

„Podatność ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych na działanie proteaz aspartylowych wydzielanych przez patogeniczne drożdżaki z gatunku *Candida albicans*.”

Streszczenie

Candida albicans jest stałym składnikiem naturalnego mikrobiomu zdrowych ludzi, występującym na skórze oraz powierzchniach błon śluzowych przewodów pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego. W pewnych okolicznościach, gdy dochodzi do zakłócenia naturalnego mikrobiomu czy spadku odporności gospodarza, ten zazwyczaj nieszkodliwy drożdżak może przekształcić się w agresywny patogen, powodujący liczne choroby, od stosunkowo łagodnych i częstych infekcji powierzchniowych skóry i paznokci oraz błon śluzowych do ciężkich, układowych kandydoz związanych z zakażeniem niemal wszystkich narządów wewnętrznych i krwi, często prowadzących do zagrożenia życia.

Jednym z głównych czynników wirulencji tych mikroorganizmów, determinującym ich inwazyjność i patogenność, są sekrecjonowane proteazy aspartyłowe (Sap) – rodzina dziesięciu enzymów proteolitycznych charakteryzujących się szerokim zakresem specyficzności substratowej, zmienną zależnością aktywności proteolitycznej od warunków środowiska i zmiennym poziomem produkcji w różnych typach i stadiach infekcji drożdżakowych. Proteazy te, hydrolizując białka i peptydy gospodarza uczestniczą w inwazji jego tkanek, rozprzestrzenianiu infekcji oraz obronie przed jego układem immunologicznym.

Przeciwdrobnoustrojowe peptydy (AMP), będące ewolucyjnie najwcześniejszymi czynnikami wrodzonej odporności, biorą udział w obronie gospodarza przeciw zakażeniom grzybiczym. AMP wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i stanowiące pierwszą linię ochrony przed atakiem mikroorganizmów wykazują ogromną różnorodność pod względem struktury, funkcji i mechanizmów działania, co pomaga im w skutecznym hamowaniu namnażania wirusów, bakterii i grzybów.

Ze względu na to, iż ciągle zwiększająca się liczba szczepów *C. albicans* opornych na powszechnie stosowane leki przeciwgrzybicze stała się poważnym problemem medycznym, istotnym aspektem jest potrzeba odkrywania nowych związków neutralizujących te mikroorganizmy, jak również zgłębianie wiedzy na temat mechanizmów wirulencji, dzięki którym patogeny te dokonują inwazji organizmu gospodarza. Dlatego też celem niniejszej rozprawy była szczegółowa charakterystyka wpływu dziesięciu rekombinowanych Sap, nadprodukowanych przy użyciu systemu ekspresyjnego *Pichia pastoris*, na szereg różnych ludzkich AMP, wybranych na podstawie różnic w strukturze, mechanizmie działania oraz miejscach wytwarzania w organizmie ludzkim.

Przeprowadzone analizy wykazały dużą różnorodność w zdolności degradacji hydrolitycznej sześciu ludzkich peptydów przeciwgrzybowych (przedstawiciele: katalicydyn – LL-37, histatyn – His5, dermicydyn – DCD-1L, α -defensyn – HNP-2 oraz dwóch peptydów NAT26 i HKH20, wycinanych przez proteazy gospodarza z większych białek – wielko- (HK) i drobnocząsteczkowego (LK) kininogenu) przez enzymy proteolityczne *C. albicans*. Kationowy i α -helikalny peptyd LL-37 oraz anionowa DCD-1L ulegały degradacji pod wpływem działania Sap1-4 oraz Sap8-9; z kolei bogatą w reszty histydyny His5 efektywnie hydrolizowały Sap1-4 i Sap7-9. Jedynym peptydem całkowicie odpornym na działanie tych proteaz okazała się bogata w wiązania disiarczkowe α -defensyna – HNP-2. Pierwszy z peptydów wycinanych z obu kininogenów – NAT26, będący fragmentem sekwencji

