nin virülansa etkisi de bilinmektedir. SpeI varlığında IgG'nin opsonizasyon kapasitesi düşmekte ve *S. pyogenes*'in öldürülmesi azalmaktadır. SpeB yapamayan mutantlar fagositoza daha duyarlı ve iç organlara yayılmakta daha başarısız hale gelmekte, özgül antikor içeren kandan çok daha çabuk temizlenmektedirler. Ancak bunun kliniğe yansması net değildir. İnvaziv *S. pyogenes* enfeksiyonlarında SpeB pozitif olduğu halde anti-SpeB titrelerinin düşük olması SpeB'ye karşı güçlü bir immün yanıt olmadığında hastalığın ciddileşme riskinin arttığını düşündürmektedir (12). Ancak toksik şok sendromlu hastalarda SpeB pozitifliği ile hastalığın ciddiyeti arasındaki ters bir ilişki bulunmuştur (13).

IdeS: Bu sistein proteinaz da IgG'yi menteşe bölgesinden SpeB'nin kestiği noktadan kesmektedir. Daha özgüldür, diğer Ig izotiplerini etkilememektedir. Mac-1 benzeri protein olarak da bilinmektedir (10). Mac-1, Fc reseptörüne bağlanabilen bir lökosit integrinidir. IdeS, Mac-1'i taklit ederek opsonofagositozu inhibe edebilmektedir. Sistein proteinaz aktivitesi daha sonra bulunmuş ve IgG'yi kestiği gösterilmiştir (14). Geni pek çok izolatta gösterilmiştir ve hastalarda IdeS'e karşı antikorların bulunması in vivo ekspresyonunun da olduğunu kanıtlamaktadır. Virülansa katkısı vardır. IgG2yi parçalamasının Ig bağımlı fagositozu engellediği bilinmektedir. Ancak proteaz inaktive edildiğinde de nötrofillere bağlanabilmektedir. Eğer inaktivasyon yalnızca proteazın aktif bölgesine ait bir mutasyondan kaynaklanıyorsa fagositoz önleyici etkinin kaybolmadığı da iddia edilmiştir. Bu durumda, IdeS'in immünomodülatör etkisinin yalnızca proteaz aktivitesi ile sınırlı olmadığı söylenebilir (15).

Paragonimus westermani : İnsan vücudunun

parazitlere karşı en etkin savunması eozinofillerdir. Eozinofiller için en etkili uyaran ise özgül IgG ile kaplı bir parazit yüzeyidir. İnvaziv larvaların yaşam döngüsünde yerinin olduğu helmintlerden bazılarında sistein proteaz üretimi olduğu bilinmektedir. Kistten yeni çıkmış *P. westermani* metaserkaryaları insan için enfektif formdur ve salgıladıkları ESP (excretory secretory product) sistein proteazlar içerir. Eozinofiller ESP ile inkübe edildiklerinde, degranülasyonda ve süperoksit üretiminde anlamlı ölçüde düşme saptanmıştır. Bu etki doza bağımlıdır ve ESP'nin önceden ısı ile muamele edilmesiyle önlenmektedir. IgG parçalayan proteaz larvaların göçü sırasında eozinofillerin uyarılmasını ve etkili immün yanıt oluşumunu engelleyerek parazit kalıcı olmasına yardımcı olabilir (16).

