**Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Doroty Satały**

Drożdżopodobne grzyby z rodzaju *Candida* bytują w stanie komensalnym na skórze i błonach śluzowych większości zdrowych ludzi, najczęściej nie powodując objawów chorobowych. Ich patogenna natura objawić się może w przypadkach uszkodzenia fizycznych barier ochronnych lub znacznego osłabienia biologicznych mechanizmów odpornościowych organizmu gospodarza. Drożdżaki te stają się wtedy przyczyną szeregu chorób, począwszy od stosunkowo niegroźnych infekcji powierzchniowych aż po wielonarządowe i systemowe zakażenia, często bezpośrednio zagrażające życiu. Utrzymująca się w ciągu ostatnich dekad tendencja wzrostu częstości zakażeń grzybiczych wymusza intensyfikację badań nad molekularnymi mechanizmami zakażeń wywoływanych przez różne gatunki *Candida*, w szczególności gatunki inne niż *C. albicans*, takie jak *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, wspólnie określane czasem jako *Candida* „non-albicans", będące coraz częstszą przyczyną zakażeń ogólnoustrojowych o słabej podatności na leczenie.

Najbardziej zewnętrzną warstwą drożdżaków *Candida* spp. jest ściana komórkowa, stanowiąca powierzchnię kontaktu pomiędzy gospodarzem a mikroorganizmem patogennym, pełniąca istotną rolę w oddziaływaniach, umożliwiających kolonizację i inwazję tkanek gospodarza przez komórki drożdżaków. Spośród licznych składników ściany komórkowej, kluczową funkcję w zjawisku adhezji pełnią białka, mogące oddziaływać z wieloma ligandami gospodarza, często białkowymi.

Po uszkodzeniu i pokonaniu przez drożdżaka pierwszej bariery ochronnej gospodarza, jaką stanowi warstwa komórek nabłonkowych, może dochodzić do wyeksponowania błon podstawnych oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej, które pełniąc rolę łącznika pomiędzy patogenem a gospodarzem mogą przyczyniać się do wzrostu adhezji oraz ułatwienia inwazji.

Ze względu na alarmujący wzrost zakażeń grzybiczych, trudności terapeutyczne oraz brak rozpoznania mechanizmów zjadliwości gatunków *Candida* „non-albicans", za cel niniejszej pracy postawiono biochemiczną charakterystykę oddziaływań pomiędzy składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektyną, witronektyną i lamininą, a białkami eksponowanymi na ścianie komórkowej trzech patogenów grzybiczych z grupy *Candida* „non-abicans": *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata*, oraz wskazanie roli tych białek w procesie adhezji do komórek nabłonkowych gospodarza.

Podczas wstępnego oczyszczania białek powierzchniowych *Candida* spp. metodą chromatografii jonowymiennej, posługując się kompetycyjnym testem mikropłytkowym na

wiązanie ligandu, wytypowano główne receptory eksponowane na powierzchni drożdżaków, odgrywające istotną rolę w oddziaływaniu z fibronektyną. Wśród wytypowanych białek znalazły się zarówno prawdziwe adhezyny, związane kowalencyjnie ze ścianą komórkową, takie jak białka o sekwencji podobnej do aglutynin Als, Hyr (*ang.* hyphally regulated protein), Epa3 (*ang.* epithelial adhesin 3) czy Epa6 (*ang.* epithelial adhesin 6), jak i nietypowe białka, luźno związane ze strukturą ściany, których obecność na powierzchni nadal pozostaje kontrowersyjna, a do których zalicza się enolaza (Eno1), izomeraza triozofosforanowa (Tpi), izomeraza glukozo-6-fosforanowa (Pgi) czy białko szoku cieplnego Ssa2. Na dalszych etapach chromatograficznych, zmierzających do pozyskania czystych preparatów białkowych, zadbano zatem o pozyskanie białek, należących do tych dwóch grup, zapewniając w ten sposób zróżnicowane spojrzenie na udział białek powierzchniowych drożdżaka w procesie adhezji do białek i komórek gospodarza.

W celu szczegółowej charakterystyki oddziaływania białek powierzchniowych z ludzkimi komórkami nabłonkowymi linii A431 oraz białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oczyszczono zidentyfikowane wcześniej białka z ściany komórkowej *C. parapsilosis*: CPAR2_404780 i CPAR2_404800 (o sekwencjach podobnych do aglutynin Als1 i Als7) oraz Gnd1 (dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa) i Ssa2, z ściany komórkowej *C. tropicalis*: Hyr, Eno1 i Gpm1 (mutaza fosfoglicerynianowa 1), a z ściany komórkowej *C. glabrata*: Epa6, Epa3, Tpi i Tdh3 (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego).

W oparciu o metody pomiarów powierzchniowego rezonansu plazmonowego oraz anizotropii fluorescencji określono powinowactwo oczyszczonych białek powierzchniowych *Candida* spp. do składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Dla pojedynczego kompleksu białko grzybicze – białko ludzkie wyznaczono stałe dysocjacji *K*D, które mieściły się w zakresie od $10^{-6}$ M do $10^{-9}$ M. W oparciu o mikropłytkowe testy na wiązanie ligandu oraz technikę mikroskopii fluorescencyjnej wykazano, że zarówno klasyczne adhezyny, jak i nietypowe białka powierzchniowe mogą ulegać adhezji do komórek nabłonkowych linii A431.

Uzyskane wyniki to pierwsza charakterystyka ilościowa (pod względem parametrów kinetycznych i termodynamicznych) oddziaływań pomiędzy składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza a białkami eksponowanymi na powierzchni drożdżaków *Candida* „non-albicans". Poszerzają wiedzę na temat mechanizmów wirulencji drożdżaków *Candida* „non-albicans" oraz mogą przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia grzybiczych zakażeń systemowych, np. w oparciu o hamowanie interakcji drożdżaków z białkami i komórkami gospodarza.

Dorota Satała

13.09.18 r.