

Enzymy cytoplazmatyczne patogennych drożdżaków z rodzaju *Candida*, „chałturzące” jako adhezyny na ścianie komórkowej – strukturalne podstawy nowej funkcji

Od ponad 20 lat wiadomo, że wiele białek „chałturzy” – pełni dodatkowe, często zgoła nieoczekiwane funkcje poza rolą główną, dobrze wcześniej znaną i ewolucyjnie konserwatywną. Wielofunkcyjność tych białek „chałturzących” (ang. *moonlighting proteins*) zależy od ich lokalizacji, stężenia ligandów, stanu oligomeryzacji czy tworzenia kompleksów z innymi białkami.

Duża i już „klasyczna” podgrupa białek chałturzących obejmuje białka pierwotnie wewnątrzkomórkowe, które pełnią dodatkową funkcję na powierzchni komórek. W wielu patogennych mikroorganizmach ta zewnątrzkomórkowa aktywność odgrywa kluczową rolę w infekcji, a zwłaszcza w procesie o krytycznym znaczeniu dla skutecznej kolonizacji organizmu gospodarza – adhezji, czyli wiązania się z komórkami gospodarza czy białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Zagadnienie adhezyjnej roli białek chałturzących jest dość dobrze rozeznane w odniesieniu do bakterii, ale patogenne grzyby są pod tym względem bardzo słabo scharakteryzowane. Szczególnie dotkliwie jest ubóstwo informacji na ten temat w przypadku drożdżopodobnych grzybów z rodzaju *Candida*, które powodują szereg chorób (kandydoz) o różnym nasileniu i podatności na leczenie, począwszy od stosunkowo niegroźnych infekcji powierzchniowych, aż po zagrażające życiu zakażenia ogólnoustrojowe. Kandydozy, zwłaszcza systemowe, stanowią aktualnie poważny problem medyczny, gdyż w ostatnich dekadach częstość ich występowania niebezpiecznie wzrosła.

Podstawą proponowanych badań jest hipoteza robocza, że określone enzymy pochodzenia cytoplazmatycznego, występujące na powierzchni drożdżaków *Candida*, posiadają cechy strukturalne, które odróżniają je od prekursorów, zlokalizowanych w cytoplazmie oraz determinują ich przypuszczalną dodatkową funkcję adhezyjną.

Celem proponowanych badań jest porównanie strukturalnych cech wybranych cytoplazmatycznych enzymów i ich form, występujących na powierzchni komórek i przypuszczalnie pełniących tam dodatkową funkcję adhezyn, z różnych gatunków drożdżaków *Candida*.

Proponowane badania przeprowadzone zostaną w sposób porównawczy na czterech gatunkach drożdżaków: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. glabrata* hodowanych w warunkach, do pewnego stopnia symulujących środowisko w miejscach infekcji. W tak hodowanych drożdżakach określony zostanie zestaw białek powierzchniowych, wśród których znajdują się enzymy pochodzenia cytoplazmatycznego, osadzone w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej i tam „chałturzące” w roli adhezyn. Spośród nich wybrane zostaną obiekty dalszych badań. Przede wszystkim, zostaną one wyizolowane ze ścian komórkowych drożdżaków i oczyszczone. Dalsze badania będą biegły w dwóch kierunkach:

- (i) na poziomie komórkowym, badania zmierzać będą do zaproponowania mechanizmów przenoszenia tych białek chałturzących z cytoplazmy i ich trwałego deponowania na powierzchni komórki;
- (ii) na poziomie cząsteczkowym, badania zmierzać będą do identyfikacji elementów struktury cząsteczek tych białek, odpowiedzialnych za dodatkową funkcję adhezyjną.

Do oczyszczania i chemicznej charakterystyki białek zastosowane zostaną techniki chromatografii wysokosprawnej. Spektrometria mas będzie nieodzowna w globalnych badaniach zestawów białek (proteomice) oraz identyfikacji subtelnych modyfikacji struktury białek, które mogą umożliwiać im chałturzenie na ścianie komórkowej. Do badań mocy i szybkości tworzenia kompleksów białek chałturzących z białkami gospodarza wykorzystane zostaną dwie zaawansowane metody fizyczne – pomiary rezonansu plazmonów powierzchniowych i pomiary polaryzacji fluorescencji. Metoda chemicznego sieciowania (ang. *cross-linking*) zastosowana zostanie do sodowania miejsc oddziaływania w kompleksach białko grzybowe-białko gospodarza. Przy użyciu bioinformatycznych programów do modelowania molekularnego białek, zaproponowane zostaną strukturalne modele tych kompleksów.

Proponowane badania poszerzą wiedzę na temat molekularnych mechanizmów kandydoz. Jest to tematyka bardzo aktualna i potrzebna z punktu widzenia medycyny, ze względu na ciągły wzrost częstości tych zakażeń w populacji ludzkiej obserwowany w ostatnich dziesięcioleciach. Wybrana tematyka badań jest też istotna dla pogłębienia wiedzy podstawowej o molekularnych podstawach funkcjonowania białek, gdyż białka chałturzące rzucają wyzwanie klasycznemu dogmatowi „jeden gen – jedno białko – jedna funkcja”.

Mimo że niniejsze badania są klasyfikowane jako badania podstawowe, mogą przyczynić się do odsłonięcia nowych celów dla nowatorskich strategii terapeutycznych i diagnostycznych.