Streszczenie pracy doktorskiej mgra Mariusza Gogóla

(promotor: dr hab. Maria Rąpała-Kozik)

„Wpływ proteaz aspartylowych drożdżaków *Candida albicans* na potencjał grzybobójczy zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych i generację prozapalnych peptydów - kinin"

Drożdżaki z gatunku *Candida albicans* są naturalnym składnikiem mikroflory około 70% osobników populacji ludzkiej, zdolnym do kolonizacji różnych nisz organizmu. Ich obecność zwykle nie powoduje infekcji, jednak w szczególnych warunkach, gdy dochodzi do obniżenia odporności organizmu gospodarza czy zaburzenia balansu mikroflory, mogą one prowadzić do rozwoju zakażeń zwanych kandydozami – zarówno powierzchniowych jak i niebezpiecznych dla życia infekcji systemowych, będących wynikiem intensywnego rozsiewania się drożdżaka za pośrednictwem układu krwionośnego. Infekcje systemowe stwarzają duże zagrożenie i są przyczyną zgonów około 50% cierpiących na nią pacjentów.

Zarówno etap kolonizacji organizmu gospodarza jak i infekcji zależny jest od wielu czynników wirulencji drożdżaków, do których zalicza się zmienność morfologiczną i fenotypową oraz produkcję adhezyn i enzymów hydrolitycznych. Do tych ostatnich należy rodzina proteaz aspartylowych (Sap). *C. albicans* posiada 10 genów (*SAP1-SAP10*) kodujących te enzymy, z których znaczna część uwalniana jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Sap1-Sap8). Dwie proteazy z tej rodziny (Sap9-Sap10) posiadają kotwicę GPI lokującą te enzymy – odpowiednio - w błonie komórkowej oraz błonie i ścianie komórkowej drożdżaka. Sap posiadają zróżnicowane optima pH dla swojego działania (pH=2,5-7) i dzięki temu mogą spełniać swoje funkcje w różnych niszach organizmu gospodarza (np. drogi rodne, układ pokarmowy, układ oddechowy, skóra) dopasowując się do panujących w nich warunków. Umożliwiają w ten sposób pozyskiwanie przez drożdżaki substancji odżywczych, wspomagają adhezję oraz dalszą inwazję tkanek gospodarza a także ułatwiają patogenowi unikanie odpowiedzi immunologicznej.

Infekcja spowodowana przez *C. albicans* wywołuje inicjację odpowiedzi odpornościowej. Jedną z pierwszych etapów tej odpowiedzi jest rekrutacja neutrofili

do miejsca infekcji gdzie komórki te mogą wykorzystywać rożne mechanizmy inaktywacji mikroorganizmu takie jak fagocytoza, degranulacja czy wytwarzanie zewnątrzkomórkowych pułapek (NET). Struktury te zbudowane są z sieci DNA, stanowiącej rusztowanie dla przeciwdrobnoustrojowych białek, zarówno histonów jak i białek pochodzących z ziarnistości neutrofilowych - azurocydyny, laktoferyny czy mieloperoksydazy. Jednym z nich jest również elastaza neutrofilowa, której niekontrolowana aktywność w miejscu infekcji może także stanowić potencjalne zagrożenie dla komórek gospodarza, prowadząc do degradacji jego własnych tkanek. Ponadto, podczas generacji NET zostają uwolnione deiminazy peptydyloargininowe (cytoplazmatyczny PAD2 oraz jądrowy PAD4), które posiadają potencjał cytrulinacji zewnątrzkomórkowych białek, polegający na konwersji dodatnio naładowanych reszt argininy do reszt cytruliny, nie posiadających ładunku. Modyfikacja taka może pociągać ze sobą istotną zmianę właściwości fizykochemicznych cząsteczek. Ponadto, w strukturach NET mogą również zostać uwięzione inne, lokalnie występujące białka gospodarza jak np. wielkocząsteczkowy kininogen (HK), który jest nieenzymatycznym składnikiem układu kontaktu, odpowiedzialnego za produkcję prozapalnych peptydów zwanych kininami.

