

Imię i nazwisko autora rozprawy: Julia Borzyszkowska-Bukowska
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Dynamika molekularna oddziaływań przeciwgrzybowych heptaenów aromatycznych i ich izomerów *all-trans* ze sterolami w błonach lipidowych

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Molecular dynamics of interactions of antifungal aromatic heptaenes and their *all-trans* isomers with sterols in lipid membranes

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Jan Mazerski	dr inż. Tomasz Laskowski



PODZIĘKOWANIA

Chciałabym z całego serca podziękować prof. dr hab. inż. Janowi Mazerskiemu za przekazaną wiedzę, cenne rady merytoryczne, okazaną życzliwość i wyrozumiałość oraz dr inż. Tomaszowi Laskowskiemu za poświęcony czas i zaangażowanie, gotowość do dyskusji i przyjazną atmosferę, a także nieocenioną pomoc na każdym etapie pracy.

Chciałabym również podziękować dr inż. Pawłowi Szczepblewskiemu oraz dr inż. Łukaszowi Nierzwickiemu i dr hab. inż. Jackowi Czubowj, którzy stworzyli podwaliny do powstania niniejszej rozprawy.

Szczególne wyrazy wdzięczności chciałabym przekazać Mojemu Mężowi, Pawłowi, Rodzinie i Przyjaciołom, którzy zawsze we mnie wierzyli i byli dla mnie nieocenionym wsparciem.

STRESZCZENIE

Aromatyczne heptaeny (AH) należą do grupy makrolidów polienowych o działaniu przeciwgrzybowym. Antybiotyki z tej grupy były pierwszymi, które zostały wykorzystane w terapii układowych infekcji grzybiczych. Amfoterycyna B (AmB) oraz nystatyna, czyli niearomatyczni przedstawiciele makrolidów heptaenowych, mają istotne znaczenie kliniczne w leczeniu, odpowiednio, grzybic wewnętrznych i zewnętrznych.

Molekularne podstawy mechanizmu działania AH nie były do tej pory badane. Można założyć - na podstawie podobieństwa strukturalnego do AmB - że pierwszym i kluczowym etapem dla aktywności i selektywności tych związków jest oddziaływanie z błoną lipidową, a konkretnie sterolami w niej zawartymi. Do tej pory związki należące do grupy AH w swojej natywnej formie nie znalazły szerokiego zastosowania w medycynie. Tym niemniej, wyniki najnowszych badań nad tą podgrupą antybiotyków potwierdzają możliwość uzyskania ich stabilnych pochodnych w postaci izomerów *all-trans* na drodze fotochemicznej izomeryzacji.

Prowadzone badania z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej obejmowały trzech przedstawicieli AH: kandycydynę D, partrycynę A oraz partrycynę B w formie natywnej i *all-trans*. Eksperymenty obliczeniowe miały na celu, przede wszystkim, określenie zależności pomiędzy geometrią pierścienia makrolidowego a powinowactwem antybiotyku do sterolu. Otrzymane rezultaty mogą stać się pierwszym krokiem na drodze do wyjaśnienia molekularnych podstaw o ponad rząd wielkości wyższej aktywności biologicznej AH w porównaniu do AmB. Ponadto, przeprowadzone badania miały na celu pozwolić na uchwycenie roli aromatycznego łańcucha bocznego w oddziaływaniu tej grupy związków ze składnikami błony lipidowej.

ABSTRACT

Aromatic heptaene (AH) macrolides belong to the group of polyene antimycotics. Polyene macrolides are the first antibiotics to be used in the treatment of systemic fungal infections. Amphotericin B (AmB) and nystatin, i.e., non-aromatic representatives of heptaenic macrolides, are of significant clinical importance in the treatment of internal and external mycoses, respectively.

The molecular basis of the mechanism of action of AH has not been studied so far. It can be assumed - on the basis of the structural similarity to AmB - that the first and key step for the activity and selectivity of these compounds is an interaction with the lipid layer, specifically with the sterols contained therein. Until now, compounds belonging to the AH group in their native form have not found wide application in medicine. Nevertheless, the results of the latest research on this subgroup of antibiotics confirm the possibility of obtaining their stable derivatives in the form of *all-trans* isomers by photochemical isomerization.

The research conducted with the use of molecular dynamics methods included three representatives of AH: candicidin D, partricin A and partricin B in native and *all-trans* form. Computational experiments were primarily aimed at determining the relationship between the geometry of the macrolide ring and the affinity of the antibiotic for sterol. The obtained results may also become the first step to elucidate the molecular basis of over an order of magnitude higher biological activity of AH's in comparison to the one of AmB. Moreover, the results of the conducted research may allow to capture the role of the aromatic side chain in the interaction of this group of compounds with the components of the lipid membrane.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
I. WSTĘP.....	9
II. CHARAKTERYSTYKA MAKROLIDÓW POLIENOWYCH.....	12
II. 1. MAKROLIDY POLIENOWE.....	12
1. 1. <i>Amfoterycyna B</i>	13
1. 2. <i>Modele mechanizmu działania AmB</i>	14
a) Model (pół)kanału jonowego.....	14
b) Modele adsorpcji na powierzchni oraz gąbki sterolowej.....	15
c) Model uszkodzeń oksydacyjnych	16
II. 2. AROMATYCZNE MAKROLIDY HEPTAENOWE.....	17
2. 1. <i>Kandycydyna D</i>	18
2. 2. <i>Partrycyna</i>	19
II. 3. IZOMERYCZNE AROMATYCZNE MAKROLIDY HEPTAENOWE	21
3. 1. <i>Fotochemiczna izomeryzacja AH</i>	21
II. 4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBOWA AROMATYCZNYCH MAKROLIDÓW HEPTAENOWYCH.....	23
4. 1. <i>Aktywność przeciwgrzybowa izomerycznych makrolidów heptaenowych</i>	24
II. 5. BADANIA ODDZIAŁYWANIA CZĄSTECZEK Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK MODELOWANIA MOLEKULARNEGO.....	26
5. 1. <i>Umbrella Sampling</i>	28
5. 2. <i>Metadynamika</i>	29
II. 6. PODSUMOWANIE.....	32
III. CEL I ZAKRES PRACY.....	33
IV. METODY.....	34
IV. 1. MODELOWANIE MOLEKULARNE.....	34
1. 1. <i>Parametryzacja</i>	34
1. 2. <i>Przygotowanie układów symulacyjnych</i>	35
1. 3. <i>Procedura symulacyjna</i>	36
a) 1D – Umbrella Sampling.....	37
b) 2D – Metadynamika.....	38
V. WYNIKI I WNIOSKI	40
V. 1. BADANIA ODDZIAŁYWANIA ANTYBIOTYK – STEROL.....	40
1. 1. <i>Umbrella Sampling</i>	40
1. 2. <i>Metadynamika</i>	46

V. 2. ANALIZA ZACHOWANIA SIĘ ŁAŃCUCHA BOCZNEGO AROMATYCZNYCH MAKROLIDÓW POLIENOWYCH	53
2. 1. Ułożenie łańcucha bocznego	53
2. 2. Zanurzenie łańcucha bocznego w błonie lipidowej w trakcie symulacji.....	57
VI. DYSKUSJA	62
VI. 1. 1D-UMBRELLA SAMPLING	62
VI. 2. 2D-METADYNAMIKA.....	64
VI. 3. ROLA AROMATYCZNEGO ŁAŃCUCHA BOCZNEGO	66
VI. 4. PODSUMOWANIE	68
LITERATURA	71
WYKAZ RYSUNKÓW.....	81
WYKAZ TABEL	84
DOROBEK NAUKOWY	85
DODATEK A	87
MINIMA ENERGETYCZNE US.....	87
DODATEK B	90
MAPY ENERGII SWOBODNEJ WRAZ Z MINIMAMI ENERGETYCZNYMI	90
MINIMA ENERGETYCZNE 2D-MTD	93