Kompleman sistemine ait molekülleri yıkan proteazlar

Kompleman sistemi, parçalanarak birbirini aktive eden bir dizi molekülden oluşmaktadır. Klasik yoldan aktivasyonu antijen-antikor kompleksi ile uyarılıp C1'den C9'a ilerlemektedir. Buradaki antikorun IgG ya da IgM olması gerekmektedir. IgG4, IgA, IgD, IgE komplemanı klasik yoldan aktive edememektedirler. Alternatif yoldan aktivasyon için ise özgül bir immün yanıt oluşumu gerekmemektedir. Gram negatif bakteri duvarı, endotoksinler, zimojenler, bazı zarflı viruslar doğrudan komplemanın alternatif yolunu tetikleyebilmektedir. Bu yol C3'ten C9'a ilerlemektedir. Son zamanlarda üçüncü bir yol olarak lektin yolundan söz edilmektedir. Bu yol aslında klasik yol ile aynıdır ancak mannoz bağlayan lektin ile uyarılmaktadır. Kompleman sisteminin uyarılmasının iki ana sonucu bulunmaktadır. Bunlardan ilki oluşan C3b'nin fagositer hücre yüzeyindeki C3b reseptörlerine bağlanarak fagositozu kolaylaştırmasıdır (opsonizasyon). İkincisi de uyarılan kompleman parçalarının birleşerek MAC (membrane attack complex) oluşturması ve hedef hücreyi lizise götürmesidir. Elbette kompleman sisteminin etkileri bununla sınırlı değildir. Aktive olan komponentler immün sistem hücrelerini ve sitokinleri de

etkilemektedirler (3).

Mikroorganizmalar, doğal konak savunmasının önemli bir bileşeni olan kompleman sistemine karşı da stratejiler geliştirmişlerdir. Kompleman parçalayan enzimler bunlardan biridir.

Streptococci: A grubu streptokokların tümü, B,C ve G grubu streptokoklar hücre duvarına bağlı bir serin endopeptidaz sentezlemektedirler. *S.pyogenes*'te ScpA, *S. agalactiae*'da ScpB olarak isimlendirilen bu enzim duvardan ayrılarak hücre dışında da etkinlik gösterebilir. *S.pyogenes*'te duvardan ayrılmasını SpeB sağlamaktadır. Bu proteaz, streptokoklar arasında %95-98 homoloji göstermektedir. Virülansa da katkısı gözlenmiştir. C5a peptidaz aktivitesi ile C5a'yı parçayarak enfeksiyon bölgesine fagositer hücre göçünü azaltmaktadır. Enfeksiyon bölgesindeki streptokokların temizlenmesini, bakterinin lenf nodundan dalağa transferini geciktirmektedir (10). *S. pyogenes*'te ScpA ile intranazal aşılama yapılması, farede Grup A streptokok kolonizasyonunu önleyebilmektedir (17). ScpA sentezleyemeyen mutantların pnömoni yapma riski de sokak suşuna göre daha düşük bulunmuştur (18). *S. agalactiae*'da bunlara ek bir işlevi daha olabileceğine dair kanıtlar vardır. *S. agalactiae*'nın invazinleri henüz tanımlanmamış olsa da fibronektin, laminin ve sitokeratine bağlanabildikleri bilinmektedir. ScpB fibronektine ve doğrudan epitel hücrelerine bağlanabilmekte ve ScpB'nin inhibisyonu invazyonu inhibe etmektedir. İnvazyonun inhibisyonu ScpB salgılayamayan mutantlarda da görülmektedir (19). Bu çalışma, B grubu streptokoklarda ScpB'nin C5a peptidaz aktivitesinin yanısıra invazin olarak da virülansa katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Porphyromonas gingivalis: Gingipain R ve Gingipain K olarak bilinen sistein proteazlar salgılamaktadır. Bu enzimler C3 ve C5'i parçalayarak aktif C3a benzeri parça ve C5a benzeri parça oluşturmaktadırlar. Bu aktif kompleman bileşenleri, proinflamatuvar etki göstererek fagositozu, nötrofillerden enzim salınımını ve PMNL kemotaksisini artırmaktadır. Oluşan aktif kompleman parçalarının aktivitesi inflamasyon sırasındaki gibi okside bir ortamda

daha da artmaktadır. Burada bakteri immün sistem aktivitesini baskılamak yerine tetiklemektedir. Doku hasarının artması, bakteriyel invazyonu kolaylaştırmaktadır (20).