Celem niniejszej pracy była analiza możliwości unikania przez *C. albicans* bójczych własności NET poprzez wykorzystanie przez nie potencjału proteolitycznego proteaz aspartylowych. Rozważania te skupione były na trzech zagadnieniach:

(1) charakterystyce procesu degradacji białkowych składników NET: histonów, białek ziarnistości neutrofilowych i peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz analizie możliwości ich unieczynnienia względem *C. albicans*;

(2) możliwości inaktywacji przez proteazy *C. albicans* α1-inhibitora proteaz (A1PI), będącego głównym inhibitorem elastazy neutrofilowej, wydzielanej lokalnie, także w obrębie sieci NET. Deregulacja taka mogłaby wzmagać niszczący względem komórek gospodarza potencjał NET lub sprzyjać dalszemu rozsiewaniu komórek drożdżaka;

(3) możliwości lokalnej produkcji prozapalnych peptydów – kinin - jako wynik działania Sap na występujący w miejscu infekcji kininogen.

We wszystkich tych analizach rozważono możliwość lokalnej cytrulinacji białek gospodarza z udziałem PAD i jej wpływu na możliwą proteolizę z udziałem Sap.

Przeprowadzone badania wykazały, że główne białka NET: laktoferyna, mieloperoksydaza i azurocydyna nie są substratami dla proteaz aspartylowych *C. albicans*. Również antygrzybicza kalprotektyna obecna w NET nie ulegała inaktywacji w zakresie pH optymalnym dla swojego działania. Częściową degradację laktoferyny i kalprotektyny zaobserwowano tylko w pH4 przy udziale Sap2 i Sap3. Taka reakcja mogłaby dotyczyć tylko specyficznych niszy gospodarza, preferujących niskie pH, gdzie potwierdzono możliwość generacji NET (przewód pokarmowy, drogi rodne).

Natomiast histony H2, H3 i H4 były wydajnie degradowane przez Sap 1-4 i Sap9 w szerokim zakresie pH, zarówno z udziałem form komórkowych jak i strzępkowych drożdżaka.

W obrębie NET może dochodzić do cytrulinacji histonów zarówno na etapie dekondensacji chromatyny z udziałem jądrowego PAD4 jak i w przestrzeni pozakomórkowej z udziałem cytoplazmatycznej izoformy PAD2, obecnej w NET. Jak wykazano, cytrulinacja histonów prowadziła tylko do częściowego osłabienia wydajności ich proteolizy przez Sap. Można zatem przypuszczać, że obserwowana w przypadku histonów izolowanych z NET utrata ich potencjału bójczego względem *C. albicans* może być wynikiem działania Sap w miejscu infekcji i degradacji histonów z ich udziałem.

Składnikiem NET najbardziej podatnym na degradację z udziałem Sap okazał się peptyd LL-37, którego proteoliza może zachodzić w szerokim zakresie pH (3-7) przy udziale Sap charakterystycznych dla obu typów morfologicznych drożdżaka, przy czym Sap1-4, Sap8 oraz Sap9 wykazywały największą wydajność tej reakcji.

W przeciwieństwie do histonów, cytrulinacja LL-37 prowadzi do niewielkiego wzrostu wydajności jego degradacji przez Sap, co może być skutkiem zaburzenia α-helikalnej struktury tej cząsteczki. Modyfikacja ta jest również najbardziej prawdopodobną przyczyną obserwowanej utraty właściwości bójczych kolejnych cytrulinowanych pochodnych LL-37, co może wskazywać, że zarówno degradacja jak i cytrulinacja histonów oraz LL-37 przyczynia się do unikania przez mikroorganizmy ich unieruchamiania i niszczenia w sieciach NET.

Proteazy *C. albicans* mogą spełniać swoją rolę w infekcji także w sposób pośredni, poprzez inaktywację ludzkiego A1PI. Jak wykazano, degradacja ta polega na hydrolizie wiązania peptydowego pomiędzy K^{343} i G^{344} i prowadzi do inaktywacji

właściwości inhibitorowych A1PI na skutek odcięcia pełnej sekwencji pętli reaktywnej, stanowiącej miejsce oddziaływania z elastazą neutrofilową. Degradacja ta przebiega z udziałem Sap1-4 oraz Sap9, głównie w środowisku lekko zakwaszonym (pH 5-6), np. w tkankach płuc, szczególnie u osób dotkniętych mukowiscydozą lub astmą, gdzie kandydozy są częstymi chorobami towarzyszącymi. Mimo potencjalnej możliwości cytrulinacji A1PI, modyfikacja ta nie ma wpływu na proces jego proteolizy ani jego aktywność inhibitorową.

