

BUNKOVÁ STENA HÚB – VÝZVA PRE VÝSKUM NOVÝCH ANTIMYKOTÍK

MARIÁN MAZÁN^a, KATARÍNA MAZÁŇOVÁ^b
a VLADIMÍR FARKAŠ^a

^a Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, ^b Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovensko
Marian.Mazan@savba.sk

Došlo 10.10.05, prijaté 21.12.05.

Kľúčové slová: antimykotiká, huby, kvasinky, bunková stena

Obsah

1. Úvod
2. Vlastnosti a zloženie bunkovej steny kvasiniek
 - 2.1. β -1,3-Glukán
 - 2.2. β -1,6-Glukán
 - 2.3. Chitín
 - 2.4. Glykoproteíny
3. Záver

1. Úvod

Kvasinky sú huby patriace medzi najjednoduchšie eukaryotické organizmy na Zemi. Sú často využívané ako model pre štúdium rôznych životných procesov, ktoré prebiehajú aj u vyšších organizmov. Najčastejšie používaným experimentálnym modelom eukaryotickej bunky je askomycétna kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Tento jednobunkový chemoheterotrofny organizmus sa používa aj na štúdium biogenézy a funkcie eukaryotických organel.

Bunková stena je najvrchnejšia organela kvasinkovej bunky, udáva jej tvar a tvorí obal chrániaci bunku pred nepriaznivými vplyvmi životného prostredia. Z jej umiestnenia a zloženia vyplývajú mnohé dôležité úlohy. Jednou z hlavných funkcií okrem udržiavania tvaru bunky je jej nevyhnutnosť pri rozmnožovaní, keďže sféropasty (kvasinky s čiastočne odstránenou bunkovou stenou) nie sú schopné pučať a deliť sa. Bunková stena je nositeľom somatických antigénov a mediátorom interakcií bunky s okolím a inými bunkami rovnakého druhu, resp. s bunkami hostiteľa.

Poznanie zloženia a biosyntézy fungálnej bunkovej steny je dôležité z hľadiska boja proti najčastejšie sa vy-

skytujúcim patogénom, akými sú napr. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus*. Je dokázané, že biosyntéza β -1,3-glukánu a chitínu sú esenciálne exocelulárne enzýmové pochody a keďže sa ani jedna z týchto zložiek nenachádza v bunkách cicavcov a rastlín, sú unikátnym terčom pre výskum a vývoj nových antimykotík. Nové špecifické liečivá by mohli byť z tohto dôvodu menej toxické pre cicavčí a rastlinný organizmus. V poslednej dobe sa rapídne zvýšil počet imunokompromitovaných pacientov, či už HIV-pozitívnych, po transplantácii orgánov, alebo po dlhotrvajúcej liečbe antibiotikami, ktorí potrebujú liečbu antimykotikami. Bežnými kvasinkovými ochoreniami, ktoré trápia populáciu, sú povrchové a systémové infekcie. Vznikajú na vlhkých miestach ako napríklad medzi prstami nôh (atletické chodidlo). Ťažší priebeh s ohrozením života majú invazívne fungálne ochorenia vnútorných orgánov.

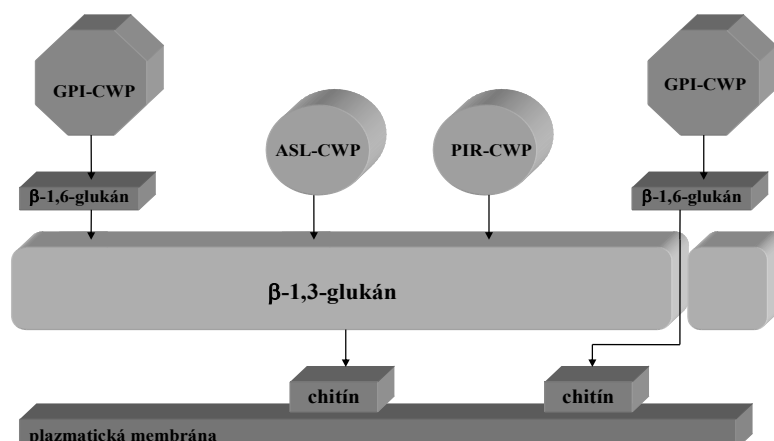
Štúdiom bunkovej steny kvasiniek môžeme získať cenné znalosti o jej presnejšom zložení, biosyntéze a funkciách. V posledných desaťročiach sa získalo mnoho poznatkov o enzýmoch a mechanizmoch biosyntézy polymérnych prekurzorov fungálnych bunkových stien. Najviac poznatkov o zložení a biosyntéze bunkovej steny húb je známych u *Saccharomyces cerevisiae* a ľudských patogénov *Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*.