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AH	–	aromatyczne heptaeny
AmB	–	amfoterycyna B
Chol	–	cholesterol
CndD	–	kandycydyna D (ang. candidin D)
Erg	–	ergosterol
<i>iso-CndD</i>	–	izo-kandycydyna D (ang. <i>iso--candidin D</i>)
<i>iso-ParA</i>	–	izo-partrycyna A (ang. <i>iso--partricin A</i>)
<i>iso-ParB</i>	–	izo-partrycyna B (ang. <i>iso--partricin B</i>)
MTD	–	metadynamika (ang. <i>metadynamics</i>)
ParA	–	partrycyna A (ang. <i>partricin A</i>)
ParB	–	partrycyna B (ang. <i>partricin B</i>)
US	–	ang. <i>Umbrella Sampling</i>
WHAM	–	metoda ważonych histogramów (ang. <i>Weighted Histogram Analysis Method</i>)
Z	–	odległość środków mas wyznaczanych przez atomy węgla aromatycznego pierścienia łańcucha bocznego oraz atomów fosforu fosfolipidów z drugiego listka biwarstwy, [Å]
α	–	kąt odchylenia głównej osi pierścienia makrolidowego od osi Z, [°]
θ	–	kąt wzajemnego ułożenia sterolu względem antybiotyku, [°]
ξ	–	odległość pomiędzy centrami mas wyznaczanymi poprzez pierścień makrolidowy antybiotyku oraz układ pierścieniowy sterolu, rzutowany na płaszczyznę XY, [Å]
ϕ	–	kąt pomiędzy aromatycznym łańcuchem bocznym a pierścieniem makrolidowym antybiotyku, [°]

I. WSTĘP

Choroby wywoływane przez organizmy grzybowe są równie, a w niektórych przypadkach o wiele bardziej niebezpieczne w porównaniu do infekcji wywoływanych przez bakterie. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy są niewielkie różnice pomiędzy komórkami grzybowymi a ssaczymi. Duże podobieństwo na poziomie biochemicznym stanowi problem, gdyż w znaczącym stopniu utrudnia medyczne zastosowanie substancji oddziałujących z celami molekularnymi w organizmie patogenu. Fakt ten rzutuje na niską selektywną toksyczność leków stosowanych w terapii przeciwgrzybiczej.

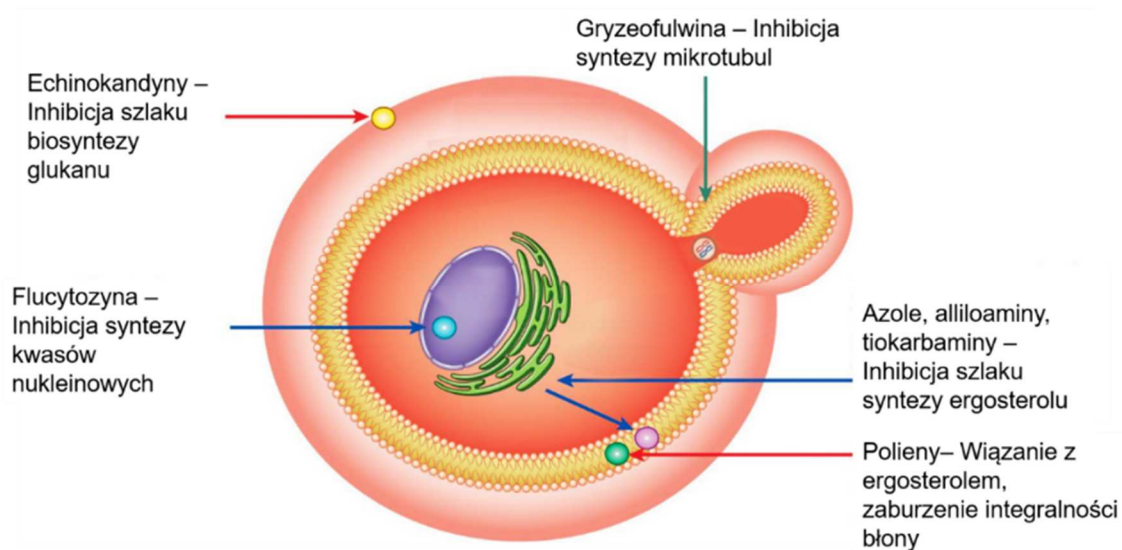
W terapii grzybic stosuje się wiele metod ich klasyfikacji. Jedną z zaproponowanych klasyfikacji dzieli je, ze względu na miejsce występowania, na powierzchniowe oraz układowe. W przypadku grzybic powierzchniowych selektywna toksyczność nie jest tak kluczową kwestią, o ile dany preparat wykazuje działanie wyłącznie powierzchniowe. Natomiast układowe infekcje grzybicze są jednym z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny [1,2].

Dotykają one przede wszystkim osób z obniżoną odpornością, głównie zarażonych wirusem HIV i chorych na AIDS, pacjentów po przeszczepach oraz chorych na nowotwory, będących w trakcie leczenia onkologicznego [3,4].

Niestety, pojawiają się również doniesienia o zwiększeniu ryzyka wystąpienia infekcji grzybiczej związane z zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 [5–7] jak i cięższym przebiegu COVID-19 przy współtowarzyszącym zakażeniu grzybiczym [8].

Obecnie obserwuje się wzrost zakażeń wywołanych przez grzyby, głównie z rodziny *Candida* oraz *Aspergillus*. Pośród *Candida* do najczęściej występujących zalicza się głównie *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei* [9]. W niektórych regionach świata zaczęto odnotowywać również przypadki kandydozy wywołanej przez *Candida auris* [10–12].

W profilaktyce i leczeniu grzybic systemowych stosuje się między innymi: fluoropirymidyny, azole, alliloaminy, morfoliny, echinokandyny oraz makrolidy polienowe, w tym amfoterycynę B i jej pochodne [13,14]. Na rys. I.1.1 przedstawiono cele molekularne stosowanych środków przeciwgrzybowych wraz z ich postulowanym mechanizmem działania [15].



Rys. II. 1.1. Schematyczne przedstawienie celi molekularnych w komórce grzybowej najczęściej stosowanych środków przeciwgrzybowych wraz z mechanizmem działania. Opracowane na podstawie [15].

Niestety, w większości przypadków antybiotyki wykazujące wysoką aktywność przeciwgrzybową charakteryzują się przy tym jednocześnie niską selektywną toksycznością w układzie patogen - gospodarz.

Wzrasta również częstość zakażeń wywołanych przez grzybowe szczepy odporne [16]. Mimo że od kilkunastu lat trwa nieustający pościg naukowców zajmujących się walką z infekcjami wywołanymi antybiotykoopornymi szczepami bakterii, wciąż niewiele wiadomo na temat skutków pojawienia się i ewentualnych możliwości zapobiegania powstawania lekoopornych szczepów grzybowych [17]. Istnieje kilka prawdopodobnych, złożonych i różnorodnych mechanizmów nabywania przez komórki grzybowe oporności na stosowane antymykotyki [14,16].

Wobec aktualnego, raczej niskiego stanu wiedzy na temat infekcji grzybiczych oraz możliwości terapii przeciwgrzybowej koniecznym działaniem jest dalsze

poszukiwanie nowych lub ulepszonych substancji o pożądanym właściwościach.

