

Jakub Suchodolski

Tytuł w jęz. polskim:

Wpływ ergosterolu na aktywność transportera Cdr1 i wybrane parametry błony plazmatycznej u *Candida albicans*

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biotransformacji pod kierunkiem dr hab. Anny Krasowskiej, prof. UWr.

Wrocław 2020

STRESZCZENIE

Grzyby *Candida albicans* są patogenami oportunistycznymi ludzi, które w obecności chorób współistniejących prowadzą do ok. 50% śmiertelności pacjentów. Stosowane leki przeciwgrzybowe celują w ergosterol błon komórkowych (leki polienowe) lub szlak jego biosyntezy (leki azolowe). Leki polienowe mimo wysokiej skuteczności przeciwko komórkom grzybów są wysoce toksyczne względem komórek gospodarza. Powszechniej stosowane i mniej cytotoksyczne są leki azolowe, jednakże prawie 20% klinicznie izolowanych szczepów *Candida* wykazuje na nie oporność. Wśród mechanizmów oporności identyfikuje się aktywację białka Cdr1, będącego głównym transporterem oporności wielolekowej u *C. albicans*. Jednym z elementów opracowywania nowych form leczenia grzybic jest poszukiwanie procesów komórkowych związanych z aktywnością Cdr1. W niniejszej pracy podjęto się przebadania wpływu ergosterolu na parametry błony plazmatycznej oraz aktywność białka Cdr1.

Pierwszymi celami pracy doktorskiej było uzyskanie komórek *C. albicans* pozbawionych ergosterolu oraz określenie ich wzrostu w typowych podłożach laboratoryjnych. Model badawczy uzyskano poprzez usunięcie genu *ERG11*, kodującego enzym szlaku biosyntezy ergosterolu - 14 α -demetylazę lanosterolu (bezpośredni cel leków azolowych). Zastosowano metodę dwuetapowej rekombinacji kasety genowej SAT1-Flipper do locus genu *ERG11* z selekcją na podłożu pełnym YPD. Dowiedziono, że tak uzyskane komórki *C. albicans* wykazują oporność na leki azolowe i polienowe oraz wzrastają w warunkach tlenowych na podłożu pełnym YPD (wykazując defekt wzrostowy względem szczepu wyjściowego).

Dodatkową obserwacją w tej części pracy był brak wzrostu *C. albicans* pozbawionych ergosterolu na podłożu minimalnym YNB. Efekt ten opisano jako auktotrofię uzyskanego szczepu pod względem adeniny i uracylu. Powyższe dane pozwoliły wnioskować, że przyczyną wcześniejszych niepowodzeń w konstrukcji izogenicznych mutantów *C. albicans erg11 Δ /* było stosowanie selekcji na podłożach minimalnych. Pozbawienie *C. albicans* genu *ERG3* umożliwia usunięcie genu *ERG11* i wzrost na podłożach minimalnych. W pracy doktorskiej dowiedziono, że podwójny mutant *erg11 Δ /*, *erg3 Δ /* charakteryzuje się jednak zwiększonym defektem wzrostu na podłożu pełnym YPD niż komórki pozbawione jedynie genu *ERG11*.

Kolejnym celem pracy doktorskiej było przebadanie struktury i funkcjonowania błony plazmatycznej komórek *C. albicans* pozbawionych ergosterolu. Wytypowano przebadanie następujących parametrów: płynności, profilu steroli i procesu ich transportu, profilu fosfolipidów, asymetrii, oraz potencjału błonowego.

Pozbawienie *C. albicans* genu *ERG11* skutkowało zwiększoną sztywnością błony plazmatycznej. Jedną z przyczyn było akumulowanie w niej 14- α metylergosta8,24,28-dienolu, lanosterolu i innych C-14 metylowanych pochodnych lanosterolu. Dowiedziono, że w przeciwieństwie do szczepu wyjściowego, ilość steroli mutantu pozbawionego *ERG11* przyrastała proporcjonalnie do czasu hodowli. Przyczyną była wzmożona ekspresja genów szlaku biosyntezy ergosterolu, głównie: *ERG25*, *ERG251*, *ERG27* oraz *ERG6*.