Tieto znalosti sa zúročili a na trhu pre použitie v humánnej medicíne sa už objavil prvý špecifický antifungálny prostriedok Candidas inhibujúci biosyntézu polysacharidu β -1,3-glukánu.

2. Vlastnosti a zloženie bunkovej steny kvasiniek

Bunková stena húb vrátane kvasiniek je masívna povrchová štruktúra, ktorá poskytuje fyzikálnu a osmotickú ochranu bunky. Hrá tiež úlohu pri sexuálnom rozpoznaní medzi bunkami opačného párovacieho typu, flokulácii, sporulácii, odpovedi na stres a je sprostredkovateľom kontaktu medzi patogénnou hubou a hostiteľským organizmom. Z celkovej hmotnosti bunky zaberá približne 25 %. Je esenciálna pre rozmnožovanie buniek; bunky zbavené bunkovej steny už nie sú schopné konjugácie, ani cytokinézy. Bunková stena je komplexom makromolekúl, ktoré obalujú bunku z vonkajšej strany až k plazmatickej membráne, teda zahŕňa i periplazmatický priestor¹. Bunková stena kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pozostáva hlavne z β -1,3-glukánu, β -1,6-glukánu, chitínu a glykozylovaných proteínov. Na obr. 1 sú znázornené jednotlivé komponenty bunkovej steny a ich vzájomné väzby.

Pozorovaním pod elektrónovým mikroskopom bola určená hrúbka vnútornej elektrónovo transparentnej vrstvy, ktorá je približne 70–100 nm. Jej hrúbka závisí od



Obr. 1. Schématické znázornenie zloženia bunkovej steny kvasiniek s vyznačením vzájomných kovalentných väzieb; GPI-CWP – proteíny bunkovej steny kovalentne zakotvené v bunkovej stene cez glykozylofosfatidylinozitolový zvyšok, PIR-CWP – kovalentne viazané proteíny bunkovej steny obsahujúce vnútorné opakujúce sa úseky aminokyselín, ASL-CWP – kovalentne viazané proteíny cez alkalicky citlivú väzbu. Disulfidové väzby medzi proteínmi nie sú znázornené

rastových podmienok a genetického vybavenia bunky². Vnútrná vrstva zabezpečuje mechanickú odolnosť steny. Pozostáva hlavne z β -1,3-glukánovej siete a chitínu, a reprezentuje približne 50–60 % suchej hmotnosti steny (tab. I). Pozorovala sa aj vonkajšia elektrónovo hustá vrstva. Obsahuje viacnásobne glykozylované manoproteíny vyčnievajúce z povrchu bunky, ktoré majú okrem mnohých iných funkcií i úlohu v rozpoznávaní bunky inou bunkou. Vonkajšia vrstva obmedzuje priepustnosť cudzích enzýmov, akými sú napríklad obranné enzýmy v rastlinných tkanivách schopné degradovať bunkovú stenu³. Sacharidové bočné reťazce povrchových proteínov obsahujú viacnásobné fosfodiesterové mostíky, ktoré s voľnými karboxylovými skupinami proteínov prispievajú k početným negatívnym nábojom na bunkovom povrchu pri fyziologickej hodnote pH (cit.⁴). Tieto bočné manánové

reťazce sú zodpovedné za hydrofilné vlastnosti steny a mohli by sa zúčastňovať pri zadržiavaní vody a ochrane pred vysychaním. Vonkajšia proteínová vrstva zaberá okolo 1/3 zo suchej hmotnosti bunkovej steny. Proteíny bunkovej steny sú kovalentne viazané k β -1,3-glukán – chitínovej sieti buď priamo cez alkalicky citlivú väzbu – ASL (alkali sensitive linkage) proteíny, alebo nepriamo cez β -1,6-glukán glykozylofosfatidylinozitolovú (GPI) kotvu.

Navyše proteíny bunkovej steny môžu byť navzájom kovalentne viazané disulfidovými mostíkmi. Okrem toho niektoré proteíny sú zadržiavané v bunkovej stene iónovými a neiónovými interakciami⁵.

Po prenesení kvasiniek do hypertonického prostredia môžu bunky stratiť až 60 % ich pôvodného objemu. Tento proces je vratný. Pružnosť bunkovej steny je pravdepodob-

Tabuľka I
Zloženie bunkovej steny v *Saccharomyces cerevisiae*⁶

Makromolekula	Hmotnosť sušiny [%]	Miesto syntézy	Základná forma	
			SP	vetvenie
Manoproteíny	35–40	Sekrečná cesta	200 ^a	vysoké
β -1,6-Glukán	5–10	(PM)?	140	vysoké
β -1,3-Glukán	50–55	PM	1500	stredné
Chitín	1–2	PM	190 ^b	lineárny

