

VAISTAI NUO MIKROSKOPINIŲ GRYBŲ I DALIS. MIKROSKOPINIŲ GRYBŲ LĄSTELĖS STRUKTŪRA, FUNKCIJA IR VAISTŲ VEIKIMO TAIKINIAI. LITERATŪROS APŽVALGA

Algimantas Matusevičius, Marija Ivaškienė, Vytautas Špakauskas
Lietuvos veterinarijos akademija, Neužkrečiamųjų ligų katedra, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;
tel.(8~37) 36 30 41; el. paštas: amatusевичius@lva.lt

Santrauka. Šiame straipsnyje apibendrinti ir susisteminti literatūros duomenys apie patogeninių grybų ląstelės struktūrą, funkciją ir joje esančius jautrius vaistams nuo mikroskopinių grybų taikinius. Skirtingai nuo bakterijų, grybų ir žinduolių ląstelės yra eukariotai, todėl grybų ir žinduolių ląstelės yra panašios molekulinio lygiu ir baltymų sinteze. Šis panašumas sukelia vaistų nuo grybų toksinį poveikį žinduoliams (gyvūnams). Esminis skirtumas tarp grybo ir žinduolio ląstelių yra tas, kad grybo ląstelė turi sienelę, o gyvūno ląstelė sienelės neturi, jos citoplazma apsupta plazminės membranos. Šis skirtumas sudarė galimybę atlikti kryptingus tyrimus modifikuojant jau žinomas vaistines medžiagas ar sintetinant naujus vaistus, kurie veiktų tik mikroskopinio grybo ląstelės sienelėje vykstančius procesus, bet neveiktų žinduolių ląstelių. Nustačius grybo ląstelės sienelėje daug jautrių taikinių ir vis dar ieškant naujų, sukurta keletas vaistinių medžiagų, efektyviai gydančių sergančius grybų sukeltomis ligomis, ir yra mažai arba visai netoksiškų gyvūnui.

Grybo ląstelės sienelė yra svarbus struktūrinis vienetas, užtikrinantis ląstelei mechaninį tvirtumą ir saugumą. Ji yra struktūriškai unikali – sudaryta iš glikoproteinų, polisacharidų (gliukano ir chitino), kurie, persipindami tarpusavyje formuoja sudėtingą tinklą, atliekantį ląstelės sienelės struktūrinio pagrindo funkciją.

Pagrindinis plazminės membranos komponentas ir jautrus taikinyvas vaistams yra ergosterolis, nuo jo kiekio priklauso grybo ląstelės vientisumas ir patvarumas. Jo sintezė sudėtinga, apima keletą etapų, joje dalyvauja daug fermentų, ji vyksta mevalonato keliu. Kadangi ergosterolio sintezėje dalyvauja fermentai, buvo nustatyta ir susintetinta keletas vaistinių medžiagų, kurios inaktyvuoja kai kuriuos fermentus vykdančius ergosterolio sudėtinių dalių sintezę sienelėje. Ergosterolio sintezėje dalyvaujančius fermentus slopina azolai, alilaminai, tiokarbamatai, morfolinai.

Kito svarbaus grybo sienelės komponento beta gliukano sintezėje dalyvauja fermentas beta gliukano sintazė. Nustačius beta gliukano sintazės inhibitorius, atrasta ir susintetinta nauja echinokandinų ir pneumokandinų vaistų nuo mikroskopinių grybų grupė. Šiuo metu atliekami tyrimai ieškant naujų medžiagų, kurios inaktyvuoja kitus fermentus, dalyvaujančius ergosterolio, beta gliukanų, chitino ir kitų grybo ląstelės sienelės komponentų sintezėje.

Vaistų nuo grybų veikimas, vartojimas bus aprašyti kitame šio žurnalo numerio apžvalginiam straipsnyje.

Raktažodžiai: grybo ląstelė, jautrūs taikiniai, vaistų veikimas.

ANTIFUNGAL DRUGS

PART I. FUNGAL CELL STRUCTURE, FUNCTION AND SUSCEPTIBLE TARGETS FOR ANTIFUNGAL AGENTS. REVIEW

Algimantas Matusevičius, Marija Ivaškienė, Vytautas Špakauskas
Department of Non-Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, , Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania,
tel +370 37 36 30 41; e-mail: amatusевичius@lva.lt

Summary. The aim of this review is to discuss the critical points of current knowledge about pathogenic fungi cell structure, function and susceptible targets for antifungal agents. Unlike bacteria, both fungi and mammalian are eukaryotic cells. Thus, fungal and mammalian cells are comparable at the molecular level and protein synthesis function. However, the antifungal agents develop a toxic effect on mammalian cells. The main difference between fungal and mammalian cells is that animal cells do not have a cell wall, they are enclosed by a plasma membrane, and fungal cell has a cell wall, which is an obvious target for antifungal agents. Cellular differences between fungal and mammalian cells gave the opportunity to modify well-known or design new antifungal agents, that would kill off the fungal organism without dangerous effects on the host. The identification of new susceptible targets in fungal cell lead to development of effective and less toxic to the host antifungals. The fungal cell wall is a dynamic organelle that must provide the cell with sufficient mechanical strength. Fungal cell wall is structurally unique, is comprised of glycoproteins and polysaccharides, mainly glucan and chitin, which are cross-linked together to form a complex network, which forms the structural basis of the cell wall. Ergosterol is an essential component of the fungal cell membrane, required to maintain cellular rigidity and integrity. Ergosterol biosynthesis pathway is a specific branch of the mevalonate pathway and is fungal-specific and unique, there are several enzymatic steps that are attractive targets for antifungal drugs. Azoles, allilamines, thiocarbamates and morpholines inhibit the synthesis of ergosterol. Since the (1,3)- β -glucan structure is not found in mammalian cells, enzyme (1,3)- β -glucan synthase has become a target for echinocandins and pneumocandins. The search for new antifungal drugs and strategies, that will focus on inhibition of ergosterol, glucan, chitin synthesis and more targets, continues. Antifungal agents, their mode of action and application will be reviewed in the next edition.

Key words: fungal cell, susceptible targets, the mode of action of antifungal drugs.

Įvadas. Patogeninių grybų ląstelės struktūros, funkcijos, jautrių grybo vietų, veikiamų vaistinių medžiagų, žinojimas svarbus veikimo mechanizmui suprasti ir naujų vaistų paieškai bei kūrimui. Išaiškinus vis daugiau jautrių grybo ląstelėje taikinių ir nustačius jų jautrumą vaistams, susidaro galimybės kurti naujos kartos vaistus. Per pastaruosius dešimtmečius modifikuojant esamų vaistų nuo mikroskopinių grybų cheminę struktūrą, susintetinta naujų vaistinių medžiagų arba net surasta naujų vaistų grupių, veikiančių patogeninius grybus. Daugiausia pasiekta modifikuojant triazolų struktūrą, sintetinant naujos kartos bistriazolus (Gallagher et al., 2004; Cleary et al., 2005). Sukurta daug vaistinių medžiagų grybo sienelėje slopinančių gliukano, chitino, taip pat ergosterolio sintezę pirmuose ir vėlesniuose jo susidarymo etapuose (Ernst et al., 2002; Higashiyama, Kohno, 2004; Raasch, 2004).

Darbo tikslas. Straipsnyje apžvelgsime ir susisteminsime literatūros duomenis apie grybų ląstelės struktūrą, funkciją, joje esančius jautrius taikinius vaistams nuo mikroskopinių grybų. Pateikti duomenys padės geriau suprasti vaistų veikimą, vykdyti kryptingą sintezę bei esamų vaistinių medžiagų modifikavimą kuriant efektyvesnius ir gyvūnui netoksiškus vaistus.