Optymalny chemoterapeutyk, powinien charakteryzować się:

- 1) wysoką aktywnością,
- 2) szerokim spektrum działania,
- 3) wykazywaniem efektu grzybobójczego (nie: grzybostatycznego),
- 4) brakiem indukowania szczepów opornych
- 5) aktywnością wobec szczepów z opornością wielolekową
- 6) niską toksycznością wobec komórek gospodarza.

Prace nad jego znalezieniem są rozwijane w dwóch głównych kierunkach. Przede wszystkim poszukuje się nowych celów molekularnych oraz związków wykorzystujących te cele. Innym podejściem jest opracowywanie nowych form leków (liposomy, postaci zjonizowane) o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych [18].

II. CHARAKTERYSTYKA MAKROLIDÓW POLIENOWYCH

II. 1. Makrolidy polienowe

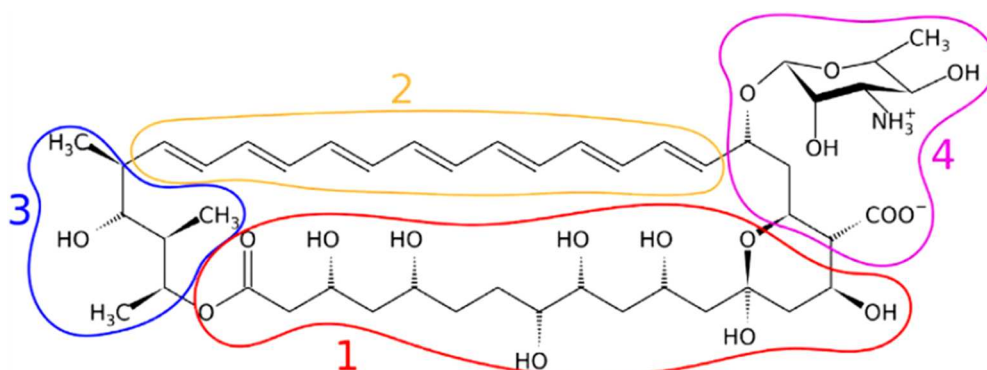
Przedstawicielami antybiotyków przeciwgrzybowych, które łączą w sobie większość w/w pożądanych cech, są makrolidy polienowe, nazywane skrótowo polienami. Są to związki chemiczne pochodzenia naturalnego, wytwarzane przez promieniowce (*Streptomyces*), będące produktami ich metabolizmu peryferyjnego. Nazwa tej grupy antybiotyków związana jest bezpośrednio z ich strukturą. Są one zbudowane z makrocyklicznego laktonu (makrolidu), w obrębie którego znajduje się polienowy chromofor oraz łańcuch polioliowy. Pierścień makrolidowy połączony jest wiązaniem glikozydowym z przynajmniej jednym ugrupowaniem monosacharydowym. W zależności od ilości sprzężonych wiązań podwójnych tworzących chromofor, makrolidy polienowe dzieli się na trieny, tetraeny, pentaeny, heksaeny, heptaeny oraz oktaeny. Cząsteczki te wykazują właściwości amfipatyczne z uwagi na występowanie w ich strukturze zarówno obszarów hydrofobowych (części polienowa), jak i hydrofilowych (łańcuch polioliowy oraz polarna głowa), rys. II.1.1. Obecność tych fragmentów cząsteczki nadaje makrolidowym antybiotynom polienowym właściwości istotne dla ich mechanizmu działania.

Antybiotyki z grupy makrolidów polienowych jako pierwsze zostały wykorzystane w walce z infekcjami grzybiczymi. Odkrycie nystatyny i amfoterycyny w latach 50-tych ubiegłego wieku zapoczątkowało nowy rozdział w historii leczenia chorób wywoływanych przez patogeny grzybowe [19,20]. Wieloletnie badania nad tą grupą antymykotyków doprowadziły do poszerzenia w znaczącym stopniu zakresu i poziomu wiedzy na ich temat. Według doniesień literaturowych, do dnia dzisiejszego odkrytych zostało ponad 200 różnych makrolidów polienowych, lecz tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie kliniczne [21].



1. 1. Amfoterycyna B

Wśród najważniejszych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych należy wymienić przede wszystkim amfoterycynę B (AmB, rys II.1.1 [22]). Jest ona jednym z najlepiej poznanych antybiotyków przeciwgrzybowych należących do grupy makrolidów polienowych i reprezentuje rodzinę makrolidów heptaenowych.



Rys. II. 1.1. Struktura Amfoterycyny B z zaznaczonymi charakterystycznymi fragmentami: 1) hydrofilowy fragment polioliowy, 2) hydrofobowy fragment polienowy, 3) hydrofilowy ogon, 4) polarna głowa składająca się z reszty mykozaminy i ugrupowania karboksylowego [21].

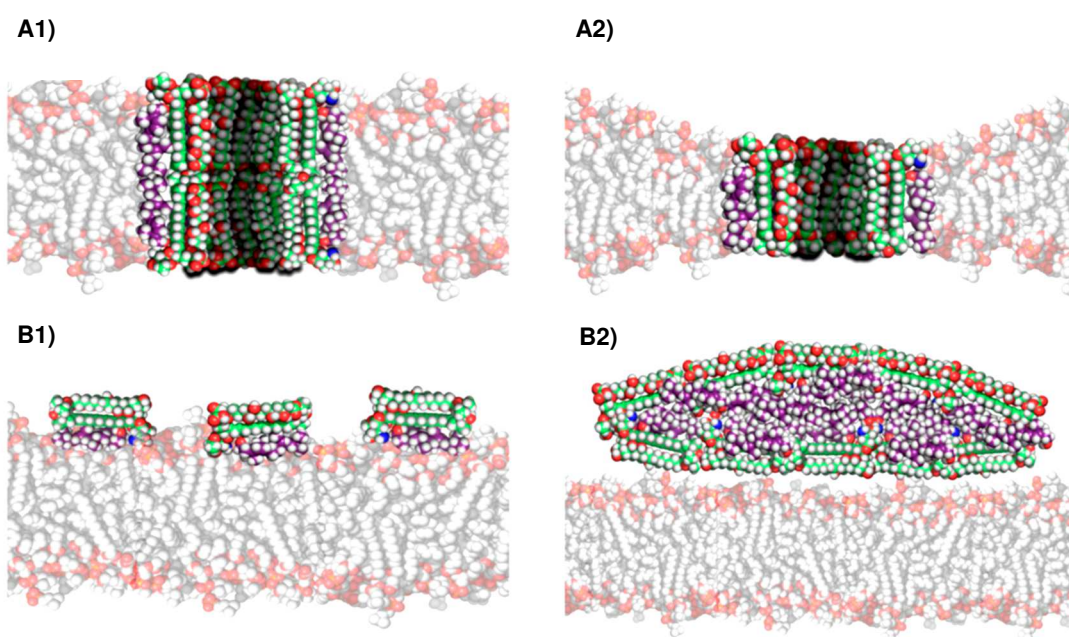
Od ponad 60 lat AmB jest stosowana w leczeniu układowych infekcji grzybiczych i uznawana jest za tak zwany „złoty standard” wśród preparatów o działaniu przeciwgrzybowym. Amfoterycyna B łączy w sobie większość cech dobrego antybiotyku przeciwgrzybowego, jednak mimo wielu zalet związek ten jest również jednym z najbardziej toksycznych chemoterapeutyków i wywołuje wiele poważnych skutków ubocznych, m. in: nefrotoksyczność, anemię hemolityczną, uszkodzenia centralnego systemu nerwowego, czy też kardiotoxyczność [23–25].