^a N – viazané; ^b chitín zo zárodočnej jazvy; bunková stena známeho patogéna *Candida albicans* má podobné zloženie; SP – stupeň polymerizácie, PM – plazmatická membrána; miesto syntézy β -1,6-glukánu nie je dostatočne preukázané; údaje tu prezentované sa môžu líšiť v závislosti na rastových podmienkach

ne výsledkom vlastností β -1,3-glukánových reťazcov. Pružnosťou steny sa vysvetľuje, prečo je stena živých buniek omnoho viac priepustná ako izolované bunkové steny, ktoré sú priepustné pre molekuly do 720 kDa. Permeabilita steny živých buniek je omnoho vyššia pre molekuly s väčšou molekulovou hmotnosťou hlavne za hypotonických podmienok a tiež závisí od rastových podmienok⁷.

2.1. β -1,3-Glukán

Hlavnou zložkou vnútornej vrstvy bunkovej steny je β -1,3-glukán, ktorý formuje mikrofibrilárnu kostru, cez ktorú sú naviazané ostatné zložky. Je zodpovedný za mechanickú pevnosť bunkovej steny a najčastejšie sa farbí špecificky s anilínovou modrou. β -1,3-Glukán patrí do takzvanej „rodiny dutej závitnice“, inými slovami má tvar porovnateľný s pružinou, ktorá môže existovať v rôznych stavoch predĺženia. V bunkách zo stacionárnej fázy rastu β -1,3-glukán obsahuje okolo 1500 glukózových jednotiek a je vo vode nerozpustný. Určenie stupňa polymerizácie závisí od veľkej miery od typu kyseliny použitej na jeho extrakciu. Všeobecne stupeň polymerizácie sa mení od podmienok prostredia, od rastovej fázy a zdroja uhlíka⁸. V stacionárnej fáze rastu bunky je β -1,3-glukán mierne rozvetvený a obsahuje okolo 3–4 % β -1,6-viazaných glukózových zvyškov. Aj počet vetvených β -1,6-glukánových zvyškov závisí od rastových podmienok.

Mierny stupeň vetvenia v β -1,3-glukánových molekulách kvasiniek zo stacionárnej fázy predchádza rozsiahlej kryštalizácii, ktorá bola pozorovaná na povrchu regenerujúcich sa protoplastov. Údaje z röntgenovej analýzy izolovaných bunkových stien potvrdili nízku úroveň vetvenia kryštalického β -1,3-glukánu. Molekuly β -1,3-glukánu sú navzájom spevnené množstvom slabých vodíkových väzieb, ktoré umožňujú stabilnú štruktúru závitnic i trojrozmernej siete. Fibrily β -1,3-glukánu v izolovaných bunkových stenách už nie sú schopné sa predĺžiť, kým póry v glukánovej vrstve živej bunky sú schopné sa rozšíriť, čo umožňuje priepustnosť vnútornej vrstvy i pre menšie molekuly proteínov.

V kvasinkách sa našli dva β -1,3-glukánsyntázové komplexy, ktoré obsahujú buď Fks1p alebo Gsc2/Fks2p katalytickú podjednotku v závislosti od rastovej fázy a podmienok prostredia a regulačnú podjednotku Rho1p, ktorý viaže GTP. Súčasná delécia oboch β -1,3-glukán syntáz je letálna. Tieto proteíny s viacnásobnými transmembránovými doménami sú preto nepostrádateľné pre syntézu β -1,3-glukánu. Zodpovedné gény sú dobre konzervované vo všetkých hubách³. Je všeobecne známe, že Fks1p a Gsc2/Fks2p reprezentujú katalytické podjednotky, hoci im chýba typické UDP-Glc viažuce miesto (K/RXGG) nájdené v glykogénsyntáze a v α -1,3-glukánsyntáze u *Schizosaccharomyces pombe*.

Doteraz nie je dostatočne preukázané, či rast β -1,3-glukánových reťazcov v kvasinkách prebieha na ich redukujúcom, alebo neredukujúcom konci. U huby *Sclerotium rolfii* bolo zistené, že β -1,3-glukán sa predlžuje na nere-

dukujúcom konci. Ten istý predpoklad je tiež u bakteriálnej celulózy, chitínu z rias a galakturonanu z rastlín. Z toho vyplýva, že redukujúci koniec predlžujúceho sa reťazca by mohol byť ihneď dostupný pre spojenie s ďalšími zložkami bunkovej steny.

Ďalšie enzýmy potenciálne zapojené v syntéze β -1,3-glukánovej siete sú Gas1p endotransglykozidáza, ktorá štiepi a znovuprestavuje β -1,3-glukánové reťazce⁹, Bgl2p, endotransglykozidáza, ktorá štiepi β -1,3-glukán a zavádza vo vnútri reťazca β -1,6-väzby¹⁰, a podobnú funkciu by mohli mať tiež enzým Crh1p (cit.11) a niektoré enzýmy z rodiny SUN (cit.12).