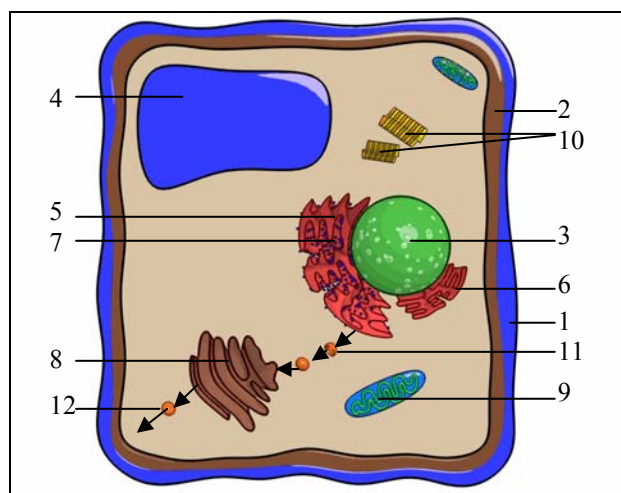
Grybų karalystei (*Fungi* arba *Mycota*) priklauso heterotrofiniai organizmai. Jie gali būti vienaląsčiai (mielės) arba daugialąsčiai. Tai primityvūs augalai, kurie neturi chlorofilo ir maisto medžiagas gauna egzistuojdami kaip saprofitai ar parazitai. Skirtingai nuo tam tikrų bakterijų ir augalų-autotrofų, jiems reikia iš anksto suformuotų organinių junginių – energijos šaltinio ir anglies šaltinio ląstelių struktūrų sintezei. Grybas sudarytas iš daugybės siūlų, vadinamų hifais, kurie jungiasi į siūlų tinklą ir sudaro micelį, arba grybieną. Hifai pasižymi viršūniniu augimu ir šoniniu šakojimusi. Dažnai grybiena išplinta dideliame substrato plote ir visu paviršiumi siurbia maisto medžiagas. Kai kurių grybų atstovų hifai yra vienaląsčiai, neturi pertvarų, turi daug branduolių. Daugelio grybų hifai turi pertvaras arba septas, ir kiekviena ląstelė turi po branduolį. Pertvaros viduryje yra anga arba pora, pro kurią juda citoplazma (Lipke, Ovalle, 1998; Kendrick, 2001; Carlile et al., 2001).

Mikroskopiniai grybai yra eukariotai, nes turi branduolį su chromosomomis ir DNR. Grybo ir žinduolio ląstelės turi panašią DNR replikaciją ir baltymų sintezę. Patogeninių grybų ir žinduolių ląstelių panašumas sudaro kliūtis kuriant naujus vaistus, nes dėl šio panašumo vaistai toksiški gyvūnui. Pirmieji vaistai, nors ir efektyvūs gydant sergančius gyvūnus nuo grybų sukeltų ligų, dėl panašaus poveikio žinduolių ląstelėms yra toksiški, todėl jų vartojimas ribotas (De Pauw, 2000; Slavin et al., 2004).

Skirtingai nuo žinduolių ląstelių grybų ląstelė turi sienelę. Gyvūnų ląstelės sienelės neturi, turi tik išorinę plazminę membraną, padengtą glikokaliksu. Šio esminio skirtumo pagrindu tyrinėjant grybo ląstelės sienelės struktūrą buvo atrasti jautrūs vaistams nuo grybų taikiniai. Vaistai turi veikti tik grybo ląstelę ir nedaryti įtakos žinduolių ląstelėms. Grybai naudojami kaip modeliniai organizmai studijuojant ląstelės ir genų struktūrą bei funkciją. Tyrinėjant *Sacharomyces cerevisiae* nustatyta, kad ne tik daugelis genų, bet ir žinduolių bei grybų ląstelių funkcijos

yra panašios (Kapteyn et al., 1996; Kendrick, 2001).

Grybo ląstelės struktūra. Grybo ląstelės citoplazmoje, kurią supa plazminė membrana, yra branduolys, endoplazminis tinklas su ribosomomis, Goldžio aparatas, mitochondrijos, vakuolės, daug intarpų, glikogeno, baltymų grūdelių (1 pav.). Ląstelės supa tvirta išorinė sienelė, kurioje yra chitino, gliukanų, sterolių, baltymų ir kitų medžiagų. Išaiškinus grybo ląstelės sienelėje jautrius vaistams taikinius, atsirado galimybė vykdyti kryptingą vaistų sintezę. Vaistai turi veikti tik grybo ląstelės sienelėje jautrius taikinius, bet neturi toksiškai veikti žinduolių. Žinduolių ląstelės neturi išorinės sienelės ir tokių ląstelių vaistai veikti neturi.

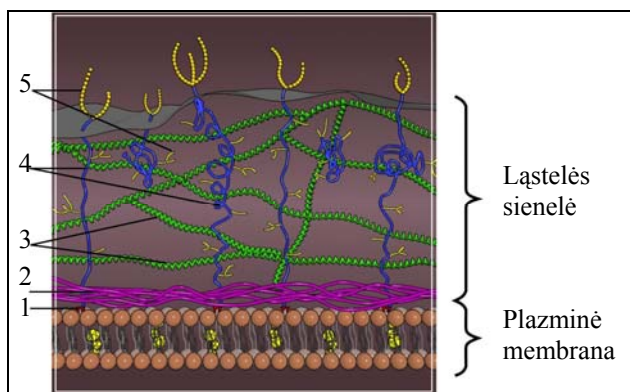


1 pav. **Grybo ląstelė** (Matusevičius A., Ivaškienė M., Špakauskas V., 2008)

1. Ląstelės sienelė 2. Plazminė membrana 3. Branduolys 4. Vakuolė 5. Šiurkštusis endoplazminis tinklas 6. Lygusis endoplazminis tinklas 7. Ribosomos 8. Goldžio kompleksas 9. Mitochondrija 10. Mikrovamzdeliai 11. Transportinė pūslelė 12. Sekretinė pūslelė

Ląstelės sienelė. Mikroskopinio grybo ląstelės sienelė (2 pav.) yra dinaminė struktūra, nuolat atstatoma ir rekonstruojama pagal momento poreikius (Adams, 2004). Sienelė gali sudaryti 30 ar daugiau nuošimčių ląstelės svorio. Ji palaiko grybo formą, saugo ląstelę nuo osmosinio slėgio pokyčių ir kito neigiamo aplinkos poveikio, leidžia grybo ląstelei bendrauti su aplinka. Ląstelės paviršiaus biomolekulės atsakingos už grybų prisitvirtinimą prie įvairiausių paviršių. Ląstelės sienelė pasižymi imunogeninėmis savybėmis. Joje esantys fermentai skaido dideles molekules, tokias kaip baltymai, polisacharidai ir lipidai, kad aprūpintų ląstelę maisto medžiagomis. Grybo ląstelės sienelės struktūra ir biosintezė yra unikalios, todėl jų supratimas atvers kelią naujiems efektyviems vaistams sukurti (Cabib et al., 2001).

Didžiąją ląstelės sienelės dalį sudaro polisacharidai. Mažiau yra baltymų, lipidų, pigmentų ir neorganinių druskų. Nekovalentinėmis jungtimis, daugiausia hidrofobinėmis vandenilio, taip pat ir kovalentinėmis jungtimis, šie komponentai yra susijungę į nuoseklią struktūrą. Taigi sienelė yra trimatė struktūra, atliekanti daugelį funkcijų.



2 pav. Grybo ląstelės sienelės sandara (Matusevičius A., Ivaškienė M., Špakauskas V., 2008)

1. GPI jungtis 2. Chitinas 3. Gliukanas 4. Baltymai 5. Oligosacharidai.

Struktūriškai grybo ląstelės sienelė sudaryta iš dviejų sluoksnių – išorinio mannoproteinų ir vidinio polisacharidų. Struktūriniai polisacharidai chitinas ir gliukanas sudaro mikrofibrilių pluoštus, užtikrinančius ląstelės tvirtumą. Ištirta, kad net 20 proc. viso *Saccharomyces* rūšies atstovo genomo yra įtraukta į ląstelės sienelės biosintezės procesą (Durán, Nombela, 2004). G. Lesage ir H. Bussey (2006) nustatė 135 genus, reguliuojančius (1,3)- β -gliukano sintezę. Tai įrodo sienelės ir jos sudėtinųjų dalių svarbą grybo egzistavimui. *S. cerevisiae* ląstelės sienelės makromolekulių sudėtis: baltymai – 35–40 proc. sienelės sausojo svorio, (1,3)- β -gliukanas – 50–55 proc., (1,6)- β -gliukanas – 5–10 proc., chitinas – 1–2 proc. (Kapteyn et al., 1997; 1999).

Chitinas. Grybo sienelėje chitiną (2 pav.) sudaro ilgas angliavandenio polimeras, randamas ir vabzdžių, vorų bei kitų nariuotakojų egzoskelete. Chitinas suteikia kietumo, palaiko ploną grybo ląstelių struktūrą, sudarytas iš (1,4)- β -N-acetil-D gliukozaminų liekanų ir kovalentinėmis jungtimis jungiasi su (1,3)- β -gliukanu ir (1,6)- β -gliukanu (Klis et al., 2002).

