

Analiza roli proteaz lizosomalnych w programowanej śmierci komórki

Śmierć komórki stanowi fundamentalny proces biologiczny niezbędny do utrzymania homeostazy tkanek, obrony immunologicznej oraz prawidłowego rozwoju organizmu, a jej deregulacja przyczynia się do powstawania nowotworów, przewlekłego stanu zapalnego i zaburzeń neurodegeneracyjnych. Podczas gdy apoptoza jest procesem immunologicznie cichym i przebiega bez lizy komórki, pyroptoza, prozapalna forma śmierci, kończy się pęknięciem błony komórkowej. Jednak proteolityczne punkty kontrolne determinujące te odmienne losy komórkowe nie są w pełni poznane. Wcześniejsze doniesienia sugerowały współdziałanie katepsyn lizosomalnych w aktywacji inflamasomu NLRP3, lecz precyzyjny udział poszczególnych proteaz oraz ich zależność od rodzaju bodźca i kontekstu komórkowego pozostawały nieokreślone. Luki te wynikają głównie z szerokiego stosowania nieselektywnych inhibitorów oraz metod bazujących na pomiarze całkowitej ilości białka, które nie odzwierciedlają faktycznej aktywności enzymatycznej. W celu przewyciężenia tych ograniczeń zastosowano selektywne narzędzia chemiczne (tj. małowzrostkowe sondy aktywności enzymatycznej), umożliwiające określenie funkcjonalnych ról cysteinowych katepsyn w regulowanej śmierci komórki (RCD), ze szczególnym uwzględnieniem ich przecięcia z egzekucją pyroptozy.

Proteolityczna aktywacja gasderminy D (GSDMD) stanowi kluczowy etap prowadzący do pyroptozy, a narastające dowody wskazują, że oprócz kaspazy-1 etap ten może być modulowany również przez inne proteazy cysteinowe. W celu zbadania tych interakcji oraz ustalenia roli badanych enzymów w pyroptozie wykorzystano techniki *in vitro* oparte na proteolizie rekombinowanych białek, immunoblotting, obrazowanie komórek w czasie rzeczywistym oraz cytometrię masową (CyTOF), a także selektywne inhibitory i sondy aktywności (ABPs) generowane z użyciem technologii HyCoSuL; hybrydowa kombinatoryczna biblioteka substratów fluorogenicznych. Do stymulacji pyroptozy zastosowano nigerycynę, jonofor potasowy, aktywujący kanoniczny szlak śmierci, oraz lizosomotropowy dipeptydowy ester leucyna-leucyna-OMe (LLOMe), indukujący permeabilizację błony lizosomalnej (LMP). Zastosowanie małowzrostkowych sond aktywności enzymatycznej dla katepsyn umożliwiło bezpośrednią wizualizację aktywności tych proteaz w żywych komórkach, omijając ograniczenia metod opartych na przeciwciałach, które nie rozróżniają formy nieaktywnej od formy aktywnej. Z kolei cytometria masowa pozwoliła na zastosowanie sond TOF (TOF-probes) oraz panelu przeciwciał dzięki czemu udało się uzyskać wysokorozdzielczy profil zdarzeń proteolitycznych na poziomie pojedynczych komórek.

Uzyskane wyniki wskazują, że proteazy cysteinowe mogą łączyć się ze szlakami śmierci pyroptotycznej; jednak w warunkach fizjologicznych to kanoniczna oś kaspazy-1-GSDMD pozostaje głównym mechanizmem prowadzącym do pęknięcia błony komórkowej. Analizy kinetyczne z zastosowaniem selektywnych inhibitorów wykazały, że katepsyna B jest dominującą proteazą lizosomalną odpowiedzialną za lityczny charakter tej ścieżki, podkreślając jej nadrzędną rolę w śmierci komórki zależnej od lizosomów (LCD). Chociaż katepsyna S oraz inne enzymy z tej rodziny są zdolne do hydrolizy substratów pyroptotycznych *in vitro*, ich udział wydaje się wysoce zależny od warunków i ujawnia się przede wszystkim w

warunkach nasilonego stresu lizosomalnego. Całość obserwacji wspiera model, w którym procesy śmierci komórkowej funkcjonują jako sieć zdarzeń proteolitycznych, a nie jednowymiarowa liniowa kaskada, przy czym proteazy cysteinowe mogą wzmacniać lub modulować efekt końcowy. Katepsyny mogą odgrywać ważną rolę w procesowaniu IL-1 β i IL-18, a w określonych warunkach inicjować alternatywne drogi do śmierci litycznej, gdy mechanizmy zależne od kaspazy-1 są ograniczone. Taka funkcjonalna redundancja najprawdopodobniej stanowi ewolucyjne zabezpieczenie, zapewniające uszkodzonym lub zakażonym komórkom zdolność do litycznego obumarcia i uwolnienia immunostymulujących sygnałów nawet w sytuacji zahamowania kanonicznej pyroptozy.