aminokwasowej domeny 3, ulegał rozpadowi w wyniku działania wszystkich Sap za wyjątkiem Sap10, z kolei drugi peptyd – HKH20, pochodzący z domeny 5 HK, był całkowicie hydrolizowany tylko przez jedną proteazę – Sap9 i w niewielkim stopniu przez Sap1 i Sap3. Badane próbki sprawdzono równocześnie pod względem zachowania aktywności przeciwgrzybowej wobec *C. albicans*. Testy przeżywalności wykazały, iż degradacja AMP zależna od enzymów Sap pozbawia te peptydy ich grzybobójczych właściwości.

Wyniki szczegółowej analizy kinetycznej rozpadu hydrolitycznego wyselekcjonowanych par AMP-Sap pozwoliły stwierdzić, iż najbardziej aktywnymi względem wszystkich AMP są zakotwiczone w błonie komórkowej *C. albicans* Sap9 oraz uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej Sap3 i Sap2, a następnie Sap1, Sap4, Sap8, Sap7, Sap6 i Sap5. Co więcej, porównując szczegółową analizę degradacji z testami przeżywalności *C. albicans* w obecności mieszaniny wygenerowanych peptydów zauważono, iż w przypadku LL-37 oraz His5 w początkowych stadiach hydrolitycznej obróbki powstają peptydy o zbliżonych, a nawet silniejszych właściwościach grzybobójczych. Zidentyfikowane peptydy to wycinany w wyniku działania Sap2-3 oraz Sap8-9 na LL-37 – LL1-25, produkowany w wyniku hydrolizy Sap1 i Sap8 – LL9-37, a także produkt pośredni powstały w wyniku działania Sap1-4 i Sap9 na His5 – His1-17, produkowany przez Sap2-3 oraz Sap9 – His1-13 i powstały w wyniku hydrolizy His5 przez Sap7 – His1-21.

W wyniku analizy hydrolizy badanych AMP przez Sap w zależności od wartości pH (4-7) stwierdzono, iż mimo wyższej aktywności większości proteaz *C. albicans* w warunkach kwaśnych, ich różnorodność i szeroki zakres pH (2-7) optymalny dla aktywności enzymatycznej pozwala Sap na efektywne działanie na docelowe substraty w różnych niszach organizmu gospodarza.

Analiza trawienia kininogenów – HK i LK, dziesięcioma proteazami *C. albicans* pokazała, iż enzymy Sap1-4 i Sap8-9 w dużym stopniu degradują domenę 3, w której znajduje się sekwencja NAT26, w sposób uniemożliwiający powstawanie przeciwgrzybowych peptydów; z kolei Sap2-3 i Sap9 hydrolizują HK w domenę 5, ale tylko w przypadku Sap9 wycinany jest fragment nie posiadający właściwości grzybobójczych.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie wzbogacają wgląd w dynamiczny proces oddziaływań gospodarz-patogen grzybowy w chorobowych stanach organizmu ludzkiego. Zbadanie i wykazanie po raz pierwszy podatności większości głównych klas ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych na hydrolityczne działanie dziesięciu enzymów Sap, które są głównymi czynnikami wirulencji jednego z najczęstszych patogenów grzybiczych u ludzi – *C. albicans*, pokazała, iż enzymy Sap są skutecznym narzędziem drożdżaka zdolnym neutralizować pierwszą linię obrony gospodarza przed infekcją. Charakterystyka mechanizmów patogenezy kandydozy, w tym tych, w które zaangażowane są produkowane przez wirulentne gatunki *Candida* enzymy proteolityczne, może przyczynić się do zrozumienia procesów, mających istotne znaczenie w przebiegu infekcji, a także do rozwoju w dziedzinie farmakologii poprzez zastosowanie badanych w niniejszej pracy peptydów jako profilaktycznych antybiotyków naturalnych.