Žinomos trys chitino kristalinės formos (alfa, beta ir gama). Grybų sienelės struktūroje egzistuoja alfa forma, kuri sudaro dvigubą spiralę ir yra palaikoma vandenilinėmis jungtimis. Ši struktūra labai panaši į celiuliozės. Nors chitinas sudaro nedidelę sienelės dalį (1–2 proc. mielių sienelės sausojo svorio, 10–20 proc. siūlinių grybų sienelės sausojo svorio), jis yra labai svarbus grybo sienelės komponentas (Klis, 1994; De Nobel et al., 2000; Klis et al., 2002). Chitino kristalinis polimeras turi didelę tempimo jėgą, todėl palaiko ląstelės sienelės vientisumą. Sutrikus chitino sintezės procesui, sienelės struktūra suyra, ląstelė praranda formą ir tampa osmotiškai nestabili (Bago et al., 1996). Už chitino sintezės procesą atsakingas plazminės membranos fermentas – chitino sintazė. Šis fermentas paverčia uridindifosfato-N-acetilgliukozaminą (UDF-N-acetilgliukozaminą) į N-acetilgliukozaminą, kuris patenka į besiformuojančią chitino grandinę. Chitino polimerų ilgėjimas vyksta per vektorinę sintezę, susidarę grandys išstumiamos per plazminę membraną į ekstraląstelinį tarpą. Vandenilio jungtys tarp naujai susi-

formavusių chitino polimerų dalyvauja susidarant mikrofibrilėms. Susintetintos chitino grandinės išsidėsto greta plazminės membranos (2 pav.). Šis chitino sintezės procesas vyksta ląstelės aktyvaus augimo zonose, ląstelės atkūrimo vietose (po pažeidimo), mielių – pumpuravimosi vietose (Bowman et al., 2006). **Dėl struktūrinio vientisumo, kurį chitinas užtikrina ląstelės sieniei, jis yra puikus taikynys vaistams nuo mikroskopinių grybų.** Geriausi žinomi chitino sintezės slopikliai yra natūraliai aptinkami nikkomicinai ir polioksina. Jie yra chitino sintazės substrato UDF-N-acetilgliukozamino analogai, todėl veikia kaip konkurenciniai chitino sintazės slopikliai (Hector, Schaller, 1992; Lagoja, 2005).

Gliukanas (2, 5 pav.), sudaro daugiau nei pusę (50–60 proc.) sausojo sienelės svorio (Fleet, 1991; Wills et al., 2000). Priklausomai nuo grybo rūšies 65–90 proc. viso gliukano sudaro (1,3)- β -gliukanas, o kiti gliukanai [(1,4) beta (1,6) beta ir (1,3) alfa] sudaro mažesnę kiekį (Bernard, Latge, 2001; Grun et al., 2005).

(1,3)- β -gliukano grandinė, turinti 1500 gliukozės monomerų polimerizacijos laipsnį, atitinka tuščiaavidurės spiralės formą, suteikiančią elastingumo ir tempimo jėgos ląstelės sieniei (Klis et al., 2002). Polimerizacijos mastas priklauso nuo aplinkos sąlygų, augimo fazės ir anglies poreikio. Gliukozės monomerai yra susijungę į linijinį polimerą per 1,3 jungtis ir turi 3–4 proc. atsitiktinai (maždaug prie kas 40–50 gliukozės monomero) išsidėsčiusių (1,6)- β -gliukozės liekanų (5 pav.). (1,3)- β -gliukanas randamas beveik visų mikroskopinių grybų sienelėje, išskyrus zigomicetų (*Zygomycota*) hifų sienelės (Barreto-Bergter, Gorin, 1983). (1,3)- β -gliukanas sintetinamas plazmos membranoje su (1,3)- β -gliukano sintazės fermento pagalba ir per membranos poras išskiriamas į tarpuląstį (Inoue et al., 1996). Kadangi vaistai nuo grybų prisijungia tik prie (1,3)- β -gliukano, kuris yra grybo ląstelės sienelėje, ir jį veikia, o žinduolių ląstelėse (1,3)- β -gliukano nėra, prie gyvūnų ląstelių šie vaistai negali prisijungti ir jiems yra netoksiški. (1,3)- β -gliukano sintezę reguliuoja fermentas 1,3- β -gliukano sintazė. **(1,3)- β -gliukano buvimas grybo ląstelės sienelėje ir jo nebuvimas žinduolių ląstelėse daro jį puikiu vaistams nuo grybų taikiniu.** (1,3)- β -gliukano grandinė turi kelis neredukuojančius galus, prie kurių prisijungia (1,6)- β -gliukanas ir chitinas. Kai chitinas prisijungia prie (1,3)- β -gliukano, šis tampa netirpus šarmuose ir taip paaiškina šarmuose tirpių ir šarmuose netirpių (1,3)- β -gliukano molekulių egzistavimą grybo ląstelės sienelėje (Kollár et al., 1995).

(1,6)- β -gliukano molekulė yra palyginti maža, ją sudaro apie 350 gliukozės liekanų (Klis et al., 2002). Ląstelės sienelėje (1,6)- β -gliukanas sudaro tik 5 proc. visų sienelės komponentų. Šio gliukano struktūra yra amorfinė, ir jis atlieka klijų vaidmenį, – lanksčiai kovalentinėmis jungtimis sujungia (1,3)- β -gliukaną su chitinu ir mannoproteinais (Kollár et al. 1997; Kapteyn et al., 1997; 1999).

(1,3)- α -gliukanas randamas daugelio mikroskopinių grybų sienelėje ir sudaro 9–46 proc. sausojo sienelės svorio. Alfa gliukano sluoksnio struktūra panaši į fibrilių pluoštą, gretimą plazminei membranai ir, manoma, jis

atlieka pagrindinį struktūrinį vaidmenį stiprinant bazinį grybo sienelės sluoksnį. Lyginant su (1,3)- β -gliukanu, kuris būtinai ląstelės morfologijai ir vientisumui palaikyti, alfa gliukano reikšmė nepakankamai aiški (Dekker et al., 2007). Elektroniniu mikroskopu nustatyta, kad alfa gliukanas egzistuoja kaip fibrilinis sluoksnis, padengtas beta gliukano sluoksniu. Pastebėta, kad dimorfinių grybų *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* ir *B. brasiliensis* virulentiškumas turi tiesioginį ryšį su alfa gliukanu. 35–45% mielinių grybų sienelės angliavandenių turi alfa gliukano. Kai šie grybai egzistuoja nevirulentinės micelinės formos, alfa gliukano sienelėje jų beveik nerandama (Hogan, Klein, 1994). Manoma, kad alfa gliukanas turi įtakos grybo virulentiškumui (Kügler et al., 2000).

Elektroniniu mikroskopu nustatyta, kad grybo ląstelės sienelės komponentai yra susidėję į sluoksnių struktūrą, kur (1,3)- β -gliukanas formuoja tankiai persipynusių mikrofibrilių vidinį sluoksnį, virš jo – (1,6)- β -gliukano sluoksnis ir glikoproteinų sluoksnis (Osumi, 1998). Chitinas, gliukanas ir glikoproteinai tarpusavyje susijungę kovalentinėmis jungtimis (Hartland et al., 1994). Glikoproteinai su (1,6)- β -gliukanu susijungia glikozilo fosfatidilo (GPI) jungtimi (4 pav.).

Glikoproteinai. Išorinis grybo sienelės sluoksnis yra baltymai, kurie sudaro 30–50 proc. sienelės sausojo svorio (Fleet et al., 1991; Brown, Catley, 1992). Didesnę baltymų dalį sudaro glikoproteinai, nes sienelės baltymų polipeptidinės grandinės yra kovalentiškai susijungusios su oligosacharidų grandinėmis. Oligosacharidai keičia baltymų fizikines ir chemines savybes, stabilizuoja jų konformaciją, saugo nuo proteolizės. Ląstelės baltymų funkcija yra palaikyti ląstelės formą, tarpininkauti ląstelei judant ir prisitvirtinant, apsaugoti nuo pašalinių agentų, kontroliuoti medžiagų patekimą, perduoti intraląstelinius signalus iš išorinių stimuliatorių, sintezuoti ir tvarkyti sienelės komponentus.

