

mgr Joanna Szczepaniak

Wpływ wybranych czynników na aktywność transporterów ABC

Candida albicans

Streszczenie:

Candida albicans jest jednym z gatunków grzybów drożdżopodobnych zaliczanych do patogenów oportunistycznych. Głównym mechanizmem oporności tych grzybów jest nadekspresja transporterów, które usuwają z komórek ksenobiotyki. U *C. albicans* zidentyfikowano trzy pompy wyrzutu leków: Cdr1p, Cdr2p, należące do transporterów ABC oraz Mdr1 z rodziny MFS.

Pierwszym celem niniejszej pracy było opracowanie metody pozwalającej na pomiar aktywności transporterów ABC w czasie rzeczywistym. Pokazano, że sonda fluorescencyjna, jodek 3,3'-dipropylotiakarbocyaniny (diS-C3(3)), jest specyficznym substratem dla transporterów ABC, Cdr1p oraz Cdr2p, ale nie dla pompy MFS, Mdr1p. W przeciwieństwie do *Saccharomyces cerevisiae*, u *C. albicans* nawet w przypadku szczepów posiadających transportery ABC, obserwuje się czas akumulacji sondy w komórkach (co najmniej 40 minut), co sugeruje różnice w czasie odpowiedzi na substrat między tymi dwoma gatunkami grzybów. Wykazano, że efektywność wyrzutu sondy przez transportery *C. albicans* zależy od fazy wzrostu. Zaobserwowano także różnice pomiędzy aktywnością Cdr1p oraz Cdr2p. Szczep pozbawiony tego drugiego transportera usuwał diS-C3(3) na zewnątrz komórek dopiero po dodaniu glukozy. Różnicę można było jednak zaobserwować w ekspresji *CDR1*. Szczep *cdr2Δ* wykazywał bardzo niski poziom transkryptu tego genu. Dopiero dodanie glukozy powodowało wzrost ekspresji, który korelował się z ilością białka. Brak aktywności Cdr1p w tym szczepie nie był spowodowany stężeniem ATP w komórkach - szczep *cdr2Δ* posiadał większą ilość ATP niż pozostałe szczepy. Dodanie glukozy powodowało wzrost stężenia ATP niezależnie od posiadania przez szczep transporterów ABC. Jest to pierwsze dotąd doniesienie o różnicy w aktywności Cdr1p oraz Cdr2p pod wpływem glukozy, a także pierwsze doniesienie o substracie, który jest preferencyjnie usuwany z komórek przez Cdr2p.

Leki azolowe, znane substraty transporterów ABC, nie hamowały wyrzutu diS-C3(3) (z wyjątkiem mikonazolu). Stwierdzono, że sonda fluorescencyjna i azole nie konkurują o miejsce wiązania w kieszeni wiążącej transporterów ABC. Natomiast znany niekompetycyjny inhibitor Cdr1p,

enniatyna A, hamował wyrzut diS-C3(3) przez ten transporter. Inny związek z grupy enniatyn, beauwerycyna hamowała aktywność obu transporterów. Jest to pierwsze doniesienie o inhibitorze Cdr2p w natywnym środowisku lipidowym.

W celu identyfikacji nowych inhibitorów aktywności transporterów ABC przebadano grupę związków styrylochinolinowych. Dwanaście styrylochinolin charakteryzowało się wysoką aktywnością przeciwgrzybiczną. Związki te posiadają dwie grupy funkcyjne – hydroksylową lub/i acetoksyłową, ulokowane w pozycji *orto*, *meta* lub *para* na pierścieniu fenolowym lub na pierścieniu chinolinowym. Stwierdzono, że trzy z badanych związków są substratami dla Cdr1p, dziewięć związków wykazało działanie synergistyczne z flukonazolem, uwrażliwiając komórki na ten lek 64-krotnie. Ponadto część związków hamowała wyrzut znanego substratu transporterów ABC, rodaminy 6G. Wykazano także, że związki rozgałęzione molekularnie, posiadające grupy acetoksyłowe powodują zwiększenie ilości białka Cdr1. Przy pomocy wyników uzyskanych w trakcie wykonywania niniejszej pracy odkryto zarówno rolę glukozy w regulacji aktywności transporterów ABC, jak i nowe inhibitory tych pomp. Są to badania, które mogą w znaczący sposób przyczynić się do odnalezienia nowego skutecznego leku przeciw grzybicom powodowanym przez *C. albicans*.