W dalszych etapach pracy, stosując RNA-Seq, przebadano ekspresje genów kodujących białka związane z wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowym transportem steroli. Uzyskane wyniki wskazywały, że w komórkach pozbawionych *ERG11* najpewniej większą rolę odgrywają białka wiążące sterole lokalizujące w cytoplazmie (białka Osh) niż białka wiążące sterole lokalizujące w miejscach kontaktu błony plazmatycznej z retikulum endoplazmatycznym (białka Lam i Arv1). Dodatkowo dowiedziono zwiększonej ekspresji genów, których produkty biorą udział w estryfikacji steroli i magazynowaniu ich jako materiał zapasowy. Mniejszą rolę zaobserwowano dla genów związanych z procesem transportu acetylowanych steroli na zewnątrz komórek.

Pozbawienie komórek ergosterolu wpływało również na profil fosfolipidów błony plazmatycznej. Obserwowano zwiększoną ilość fosfatydylocholin, fosfatydyloinozytoli, wiązań nienasyconych łańcuchów tłuszczowych oraz obniżoną długość łańcuchów tłuszczowych i ilość fosfatydyloetanolamin, które akumulowały głównie w monowarstwie zewnętrznej błony plazmatycznej. Powyższy wynik naprowadził dalsze prace na przebadanie potencjału błonowego i procesów z nim związanych w komórkach pozbawionych ergosterolu. W eksperymentach wykorzystano opracowaną w ramach niniejszej pracy metodę szacowania zmian potencjału błonowego z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej di-4-ANEPPS. Dowiedziono, że brak ergosterolu wpływa na depolaryzację błon komórkowych. Jako jedną z przyczyn wytypowano delokalizację H⁺-ATPazy do wakuol, obniżenie jej aktywności i ilości.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie jaki wpływ ma pozbawienie komórek *C. albicans* ergosterolu na funkcjonowanie transportera Cdr1. Wytypowano przebadanie ekspresji kodującego go genu (*CDR1*), ilości białka, jego lokalizacji i aktywności w wyrzucie ksenobiotyków. Komórki pozbawione ergosterolu charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genu *CDR1* oraz zwiększoną ilością białka Cdr1. Za przyczynę powyższego uznano jednocześnie zwiększoną ekspresję genów kodujących pozytywne regulatory ekspresji *CDR1* (*UPC2* oraz *ZNC1*) i obniżoną ekspresję genu kodującego negatywny regulator ekspresji *CDR1* (*FLO8*). Dowiedziono jednakże, że w komórkach tych białko Cdr1 delokalizuje z błony komórkowej do wakuol we wczesnej fazie wzrostu wykładniczego. Powyższe zjawisko związane było z obniżoną w stosunku do szczepu wyjściowego aktywnością białka Cdr1. W doświadczeniach z komórkami pozbawionymi jednocześnie genów *ERG11* oraz *CDR1* dowiedziono, że w komórkach pozbawionych jedynie genu *ERG11*, białko Cdr1 posiada częściową aktywność.

Ostatnim celem niniejszej pracy było przedstawienie praktycznego zastosowania uzyskanego modelu badawczego. Praca z mutantem *C. albicans* pozbawionym genu *ERG11* pozwoliła wytypować dwie kombinacje leków, z których jedna miała korzystne (gentamycyna pobudzała aktywność flukonazolu), a druga niekorzystne efekty (kwas kaprynowy uodparniał komórki na amfoterycynę B). Mechanizm działania kombinacji flukonazolu i gentamycyny został określony jako związany z hydrofobowością powierzchni komórek *C. albicans*. Komórki o zwiększonej hydrofobowości traktowane flukonazolem charakteryzowały się zwiększoną ilością błonowych fosfatydyloinozytoli, które są bezpośrednim miejscem wiązania gentamycyny. Mechanizm antagonistycznego działania kombinacji kwasu kaprynowego i amfoterycyny B został zidentyfikowany jako następujący: traktowanie komórek *C. albicans* kwasem kaprynowym prowadzi do upłynnienia błon komórkowych, które *C. albicans* rekompensuje nadprodukcją ergosterolu. Pośrednim tego efektem jest uodpornienie komórek *C. albicans* na amfoterycynę B.

Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji o roli jaką pełni ergosterol w utrzymywaniu prawidłowej struktury błony komórkowej u *C. albicans*. Dowiedziono, że jej zaburzenie na skutek pozbawienia komórek ergosterolu związane jest z utratą prawidłowej lokalizacji i aktywności białka Cdr1. Powyższe wnioski mogą przyczynić się do opracowywania nowych form leczenia grzybic, co w niniejszej pracy zostało zaprezentowane na przykładzie nowoopisanych kombinacji leków.