PRACA DOKTORSKA MGR GRAŻYNY BRAŚ

Charakterystyka działania głównych proteinaz aspartylowych produkowanych przez patogenne drożdżaki *C. albinans* i *C. parapsilosis* na ludzkie kininogeny

STRESZCZENIE

W wyniku alternatywnego składania jednego genu *KNG* powstają dwa rodzaje ludzkich kininogenów: wielkocząsteczkowy (HK) oraz drobnocząsteczkowy (LK). Białka te charakteryzują się wielodomenową budową, której konsekwencją jest uczestnictwo HK i LK w szeregu procesów, zachodzących w organizmie człowieka, odpowiedzialnych za utrzymanie jego biochemicznej homeostazy. Oba kininogeny są inhibitorami proteinaz cysteinowych, cząsteczkami o działaniu antyadhezyjnym, donorami antybakteryjnych peptydów oraz wazoaktywnych i prozapalnych kinin. Ponadto HK uczestniczy w kaskadzie krzepnięcia krwi i jest źródłem dwułańcuchowej aktywnej formy tego białka (HKa).

Kalikreiny ludzkie: osoczowa oraz tkankowa należą do kininogenaz, zdolnych do specyficznej hydrolizy wiązań peptydowych w obrębie domeny 4 kininogenów, której skutkiem jest generacja kinin: bradykininy (BK) lub kalidyny (Lys-BK) – uniwersalnych mediatorów stanu zapalnego, które w wyniku oddziaływania z receptorami kinin typu 2 i 1 (B_2R i B_1R) wywołują główne symptomy reakcji zapalnej, w tym wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz wysięk osocza, sprzyjający rozprzestrzenianiu się patogennych mikroorganizmów w trakcie infekcji. W przypadku HK, zjawisku temu towarzyszy ponadto powstawanie HKa, który dzięki interakcji z receptorem urokinazowego aktywatora plazminogenu również posiada właściwości prozapalne.

Wiele patogennych gatunków bakterii produkuje proteinazy posiadające kininogenazową aktywność. Zachodzącej przy ich udziale hydrolizie kininogenów często towarzyszy produkcja kinin. W odniesieniu do oportunistycznych drożdżaków z rodzaju *Candida*, będących przyczyną coraz częściej diagnozowanych ogólnoustrojowych i wielonarządowych zakażeń grzybiczych, zjawisko to jest stosunkowo słabo poznane.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy była analiza kininogenazowej aktywności głównych sekrecjonowanych proteinaz aspartylowych (SAP) produkowanych przez najpowszechniej występujące patogenne gatunki z rodzaju *Candida*: *C. albicans* oraz *C. parapsilosis*, obejmująca charakterystykę wpływu enzymów grzybiczych na aktywność kininogenów jako inhibitorów proteinaz cysteinowych oraz uwalnianie prozapalnych fragmentów kininogenu: kinin i HKa.

W badaniach wykorzystano izolowane i oczyszczone z hodowli *Candida* enzymy: SAP2, produkowaną przez *C. albicans* oraz SAPP1 i SAPP2, sekrecjonowane przez *C. parapsilosis*. W przypadku każdego z enzymów wykazano zdolność do hydrolizy kininogenów, z wyraźną preferencją trawienia LK. Skutkiem hydrolizy domeny 2 i 3

kininogenów jest utrata zdolności do hamowania proteinaz cysteinowych, wykazana dla jednego z przedstawicieli tej klasy enzymów – papainy.

Proteoliza domeny 4 kininogenów, zachodząca pod wpływem SAP2, skutkuje uwolnieniem słabo jak dotąd poznanej kininy – Met-Lys-BK oraz oddziałującego z B_1R peptydu des-Arg^9-Met-Lys-BK. Met-Lys-BK produkowana jest ponadto przy udziale obu analizowanych proteinaz *C. parapsilosis*, przy czym SAPP2 uczestniczy również w generacji kolejnej pochodnej BK, tj. Leu-Met-Lys-BK. Każdy z badanych enzymów uwalnia ponadto z domeny 4 HK i LK szereg peptydów, które w dalszym ciągu stanowią potencjalne źródło kinin. Podczas gdy produkcja kinin pod wpływem SAP2 zachodzi głównie w środowisku kwaśnym, kininotwórcza aktywność SAPP1 i SAPP2 w pH obojętnym jest tylko dwu- lub trzykrotnie niższa, aniżeli w pH 4-5, optymalnym dla działania tych enzymów.

Kininy produkowane przez SAP2 oraz SAPP1 i SAPP2 zdolne są do oddziaływania z B_2R oraz B_1R. Choć Met-Lys-BK oraz Leu-Met-Lys-BK są słabszymi ligandami dla B_2R, aniżeli kininy produkowane pod wpływem ludzkich kalikrein, des-Arg^9-Met-Lys-BK charakteryzuje się identycznym powinowactwem do B_1R, co najsilniejszy agonista tego receptora: des-Arg^9-Lys-BK.

Met-Lys-BK oraz Leu-Met-Lys-BK stymulują komórki ludzkiego śródbłonka HMEC-1 do produkcji prozapalnych interleukin: IL-1β oraz IL-6. Efekt produkcji prozapalnych cytokin: TNF-α, IL-1β oraz IL-6 wykazano ponadto w wyniku stymulacji promonocytarnych komórek linii U937 przez Met-Lys-BK oraz mieszaninę fragmentów LK generowanych przez SAP2.

Analiza stabilności generowanych przez SAP2, SAPP1 i SAPP2 kinin w osoczu zasugerowała, iż peptydy te są biologicznie równocenne BK, z racji szybkiego przekształcania ich do BK i des-Arg^9-BK.

Zmodyfikowany przez SAP2 HK nie traci zdolności do oddziaływania z prekalikreiną osoczową, co sugeruje odporność lekkiego łańcucha HK na proteolizę. Łańcuch ten zaangażowany jest w niezależny od B_1R i B_2R mechanizm propagacji stanu zapalnego. Uczestnictwo w generacji prozapalnych, innych niż kininy, fragmentów HK potwierdzono, wykazując zdolność stymulacji promonocytarnych komórek U937 do produkcji TNF-α i IL-1β przez produkowane przy udziale SAP2 i SAPP1 fragmenty HK.

Przedstawione wyniki szczegółowo charakteryzują działanie proteinaz: SAP2, SAPP1 i SAPP2 na HK i LK, którego konsekwencjami jest inaktywacja aktywności inhibitorowej kininogenów wobec proteinaz cysteinowych oraz produkcja kinin i HKa. Opisane aktywności proteinaz drożdżowych mogą wnosić istotny wkład w mechanizmy patogenezy infekcji wywoływanych przez *C. albicans* i *C. parapsilosis*.