Entamoeba histolytica: İnvazyonda önemli rolü olan bir sistein proteaz salgılamaktadır. Bu enzim aktivitesi *E. histolytica*'da *Entamoeba dispar*'a göre 10-1000 kat daha fazla bulunmuştur. Sistein proteazın immün sisteme yönelik birden fazla etkisi saptanmıştır. IgA'yı menteşe bölgesinden kesmektedir. Oluşan Fab parçası amip antijenlerini maskeleyerek etkisi yapabilmektedir. IgG ağır zincirini parçalamaktadır. Kompleman sistemi bileşenlerini aktif olabilecekleri şekilde keserek aktif C3b, C3a ve C5a oluşturmaktadır. Aktif C3b, MAC oluşturmaya kadar ilerleyebilmekte, ancak MAC inhibitörü ile çapraz reaksiyon veren bir galaktozla inhibe olan lektin ile durdurulmaktadır. Oluşan aktif C3a ve C5a ise proteaz tarafından parçalanmaktadır. *E. histolytica* kompleman sistemini aktive etse de kendine yönelik etkisini durdurabilmektedir (21).

Defensin aktivitesini etkileyen proteazlar:

Defensinler, evrimsel olarak korunmuş, potent antibakteriyel etkinliğe sahip küçük peptidlerdir. Bu katyonik peptidler, nötrofillerde, biyolojik sınırlardaki epitellerde, hücre dışı sıvılarda bulunmakta ve kalabalık bir mikroorganizma grubuna karşı özgül olmayan konak savunmasının önemli bir bileşenini oluşturmaktadırlar. Çeşitli Gram negatif ve pozitif bakterileri hücre zarına hasar vererek öldürebilmektedirler (22).

Bazı patojenler bu savunmayı aşacak stratejiler geliştirmişlerdir. Bunlardan biri defensinin enzim etkisiyle yıkılmasıdır. *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *S. pyogenes* gibi yaygın patojenler LL-37 adlı antibakteriyel peptidi parçalayabilmektedir (23).

Bazı durumlar ise daha karmaşıktır. *P. aeruginosa*'nın elastaz ve alkalın proteazı, *S. pyogenes*'in sistein proteazı, *E. faecalis*'in jelatinazı gibi bazı enzimler insanda bağ dokunun bir komponenti olan dekorini parçalamaktadırlar. Bunun bir komponenti olan dermatan sülfat açığa

çıkmakta ve alfa-defensine bağlanarak antimikrobiyal etkisini inhibe etmektedir. Ancak, durum bununla sınırlı değildir. Dermatan sülfat, gelişim, koagülasyon, inflamasyon, yara iyileşmesi gibi bazı fizyolojik durumlarda da rol oynamaktadır. Bu koşullarda alfa-defensini inhibe etmeye yetecek miktarlarda dermatan sülfat bağ dokudan serbestleşebilmektedir. İnflamasyon sırasında salınan bazı sitokinler (transforming growth factor beta, platelet derived growth factor BB, epidermal growth factor) dermatan sülfat salınımını ve alfa-defensinle bağlanmasını düzenleyebilmektedir (24).

Çoğu mikroorganizma, farklı işlevlere sahip birden fazla proteinaz sentezlemektedir. *P. aeruginosa*'da alkalın proteaz, elastaz ve proteaz IV'ün patogeneze katkıları gösterilmiştir. Doku hasarında, Ig'nin ve kompleman sistemi moleküllerinin parçalanmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Proteazlar mantar enfeksiyonlarının patogenezinde de önemli bir yere sahiptirler. *Candida albicans*'ın aspartil proteazları adherens ve penetrasyonda rol almaktadırlar. Semptomatik enfeksiyonlardan izole edilen suşlarda, asemptomatik kolonizasyonlardan izole edilenlere göre proteaz aktivitesi daha fazladır (25, 26). *Candida albicans* komplemanı, tükrükteki laktoferrini, lökositlerin hücre içi lizozomal enzimi katepsin D'yi parçalayan proteinazlar salgılamaktadır. Bunlardan **Sap2**'nin mukusu, sIgA'yı, alfa2-makroglobülini parçalayabildiği bilinmektedir (27).