Mikroskopinio grybo ląstelės šiuo atveju endoplazminiame tinkle esančios ribosomos (1 pav.) sintetina baltymus. Baltymai N gale turi signalinę seką (trumpa aminorūgščių seka), kuri nukreipia baltymą į paskirties vietą. N galo signalinė seka nurodo, kad sintetinas polipeptidas, atsiskykęs nuo ribosomos, pateks į endoplazminį spindį. Endoplazminio tinklo spindyje modifikuojamas naujai susintetintas baltymas. Čia pašalinama signalinė seka iš karboksi grupės pusės (C gale), susiformuoja atitinkama erdvinė polipeptido struktūra, susidaro disulfidiniai ryšiai, glikozilinami baltymai. Prie baltymų prisijungia viena arba keletas sacharidinių grupių. Prie baltymo aminorūgšties asparagino (Asn) amino grupės (NH_2) prijungiamas pirminis oligosacharidas $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Taip formuojami N-glikozilinti baltymai. Prie aminorūgščių, turinčių OH grupę (Ser, Thr, Tyr), kovalentinėmis jungtimis prijungiamos cukrų molekulės, formuojančios O-glikozilintą glikoproteiną. Baltymų glikozilinimą katalizuoja fermentas transferazė, esantis endoplazminio tinklo spindžio paviršiuje. Iš endoplazminio tinklo pernašos pūslelės susidariusius glikoproteinus perneša į Goldžio kompleksą, kur oligosacharidinės grandinės galutinai glikozilinamos (1 pav.). Goldžio komplekse glikoproteinai rūšiuojami, paruošiami sekrecijai pro plazminę ląstelės

membraną ir integravimui į sienelės struktūrą (Lesage, Bussey, 2006). Pagal tai, kaip baltymai tvirtinami ląstelės sienelėje, jie skirstomi į dvi grupes – GPI-baltymai ir Pir-baltymai (4 pav.). GPI-baltymai C gale turi glikozilo fosfatidilinozitolio (GPI) jungtį, kuri prijungiama endoplazminiame tinkle. *S. cerevisiae* genome nustatyta apie 60–70 tokių baltymų (Caro et al., 1997). Maždaug 40 jų yra tiesiogiai prisijungę prie plazminės membranos, tuo tarpu likusieji kovalentinėmis jungtimis sujungti su (1,6)- β -gliukanu (Fujii et al., 1999; Kollar et al., 1997). Genų, koduojančių GPI jungties biosintezės komponentus, mutacija *Neurospora crassa* grybelyje sukelia fenotipo iškrypimą ir ląstelės lizę. Tai įrodo baltymų GPI jungties reikšmę tinkamai ląstelės sienelės funkcijai (Bowman et al., 2006).

Sudėtingą GPI struktūrą sudaro manozės ir gliukoza-mino liekanos, sujungtos su inozitol- PO_4 -lipidiniu komponentu, vadinamu fosfatidilinozitoliumi, ir visa tai jungiama prie baltymo C galo per fosfoetanolamino grupę. GPI jungia baltymą prie plazminės membranos riebalų rūgščių (Klis et al., 2002; De Groot et al., 2003). Pir baltymai (pasikartojantys struktūriniai baltymai) turi 19 aminorūgščių sekų pasikartojimus ir yra tiesiogiai sujungti su sienelės (1,3)- β -gliukanu per šarmams jautrią deguonies jungtį. Šie baltymai neturi C galo sekos GPI jungčiai prijungti (Klis et al., 2002).

Plazminė membrana. Grybo plazminę membraną sudaro dviejų lipidų sluoksniai. Lipidų amfipatinės molekulės sudarytos iš hidrofilišios dalies, atsisukusios į membraną išorę, ir hidrofobišios dalies, atsisukusios į dvisluoksnio vidų. Hidrofobišios lipido dalis yra membranos viduje, dažniausiai sudaryta iš įvairaus ilgio nešakotų angliavandenių grandinės (2, 3 pav.). Steroliai yra neatsiejami plazminės membranos struktūriniai ir reguliaciniai komponentai. Jie taip pat yra steroidinių hormonų pirmtakai, atsakingi už grybo micelio dalijimąsi (Mysyakina, Funtikova, 2007). Steroliai yra cikliniai dariniai, kurių struktūros pagrindą sudaro steranas – perhidrofenantreno ir ciklopentano kondensacijos produktas. Sterolių molekulėje prie C-3 atomo yra prijungta -OH grupė. Ergosterolis yra galutinis sterolių biosintezės produktas grybo ląstelėje. Jis įeina į visų grybo ląstelės organelių membranų sudėtį, bet didžiausi jo kiekiai aptinkami plazminėje membranoje. Ergosterolis atsakingas už tokias struktūrinės membranos savybes kaip konsistencija ir pralaidumas, kaip ir cholesterolis žinduolio ląstelėje. Ergosterolis skiriasi nuo cholesterolio (6 pav.) dvigubų jungčių išsidėstymu ties C-7,8 žiedo struktūroje ir ties C-22 šoninėje grandinėje, taip pat metilo grupės buvimu ties C-24 šoninėje grandinėje (Daum et al., 1998).

Be sterolių, grybų ląstelės membraną sudaro fosfolipidai, riebalų rūgštys ir sfingolipidai – tipiniai eukariotinės ląstelės komponentai.

Ergosterolio molekulė ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$) membranoje orientuota taip, kad jos nedidelė polinė dalis – hidroksilo grupė – sąveikautų su polinėmis fosfolipidų hidrofilišios dalies galvutėmis. Plokšti steroidiniai žiedai įsiterpia tarp fosfolipidų hidrofobišios grandinės (3 pav.). Ergosterolis tarsi užpildo tarpus, todėl membrana pastorėja, mažėja laidumas ir judrumas. Įsiterpęs ergosterolis keičia fosfolipidų

riebalų rūgščių grandinių išsidėstymo kampus. Membrana tampa mechaniškai tvirtesnė. Svarbiausia ergosterolio funkcija membranoje – reikiamos konsistencijos palaikymas. Jei membrana labiau suskystėtų, ji negalėtų atlikti apsaugos, selektyvaus pralaidumo funkcijų. Ergosterolis membraną sutirština iki reikiamo lygio (Wills et al., 2000). Grybų ląstelėse steroliai egzistuoja dviejų formų: laisvieji steroliai ir sterolių esteriai. Steroliai gaminami lygiajame endoplazminiame tinkle, tačiau jų pernešimo mechanizmas iš sintezės vietos į membraną nėra iki galo išaiškintas. Manoma, kad sterolių judėjimas iš endoplazminio tinklo į membraną vyksta vezikuliniu (su sekretinių pūslelių pagalba) arba nevezikuliniu (su baltymų – nešiklių pagalba) keliu (Schulz, Prinz, 2007).

Ergosterolio sintezė. Ergosterolio biosintezės kelias apima daugiau kaip 20 metabolinių reakcijų. Jo biosintezės kelias ir vaistų veikimo vietos į ergosterolio sintezę pateikti 7 pav. Jame pavaizduota sutrumpinta versija to, kas bendrai vadinama mevalonato, arba izoprenoido, keliu. Beveik visose gyvo organizmo ląstelėse veikia mevalonato kelias (Goldstein, Brown, 1990). Juo vyksta ergosterolio sintezė. Jis susijęs su lipoproteinų sinteze, elektronų transportu bei ląstelių proliferacija. Pradiniam ergosterolio biosintezės etape dalyvaujant fermentams iš acetyl-CoA pasigamina mevalonato rūgštis, iš pastarosios – skvalenas. Veikiant fermentui skvaleno epoksidazei ir 2,3-oksidoskvaleno-lanosterolio ciklazei susintetinamas pirmasis sterolis – lanosterolis. Lanosterolį veikiant citochromo P450 lanosterolio 14- α -demetilazei ir kitiems fermentams susintetinama daug sterolių. Šio etapo pabaigoje veikiant C-22-desaturazei pasigamina ergostatetraenolis. Pastarąjį veikiant C-24-reduktazei susintetinamas ergosterolis (7 pav.). Grybo ląstelės plazminėje membranoje vienas pagrindinių sienelės komponentų yra ergosterolis, kurio sintezė grybo ląstelėje vyksta keliais etapais. Pažeidus ergosterolio sintezę, grybo ląstelė tampa jautri išorės veiksniams ir žūsta. Šiuo metu vaistų nuo mikroskopinių grybų sintezė nukreipta į ergosterolio sintezės slopinimą. Vaistai, slopinantys ergosterolio sintezę grybo ląstelės sienelėje, yra efektyvūs ir mažai toksiški gyvūnui. Tokiu veikimu pasižymi alilaminai, tiokarbamatai, azolai, morfolinai. Alilaminai ir tiokarbamatai (7 pav.) ergosterolio sintezę slopina pirmame jo susidarymo etape, tai yra inaktyvuojami fermentai, kurie būtini lanosterolio sintezei (Shilova et al., 2004). Azolai (imidazolai, triazolai) ergosterolio sintezę slopina saardydami citochromo P450 fermentą – lanosterolio 14- α -demetilazę (Georgopapadakou, Walsk, 1996). Morfolinai slopina du ergosterolio sintezės etapus, saardydami fermentus C-14-reduktazę ir C-8-izomerazę. Polienai tiesiogiai sujungia ergosterolį membranoje, dėl to membrana suyra ir ląstelės žūva. Sutrikus ergosterolio sintezei reikalingų fermentų veiklai, grybo ląstelės sienelėje kaupiasi skvalenas, fekosterolis ir kiti tarpiniai steroliai veikdami ląstelę toksiškai, o būtinajam ląstelės vientisumui palaikyti ergosterolio kiekis mažėja (Mercer, 1991; 1993; Oehlschlager, Czyzewska, 1992; Daum et al., 1998). Toliau tiriami ergosterolio sintezėje dalyvaujantys taikiniai – oksidoskvaleno-lanosterolio ciklazė ir C-24-metiltransferazė bei juos veikiančios medžiagos (Oehlschlager, Czyzewska, 1992; Jolidon et al.,

1993). **Pastarojo fermento neturi žinduolio ląstelės, dėl to jis yra ypatingo dėmesio centre.**

Sterolių biosintezės slopinimas daro įtaką ne tik šiame procese dalyvaujantiems fermentams, bet ir kitiems su plazmine membrana sujungtiems fermentams, atsiranda pakitimai membranos transporto sistemoje, kvėpavime, riebalų rūgščių sintezėje ir ląstelės morfologijoje. Kintant ląstelės morfologijai sienelė sustorėja, tarp sienelės ir citoplazminės membranos susidaro smulkios pūslelės, pūslelės turinys nusėda sustorėjusioje sienelėje. Nesiformuoja septos, suardomos endoplazminio tinklo ir mitochondrijų membranos, vyksta lipidinių granulių akumuliacija, padidėja ląstelės vakuolizacija (Hippe, 1991).

