

STRESZCZENIE

Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy są drożdżopodobne grzyby (drożdżaki) z rodzaju *Candida*, w tym *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, a także wcześniej zaliczany do rodzaju *Candida* gatunek *Nakaseomyces glabrata*. Zasadają one jamę ustną, układ pokarmowy oraz układ moczowo-płciowy, zwykle nie wywołując infekcji. Jednak zachwianie równowagi, które może być spowodowane między innymi obniżeniem odporności organizmu gospodarza, prowadzi do trudnych w leczeniu infekcji grzybiczych, tak zwanych drożdżyc lub kandydoz. Infekcje grzybicze stanowią istotny problem medyczny ze względu na wzrastającą oporność drożdżaków na stosowane leczenie.

Jednym z najważniejszych elementów budujących komórki drożdżaków jest ściana komórkowa, która w kontakcie z gospodarzem stanowi pierwszą linię zarówno obrony jak i ataku. Znaczną jej część stanowią białka, które dzieli się na typowe, zakotwiczone kotwicą glikozylofosfatydyloinozytolową (GPI) oraz atypowe, luźniej związane ze ścianą komórkową. Oprócz typowych oraz atypowych stałych białkowych składników ściany komórkowej, zaobserwowano również dodatkowe, zaadsorbowane białka, określane w literaturze anglojęzycznej jako „moonlighting proteins”. Wśród tej grupy białek można znaleźć enzymy zaangażowane w wewnątrzkomórkowe procesy metaboliczne, takie jak szlak glikolizy, szlak pentozofosforanowy czy cykl Krebsa, a nawet białka biorące udział w translacji i czaperony. Pochodzenie białek „moonlighting” na powierzchni komórek drożdżaków jest nie do końca poznane. Przypuszcza się, że ich obecność jest związana z uwalnianiem zawartości cytoplazmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez martwe komórki drożdżaków lub w wyniku transportu za pomocą pęcherzyków (ang. *extracellular vesicles*), a następnie adsorpcją uwolnionych białek do powierzchni żywych komórek za pośrednictwem typowych białek adhezyjnych, takich jak w przypadku *C. albicans* adhezyny z sekwencjami aglutyninopodobnymi (Als), białka ściany komórkowej strzępek (Hwp) czy białka o zwiększonej przyczepności do polistyrenu (Eap).

Jednym z białek „moonlighting” jest fosfogliceromutaza (Gpm1), kofaktoro-zależna izomeraza zaangażowana w szlak glikolizy, gdzie odpowiedzialna jest za konwersję 3-fosfoglicerynianu do 2-fosfoglicerynianu w obecności kofaktora 2,3-bisfosfoglicerynianu. Dotychczas zostało opisanych kilka zewnątrzkomórkowych funkcji Gpm1, pełnionych na powierzchni komórek drożdżaków a zalicza się do nich oddziaływanie z ludzkimi białkami: prekalikreina, wielkocząsteczkowym kininogenem (HMWK), czynnikiem XII i plazminogenem, a także czynnikiem H i czynnikiem H-podobnym 1 (ang. *factor H-like protein*

I) układu dopełniacza oraz wiązanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) takich jak fibronektyna (Fn), witronektyna (Vtr) czy laminina.

Przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej jest Gpm1 drożdżaków z rodzajów *Candida* i *Nakaseomyces*, jej lokalizacja na powierzchni tych drożdżopodobnych grzybów oraz oddziaływanie tego enzymu z ludzkimi białkami ECM (Vtr, Fn) oraz HMWK – kluczowym składnikiem dwóch układów hemo(homeo)statycznych gospodarza: układu aktywacji kontaktowej krzepnięcia krwi (CAS) oraz układu kinina – kalikreina (KKS). ECM stanowi najbliższe zewnętrzne otoczenie komórek ludzkich i jest jednym z pierwszych miejsc, w których dochodzi do kontaktu patogen – gospodarz. Kontakt ten umożliwia zdolność białek ściany komórkowej drożdżaków do oddziaływania z komponentami ECM. Rola HMWK w infekcjach jest inna. HMWK, obecny w surowicy krwi, jest przyciągany przez нефизjologiczne ujemnie naładowane powierzchnie, takie jak powierzchnie komórek patogennych mikroorganizmów. Wiele badań wskazuje, że bakterie są zdolne do wykorzystania HMWK do rozprzestrzeniania infekcji, między innymi poprzez uwalnianie prozapalnych peptydów – kinin, które zwiększają przepuszczalność naczyń, a także umożliwienie migracji, ucieczki ze skrzeplin i zapewnienie składników odżywczych.

W niniejszych badaniach wykazano obecność Gpm1 na powierzchni komórek badanych drożdżaków poprzez obserwacje mikroskopowe po wizualizacji za pomocą przeciwciał skierowanych na Gpm1 z *S. cerevisiae* (anty-Gpm1) oraz w ekstraktach ściany komórkowej przy użyciu techniki Western blotting. Oprócz tego, porównanie aktywności enzymatycznej rekombinowanych preparatów Gpm1 z enzymami wyizolowanymi i oczyszczonymi ze ściany komórkowej drożdżaków wykazało, że rekombinowana Gpm1 wykazuje znacznie wyższą aktywność niż pozyskana z powierzchni drożdżaków.