Glikan hidrolazlar

Ig'lerin peptid omurgasını kesen proteazların yanısıra, glikoprotein yapının üzerindeki korunmuş N-bağlı glikanları hidrolize eden enzimler de bulunmaktadır.

S. pyogenes: EndoS, özgül bir IgG glikan hidrolazdır. IgG ağır zincirinin sabit bölgesine yerleşmiş bir glikandaki beta-1,4-di-N-asetil-kitobiozu hidrolize etmektedir. Bu bölge, Ig'in lökosit yüzeyindeki Fc reseptörüne bağlanabilme ve komplemanı aktive edebilme işlevleri için zorunludur. M proteinine karşı oluşmuş özgül antikorlar önceden EndoS ile muamele edildiklerinde bakterisidal etkinliklerinin azaldığı gösterilmiştir

(10).

Ig glikozilasyonunun otoimmünite de rolü bulunmaktadır. Sistemik lupus eritematosus, inflamatuvar barsak hastalıkları, romatoid artrit gibi hastalıklarda Ig glikozilasyonunda anormallikler görülebilmektedir. Romatoid artritte B lenfositlerde galaktozil transferaz aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (28). Bu da anormal Ig glikozilasyonuna yol açmaktadır. Farede kryoglobülinlerle tetiklenen lupus benzeri glomerülofritte IgG glikozilasyon defektlerinin rolü bulunmaktadır (29). Bu durum, IgG'nin EndoS tarafından hidrolizinin poststreptokokkal otoimmün hastalıklarda rolü olup olmadığı hipotezini ortaya atmaktadır. EndoS'nin etkisinin belirlenebilmesi için ileri araştırmalar gerekmektedir.

Nikotinamid adenin dinükleotid glikohidrolaz (NADaz)

Bu enzimin hem NAD hidrolaz hem de adenindinükleotidfosfat (ADP) ribozil transferaz aktivitesi bulunmaktadır. İmmün sisteme birkaç yönden etki edebilmektedir. Birincisi, NAD'i riboz-nikotinamid bağından keserek hücre içi NAD depolarını boşaltmasıdır. NAD, özellikle enerji metabolizmasında hayati bir kofaktördür. Yokluğu, bakterinin karşı karşıya olduğu immün sistem hücrelerini, örneğin lökositleri, öldürebilmektedir. İkinci etki, hidrolizin sonucu olarak ortaya çıkan potent bir vazodilatör bileşik olan nikotinamidden kaynaklanmaktadır. Vazodilatasyon, hipotansiyon, IF- γ ve lipopolisakkaritlerle uyarılmış makrofajlarda nitrikoksit sentetaz inhibisyonu, IF- γ ile uyarılan T hücrelerinde HLA B ve C reseptörlerinin ekspresyonunun azalması, renal işlevlerin inhibisyonu etkilerden bazılarıdır. Üçüncü etki, hidrolizin yan etkilerinden biri olarak bir sekonder mesajcının sentezlenmesidir. Oluşan siklik-ADP hücre içi Ca^{+2} depolarını boşaltmaktadır. Bu durum, hücre hareketini bloke etmekte ve kemotaksis, migrasyon, fagositoz inhibe olmaktadır. Dördüncü etki ADP-ribozil transferaz ile gelişmektedir. Bazı hücrel proteine ADP-riboz eklenmesi işlev kaybına yol açmaktadır. Örneğin, hücre iskeletinin temeli olan aktin, Arg kalıntılarından ADP-ribozillenirse ak-

tivitesini kaybetmekte ve migrasyon, fagositoz, sinyal verme, salgılama, hücre içi taşıma işlevleri engellenmektedir (30,31).