Kadangi ergosterolio sintezė vyksta keliais etapais, tai ir vaistų nuo mikroskopinių grybų veikimo mechanizmas yra skirtingas. Vieni vaistai slopina ergosterolio sintezę pradžioje, kiti – viduryje arba ergosterolio susidarymo pabaigoje. Gydomas vaistų poveikis priklauso nuo to, kokiame ergosterolio susidarymo etape jis efektyviausiai veikia. **Žinant grybo ląstelės struktūrą ir jos funkciją, galima atlikti kryptingą vaistų sintezę. Į vaisto cheminę struktūrą įjungiami tokie radikalai, kurie lengvai patenka į grybo sienelę ir slopina jautriausią ergosterolio sintezės etapą.** Ieškant naujų vaistinių medžiagų ir atliekant kryptingą sintezę svarbu žinoti ne tik mikroskopinių grybų ląstelės struktūrą, bet ir joje esančias jautriausias vietas, kurias vaistai gali veikti.

Kiti taikiniai. Fosfolipidų sintezė. Grybuose fosfolipidų sintezė vyksta panašiu keliu kaip ir žinduoliuose (Carman, Henry, 1989). Skirtumas tas, kad grybo ląstelėje fosfatidilserino biosintezė vyksta iš citidindifosfato-diacilglicerolio, o žinduolių – iš fosfatidiletanolamino ir serino (Georgopapadakou, Walsh, 1996).

Sfingolipidų sintezė. Grybų, taip pat ir žinduolių ląstelėse sfingolipidai išsidėsto išoriniame plazminės membranos sluoksnyje (Patton, Lester, 1991). Jie – būtini membranos komponentai, dalyvaujantys intraląstelinėse reakcijose – endocitozėje, apoptozėje, perduodant signalus. Sfingolipidai palaiko plazminės membranos tvirtumą, todėl būtini eukariotinės ląstelės augimui ir gyvybingumui palaikyti. Pirmasis jų biosintezės žingsnis yra palmitoil-CoA kondensacija su serinu. Šią reakciją katalizuoja serino palmitoiltransferazė. **Fermentas egzistuoja tiek grybų, tiek ir žinduolių ląstelėse, todėl nėra geriausias vaistų nuo grybų taikinis.** (Lester, Dickson, 1993). Didžiausią sfingolipidų dalį grybų plazminėje membranoje sudaro inozitolio fosforilkeramidai (IFK), sintetinami IFK sintazės. Tyrimai įrodė: IFK sintazė būtina kai kuriems grybams išgyventi. IFK sintazės neturi gyvūnų ląstelės, todėl jos slopikliai (inhibitoriai) gali būti naudojami kaip vaistinės medžiagos nuo grybų (Zhong et al., 2000).

Protonų ATF-azės. Plazminės membranos fermentas H⁺ATF-azė yra integrinis membranos baltymas (Monk, Perlin, 1994). Šis fermentas būtinas elektrocheminio protono gradientui ir intraląsteliniam pH palaikyti. Plazminės membranos H⁺ATF-azės detalios iširtos molekulinio lygiu, todėl gali būti vaistų nuo grybų taikiniu, nes yra skirtumas tarp grybo ir žinduolių fermentų (Georgopapadakou, Walsh, 1996; Wills et al., 2000).

Baltymai–nešikliai. Manoma, kad baltymai, esantys

Candida rūšies grybų struktūroje, atlieka „siurblių“ funkciją ir yra atsakingi už atsparumą azolams (Sasnauskas et al., 1992; Balzi, Goffeau, 1994). Šių baltymų funkcijos panašios į daugybinio atsparumo vaistams baltymus, apinkamus bakterijų, parazitų ir žinduolių ląstelėse. Pašalinus daugybinio atsparumo vaistams geną iš *C. albicans*, labai susilpnėjo jo virulentiškumas (Ben-Yaacov et al., 1995). Grybų ir žinduolių ląstelių baltymų sintezės polipeptidinės grandinės elongacijos reakcijoms reikalingi dviejų tirpių baltymų ir elongacijos faktoriai (EF-1 α ir EF-2). Tačiau grybams reikia dar vieno, papildomo, EF-3 elongacijos faktoriaus, kurio neturi žinduolių ląstelės (Georgopapadakou, Walsh, 1996). Šis 120-125 kDa dydžio baltymas randamas daugelyje grybų, įskaitant *C. albicans* ir *P. carinii*. Suardžius šio baltymo geną grybas žūva (Colthurst et al., 1991).

DNR ir topoizomerazės. Topoizomerazės I (TOP 1) ir II (TOP 2) yra fermentai, kontroliuojantys chromosomų replikaciją, transkripciją, rekombinaciją ir atsiskyrimą. Yra du topoizomerazių fermentai: TOP1, veikiantis vieną DNR grandinę, ir TOP2, veikiantis abi grandines (Stewart et al., 1998). TOP1 fermentas yra būtinas kai kurių grybų vystymuisi ir virulentiškumui palaikyti. Jo pašalinimas iš *C. albicans* sukėlė lėtą ląstelės augimą ir morfologinius pokyčius (Fostel et al., 1992; Fostel, Montgomery, 1995; Jiang et al., 1997). Fermento TOP1 genas turi daug sričių, kurių žinduolių transkriptonas neturi (Stewart et al., 1996). Topoizomerazių inhibitorių veikimo antibakteriniai ir chemoterapiniai vėžio tyrimai parodo, kad grybo topoizomerazės taip pat yra prieinami vaistų taikiniai. Kol kas nežinoma, ar mikroskopinio grybo topoizomerazė II skiriasi nuo žinduolių topoizomerazės, bet šiuolaikiniai tyrimai parodė, kad grybo topoizomerazė I jau gali būti selektyviai slopinama (Amaral, et al., 2005).

Virulentiškumo faktoriai. Patogeninių grybų virulentiškumo faktoriai geriausiai apibūdinti molekulinės genetikos metodais. Kuriant virulentiškumo slopiklius taikomi keli pagrindiniai principai. *C. albicans* infekcija prasideda pradine prisitvirtinimo faze, po kurios seka epitelinių ar endotelinių ląstelių invazija (Kennedy et al., 1992). *Candida* rūšys sugeba prisitvirtinti prie endotelinių ar epitelinių ląstelių paviršiuje esančio fibronektino ir prie tarpuląsčio baltymų (fibrinogeno, laminino, kolageno IV) subepiteliniuose ir subendoteliniuose audiniuose (Hostetter, 1994). Prisitvirtinimo molekulių, ypač turinčių baltymus su Arg-Gly-Asp aminorūgščių seka, blokas sumažina *C. albicans* invaziją audiniuose (Klotz et al., 1992). Fermento lakazės gaminamas melaninas yra svarbus patogeninio grybo *C. neoformans* virulentiškumo faktorius, taip pat ir kitų grybų, sukeliančių feohifomikozes (Liu et al., 1999). Ryšys tarp melanizacijos ir patogenezės dar nėra iki galo išaiškintas, bet dėmesys *C. neoformans* ir jo melanino gamybai turi dvi galimas naudas. Pirma, tai padės geriau išnagrinėti melanino funkciją ne tik *in vitro*, bet ir mielių ląstelėse, esančiose „šeimininko“ organizme. Antra, melanino molekulinės biologijos ir biocheminių savybių supratimas padės sukurti naujus vaistus nuo *C. neoformans* ir kitų grybų (Wills et al., 2000).

