

3-bromopirogronian (3-BP) jest małą cząsteczką uzyskiwaną w wyniku syntezy i bromowania pirogronianu. W 2000 roku wykazano silne właściwości przeciwnowotworowe tego związku. Jego zaletą jest selektywna i wysoka aktywność wobec komórek nowotworowych wykazujących efekt Warburga oraz mała toksyczność względem komórek zdrowych. Badania przeprowadzone w Zakładzie Genetyki Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego wykazały brak mutagennych właściwości związku. Ponadto, analizy przeprowadzone na szczepach *Saccharomyces cerevisiae* ujawniły, że 3-BP nie jest substratem dla transporterów błonowych z rodziny PDR, które odpowiedzialne są za fenotyp oporności na wiele leków przeciwnowotworowych i przeciwgrzybiczych. Do tej pory przebadaliśmy 113 szczepów różnych gatunków grzybów pod względem ich wrażliwości na działanie 3-BP. Szczególnie wrażliwe okazały się szczepy *Cryptococcus neoformans*. Spośród 38 różnych gatunków tylko *C. neoformans* i *C. gattii* są gatunkami patogennymi. Kryptokokoza wywoływana przez te patogeny stanowi powszechny problem szczególnie istotny dla pacjentów z immunosupresją i jest jedną z częstszych przyczyn zgonów chorych na AIDS. Odsetek przypadków śmiertelnych kryptokokozy u pacjentów po przeszczepie lub z nowotworami układu krwiotwórczego sięga ponad 40%. W literaturze przedmiotu często zwraca się uwagę na brak skutecznej terapii w leczeniu ustrojowych zakażeń grzybiczych wywołanych przez szczepy wielolekooporne. Najczęściej stosowane są mało skuteczne leki azolowe oraz droga i wysoce nefro- i hepatotoksyczna amfoterycyna B.

Celem głównym projektu badawczego jest poznanie molekularnych przyczyn dużej wrażliwości patogennych grzybów z rodzaju *Cryptococcus* na działanie nowego, potencjalnego leku przeciwnowotworowego i przeciwgrzybicznego - 3-bromopirogronianu. Zbadane zostaną zmiany fizjologiczne i biochemiczne zachodzące pod wpływem działania związku, w komórkach grzybów należących do rodzaju *Cryptococcus*. W celu sprawdzenia czy istnieje korelacja pomiędzy odmienną wrażliwością różnych gatunków *Cryptococcus spp.* na działanie 3-BP a tempem akumulacji tego związku w komórkach, zostanie zbadana kinetyka jego transportu z wykorzystaniem 3-BP znakowanego izotopem <sup>14</sup>C. Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na zróżnicowaną wrażliwość grzybów jest odmienny poziom wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH). Tak więc zostanie porównany naturalny poziom GSH w komórkach różnych przedstawicieli *Cryptococcus spp.* oraz zbadany zostanie wpływ 3-BP na zmianę stężenia GSH w komórkach analizowanych szczepów, przy równoczesnej kontroli przeżywalności komórek w każdym punkcie czasowym. Ponadto, zamierzeniem projektu jest również identyfikacja transporterów 3-BP, a także innych krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych w komórkach *C. neoformans* i *C. gattii*. W pierwszej kolejności zostaną przeprowadzone badania *in silico* w celu odnalezienia sekwencji nukleotydowych kodujących potencjalne transportery wykazujące konserwatywną konstrukcję aminokwasową charakterystyczną dla grupy transporterów Jen1. Następnie zbadana zostanie zmiana ekspresji analizowanych genów pod wpływem inkubacji w obecności 3-BP. Kolejnym etapem będzie przeprowadzenie heterologicznej ekspresji wybranych genów w komórkach *S. cerevisiae Δjen1 Δady2* przy użyciu plazmidu p416-GPD. Szczep ten posiada delekcje dwóch genów kodujących najważniejsze drożdżowe transportery krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych. Dlatego, późniejsze określenie kinetyki transportu 3-BP i innych kwasów karboksylowych w komórkach uzyskanych transformantów zweryfikuje funkcje wprowadzonych genów. Ponadto, obecność lub brak transporterów analizowanych związków może determinować wrażliwość różnych szczepów na działanie fungicydów takich jak 3-BP.

Wyniki realizowanego projektu na poziomie badań podstawowych dostarczą nowych informacji na temat mechanizmów odpowiedzi komórkowej grzybów z rodzaju *Cryptococcus* na działanie 3-BP. Dokładne poznanie i zrozumienie zmian zachodzących w komórkach tego patogenu będzie cennym elementem pozwalającym na lepsze poznanie jego fizjologii i genetyki oraz może stanowić podstawę przyszłych badań, których celem jest stworzenie nowych leków i strategii leczenia kryptokokozy u ludzi. Ponadto, poszukiwanie substratów dla wybranych transporterów błonowych, które opisywane są jako potencjalne transportery kwasów karboksylowych. Tak więc jest to istotne nie tylko z punktu widzenia identyfikacji transportera dla 3-BP, ale również określenia niepoznanych dotąd funkcji tych białek.