S. pyogenes'te 1980'lerin sonundan itibaren invaziv *S. pyogenes* enfeksiyonlarında artma gözlenmektedir. Bunun nedenlerini araştırmak amacıyla planlanan bir çalışmada, 1976-1988 yılları arasında klinik suşlarda NADaz enzimi ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Gen, tüm suşlarda bulunmaktadır. Bir mutasyon sonucu aşırı eksprese olmaya başlamasının bakteriyeye ek bir virülans faktörü kazandırdığı düşünülmüştür. Bu durumun invazyona ne kadar katkısı olduğu henüz açık değildir (31).

Başka enzimler de immün sistemi etkileyebilmektedirler. Mikroorganizmaları öldürmeye yönelik oksijen radikallerini etkisiz hale getiren süperoksit dismutaz ve katalazın patogeneze katkısı bilinmektedir. *C. albicans*'ta ve *Cryptococcus neoformans*'ta hücre dışı fosfolipaz aktivitesinin virülansla korelasyonu gösterilmiştir (32-34). *C. albicans*'ta diğer *Candida* türlerine göre fosfolipaz aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (35). Ayrıca invazif *C. albicans* suşlarında kolonize olan suşlara göre fosfolipaz aktivitesi daha fazla bulunmuştur (36).

Patojen mikroorganizmalar, yaşamlarını sürdürebilmek için konak savunmasını aşmak zorundadırlar. İmmün sistemin kendilerine yönelik saldırılarını etkisiz hale getirmek için bazı özellikleri evrimsel olarak kazanmışlardır. Hücre dışına salgıladıkları bazı enzimler de bu özelliklerden biridir ve virülansa önemli katkıları vardır. Bu enzimlerin inhibitörlerinin tedavide yeri olabilir. HIV enfeksiyonunun tedavisinde, proteaz inhibitörleri yerlerini şimdiden almıştır. HIV proteaz inhibitörlerinden bazılarının *Candida albicans*'ın epitele tutunmasını inhibe edebileceği bildirilmiştir (37). *Entamoeba histolytica* karaciğer abselerinin araştırıldığı hayvan modelinde, enfeksiyon öncesi amiplerin proteaz inhibitörleri ile inkübasyonunun karaciğer abselerinin oluşumunu azaltabildiği görülmüştür (38). Ancak, mikrobiyal proteaz inhibitörlerinin kullanıma girebilmeleri için daha katedilmesi gereken çok yol bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Parslow TG. The immune response. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. 9th ed. USA. Appleton&Lange, 1997: 4. 63-74.
2. Maeda H, Yamamoto T. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. Biol Chem Hoppe Seyler. 1996; 377(4):217-26.
3. Mims C, Nash A, Stephen J. The immune response to infection. In: Mims' pathogenesis of infectious disease, 5th ed. Cornwall, UK. 2001 : 6. 156-79.
4. Kirkeby L, Rasmussen TT, Reinholdt J, Kilian M. Immunoglobulins in Nasal Secretions of Healthy Humans: Structural Integrity of Secretory Immunoglobulin A1 (IgA1) and Occurrence of Neutralizing Antibodies to IgA1 Proteases of Nasal Bacteria. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(1): 31-39.
5. Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ, Janoff EN. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ;100(7):4215-20.
6. Vitovski S, Read RC, Sayers JR. Invasive isolates of *Neisseria meningitidis* possess enhanced immunoglobulin A1 protease activity compared to colonizing strains. FASEB J. 1999 ;13(2):331-7.
7. Hauck CR, Meyer TF. The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. FEBS Lett. 1997;405(1):86-90.
8. Klausner T, Pohlner J, Meyer TF. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. Bioessays. 1993;15(12):799-805.
9. Vitovski S, Dunkin KT, Howard AJ, Sayers JR. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in carriage and disease: a difference in IgA1 protease activity levels. JAMA. 2002; 287(13):1699-705
10. Collin M, Olsen A. Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun. 2003; 71(6):2983-92.
11. Kagawa TF, Cooney JC, Baker HM, McSweeney S, Liu M, Gubba S, Musser JM, Baker EN. Crystal structure of the zymogen form of the group A *Streptococcus* virulence factor SpeB: an integrin-binding cysteine protease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(5):2235-40.
12. Mascini EM, Jansze M, Schellekens JF, Musser JM, Faber JA, Verhoef-Verhage LA, Schouls L, van Leeuwen WJ, Verhoef J, van Dijk H. Invasive group A streptococcal disease in the Netherlands: evidence for a protective role of anti-exotoxin A antibodies. J Infect Dis. 2000;181(2):631-8.
13. Kansal RG, McGeer A, Low DE, Norrby-Teglund A, Kotb M. Inverse relation between disease severity and expression of the streptococcal cysteine protease, SpeB, among clonal MITI isolates recovered from invasive group A streptococcal infection cases. Infect Immun. 2000; 68(11):6362-9.
14. von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L, Ide S, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique

- specificity for immunoglobulin G. *EMBO J.* 2002; 21(7):1607-15.
15. Lei B, DeLeo FR, Reid SD, Voyich JM, Magoun L, Liu M, Braughton KR, Ricklefs S, Hoe NP, Cole RL, Leong JM, Musser JM. Opsonophagocytosis-inhibiting mac protein of group a streptococcus: identification and characteristics of two genetic complexes. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6880-90.
 16. Shin MH, Kita H, Park HY, Seoh JY. Cysteine protease secreted by *Paragonimus westermani* attenuates effector functions of human eosinophils stimulated with immunoglobulin G. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1599-604.
 17. Ji Y, Carlson B, Kondagunta A, Cleary PP. Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 1997; 65(6):2080-7.
 18. Husmann LK, Yung DL, Hollingshead SK, Scott JR. Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect Immun.* 1997; 65(4):1422-30.14
 19. Cheng Q, Staflien D, Purushothaman SS, Cleary P. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun* 2002; 70(5):2408-13.
 20. Discipio RG, Daffern PJ, Kawahara M, Pike R, Travis J, Hugli TE, Potempa J. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology.* 1996; 87(4):660-7.
 21. Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(2):196-206.
 22. Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(1):23-7.
 23. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol.* 2002; 46(1):157-68.
 24. Schmidtchen A, Frick IM, Bjorck L. Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol.* 2001; 39(3):708-13.
 25. Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292(5-6):405-19.
 26. De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan PA, Cassone A. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun.* 1996; 64(2):466-71.
 27. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(3):400-28.
 28. Keusch J, Lydyard PM, Berger EG, Delves PJ. B lymphocyte galactosyltransferase protein levels in normal individuals and in patients with rheumatoid arthritis. *Glycoconj J.* 1998; 15(11):1093-7.
 29. Mizuochi T, Pastore Y, Shikata K, Kuroki A, Kikuchi S, Fulpius T, Nakata M, Fossati-Jimack L, Reininger L, Matsushita M, Fujita T, Izui S. Role of galactosylation in the renal pathogenicity of murine immunoglobulin G3 monoclonal cryoglobulins. *Blood.* 2001; 97(11):3537-43.
 30. Lin SJ, Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(2):241-6.
 31. Stevens DL, Salmi DB, McIndoo ER, Bryant AE. Molecular epidemiology of nga and NAD glycohydrolase/ADP-ribosyltransferase activity among *Streptococcus pyogenes* causing streptococcal toxic shock syndrome. *J Infect Dis.* 2000; 182(4):1117-28.
 32. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans* kökenlerinde bazı virülans faktörlerinin (Fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderen) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfeksiyon Derg.*, 2001, 15(4):517-25.
 33. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2001; 44(9-10):361-7.
 34. Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(1):71-83.
 35. Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg.*, 1999, 13(4):569-74.
 36. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı ve *Candida* enfeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfeksiyon Derg.*, 2000, 14(3): 405-8.
 37. Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Wurzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5):747-51.
 38. Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Vaca F, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun.* 1999; 67(1):421-2.

Geliş Tarihi: 03.03.2004

Yazışma Adresi: Dolunay GÜLMEZ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
Morfoloji Binası Kat:3 06100
Sıhhiye, ANKARA
dolunay@hacettepe.edu.tr