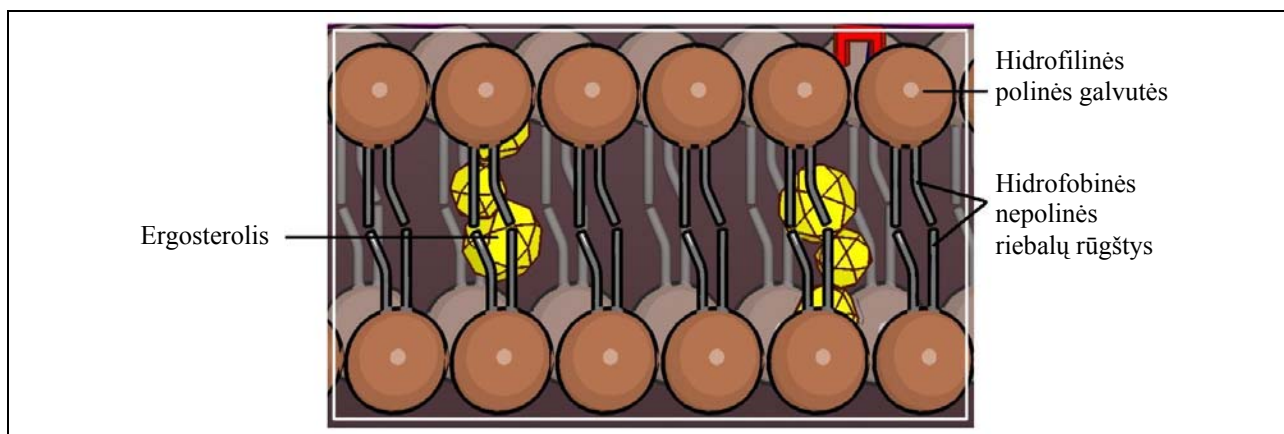
Manitolis. *C. neoformans* galimybė gaminti ir kaupiti manitolį turi įtakos patogeno atsparumui karščiui ir osmo-

siniam stresui (Chaturvedi et al., 1996). Manitolio biosintezės svarba patogeninio organizmo virulentiškumo paaiškinimui reikalauja tolimesnių tyrimų, kurie įgalintų kurti naujus vaistus nuo grybų.

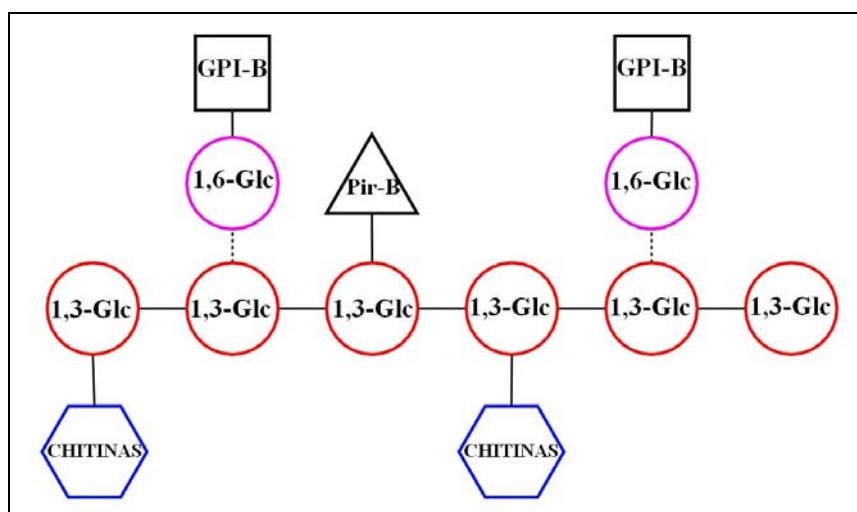
Fosfolipazės yra grupė fermentų, hidrolizuojančių esterines jungtis glicerofosfolipiduose. „Šeimininko“ ląstelės invaziją mikroorganizmais sudaro du etapai: prasiškerbimas ir išorinio ląstelės sluoksnio suardymas. Fosfolipazės yra įtrauktos į ardymo procesą, todėl padeda patogeniui prasiškerbti į šeimininko ląstelę (Ibrahim et al., 1995). Grybuose *C. albicans*, *C. glabrata*, *Penicillium notatum*, *A. fumigatus* ir *C. neoformans* aptiktos ekstraląstelinės fosfolipazės. Suardžius *C. albicans* fosfolipazės B geną (PLB), prisitvirtinimo mechanizmas nesutriko, bet sumažėjo galimybė grybui prasiškerbti į šeimininko ląstelę, susilpnėjo virulentiškumas pelėms (Leidich et al., 1998). Buvo nustatyti žinduolių fosfolipazių homologai, todėl terapijai turi būti parenkami selektyvūs vaistai.

Apibendrinant pateiktus literatūros duomenis galima pažymėti, kad grybo ląstelė panaši į žinduolio, bet turi ir esminių skirtumų. Ląstelės panašios molekulinio lygiu, turi panašią DNR replikaciją ir baltymų sintezę. Šis panašumas riboja vaistų nuo mikroskopinių grybų vartojimą, nes žinduoliams gali sukelti toksikozes. Esminis skirtumas tarp grybo ir žinduolio ląstelės yra šis: grybo ląstelė turi išorinę sienelę, o žinduolio – neturi. Šis skirtumas suteikė galimybę vykdyti kryptingus tyrimus modifikuojant jau žinomas vaistines medžiagas ar sintetinant naujus vaistus, kurie veiktų tik grybo ląstelėje vykstančius procesus, bet neveiktų žinduolių ląstelių. Nustačius grybo ląstelėje keletą jautrių taikinių ir vis dar ieškant naujų, sukurta keletas vaistinių medžiagų, kurios yra efektyvios gydant sergančius grybų sukeltomis ligomis ir mažai arba visai netoksiškų gyvūnui. Pagrindinis plazminės membranos komponentas ir jautrus taikinyms vaistams yra ergosterolis. Jo sintezė sudėtinga, kelių etapų, joje dalyvauja daug fermentų, ir vyksta mevalonato keliu. Ergosterolio sintezėje dalyvaujančius fermentus slopina azolai, alilaminai, tio-karbamatai, morfolinai.

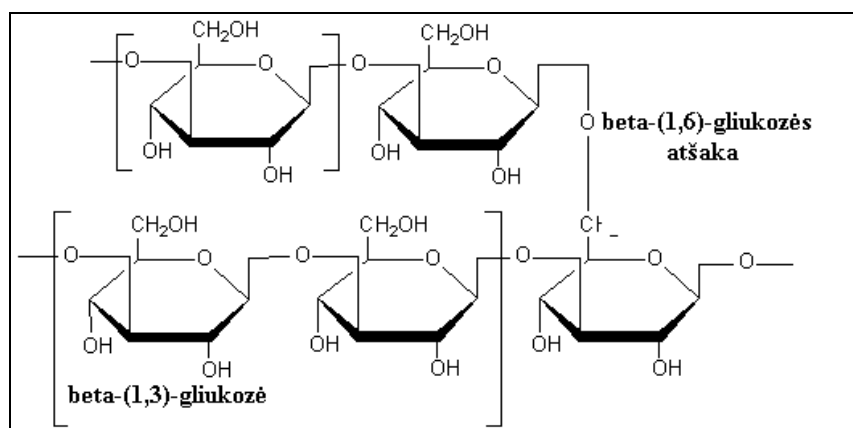
Kitas svarbus grybo sienelės komponento beta gliukano sintezėje dalyvaujantis fermentas – beta gliukano sintazė. Nustačius beta gliukano sintazės inhibitorius, atrasta ir susintetinta nauja echinokandinų ir pneumokandinų vaistų nuo grybų grupė. Pastaruoju metu atliekami tyrimai ieškant naujų medžiagų, kurios inaktyvuoja kitus fermentus, dalyvaujančius ergosterolio, gliukanų, chitino ir kitų grybo ląstelės sienelės komponentų sintezėje.