Použitie inhibitorov β -glukánsyntáz vedie k morfológickému poškodeniu bunkovej steny. Najznámejšie inhibitory sú glykolipid papulakandín a lipopeptidy echinokandín a pneumokandín nekompetitívne inhibujúce β -1,3-glukánsyntázu¹³. Z tejto triedy prešiel všetkými klinickými skúškami derivát echinokandínu B₀, ktorý firma Merck ponúka pod obchodným názvom Candidas[®]. Je účinný hlavne tam, kde sa už vyčerpali všetky možnosti liečby klasickými antimykotikami a jeho použitie je sprevádzané iba s minimálnym vplyvom nežiaducich účinkov na pacienta v porovnaní s klasickými antimykotikami.

2.2. β -1,6-Glukán

β -1,6-Glukán je značne vetvený, vo vode rozpustný polymér, ktorý obsahuje priemerne okolo 130–150 glukózových jednotiek. Nie je známe, či β -1,6-glukán je syntetizovaný ako vo vode nerozpustný polymér podobne ako β -1,3-glukán, alebo vo vode rozpustná vetvená molekula β -1,3- / β -1,6-glukánu ako u *Sclerotium rolfii*. Považuje sa za kľúčový komponent, pretože navzájom viaže ostatné zložky bunkovej steny. V bunkovej stene slúži na spájanie GPI viazaných proteínov s β -1,3-glukánom a chitínom. V stresových podmienkach výstavby bunkovej steny, kedy prebieha zvýšená syntéza chitínu, slúži ako akceptorové miesto pre novo vznikajúci chitín¹⁴. Bolo objavených niekoľko génov, ktoré ovplyvňujú hladinu β -1,6-glukánu¹⁵. Rôzne proteíny lokalizované v endoplazmatickom retikule, Golgiho aparáte a na povrchu steny silne ovplyvňujú obsah β -1,6-glukánu v bunkovej stene.

Montijn a spol. (1999)¹⁶ neobjavili žiadny intracelulárny β -1,6-glukán použitím protilátok označených koloidným zlatom, naopak vezikuly plazmatickej membrány a izolovaná bunková stena reagovali veľmi silno. Toto zistenie bolo nedávno potvrdené, pretože sa prvýkrát úspešne stanovila enzýmová aktivita β -1,6-glukánsyntázy *in vitro* v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*¹⁷. Jednotlivé kroky biosyntézy β -1,6-glukánu nie sú doteraz vyriešené, preto stále nepoznáme odpoveď, aký je enzýmový mechanizmus jeho tvorby.

2.3. Chitín

Chitín sa vyskytuje vo forme lineárnych reťazcov v chitínovom kruhu okolo krčku pukov, v okolí zárodočnej

jazvy i v primárnom septe. Približne 10 % z jeho celkového množstva je rovnomerne rozptýlené po celom obvode steny bunky¹⁸. Chitín izolovaný zo zárodočných jaziev obsahuje približne 200 *N*-acetylglukózamínových monomérov viazaných β -1,4-glykozidovou väzbou, ale nie je známe, či tento počet platí i pre chitín v obvodovej stene. Calcofluor white je fluorescentné aniónové farbivo, ktoré sa prednostne viaže na β -1,4-glukopyranózové reťazce, nachádzajúce sa v chitíne, chitosane a celulóze. V menšej miere sa viaže aj na β -1,3-glukány. V *Saccharomyces cerevisiae* sa často používa na vizualizáciu chitínu. Chitín primárneho septa sa vyskytuje predovšetkým v kryštalickej forme, zatiaľ čo amorfný podiel je viazaný v komplexe s glukánom a proteínmi v obvodovej stene.

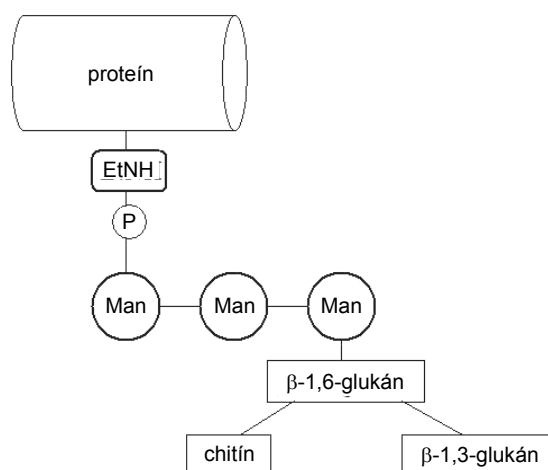
Za normálnych podmienok dochádza k rozloženiu chitínu v obvodovej stene po cytokinéze s výsledným obsahom 0,1–0,2 % v obvodovej stene a 1–2 % v jazvičkách. V bunkách s geneticky zoslabnutou stenou alebo ako odpoveď bunky na poškodenie vonkajšími vplyvmi sú chitínsyntázy zapojené v záchrannom mechanizme a obsah chitínu môže presiahnuť až 20 % zo suchej hmotnosti steny¹². Zvýšený obsah chitínu má aj aberantná bunková stena vytvorená počas regenerácie kvasinkových protoplastov.