Mimo dziesięcioleci badań nad związkami z grupy makrolidów polienowych, wciąż wiele aspektów wymaga wyjaśnienia. Molekularne podstawy mechanizmu ich działania do tej pory nie zostały wyjaśnione w sposób klarowny i jednoznaczny. Powszechnie uznaje się, że makrolidy polienowe oddziałują na błonę komórkową. Naukowcy zaproponowali kilka hipotez dotyczących sposobu działania dla najlepiej poznanego z antybiotyków polienowych – AmB. Większość z teorii postuluje, że podstawą selektywnej aktywności grzybobójczej jest zróżnicowana interakcja antybiotyków ze składnikami biwarstwy lipidowej,

w szczególności z zawartymi w niej cząsteczkami steroli, których skład różni się istotnie pomiędzy błonami komórkowymi ssaków i grzybów [26].

1. 2. Modele mechanizmu działania AmB

Na przestrzeni lat zaproponowano cztery modele mechanizmu działania dla amfoterycyny B: model kanału lub półkanału jonowego, model adsorpcji na powierzchni błony, model gąbki sterolowej oraz model uszkodzeń oksydacyjnych. Modele obejmujące oddziaływanie z błoną lipidową przedstawiono zbiorczo na rys. II.1.2 [27].



Rys. II. 1.2. Schematy zaproponowanych modeli oddziaływań AmB-ergosterol: A1) kanał jonowy, A2) półkanał jonowy, B1) wylapywanie steroli przez cząsteczki AmB zaadsorbowane na powierzchni błony, B2) sterolowa gąbka [26].

a) Model (pół)kanału jonowego

Pierwszy, najstarszy, najczęściej przyjmowany i najlepiej przebadany z zaproponowanych modeli określany jest modelem kanału jonowego [28]. Opiera się on na założeniu, że cząsteczki antybiotyku, agregując we wnętrzu błony, tworzą strukturę beczki przebijającą biwarstwę. Poprzez powstały w ten sposób hydrofilowy kanał następuje wypływ jonów (przede wszystkim K^+) i małych organicznych cząsteczek zawartych we wnętrzu komórki, co doprowadza do jej śmierci [29]. Z uwagi na swoje amfipatyczne właściwości,

cząsteczki antybiotyku we wnętrzu błony lokują się w taki sposób, że hydrofobowa krawędź polienowa pierścienia skierowana jest do wnętrza biwarstwy oddziałując z cząsteczkami sterolu, jednocześnie tworząc z udziałem fragmentu polioliowego hydrofilowy kanał. Ponadto oddziałujące ze sobą ugrupowania aminowe i karboksylowe polarnych głów sąsiadujących cząsteczek stabilizują strukturę utworzonego kanału przy pomocy oddziaływań elektrostatycznych i sieci wiązań wodorowych [30]. Istnieją doniesienia sugerujące możliwość powstawania kanałów zawierających od 4 do 12 cząsteczek polieniu [31]. Długość pojedynczej „beczułki” jest za mała, aby przebić typową błonę komórkową. Klasyczna hipoteza mechanizmu kanałowego zakłada więc, że funkcjonalny kanał wymaga współdziałania dwóch półkanałów (po jednym w każdej monowarstwie błony komórkowej). Pojawiły się jednak sugestie, że w domenach błony o małej grubości struktura półkanału powinna wystarczyć do przebicia dwuwarstwy lipidowej, model A2, rys. II.1.2[32].

b) Modele adsorpcji na powierzchni oraz gąbki sterolowej

Kolejne z zaproponowanych modeli opierają się na wysokim powinowactwie do steroli wykazywanym przez antybiotyki z grupy makrolidów polienowych oraz obserwacjach, iż cząsteczki polienów nie zawsze wnikają do wnętrza błony, a niekiedy lokują się na jej powierzchni.

Pierwszy z modeli (B1, rys. II.1.2) postuluje, iż działanie grzybobójcze AmB związane jest z adsorpcją pojedynczych cząsteczek na powierzchni równoległej do płaszczyzny błony [33] i „wyłapywaniem” ergosterolu z wnętrza biwarstwy. Miałoby to prowadzić do zmiany jej właściwości fizykochemicznych, a w efekcie do zaburzenia kluczowych procesów, takich jak endocytoza czy regulacja funkcji białek błonowych [29,34].

Kolejna z hipotez nosi nazwę modelu gąbki sterolowej (B2, rys. II.1.2). Zakłada ona, iż AmB w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w pierwszym etapie tworzy duże agregaty, które następnie, ulokowane w pobliżu lub we wnętrzu błony komórkowej doprowadzają - poprzez ekstrakcję sterolu - do zaburzenia jej integralności [35,36].



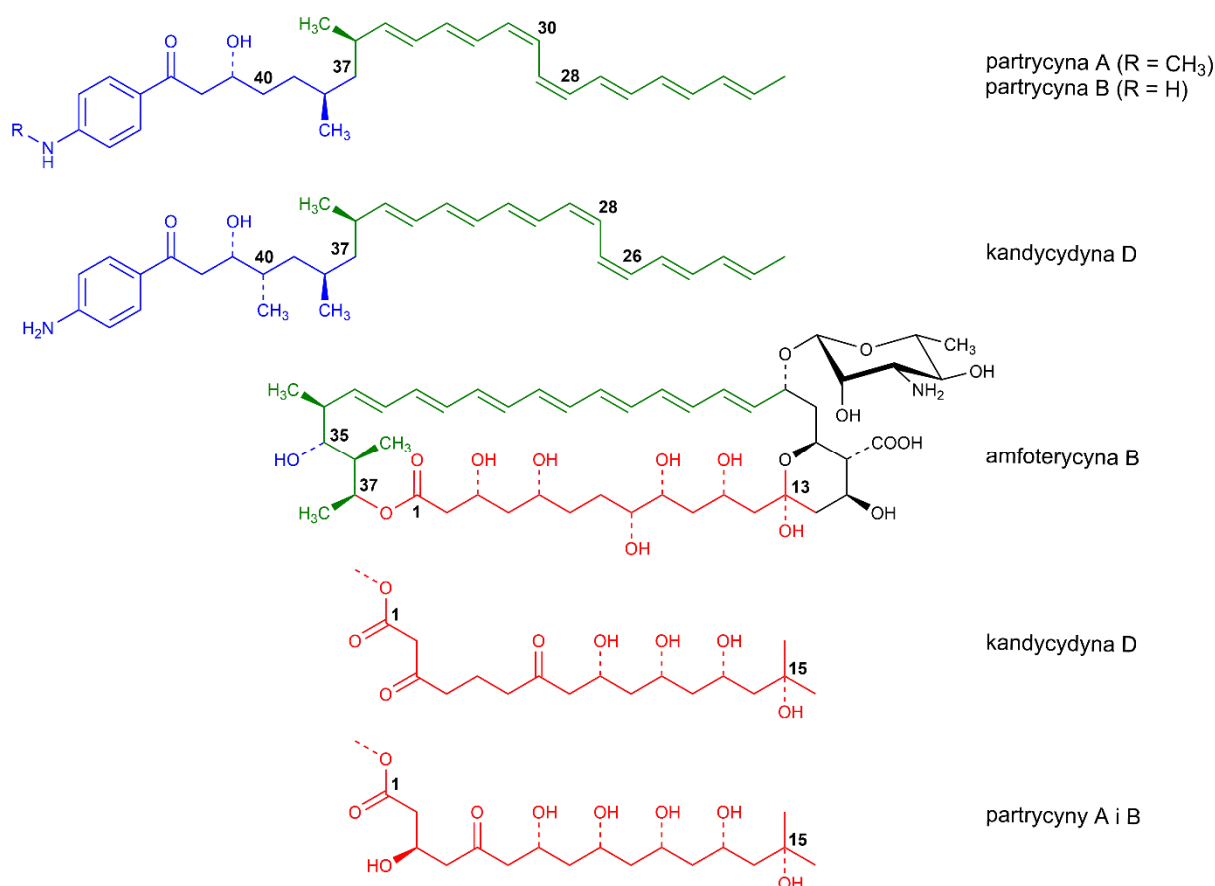
Niektórzy badacze postulują, że możliwe jest również, aby wszystkie z trzech opisanych powyżej mechanizmów występowały w tym samym czasie [35].

