

Candida albicans, oportunistycznie patogenny drobnoustrój, jest główną przyczyną grzybowych infekcji układowych u człowieka. Wysoka śmiertelność wśród chorych na ogólnie kandydoz, szczególnie wśród pacjentów z osłabionym układem odpornościowym, spowodowana jest m.in. brakiem skutecznych leków. Każde ze stosowanych obecnie chemioterapeutyków przeciwgrzybowych obciążone jest różnymi wadami. Związki te są albo bardzo toksyczne dla organizmu ludzkiego, jak np. Amfoterycyna B, albo te, będąc stosunkowo nietoksycznymi, wykazują inne ujemne cechy, jak np. szybkie narastanie oporności (5-fluorocytozyna), lub wyłącznie grzybostatyczne a nie grzybobójcze działanie (Flukonazol). Przyczyną braku skutecznych chemioterapeutyków przeciwgrzybowych są między innymi duże podobieństwa biochemiczne między komórkami grzybów i ssaków. Ponadto, a nawet konieczne jest poszukiwanie i praktyczne wykorzystanie nowych celów molekularnych – elementów różniących komórki grzyba od komórek ssaka. Na przestrzeni ostatnich kilku lat wprowadzono do leczenia zaledwie dwa nowe leki przeciwgrzybowe: vorikonazol i kaspofungin. Ponadto tylko drugi z tych leków można uznać za faktycznie nowy, z uwagi na mechanizm działania, którego głównym elementem jest hamowanie aktywności syntazy $\beta(1 \rightarrow 3)$ glukanu - polisacharydu stanowiącego ważny składnik ściany komórkowej wielu (ale nie wszystkich) grzybów patogennych dla człowieka.

W opisanej powyżej sytuacji, panuje powszechne przekonanie o pilnej potrzebie poszukiwania nowych potencjalnych chemioterapeutyków przeciwgrzybowych, w tym szczególnie takich, które wykorzystują w swoim mechanizmie działania nowe cele molekularne. Szlaki biosyntezy aminokwasów stanowią potencjalne źródło nowych celów molekularnych w terapii przeciwgrzybowej, zwłaszcza tych aminokwasów, które nie występują w komórkach ludzkich. Celem poznawczym projektu jest pełna charakterystyka dwóch enzymów szlaku biosyntezy/degradacji aminokwasów aromatycznych (Aro8p, Aro9p) oraz weryfikacja hipotezy możliwości wykorzystania ich jako celów molekularnych w chemoterapii przeciwgrzybowej. Proponowane podejście jest uwarunkowane egzogennym (Phe, Trp) lub względnie egzogennym (Tyr) charakterem aminokwasów aromatycznych dla ludzi oraz zdolnością komórki grzybowej do jego syntezy, a także brakiem leków przeciwgrzybowych charakteryzujących się niską toksycznością czy szerokim spektrum działania. Kluczowe procesy zachodzące podczas infekcji, takie jak: adhezja, filamentacja, penetracja i niszczenie komórek gospodarza związane są z ekspresją licznych białek, co prowadzi do znacznego zwiększenia zapotrzebowania na aminokwasy. Ponadto ze względu na prawdopodobnie szerokie spektrum substratowe Aro8p i Aro9p enzymy te mogą pełnić kluczowe role w kilku istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek grzybowych szlakach biosyntetycznych (m.in. biosynteza aminokwasów aromatycznych oraz L-Lys).

Plan badań obejmuje ustalenie metodami genetyczno-biochemicznymi konsekwencji braku aktywności Aro8p i Aro9p dla przeżywalności i wirulencji komórek *C. albicans*, pełną charakterystykę biochemiczną w/w enzymów oraz uzyskanie informacji strukturalnych niezbędnych dla racjonalnego zaprojektowania ewentualnych inhibitorów obu enzymów. Rozbicie obu kopii (*C. albicans* jest organizmem diploidalnym) każdego z genów dokonane zostanie z zastosowaniem techniki ukierunkowanego nokautu genowego wykorzystującej miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP we współpracy z twórcą tej techniki. Uzyskane mutanty zostaną w pełni scharakteryzowane pod kątem fenotypowym, w porównaniu z komórkami macierzystymi, szczególnie w aspekcie możliwości ich przeżycia w warunkach *in vitro*, a także pod kątem wpływu braku aktywności Aro8p i Aro9p na podstawowe czynniki wirulencji (m. in. zdolność do transformacji morfologicznej, adhezji, tworzenia i wzrostu w postaci biofilmu oraz wytwarzania i wydzielania na zewnątrz komórki proteaz aspartylowych, odpowiedzialnych za uszkodzenie tkanki gospodarza). W kolejnym etapie określona zostanie wirulencja mutantów w mieszanej hodowli z ludzkimi komórkami nabłonkowymi oraz w modelu mysiej kandydozy z wykorzystaniem noworodków mysich. Ponadto, zostaną wyizolowane i scharakteryzowane białka enzymatyczne, a otrzymane preparaty będą wykorzystane do nastawiania przesiewowych testów krystalizacyjnych.

Projekt dotyczy badań, które stanowią niezbędny i istotny punkt wyjściowy do dalszego rozwijania i testowania opisanej strategii terapeutycznej. Uzyskane wyniki dostarczą informacji dotyczących molekularnych skutków zablokowania szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych na etapie funkcjonowania aminotransferaz aromatycznych Aro8p i Aro9p.