Syntéza chitínu prebieha pomocou viacerých chitínsyntáz. Najlepšie preštudované sú Chs1p, Chs2p a Chs3p, ktoré sú prísne regulované¹⁸. Rýchlosť syntézy nie je rovnaká v priebehu bunkového cyklu. Je najvyššia v štádiu tesne pred pučaním a počas tvorby primárneho septa. Chitínsyntázy húb sú procesné enzýmy s rozpoznávacou oblasťou D,D,D,QRRRW (cit.¹⁹). U riasy rozsievky chitínsyntáza predlžuje rastúci chitínový reťazec na neredukujúcom konci použitím UDP-GlcNAc ako substrát. Za predpokladu, že sa fungálne chitínsyntázy správajú podobne, redukujúci koniec chitínového reťazca je priamo k dispozícii pre spojenie na akceptorové miesta β -1,3- a β -1,6-glukánov, keď prejdú cez póry plazmatickej membrány.

Najznámejšie kompetitívne inhibitory chitínsyntáz sú nikkomycín a polyoxín, ktoré sa zatiaľ v klinickej medicíne nepoužívajú²⁰.

2.4. Glykoproteíny

Glykozylované manoproteíny tvoria vonkajšiu vrstvu bunkovej steny. Biotinylácia neporušených buniek s použitím sulfátovaných derivátov biotínu, ktorý neprechádza cez plazmatickú membránu, je vhodným nástrojom pre rozlíšenie medzi autentickými stenovými a cudzorodými proteínmi²¹. Manoproteínová vrstva je omnoho menej priepustná pre makromolekuly ako vnútorná fibrilárna vrstva. Je to prevažne zapríčinené prítomnosťou dlhých a veľmi vetvených bočných sacharidových reťazcov, ktoré sú viazané *N*-glykozidovou väzbou na asparagínový zvyšok proteínu a početnými disulfidovými mostíkmi v proteínoch. Serínové a treonínové zvyšky proteínu môžu niesť krátke *O*-glykozidovou väzbou viazané oligomanozylové reťazce. Vďaka fosfodiesterovým mostíkom v oboch *N*-



Obr. 2. Schématické znázornenie väzby GPI proteínu na glukánový matrix

a *O*-viazaných manozylovaných bočných reťazcoch má bunkový povrch kvasiniek množstvo negatívnych nábojov²². Citlivosť kvasiniek na antifungálny rastlinný proteín osmotin, ktorý má vysoký izoelektrický bod, takže je pozitívne nabitý pri fyziologickom pH, závisí od prítomnosti manozylových fosfátových skupín na bunkovom povrchu²³. Fosfodiesterové skupiny môžu byť zviditeľnené použitím farbiva Alcian Blue.

Poznáme dve hlavné skupiny proteínov, ktoré sú kovalentne viazané na polysacharidy bunkových stien. GPI-CWP (glycosylphosphatidylinositol-anchored covalently linked cell wall protein) sú proteíny kovalentne nepriamo viazané na β -1,3-glukán cez β -1,6-glukánový bočný reťazec glykozylfosfatidylinozitolovou (GPI) kotvou, ako je znázornené na obr. 2. Druhou skupinou sú ASL-CWP (alkali sensitive linkage).

V genóme *Saccharomyces cerevisiae* bolo identifikovaných približne 60–70 GPI-proteínov²⁴. Približne 40 z nich majú miesto určenia plazmatickej membrány, kým ostatné po odštiepení z plazmatickej membrány sa cez ich cukorný zvyšok stanú kovalentne viazané na β -1,6-glukán²⁵. Tieto proteíny často obsahujú opakujúce sa oblasti bohaté na serín a treonín a sú vysoko *O*- a *N*-glykozylované. Najlepšie preštudovaným GPI-CWP je Sag1p, ktorý je zapojený v sexuálnom rozmnožovaní²⁶. Dozreté proteíny majú iba časť z pôvodnej GPI-kotvy, ktorá je ukotvená v plazmatickej membráne a celá štruktúra pozostáva z: NH₂-Proteín-CO-NH-(CH₂)₂-P₁-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6myo-Inozitol-P₁-Glycerol-acyly mastných kyselín. Základné jadro tohto zvyšku je tvorené etanolamín-P₁-(Man)₃- a je pravdepodobne substituovaný pridaním etanolamín fosfátových skupín²⁷. Zistilo sa, že β -1,6-glukán po extrakcii horúcou octovou môže obsahovať nepatrné množstvo galaktózy. Jej prítomnosť v bunkovej stene *Saccharomyces cerevisiae* je

v súlade s dôkazom UDP-galaktózového transportéra v droždi²⁸. Niektoré GPI-proteíny sa tiež uvoľňujú použitím slabých zásad. Z toho vyplýva, že by sa mohli viazať priamo na β -1,3-glukán cez alkalicky citlivú väzbu.