c) Model uszkodzeń oksydacyjnych

W literaturze światowej pojawiają się informacje o dodatkowym mechanizmie działania polienów związanym z wywoływaniem oksydacyjnych uszkodzeń w komórce grzybowej. Dokładny mechanizm nie został przedstawiony, natomiast zaproponowano ten model w oparciu o wyniki badań, które dowodziły, że AmB w sposób bezpośredni przyczynia się do powstawania wolnych rodników [37,38]. Dodatkowo badania nad zjawiskiem wywoływania stresu oksydacyjnego przez AmB wykazały, że w efekcie wytworzenia reaktywnych form tlenowych w komórce można zaobserwować pojawianie się uszkodzeń DNA, karbonylację białek oraz utlenianie lipidów zawartych w błonie, które w efekcie prowadzą do zaburzenia funkcjonowania komórek i ich śmierci [37–40].

II. 2. Aromatyczne makrolidy heptaenowe

Aromatyczne makrolidy heptaenowe (AH) są podgrupą polienowych antybiotyków przeciwgrzybowych, należącą do rodziny heptaenów. Poza hydrofobowym fragmentem polienowym, polarną głową i hydrofilową częścią polioliową, związki te wyróżnia występowanie przyłączonego wiązaniem aldolowym hydrofobowego ogona zawierającego pierścień aromatyczny p-aminoacetofenonu lub jego N-podstawionej pochodnej. Aromatyczne makrolidy heptaenowe syntetyzowane są w postaci kompleksów antybiotyków o zbliżonej budowie chemicznej – zmiany strukturalne występują głównie, ale nie tylko, w obrębie części hydrofilowej antybiotyku.



Rys. II. 2.1. Zestawienie różnic pomiędzy strukturami amfoterycyny B, kandycydyny D, partricycyny A i partricycyny B.

Budowa chemiczna AmB oraz AH jest bardzo zbliżona, jednakże – poza obecnością łańcucha bocznego – można również zaobserwować różnice w ilości

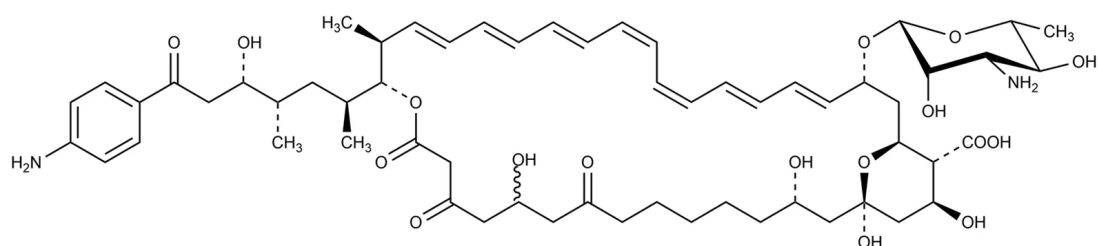
oraz rodzaju funkcji tlenowych w ich fragmentach polioliowych oraz w geometrii chromoforów heptaenowych. Ponadto, część polioliowa AH jest o dwie jednostki węglowe dłuższa w porównaniu do AmB. Chromofor amfoterycyny B występuje w formie *all-trans*, natomiast aromatycznych makrolidów heptaenowych – *cis-trans*. Chromofory *cis-trans* zawierają dwa sprzężone wiązania podwójne o geometrii *Z* w pozycjach 26, 28 lub 28, 30 [4,20,27]. Powyższe różnice przedstawiono na rys. II.2.1.

W literaturze opisującej antybiotyki należące do podgrupy aromatycznych makrolidów heptaenowych niejednokrotnie pojawiają się nieścisłości, a nawet błędne informacje. Dotyczy to między innymi stosowanego nazewnictwa, a także danych na temat składu oraz udziału poszczególnych składników kompleksów.

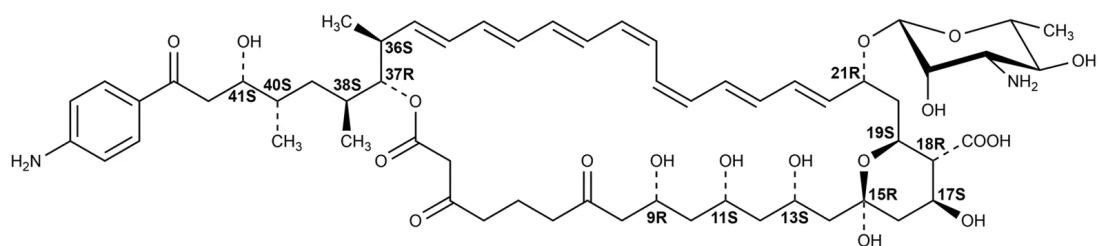
2. 1. Kandycydyna D

Kandycydyna D (CndD) jest głównym składnikiem pierwszego z odkrytych w latach 50-tych ubiegłego wieku kompleksów aromatycznych makrolidów heptaenowych – Kandycydyny. Nazwa nawiązuje do wysokiej aktywności kompleksu wykazywanej przeciw *Candida albicans*. Kandycydyna produkowana jest przez *Streptomyces griseus* IMRU 3570 [41,42].

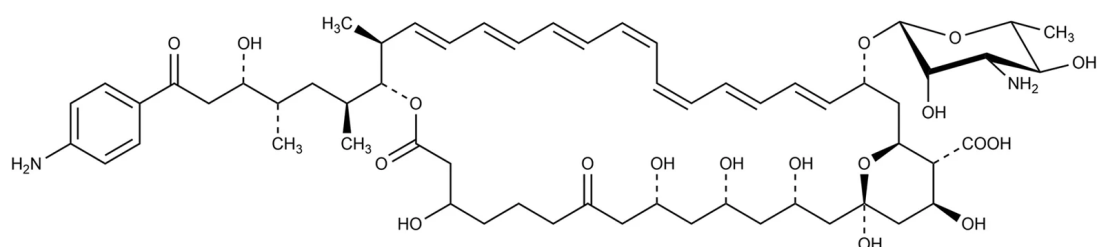
Pomimo wielu lat badań, w literaturze dotyczącej aromatycznych makrolidów występuje wciąż wiele nieścisłości. Dotyczą one między innymi składu i proporcji składników tworzących poszczególne kompleksy. W przypadku Kandycydyny różne źródła informowały, że zawiera ona od trzech [43], czterech do pięciu [44] lub nawet dziewięciu składników nazwanych kandycydynami A – I. Do niedawna była znana struktura tylko jednego z jej składników – kandycydyny D (syn. kandycydyna A2), (rys. II.2.2). Niedawno została również ustalona stereochemia kandycydyny A3 [45] oraz – częściowo – stereochemia kandycydyny A1 [46].



kandycydyna A1



kandycydyna D (syn. A2)

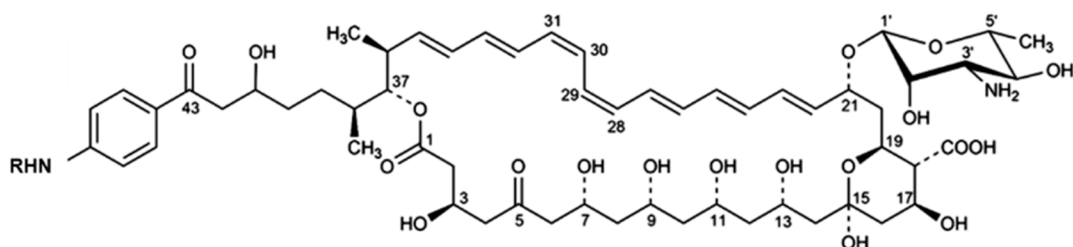


kandycydyna A3

Rys. II. 2.2. Struktury chemiczne składników kompleksu Kandycydyny obrazujące zróżnicowanie w obrębie fragmentu poliolenowego.