Oddziaływanie Gpm1 z wybranymi białkami ludzkimi (Fn, Vtr i HMWK) zostało potwierdzone mikrocząstkowymi testami wiązania. Oprócz tego, blokując powierzchnię komórek *Candida* spp. oraz *N. glabrata* przeciwciałami anty-Gpm1, oszacowano udział Gpm1 w całkowitym wiązaniu ludzkich białek przez całe komórki drożdżaka na około 25% w stosunku do wszystkich składników ściany komórkowej. Wykonano mapowanie miejsc oddziaływań Gpm1 – białka ludzkie za pomocą sieciowania chemicznego i spektrometrii mas, z potwierdzeniem przy użyciu mikrocząstkowych testów konkurencji z zastosowaniem syntetycznych peptydów, odpowiadających wskazanym odcinkom sekwencji białek – zarówno w Gpm1 jak i w białkach ludzkich. Dla wiązania Vtr wskazano peptyd Gpm1 aa138-158, dla Fn: aa138-158 i aa158-175, a dla HMWK i drobnocząsteczkowego kininogenu: aa61-80, aa116-136 oraz aa158-175. W przypadku mapowania miejsc wiązania Gpm1 na białkach

ludzkich, dla Vtr wskazano aa354-367, natomiast dla Fn: aa904-922 i aa1117-1129. Mapowanie miejsc oddziaływania na HMWK wymagało zastosowania mikroplątkowych testów wypierania z peptydami odpowiadającymi odcinkom HMWK, które wskazały domeny 3 i 6 jako główne obszary oddziaływania z Gpm1.

Wykazano zdolność Gpm1 do oddziaływania z powierzchnią komórek badanych drożdżaków poprzez dodatek znakowanej biotyną Gpm1 do monowarstwy komórek drożdżaków *Candida* spp. oraz *N. glabrata*. W ekstraktach ściany komórkowej drożdżaków, posługując się metodą sieciowania chemicznego, ujawniono białka potencjalnie oddziałujące z Gpm1 na powierzchni drożdżaków. Wśród nich były zarówno inne białka „moonlighting”, jak i typowe białkowe składniki ściany komórkowej, w tym Als3. W celu sprawdzenia hipotezy o typowych adhezynach jako potencjalnych „platformach dokujących” dla białek „moonlighting”, wykorzystano mutanty drożdży *S. cerevisiae* eksponujące na powierzchni komórek adhezyny *C. albicans*: Als3, Eap1 i Hwp1 oraz sprawdzono zdolność do oddziaływania z Gpm1. Analizy te wskazały, że Als3 jest główną adhezyną odpowiedzialną za to oddziaływanie.

Wyizolowano i oczyszczono Als3 z ściany komórkowej *C. albicans* oraz wykazano, że Als3 oddziałuje z Gpm1 poprzez podobne miejsca jak w przypadku wiązania ludzkich białek, a dokładnie: aa61-80, aa116-136, aa138-158 i aa158-175. Mapowanie miejsc oddziaływania na Als3 wymagało zastosowania mutantów drożdży *S. cerevisiae*, które na swojej powierzchni eksponowały Als3 z delecjami różnych fragmentów. Badania te pokazały, że tylko region Als3 odpowiedzialny za formowanie się amyloidu nie jest zaangażowany w oddziaływanie z Gpm1.

Sprawdzono rolę obu białek drożdżowych – Gpm1 i Als3 – w oddziaływaniu z HMWK, z ponownym wykorzystaniem w/w mutantów *S. cerevisiae* i jednoczesnym dodawaniem Gpm1 i HMWK do komórek. Wykazano, że Gpm1 chętniej oddziałuje z HMWK.

Podsumowując, Gpm1 jest cytoplazmatycznym enzymem, który prawdopodobnie na zasadzie readsorpcji po wcześniejszym uwolnieniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych lub obumierających w tym samym ognisku zapalnym komórek drożdżowych), oddziałuje ze ścianą komórkową badanych drożdżaków. Jego wkład w wiązanie badanych białek ludzkich (Fn, Vtr, HMWK) sugeruje istotny udział w interakcji patogen-gospodarz. Ze względu na wskazane miejsca oddziaływania Gpm1 – białka ludzkie, prawdopodobnie Gpm1 na powierzchni komórek może uczestniczyć w hamowaniu fibrylogenezy (wiązanie Fn), zaburzać krzepnięcie krwi (oddziaływanie z HMWK), a także hamować aktywację układu dopełniacza (wiązanie Vtr).

Przypuszcza się, że głównymi białkami dokującymi białka „moonlighting” na ścianie komórkowej są typowe adhezyny, w tym przede wszystkim główna adhezyna z rodziny Als – Als3, która obficie występuje w formie strzępkowej *C. albicans*. Aczkolwiek badania wskazały, że rola Als3 jako platformy dla Gpm1 kończy się w momencie pojawienia się ludzkiego ligandu – w tym przypadku HMWK. Ten wynik sugeruje, że Als3 może pełnić rolę ekspozycyjną dla Gpm1 na powierzchni drożdżaków w oczekiwaniu na lepszy ligand, taki jak HMWK.