ASL-CWP (alkali sensitive linkage) sú proteíny kovalentne viazané na glukánovú sieť cez doteraz neidentifikovanú „alkalicky citlivú väzbu“, pretože sa izolujú použitím miernych alkálií.

Hlavnou skupinou sú PIR-CWP (Proteins with internal repeats covalently linked cell wall proteins) proteíny pravdepodobne priamo viazané na β -1,3-glukán. Typ väzby môžeme hypoteticky predpokladať, keďže PIR proteíny sa uvoľňujú z bunkovej steny pôsobením miernych alkalických roztokov, sú vysoko *O*-glykozylované a podľa spôsobu izolácie sa mení ich stupeň glykozylácie. PIR proteíny majú vo svojej aminokyselinovej sekvencii pravidelne sa opakujúce oblasti s vysokým zastúpením glutamínu, podľa čoho je odvodení i ich názov.

U. S. cerevisiae bola objavená rodina štyroch takýchto proteínov: Pir1p, Pir2/Hsp150p, Pir3p a Pir4/Cis3p (cit.²¹). Ich aminokyselinová sekvencia je podobne organizovaná. Hlavné charakteristiky proteínov Pir sú: a) syntéza ako pre-pro peptidy a ich pro úsek proteínu je odštiepený serínovou proteázou v Golgiho aparáte, b) ich aminokyselinová sekvencia obsahuje signálny peptid, Kex2 miesto, nasledujú opakujúce sa regióny obsahujúce glutamín a vysoko konzervovaný karboxy-koniec so štyrmi cysteínovými zvyškami, ktoré sa označujú ako cysteínová doména²⁹. Tieto proteíny boli lokalizované v bunkovej stene imunologicky³⁰.

U niektorých ďalších proteínov, ako napríklad Pau1p a jeho homológov a Sps100p sa predpokladá, že prispievajú k dozretiu steny dcérskej bunky, rovnako ako proteín Ygp, ktorý je indukovaný pri nedostatku živín.

Expresia génov PIR je zvýšená v podmienkach stresu bunkovej steny, čo by mohlo znamenať, že môžu byť zapojené v procese spevnenia bunkovej steny. Vyštiepenie všetkých štyroch génov PIR1, PIR2, PIR3 a PIR4 spôsobilo zoslabnutie bunkovej steny, kvasinky mali zväčšený objem a rástli o niečo pomalšie. Tiež boli viac citlivé na farbivá Calcofluor white a Congo red, čo naznačuje, že bunková stena bola skutočne zoslabnutá³¹. Je pozoruhodné, že pri nadexprimovaní génu PIR2 sú bunky viac odolné na rastlinný antifungálny proteín osmotin, pričom ak bunkám súčasne chýbajú gény PIR1, PIR2 a PIR3, tak sú na tento proteín viac citlivé. Rozdielna odolnosť na osmotin sa pozorovala iba na bunkách s neporušenou bunkovou stenou, pretože po vytvorení sféroplastov boli všetky rovnako citlivé. Preto sa predpokladá, že Pir-CWP spôsobujú menšiu priepustnosť osmotínu a iných proteínov.

Ďalšou skupinou patriacou do tejto triedy sú proteíny, ktoré sa síce uvoľňujú v mierne alkalickom prostredí, ale nemajú opakujúce sa aminokyselinové sekvencie charakteristické pre proteíny PIR. V tejto skupine sa doteraz identifikovali tieto stenové proteíny: Scw4p-b-1,3-glukanáza, Scw10p-b-1,3-glukanáza (rodina glukozylhydroláz 17) a Tos1p.

Stenové proteíny, ako napríklad Bar1 proteáza, Aga2p aktívna podjednotka sexuálneho aglutinínového