2. 2. Partrycyna

Kolejnym przedstawicielem grupy AH jest Partrycyna, kompleks antybiotyczny w którego skład wchodzi partrycyna A (20%) i partrycyna B (80%) (rys. II.2.3), syntetyzowany przez *S. aureofacines*. Partrycyna A występują naturalnie wraz ze swoim demetylowanym analogiem (partrycyną B) w konfiguracji o geometrii



Rys. II. 2.3. Struktura partrycyny A (syn. gedamycyny) (R=Me) i partrycyny B (syn. wacydyny) (R=H).

chromoforu *cis-trans*. W odróżnieniu od kandycydyny D, dwa wiązania podwójne o geometrii Z są zlokalizowane w pozycjach 28 i 30 (26 i 28 w przypadku CndD). Składniki Partrycyny zawierają w swojej strukturze więcej, w porównaniu z kandycydyną D, funkcji hydroksylowych we fragmencie polioliowym pierścienia makrolidowego, a także nie posiadają podstawnika metylowego przy węglu C₄₀. W literaturze, Partrycyna występuje często pod nazwą Aureofacyna, zaś synonimy nazw jej składników stanowią, odpowiednio, gedamycyna (partrycyna A) oraz wacydyna (partrycyna B). Wyników większości badań, wykonanych nad Partrycyną w Katedrze Technologii Leków i Biochemii WCh PG, należy szukać właśnie pod takimi nazwami. Niedawno dopiero udowodniono ostatecznie tożsamość strukturalną składników kompleksów Aureofacyny oraz Partrycyny [47].

II. 3. Izomeryczne aromatyczne makrolidy heptaenowe

W związku z trudnościami w uzyskaniu składników poszczególnych kompleksów w formie czystej, niewiele jest informacji na temat struktur chemicznych AH. Dla niektórych z nich pojawiają się błędne informacje, postulujące natywną geometrię części chromoforowej w formie *all-trans* [47].

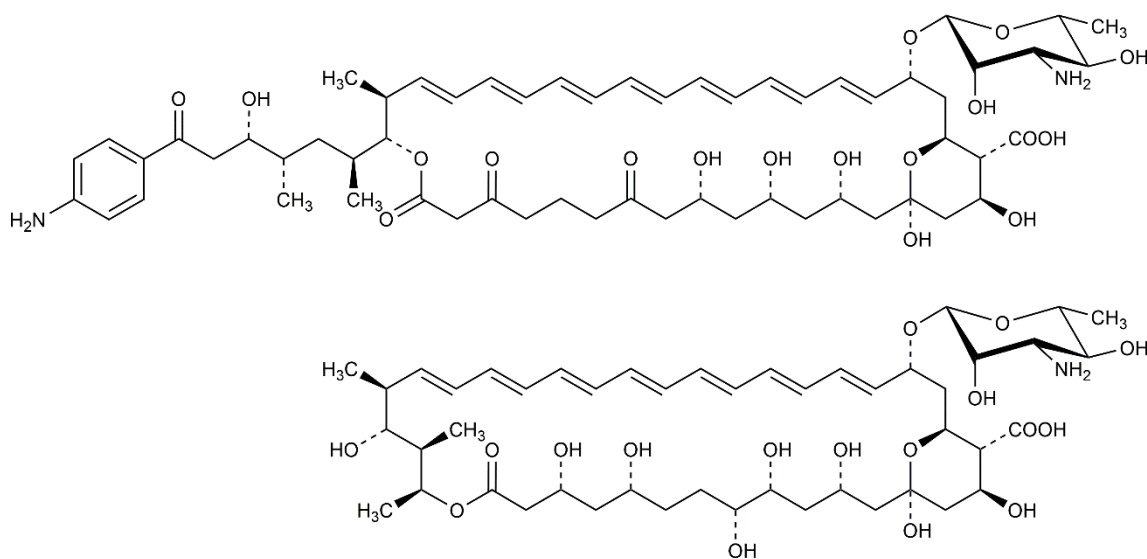
Z uwagi na występowanie w strukturze tych związków siedmiu sprzężonych wiązań podwójnych z dwoma kolejnymi wiązaniami typu *cis*, mogą one podlegać zjawisku wewnątrzcząsteczkowej izomeryzacji. W wyniku tego procesu układ chromoforowy przekształca się z formy *cis-trans* w *all-trans*.

3. 1. Fotochemiczna izomeryzacja AH

Badania nad tym zagadnieniem przeprowadzone zostały dla leworyny A2 (syn. kandycydyny D, CndD [48]) i wykazały, iż transformacja do wersji izomerycznej zachodzi z najlepszym rezultatem przy zastosowaniu naświetlania promieniowaniem monochromatycznym (długość fali 365 nm). Zaobserwowano również, że barwniki takie jak ksanten, akrydyna lub ftalocyjanina, a także niektóre związki siarki i fosforu mogą katalizować izomeryzację AH. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono także, że forma po izomeryzacji (*izo*), w porównaniu do formy natywnej, jest bardziej stabilna w roztworze oraz ma ponad dwukrotnie wyższą aktywność przeciwgrzybową [49].

Analiza strukturalna przeprowadzona z wykorzystaniem technik NMR potwierdziła uzyskanie bardziej stabilnego izomeru CndD w formie *all-trans* [50]. Wyniki badań potwierdzają, że analogiczna sytuacja występuje również dla partrycyny A (syn. gedamycyny) oraz partrycyny B (syn. wacydyny) [51].

Prezentowana na rys. II.3.1 struktura izo-kandycydyny D (*iso-CndD*) posiada geometrię chromoforu identyczną z geometrią występującą w pierścieniu makrolaktonowym AmB.



Rys. II. 3.1. Struktura izo-kandycydyny D (u góry) oraz amfoterycyny B (u dołu).

Zakładając, iż „wyprostowana” wersja układu heptaenowego jest elementem mającym wpływ na różnicujące oddziaływanie ze sterolami (cholesterolem w komórkach gospodarza, a ergosterolem w komórkach patogenu), a także mając na uwadze występowanie dodatkowo aromatycznego łańcucha bocznego w strukturze AH, można spodziewać się wzrostu selektywnej toksyczności antybiotyków tej grupy w formie *izo*.

II. 4. Aktywność przeciwgrzybowa aromatycznych makrolidów heptaenowych

Pierwsze badania dotyczące aktywności przeciwgrzybowej AH, przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* w 1960 r., wskazały na ich szerokie spektrum działania. W testach porównawczych, których wyniki przedstawiono w tabeli II.4.1, Kandycydyna wykazała o ponad rząd wielkości wyższą aktywność w porównaniu m. in. z AmB [52,53].

Tabela II. 4.1. Aktywność wybranych antybiotyków polienowych (wyrażona jako MIC) względem drobnoustrojów z rodzaju *Candida*, *Saccharomyces* i *Aspergillus* [52,53].