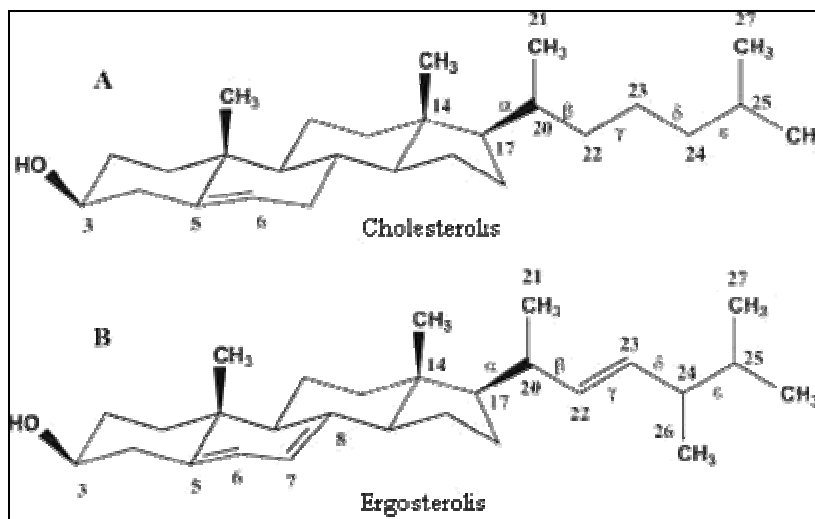
3 pav. Grybo ląstelės plazminė membrana (fosfolipidinis dvisluoksnis)
(Matusevičius A., Ivaškiienė M., Špakauskas V., 2008)



4 pav. *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės sienelės molekulinė sandara. Mechaninis sienelės stiprumas priklauso nuo elastinio trimačio (1,3)- β -gliukano molekulių tinklo, sutvirtinto vandenilio jungtimis. Terminaliniai neredukuojantys (1,3)- β -gliukano šoninių grandinių galai funkcionuoja kaip (1,6)- β -gliukano ir chitino akceptorai (prijungikliai). (1,3)- β -gliukano molekulių redukuojantys galai dalyvauja prijungiant Pir baltymus. (1,3)- β -gliukano sluoksnis formuoja vidinę ląstelės sienelės dalį, ląstelės sienelės baltymai – išorinį. Du gausiausi baltymų-polisacharidų kompleksai yra šie: GPI baltymai – (1,6)- β -gliukanas, (1,3)- β -gliukanas ir Pir baltymai – (1,3)- β -gliukanas. GPI-B – ląstelės sienelės baltymai, per GPI besijungiantys su (1,6)- β -gliukanu (1,6 Glc); Pir-B-ląstelės sienelės Pir šeimos baltymai, per O- jungtį besijungiantys su (1,3)- β -gliukanu (Kapteyn et al., 1996; 1997; Kollar et al., 1995; 1997; Smits et al., 1999; Klis et al., 2002).



5 pav. β -(1,3)-gliukano sandara



6 pav. Ergosterolio (grybo ląstelė) ir cholesterolio (žinduolio ląstelė) struktūrinė formulė (Papich et al., 2001)

2 Acetil-CoA
<i>Acetoacetyl-CoA tiolazė (ERG10)</i>
Acetoacetyl-CoA
<i>HMG CoA sintazė (ERG13)</i>
Hidroksimetilgliutaril-CoA
<i>HMG CoA reduktazė (HMG1, HMG2)</i>
Mevalono rūgštis
<i>Mevalonatinazė (ERG12)</i>
Mevalonato-5-fosfatas
<i>Fosfomevalonatinazė (ERG8)</i>
Mevalonato-5-pirofosfatas
<i>Mevalonatpirofosfatdekarboksilazė (ERG19)</i>
Izopentenilpirofosfatas (IPP)
<i>Izopentenilpirofosfatizomerazė (IDI1)</i>
Dimetilalilpirofosfatas
<i>+IPP geranilpirofosfatsintazė (ERG20)</i>
Geranilpirofosfatas
<i>+IPP farnesilpirofosfa sintazė (ERG20)</i>
Farnesilpirofosfatas
<i>Skvaleno sintazė (ERG9)</i>
Skvalenas
ALILAMINAI, TIOKARBAMATAI → <i>Skvaleno epoksidazė (ERG1)</i>
(S)-2,3-epoksiskvalenas
<i>2,3-oksidoskvaleno-lanosterolio ciklazė (ERG 7)</i>
Lanosterolis
AZOLAI → <i>Citochromo P450 lanosterolio 14-α-demetilazė (ERG 11)</i>
4,4-dimetilcholesta-8,14,24-trienolis
MORFOLINAI → <i>C-14-reduktazė (ERG 24)</i>
4,4-dimetilzimosterolis
<i>C-4-metiloksidazė (ERG25)</i>
<i>C-4-dekarboksilazė (ERG26)</i>
Zimosteronas
<i>C-3-ketoreduktazė (ERG 27,28)</i>
Zimosterolis
<i>C-24-metiltransferazė (ERG 6)</i>
Fekosterolis
MORFOLINAI → <i>C-8- izomerazė (ERG 2)</i>
Episterolis
<i>C-5-desaturazė (ERG3)</i>
5,7,24 (28)-ergostatrienolis
AZOLAI → <i>C- 22 desaturazė (ERG 5)</i>
5,7,22,24(28)- ergostatetraenolis
<i>C-24-reduktazė (ERG 4)</i>
POLIENAI → ERGOSTEROLIS

Žalia spalva pažymėti fermentai, dalyvaujantys ergosterolio komponentų sintezėje, o juos koduojantys genai – mėlyna;

Juoda spalva – ergosterolio sintezės metu susidariusios medžiagos;

Raudona spalva – vaistinės medžiagos nuo grybų, veikiančios jautrius taikinius ergosterolio sintezės kelyje (Georgopapadkou, Walsh, 1996; Kelly et al., 1997; Daum, 1998; Wills et al., 2000; Shilova et al., 2004).

7 pav. Ergosterolio sintezės kelias grybo ląstelėje ir vaistinių medžiagų veikimo taikiniai

Literatūra

1. Adams D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microb.* 2004. 150. P. 2029–2035.
2. Amaral A. C., Fernandes L., Galdino A. S., Filipe M. S., Soares C. M., Pereira M. Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. *Genet. Molec. Research.* 2005. 4 (2). P. 430–449.
3. Bago B., Chamberland H., Goulet A., Vierheilg H., Lafontaine J. G., Piche E. Effect of nikkomycin Z, a chitin synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protopl.* 1996.192. P. 80–92.
4. Balzi E., Goffeau A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. 1187. P.152–162.
5. Barreto-Bergter E., Gorin P. A. J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*; Tipson, R.S. & Horton, D., Eds.; Academic Press: New York; 1983. 41. P. 67–103.
6. Ben-Yaacov R., J. M. Becker, J. M. Oppenheim, A. Oppenheim, M. Goldway, R. Schmidt, W. Jiang, J. Clifford, and Y. Koltin. Multidrug resistance in *Candida albicans*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1995. 19B. P. 146.
7. Bernard M., Latge J. P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* 2001. Suppl. 1. 39. P. 9–17.
8. Bowman S. M., Free S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 2006. 28 (8). P. 799–808.
9. Bowman S. M., Piwowar A., Dabbous M. A., Vierula J., Free S. J. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2006. 5. P. 587–600.
10. Brown J. A., Catley B. J. Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. *Carbohydr. Res.* 1992. 227. P. 195–202.
11. Cabib E., Roh D-H., Schmidt M., Crotti L. B. & Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 2001. 276. P. 19679–19682.
12. Carlile M. J., Watkinson S. C., Gooday G. W. *The fungi.* Academic Press; 2nd edition. 2001. P. 1–3.
13. Carman G. M., Henry S. A. Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 1989. 58. P. 636–669.
14. Caro L. H., Tettelin H., Vossen J.H., Ram A.F., van den Ende H., Klis F. M. In silico identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1997. 13. P. 1477–1489.
15. Chaturvedi V., Flynn T., Niehaus W. G., Wong B. Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* 1996. 142 (4). P. 937–943.
16. Cleary J. D., Chapman S. W., Pearson M. Fungal infections. In: Koda-Kimble M. A., Young L.Y., Kradian W.A., Guglielmo B.J., ed. *Applied Therapeutics: The clinical use of drugs.* 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, Wilkins. 2005. P. 71–75.
17. Colthurst D. R., Santos M., Grant C. M., Tuite M. F. *Candida albicans* and three other *Candida* species contain an elongation factor structurally and functionally analogous to elongation factor 3. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991. 64 (1). P. 45–49.
18. Daum G., Lees N. D., Bard M., Dickson R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998. 14. P. 1471–1510.
19. De Groot P. W., Hellingwerf K. J., Klis F. M. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast.* 2003. 20 (9). P. 781–796.
20. Dekker N., van Rijssel J., Distel B., Hochstenbach F. Role of the alpha-glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast.* 2007. 24 (4). P. 279–288.
21. De Nobel J. G., Van Den Ende H., Klis F. M. Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol.* 2000. 8 (8). P. 344–345.
22. De Pauw B. Is there a need for new antifungal agents? *Clin. Microbiol. Infect.* 2000. 6 (Suppl. 2). P. 23–28.
23. Durán A., Nombela C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiol.* 2004. 150 (10). P. 3099–3103.
24. Ernst E. J., Roling E.E., Petzold C. R., Keele D. J., Klepser M. E. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, time-kill and postantifungal-effect studies. *Antimicrob. Agents Ch.* 2002. 46 (12). P. 3846–3853.
25. Fleet G. H. Cell walls. In Rose A. H., Harrison J. S. ed. *The Yeasts: Yeast Organelles.* London: Academic Press.1991. 2nd edition. P. 199–277.
26. Fostel J. M., Montgomery D. A. Identification of the aminocaproic acid A-3253 as an *in vitro* poison of DNA topoisomerase I from *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Ch.* 1995. 39 (3). P. 586–592.
27. Fostel J. M., Montgomery D. A., Shen L. L. Characterization of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* as a target for drug discovery. *Antimicrob. Agents Ch.* 1992. 36 (10). P. 2131–2138.
28. Fujii T., Shimoi H., Iimura Y. Structure of the glucanbinding sugar chain of Tiplp, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1427 (2). P. 133–144.
29. Gallagher J. C., MacDougall C., Ashley E. S., Perfect J. R. Recent advances in antifungal pharmacotherapy for invasive fungal infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2004. 2 (2). P. 253–268.
30. Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Ch.* 1996. 40 (2). P. 279–291.
31. Goldstein J. L., Brown M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990. 343 (6257). P. 425–430.
32. Grun C. H., Hochstenbach F., Humbel B. M., Verkleij A. J., Sietsma J. H., Klis F. M., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology.* 2005.15 (3). P. 245–257.
33. Hartland R. P., Vermeulen C. A., Klis F. M., Sietsma J. H., Wessels J. G. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1994. 10 (12). P. 1591–1599.
34. Hector R. F., Schaller K. Positive interaction of nikkomycins and azoles against *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Ch.* 1992. 36 (6). P. 1284–1289.
35. Higashiyama Y., Kohno S. Micafungin: a therapeutic review. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2004. 2 (3). P. 345–355.
36. Hippe S. Influence of fungicides on fungal fine structure. *Electron microscopy of plant pathogens.* Eds. Mendgen K., Lese-mann D. E. Berlin: Springer. 1991. P. 317–331.
37. Hogan L. H., Klein B. S. Altered expression of surface alpha-1-3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect. Immun.* 1994. 62 (8). P. 3543–3546.
38. Hostetter M. K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994. 7 (1). P. 29–42.
39. Ibrahim A. S., Mirbod F., Filler S. G., Banno Y., Cole G. T., Kitajima Y., Edwards J. E., Nozawa Y., Ghannoum M. A. Evi-