Tabuľka II
Známe a zaujímavé vlastnosti proteínov bunkovej steny⁶

Funkcia	Gény
<i>Prítomnosť mananových reťazcov</i>	CCW12, YDR134C
Priepustnosť bunkovej steny	
Zadržiavanie vody	
<i>Adhézia</i>	
Párenie	SAG1, AGA1, AGA2, FIG2
Flokulácia	FLO1, FLO5, FLO9, FLO10
Invazívny pseudohýfalny rast	FLO11
Tvorba biofilmu	FLO11
<i>Procesy v bunkovej stene</i>	
Prestavba glukanu	CRH1, CRH2, CRR1, FIG2 (špekulatívne), BGL2
Bunková separácia	EGT2, PRY3, CTS1, DSE2, DSE4, SCW11
Zpevnenie bunkovej steny	CWP1, PIR1, PIR2/HSP150, PIR3, PIR4/CIS3
<i>Izotropický rast</i>	PIR1, PIR2/HSP150, PIR3, PIR4/CIS3
<i>Rastové podmienky</i>	
Sporulácia	SPO1
Stacionárna fáza	SED1, SPI1
Anaerobický rast	DAN1, DAN4, TIP1, TIR1-4
Nízka teplota	TIP1, TIR1, TIR2, TIR4
<i>Metabolizmus</i>	
Esteráza	TIP1
<i>Absorbcia železa</i>	FIT1, FIT2, FIT3

komplexu v MAT_a bunkách, Pir4/Cis3p a niektoré potenciálne známe glykanázy bunkovej steny ako napríklad San4/Scw3p, môžu byť získané z intaktných buniek použitím redukujúcich činidiel. To nás vedie k predpokladu, že by mohli byť disulfidovo viazané na iné proteíny bunkovej steny. Redukujúcimi činidlami by sa mohli uvoľňovať i rozpustné intermediátne formy GPI-CWP.

Okrem vyššie spomenutých metód sa na izoláciu stenových proteínov používa extrakcia s SDS, pri ktorej sa uvoľní množstvo proteínov. Avšak iba dva proteíny transglukozidáza Bgl2p a chitináza Cts1p izolované touto metódou sú pravé stenové proteíny. Zvyšok proteínov nachádzajúcich sa v extrakte sú kontaminanty z membránových fragmentov³².

Proteíny rodiny Hsp (heat shock protein), početné glykolytické enzýmy ako Tdh1-3p, sa často nachádzajú na povrchu stien. Dajú sa extrahovať s merkaptotetanolom

v slabo alkalickom roztoku. Z toho vyplýva, že sú buď zachytené vo vnútri stien, alebo iónovo viazané na proteíny bunkového povrchu. Pravdepodobne pochádzajú z lyzovaných buniek, alebo ako sa často tvrdí, sú exportované nekonvenčným sekrečným mechanizmom³³. Hsp boli tiež nájdené v médiu regenerujúcich sa sféroplastov.

Proteíny bunkovej steny môžu mať rôzne funkcie, ktoré sú zhrnuté v tabuľke II. V mnohých prípadoch ich presná funkcia nie je známa.

3. Záver

Napriek novým publikovaným výsledkom o povahe a tvorbe bunkovej steny, stále ostáva veľa nevyriešených otázok. Medzi ne patrí: *i*) identifikácia štruktúry a jednotlivých väzieb medzi zložkami bunkovej steny; *ii*) stanovenie, izolácia a analýza štruktúry enzýmov, ktoré sa zúčastňujú posledných krokov biosyntézy bunkovej steny t.j. enzýmov, ktoré katalyzujú tvorbu väzieb medzi jednotlivými „stavebnými blokmi“ z vonkajšej strany plazmatickej membrány; *iii*) zistenie, ako sú jednotlivé gény zapojené do tvorby bunkovej steny, ako sa vzájomne ovplyvňujú a ako je ich expresia koordinovaná pôsobením špecifických kultivačných podmienok.

Zatiaľ, čo existujúce antimykotiká boli objavené viac menej náhodne, antimykotiká novej generácie budú navrhované na základe poznania štruktúry enzýmov podieľajúcich sa na biosyntéze bunkovej steny. Súčasná metóda proteomiky umožňujú izolovať jednotlivé enzýmy, exprimovať ich v dostatočnom množstve a vyriešiť štruktúru ich aktívnych centier. Pomocou kvantovo-chemických výpočtov sa na základe trojrozmernej štruktúry komplexov enzýmov so substrátom navrhnu mimetiká tranzitných stavov, ktoré by mohli účinkovať ako ireverzibilné inhibítory enzýmov. Je teda možné *in silico* projektovať štruktúry látok schopných nevratne interagovať s aktívnym centrom príslušného enzýmu a vyradiť ho z činnosti.

Novou metódou je i analýza génovej expície húb po vystavení účinku antimykotík, ktorá by mohla byť kľúčom k nájdeniu účinných a selektívnych inhibítorov procesov biosyntézy bunkovej steny. Rovnako je dôležité prihliadať i na možný vznik rezistencie na inhibítory neskôr využívané ako antimykotiká v humánnej medicíne.