Antybiotyk	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Nystatyna	1,600		1,700
Kandycydyna	0,120	0,110	
amfoterycyna B	0,150	0,090	
Kandycydyna	0,005	0,001	0,100

Kolejne badania, przeprowadzone na początku lat 80-tych dla wybranych makrolidów polienowych, których wyniki zestawiono w tabeli II.4.2, potwierdziły wysoką aktywność przeciwgrzybową AH, jednakże ujawniły one również ich niską selektywną toksyczność. Odnotowano również występowanie efektów ubocznych, takich jak działanie neurotoksyczne czy hemotoksyczne, uniemożliwiając tym samym ich wykorzystanie w terapii układowych infekcji wywołanych przez patogeny grzybowe [54,55].

Tabela II. 4.2. Aktywność przeciwgrzybowa względem drobnoustrojów *S. cerevisiae* ATCC9763 i hemolityczna wobec ludzkich erytrocytów dla wybranych antybiotyków polienowych [54,55].

Antybiotyk	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	EH ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Nystatyna	0,250	15,000
Kandycydyna	0,200	1,600
amfoterycyna B	0,100	1,600
kandycydyna D	0,006	2,000
partrycyna A	0,001	0,400
partrycyna B	0,002	0,200

4. 1. Aktywność przeciwgrzybowa izomerycznych makrolidów heptaenowych

W 2021 roku, w Katedrze Technologii Leków i Biochemii, przeprowadzono porównawcze badania *in vitro* dotyczące oceny aktywności biologicznej antybiotyków z grupy aromatycznych heptaenów w formie natywnej i izomerycznej w porównaniu do amfoterycyny B jako związku referencyjnego [56]. Dane otrzymane na podstawie oceny aktywności przeciwgrzybowej zestawiono w tabeli II.4.3.

Tabela II. 4.3. Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B, ich *all-trans* izomerów oraz amfoterycyny B.

Związek	CndD	<i>iso</i> -CndD	ParA	<i>iso</i> -ParA	ParB	<i>iso</i> -ParB	AmB
Mikroorganizm	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
C. albicans	0.003	0.003	0.002	0.006	0.002	0.003	0.060
C. glabrata	0.006	0.003	0.002	0.006	0.002	0.006	0.250
C. krusei	0.006	0.003	0.002	0.006	0.003	0.003	0.250
C. parapsilosis	0.010	0.006	0.003	0.006	0.006	0.006	0.125
C. dubliniensis	0.002	0.002	0.001	0.006	0.002	0.002	0.060
C. guilliermondii	0.030	0.030	0.006	0.030	0.010	0.010	0.125
C. famata	0.010	0.030	0.010	0.050	0.010	0.050	0.250
C. rugosa	0.030	0.030	0.030	0.050	0.030	0.030	0.125
S. cerevisiae	0.006	0.006	0.002	0.001	0.003	0.003	0.060

Otrzymane wartości MIC dla kandycydyny D oraz partrycyny A i B są niższe dla większości testowanych szczepów w porównaniu z amfoteryciną B, co pozostaje w zgodzie z uprzednio uzyskanymi danymi. Natomiast izomery *all-trans* okazały się mniej aktywne niż natywne antybiotyki, jednak w większości przypadków bardziej aktywne w porównaniu z amfoteryciną B.

Kolejnym przeanalizowanym parametrem była ocena aktywności hemolitycznej, której wyniki przedstawiono w tabeli II.4.4.

Tabela II. 4.4. Aktywność hemolityczna kandycydyny D, partrycyny A i B, ich *all-trans* izomerów oraz amfoterycyny B.

Związek	CndD	<i>iso</i> -CndD	ParA	<i>iso</i> -ParA	ParB	<i>iso</i> -ParB	AmB
EH₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]	7.53±0.82	16.67±1.40	1.28±0.68	>20	0.66±0.09	9.64±1.79	3.46±0.15

Jak pokazują otrzymane dane, aktywność hemolityczna izomerów *all-trans* w porównaniu do związków nasyconych jest zdecydowanie niższa. Najmniejszą

różnicę można zaobserwować dla pary kandycydyna D/izo-kandycydyna D, natomiast w przypadku partrycyny A i partrycyny B zmiana jest ponad 10-krotna. Co więcej, wszystkie izomery *all-trans* wykazały znacznie mniejszą aktywność hemolityczną w porównaniu do amfoterycyny B.

W ramach badań na biologiczną aktywnością makrolidów aromatycznych i ich pochodnych określono również wartości indeksu selektywnej toksyczności (ang. *selective toxicity index, STI*), które przedstawiono w tabeli II.4.5.

Tabela II. 4.5. Indeksy selektywnej toksyczności dla kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B, ich izomerów *all-trans* oraz amfoterycyny B. $STI = EH_{50}/MIC$ dla *C. albicans*.

Związek	CndD	<i>iso-CndD</i>	ParA	<i>iso-ParA</i>	ParB	<i>iso-ParB</i>	AmB
STI	30.12	33.34	5.12	>20	2.64	19.28	13.84

Wartości STI dla wszystkich izomerów *all-trans* okazały się lepsze w porównaniu do związków o geometrii *cis-trans*. Najlepsze rezultaty uzyskano dla par partrycyna A/izo-partrycyna A oraz partrycyna B/izo-partrycyna B. Selektywność amfoterycyny B była większa niż partrycyny A i partrycyny B, ale mniejsza niż kandycydyny D. Wszystkie z izo-AH antybiotyków były bardziej selektywne niż amfoterycyna B.

II. 5. Badania oddziaływania cząsteczek z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego

Metody modelowania molekularnego wykorzystuje się między innymi w badaniach nad strukturą i dynamiką biolakromolekuł i ich układów. Modelowanie jest etapem pośrednim, łączącym teorie naukowe z praktyką laboratoryjną. Coraz częściej, naukowcy przed przystąpieniem do eksperymentu przeprowadzają symulacje *in silico*, aby w racjonalny sposób zaplanować część laboratoryjną badań. Możliwe jest też odwrotne podejście, czyli wykorzystanie informacji z przeprowadzonych eksperymentów do narzucenia ograniczeń lub też udokładnienia parametrów przy tworzeniu modelu oraz wykonywaniu obliczeń i symulacji.

Zastosowanie metod obliczeniowych w badaniach o podłożu biologiczno-chemicznym stosowane jest w dwóch wersjach: mechaniki molekularnej, która przede wszystkim ma na celu uzyskanie informacji o optymalnej geometrii analizowanej struktury oraz dynamiki molekularnej, która to z kolei pozwala, między innymi, na wielowymiarowe analizowanie zachowania się układu w czasie. To właśnie druga z tych wersji jest wykorzystywana przy badaniu oddziaływań pomiędzy makrocząsteczkami. Informacje na temat interakcji pomiędzy analizowanymi molekułami są jednym z najważniejszych elementów w badaniach nad związkami biologicznie czynnymi. Według klasycznego podejścia, wykorzystującego metody empiryczne w celu określenia charakteru oddziaływań liganda z celem molekularnym, wykorzystuje się metody strukturalne takie jak krystalografia rentgenograficzna oraz techniki magnetycznego rezonansu jądrowego, a także metody eksperymentalne pozwalające na wyznaczenie stałych równowagi tworzenia się kompleksów. Niestety, zastosowanie takiego postępowania do analizy większych i bardziej skomplikowanych układów jest często bardzo wymagające i czasochłonne. Dzięki rozwojowi i zaawansowaniu technik służących modelowaniu molekularnemu wytworzyła się nowa gałąź nauki, jaką jest wspomagane

komputerowo projektowanie nowych leków, która w znaczący sposób ułatwiła to zagadnienie [57–59].