Produkt degradacji inhibitora przez Sap posiada również obniżoną zdolność do kompleksowania IL-8(72aa) – głównego chemoatraktanta neutrofili a także czynnika indukującego tworzenie NET. Dodatkowo proteazy Sap1-4 oraz Sap9 w pH 5 mają zdolność docinania interleukiny IL-8(77aa) do wspomnianej IL-8(72aa), zwiększając tym samym aktywność chemotaktyczną cząsteczki. Oba procesy przyczyniające się do wzrostu lokalnego stężenia IL-8(72aa) w miejscu infekcji mogą prowadzić do napędzania migracji neutrofili, oraz tworzenia NET. Wysokie lokalne stężenie elastazy zasocjowanej z NET oraz brak możliwości jej hamowania przez degradowany A1PI może przyczynić się do degradacji tkanek płuc a tym samym sprzyjać propagacji infekcji.

Proteazy *C. albicans* posiadają również zdolność uwalniania kinin z kininogenu. Głównym generowanym produktem jest peptyd o sekwencji MKRPPGFSPFR (Met-Lys-bradykinina) realizujący swoją aktywność za pośrednictwem receptora kinin typu B2. Mimo, że wszystkie Sap, oprócz Sap7, posiadają zdolność do generacji tego peptydu, główna rola większości z nich wydaje się być raczej wspomagająca w stosunku do Sap3, który najwydajniej generuje tę kininę. Wsparcie produkcji kinin przez te enzymy może polegać na tworzeniu peptydów posiadających sekwencję kininową bogatszą o kilka C-końcowych reszt aminokwasowych jak np. MKRPPGFSPFRSS, czy MKRPPGFSPFRS. Cząsteczki te z kolei mogą stać się substratami dla Sap3, który szybko uwalnia potencjalny C-koniec kininy prowadząc proteolizę między resztami R-S. Na szczególną uwagę zasługuje również Sap9, której końcowy produkt zależny jest od długości cząsteczki substratu. W przypadku pełnej cząsteczki kininogenu proteaza ta wycina głównie nieaktywny peptyd PPGFSPFR. W sytuacji gdy substratem jest peptyd posiadający dłuższy C-koniec jak np. MKRPPGFSPFRSSR, Sap9 może uwalniać duże ilości aktywnej Met-Lys-bradykininy.

Można zatem przypuszczać, że produkcja kinin, które mogłyby wspomagać rozprzestrzenianie się komórek *C. albicans* poprzez wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych jest ważnym zadaniem proteaz *C. albicans*. Co więcej, przeprowadzone badania mogą wskazywać, że zależnie od potrzeb mikroorganizmu może dochodzić do swego rodzaju regulacji poziomu produkcji kinin przez różny poziom ekspresji wskazanych proteaz.

Wielkocząsteczkowy kininogen, mogący ulegać asocjacji z NET, może również stać się substratem dla obecnych lokalnie PAD, uwalnianych w procesie generacji pułapek. Badania z wykorzystaniem odpowiednika cytoplazmatycznego enzymu PAD2 uwidoczniły cztery miejsca cytrulinacji białka, z czego dwa w obrębie domeny zawierającej sekwencję kinin. Modyfikacja ta spowolniła proces generacji kinin przy udziale Sap. Z kolei cząsteczka bradykininy, będąca końcowym efektem działania na Met-Lys-bradykininę niespecyficznych aminopeptydaz gospodarza, może ulegać dalszej cytrulinacji C-końcowej reszty argininy. Modyfikacja ta jednak uniemożliwia interakcję peptydu z receptorem kinin typu B2, co może wskazywać na cytrulinację jako proces regulujący przekaz sygnału w stanie zapalnym.

Podsumowując, w przedstawionej pracy wykazano, że drożdżaki *C. albicans* są zdolne do degradacji kluczowych białkowych składników NET, dzięki czemu mogą neutralizować właściwości grzybobójcze tych struktur. Aktywność Sap może także doprowadzać do zaburzenia homeostazy organizmu gospodarza, powodując wzmożoną degradację jego tkanek, co sprzyja progresji infekcji. Proces rozsiewania zakażenia może być także kontrolowany poprzez produkcję kinin, których cytrulinacja może regulować ich aktywność permeabilizacyjną.

Marcin Gozdz