- dence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1995. 63(5). P. 1993–1998.
40. Inoue S. B., Qadota H., Arisawa M., Anraku Y., Watanabe T., Ohya Y. Signaling toward yeast 1-3- β -glucan synthesis. *Cell Struct. Funct.* 1996. 21 (5). P. 395–402.
 41. Jiang W., Gerhold D., Kmiec E. B., Hauser M., Becker J. M., Koltin Y. The topoisomerase I gene from *Candida albicans*. *Microbiology.* 1997. 143. P. 377–386.
 42. Jolidon S., Polak A. M., Guerry P., Hareman P. G. Inhibitors of 2,3-oxidosqualene lanosterol cyclase as potential antifungal agents. *Biochem. Soc. Trans.* 1993. 18 (1). P. 47–48.
 43. Kapteyn J. C., Van Den Ende H., Klis F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1426 (2). P. 373–383.
 44. Kapteyn J. C., Montijn R. C., Vink E., de la Cruz J., Llobell A., Douwes J. E., Shimoi H., Lipke P. N., Klis F. M. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1, 3-/beta-1, 6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 1996. 6 (3). P. 337–345.
 45. Kapteyn J. C., Ram A. F., Groos E. M., Kollar R., Montijn R. C., Van Den Ende H., Llobell A., Cabib E., Klis F. M. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glycosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* 1997. 179 (20). P. 6279–6284.
 46. Kelly S. L., Lamb D. C., Baldwin B. C., Corran A. J., Kelly D. E. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 (15). P. 9986–9988.
 47. Kendrick B. *The Fifth Kingdom*. Focus Publishing/R. Pullins Company; 3rd edition. 2001. P. 1–9.
 48. Kennedy M. J., Calderone R. A., Cutler J. E., Kanabe T., Rieselman M. H., Robert R., Senet J. M., Annaix V., Bouali A., Mahazza C., Tronchin G., Bouchara J. P., Miegerville M., Marotblond A., Segal E. Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992. 30 (Suppl. 1). P. 95–122.
 49. Klis F. M. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast.* 1994. 10 (7). P. 851–869.
 50. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002. 26 (3). P. 239–256.
 51. Klotz S. A., Smith R. L., Stewart B. W. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob. Agents Ch.* 1992. 36 (1). P. 132–136.
 52. Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P.W., Cabib E. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta (1-3)-glucan. *J. Biol. Chem.* 1995. 270 (3). P. 1170–1178.
 53. Kollar R., Reinhold B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E. Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, beta (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 (28). P. 1762–1775.
 54. Kügler S., Schurtz S. T., Groppe E. L., Goldman W. E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97 (16). P. 8794–8798.
 55. Lagoja I. M. Pyrimidine as Constituent of Natural Biologically Active Compounds. *Chem. Biodivers.* 2005. 2 (1). P. 1–50.
 56. Leidich S. D., Ibrahim A. S., Fu Y., Koul A., Jessup C., Vitullo J., Fonzi W., Mirbod F., Nakashima S., Nozawa Y., Ghannoum M. A. Cloning and disruption of caPLB₁, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 1998. 273 (40). P. 26078–26086.
 57. Lesage G., Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006. 70 (2). P. 317–343.
 58. Lester R. L., Dickson R. C. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv Lipid Res.* 1993. 26. P. 253–273.
 59. Lipke P. N., Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 1998. 180 (15). P. 3735–3740.
 60. Liu L., Tewari R. P., Williamson P. R. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1999. 67 (11). P. 6034–6039.
 61. Mercer E. I. Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications. *Prog. Lipid Res.* 1993. 32 (4). P. 357–416.
 62. Mercer E. I. Sterol biosynthesis inhibitors: their current status and modes of action. *Lipids.* 1991. 26 (8). P. 584–597.
 63. Mysyakina I., Funtikova N. The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi. *Mikrobiologia.* 2007. 76 (1). P. 1–13.
 64. Monk B. C., Perlin D. S. Fungal plasma membrane protein pumps as promising new antifungal targets. *Crit Rev Microbiol.* 1994. 20 (3). P. 209–223.
 65. Oehlschlager A. C., Czyzewska E. Rationally designed inhibitors for sterol biosynthesis. In: J. Sutcliffe, N. H. Georgopapadaku (ed.). *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. Chapman & Hall, New York. 1992. P. 437–475.
 66. Osumi M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 1998. 29 (2–3). P. 207–233.
 67. Papich M. G., Heit M. C., Riviera J. E. Antifungal and antiviral drugs. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 8th ed./ edited by H. Richard Adams. 2001. P. 918–946.
 68. Patton J. L., Lester R. L. The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* 1991. 173 (10). P. 3101–3108.
 69. Raasch H. R. Anidulafungin: review of a new echinocandin antifungal agent. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2004. 2 (4). P. 499–508.
 70. Sasnauskas K., Jomatiene R., Lebedys E., Januska J., Janulaitis A. Cloning and sequence analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to cycloheximide. *Gene.* 1992. 116 (1). P. 105–108.
 71. Schulz T. A., Prinz W. A. Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1771 (6). P. 769–780.
 72. Shilova I. B., Guskova T. A., Glushkov R. G. Modern Drugs for Treating Dermatophytosis. *Pharm. Chem. J.* 2004. 38 (4). P. 175–180.
 73. Slavin M. A., Szer J., Grigg A. P., Roberts A. W., Seymour J. F., Sasadeusz J., Thursky K., Chen S. C., Morrissey C. O., Heath C. H., Sorrell T. Guidelines for the use of antifungal agents in the treatment of invasive *Candida* and mould infections. *J. Intern. Med.* 2004. 34 (4). P. 192–200.
 74. Smits G. J., Kapteyn J. C., van den Ende H., Klis F. M. Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999. 2 (4). P. 348–352.
 75. Stewart L., Ireton G. C., Champoux J. J. The domain arrangement of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1996. 271 (12). P. 7602–7608.
 76. Stewart L., Redinbo M. R., Qiu X., Hol W. G., Champoux J. J. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science.* 1998. 279 (5356). P. 1534–1541.
 77. Wills E. A., Redinbo M. R., Perfect J. R., Del Poeta M. New potential targets for antifungal development. *Emerg. Therapeu-*

tic Targets. 2000. 4 (3). P. 265–296.

78. Zhong W., Jeffries M. W., Georgopapadakou N. H. Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* Species. *Antimicrob. Agents Ch.* 2000. 44 (3). P. 651–653.

Gauta 2008 03 17

Printa publikuoti 2008 05 23