LITERATÚRA

1. Arnold W. N.: *The Yeasts*. Academic Press, New York and London 1990.
2. Osumi M.: *Micron* 29, 207 (1998).
3. De Nobel H., van den Ende H., Klis F. M.: *Trends Microbiol.* 8, 344 (2000).
4. Jigami Y., Odani T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 335 (1999).
5. Rast D. M., Baumgartner D., Mayer Ch., Hollestein G. O.: *Phytochemistry* 64, 339 (2003).
6. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S.: *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 239 (2002).
7. De Nobel J. G., Barnett J. A.: *Yeast* 7, 313 (1991).
8. Cabib E., Drgoňová J., Drgoň T.: *Annu. Rev. Biochem.* 67, 307 (1998).
9. Popolo L., Vai M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 385 (1999).
10. Goldman R. C., Sullivan P. A., Zakula D., Capobianco J. O.: *Eur. J. Biochem.* 227, 372 (1995).
11. Garcia-Rodriguez L. J., Duran A., Roncero C.: *J. Bacteriol.* 182, 2428 (2000).
12. Mouassite M., Camougrand N., Schwob E., Demaison G., Laclau M., Guerin, M.: *Yeast* 16, 905 (2000).
13. Beauvais A., Latgé J. P.: *Drug Resist. Update* 4, 1 (2001).
14. Kollár R., Reinhold B. B., Petráková E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgoňová J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E.: *J. Biol. Chem.* 272, 17762 (1997).
15. Shahinian S., Bussey H.: *Mol. Microbiol.* 35, 477 (2000).
16. Montijn R. C., Vink E., Muller W. H., Verkleij A., van den Ende J., Henrissat H. B., Klis F. M.: *J. Bacteriol.* 181, 7414 (1999).
17. Vink E., Rodriguez-Suarez R. J., Gerard-Vincent M., Ribas J. C., de Nobel H., van den Ende H., Duran A., Klis F. M., Bussey H.: *Yeast* 21, 1121 (2004).
18. Cabib E., Roh D. H., Schmidt M., Crotti L. B., Varma A.: *J. Biol. Chem.* 276, 19679 (2001).
19. Saxena I. M., Brown R. M.: *Cellulose* 4, 33 (1997).
20. Herrera R. J., San-Blas G.: *Curr. Drug Targets Infect Disord.* 3, 77 (2003).
21. Mrša V., Seidl T., Gentzsch M., Tanner W.: *Yeast* 13, 1145 (1997).
22. Jigami Y., Odani T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 335 (1999).
23. Ibeas J. I., Lee H., Damsz B., Prasad D. T., Pardo J. M., Hasegawa P. M., Bressan R. A., Narasimhan M. L.: *Plant J.* 23, 375 (2000).
24. Caro L. H., Tettelin H., Vossen J. H., Ram A. F., van den Ende H., Klis F. M.: *Yeast* 13, 1477 (1997).
25. Hamada K., Fukuchi S., Arisawa M., Baba M., Kitada, K.: *Mol. Gen. Genet.* 258, 53 (1998).
26. Chen M. H., Shen Z. M., Bobin S., Kahn P. C., Lipke P. N.: *J. Biol. Chem.* 270, 26168 (1995).
27. Imhof I., Canivenc-Gansel E., Meyer U., Conzelmann A.: *Glycobiology* 10, 1271 (2000).
28. Kainuma M., Chiba Y., Takeuchi M., Jigami Y.: *Yeast* 18, 533 (2001).
29. Yin Q. Y., Groot P. W. J., Dekker H. L., Jong L., Klis F.M., Koster Ch. G.: *J. Biol. Chem.* 280, 20894 (2005).
30. Kapteyn J. C., Hoyer L. L., Hecht J. E., Muller W. H., Andel A., Verkleij, A. J., Makarow M., Van Den Ende H., Klis F. M.: *Mol. Microbiol.* 35, 601 (2000).
31. Mrša V., Tanner W.: *Yeast* 15, 813 (1999).
32. Klis F. M., De Groot P., Hellingwerf, K.: *Med. Mycol.* 39, 1 (2001).
33. Delgado M. L., O'Connor J. E., Azorin I., Renau-Piqueras J., Gil M. L., Gozalbo D.: *Microbiology* 147, 411 (2001).

M. Mazáň^a, K. Mazáňová^b, and V. Farkaš^a
(^a *Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava,* ^b *Institute of Biochemistry and Genetics of Animals, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovakia*): **Fungal Cell Wall – Challenge for the Search of New Antimycotics**

The microorganism cell wall is a solid but dynamic structure, which is essential for the life of cells in a chang-

ing environment. Chemical composition of the fungal cell wall differs from those of surface structures of mammalian cells and plant cell walls; hence, the fungal cell wall is an ideal target organelle for a new generation of more efficient and less toxic antimycotics. For that reason it is important to know the composition of fungal cell wall, how its components are synthesized and how their biosynthesis is regulated. The review summarizes the present state of knowledge of the yeast cell wall and its biosynthesis.