Dzięki wykorzystaniu dynamiki molekularnej możliwe jest bardziej efektywne projektowanie nowych, potencjalnych leków. Przeprowadzane symulacje dostarczają informacji na temat zachowania molekuł w modelowanym układzie oraz dynamiki tworzenia kompleksu cel molekularny/ligand. Jak każda z metod, również i ta posiada swoje ograniczenia, takie jak rozmiar analizowanego systemu, skala czasowa badanego zjawiska, czy problemy wynikające z niedokładności stosowanych pól siłowych, wykorzystywanych do matematycznego opisu symulowanego układu [59].

W trakcie prac laboratoryjnych mających na celu opracowanie nowego leku, jednym z kryteriów, na które zwraca się szczególną uwagę, jest termodynamika procesu tworzenia się kompleksu potencjalnego leku z celem molekularnym. W przypadku projektowania nowego związku o potencjalnym działaniu terapeutycznym, przy zastosowaniu metod modelowania molekularnego najistotniejszym zadaniem jest oszacowanie podstawowych wielkości termodynamicznych badanego układu, w tym energii swobodnej [59]. To właśnie energia swobodna jest główną siłą napędową większości procesów zachodzących w żywych organizmach. Wiarygodna estymacja energii swobodnej na podstawie przeprowadzonych symulacji jest kluczowym zagadnieniem, ale i głównym wyzwaniem dla naukowców zajmujących się modelowaniem oddziaływań pomiędzy cząsteczkami. Obecnie istnieje kilka metod wykorzystywanych w tym celu. Są to między innymi metody perturbacyjne (ang. *free energy perturbation*), całkowanie termodynamiczne (ang. *thermodynamical integration*) oraz wyznaczanie potencjału średniej siły (ang. *potential of mean force*) [60].

Dla jak najlepszego oszacowania energii swobodnej modelowanego zjawiska z wykorzystaniem potencjału średnich sił, czas prowadzonej symulacji powinien być jak najdłuższy, aby układ mógł przejść przez wszystkie możliwe stany konformacyjne. W takiej sytuacji zostałby idealnie wypróbkowany. Niestety, moce obliczeniowe dzisiejszych komputerów nie pozwalają na takie postępowanie.

Jedną z głównych przyczyn, przez które nie stosuje się bezpośredniego podejścia jest fakt, iż symulacje musiałyby być prowadzone przez nierozsądnie długi czas, więc działanie takie stałoby się nieopłacalne.

Kolejnym z problemów są tak zwane lokalne minima energetyczne. Podczas prowadzonych symulacji dynamiki molekularnej istnieje niebezpieczeństwo, że układ trafi w otoczenie konformacji na tyle korzystnej energetycznie (o tak niskiej energii swobodnej), że przez pozostały czas symulacji nie będzie w stanie przejść do konformacji korzystniejszej pod względem energetycznym. Sytuacja taka może prowadzić do błędnego wytypowania najstabilniejszej konformacji odpowiadającej globalnemu minimum energetycznemu.

Poniżej przedstawiono dwie najpopularniejsze metody próbkowania układu, pozwalające na skrócenie czasu symulacji bez znaczącej utraty jakości oszacowania jego energii swobodnej.

5. 1. Umbrella Sampling

Jedną z metod stosowanych dla polepszenia oszacowania zmian energii swobodnej w zależności od wybranej współrzędnej systemu jest technika znana pod angielską nazwą *Umbrella Sampling* (US). W celu jak najlepszego „wypróbkowania” (ang. *sampling*) przestrzeni konformacyjnej oraz ułatwienia pokonania minimów lokalnych w trakcie symulacji nakłada się dodatkowy, niefizyczny potencjał odchyłający, w wyniku czego możliwe jest przejście układu przez niekorzystne, wysokoenergetyczne konformacje. W większości przypadków dodatkowy potencjał ma postać funkcji harmoniczej, która swoim kształtem przypomina parasol (ang. *umbrella*), stąd nazwa metody.

Drugim elementem tej metody, który ma pozwolić na lepsze próbkowanie przestrzeni konformacyjnej danego systemu, jest podzielenie współrzędnej, w funkcji której wyznaczana będzie energia swobodna na kilka mniejszych fragmentów, nazywanych oknami [61].

Podczas badań techniką dynamiki molekularnej z wykorzystaniem metody *Umbrella Sampling*, symulacje z przyłożonym dodatkowym potencjałem

działającym na układ zazwyczaj prowadzi się równolegle dla każdego z okien wyznaczonych dla współrzędnej.

Przyjmując ξ jako współrzędną reakcji i $U_{bias}(\xi)$ jako przyłożony dodatkowy potencjał, poszukiwany niezaburzony profil energii swobodnej, $G_i(\xi)$, można zdefiniować następująco:

$$G_i(\xi) = -k_B T \ln \rho_i^{bias}(\xi) - U_{bias}^i(\xi) + F_i \quad (\text{II. 5.1})$$

gdzie $\rho_i^{bias}(\xi)$ opisuje wynikową zaburzoną gęstość prawdopodobieństwa, natomiast stała F_i odpowiada energii swobodnej wynikającej z wprowadzenia dodatkowego potencjału i jest definiowana jako:

$$e^{-F_i/k_B T} = \left\langle e^{-U_{bias}^i(\xi)/k_B T} \right\rangle \quad (\text{II. 5.2})$$

Następnie, uzyskane dane analizuje się zbiorczo, najczęściej z wykorzystaniem metody ważonych histogramów (ang. *Weighted Histogram Analysis Method*, WHAM) [62] i przetwarza w celu wyznaczenia profilu zmian energii swobodnej w zależności od wybranej współrzędnej. Szczegółowy opis metody i przykłady zastosowania można znaleźć w literaturze, np. [61,63].

5. 2. Metadynamika

Kolejną z metod jest metadynamika (ang. *metadynamics*, MTD), która również wykorzystuje zewnętrzny potencjał działający na układ. W tym przypadku wprowadzany potencjał ulega zmianie w trakcie symulacji, w zależności od jej przebiegu i ma na celu „zniechęcenie” układu do ponownego przejścia w konformację, która już wystąpiła. Wartość potencjału jest tym większa, im częściej układ próbuje powrócić do danej konformacji. Dzięki zwiększającemu się potencjałowi układ zyskuje możliwość pokonywania coraz większych barier energetycznych, dzięki czemu jakość próbkowania wzrasta. Podczas symulacji prowadzonej wzdłuż wybranej współrzędnej układu zbierane są informacje na temat wartości potencjału odpowiadającej danej konformacji, a co za tym idzie, ilości jej wystąpień. Na bazie tych informacji dokonuje się odtworzenia profilu zmian energii swobodnej w zależności od analizowanej współrzędnej.

Matematyczny opis metody można przedstawić następująco. Wyznaczany potencjał średniej siły działającej na układ definiuje się jako:

$$F = -k_B T \lim_{t \rightarrow \infty} \ln (N(s, t)) \quad (\text{II. 5.3})$$

gdzie $N(s, t)$ jest histogramem zmiennej s określonym na podstawie nieskończenie długiej, równowagowej symulacji [64]. W przypadku tej metody, dodatkowy potencjał nakładany na układ w celu polepszenia próbkowania zależy od przebiegu trajektorii. Określa się go jako sumę krzywych Gaussa odkładanych wzdłuż badanych współrzędnych opisujących:

$$V_G(s, t) = \sum_{t'=0}^t \omega \exp \left(- \sum_{i=1}^d \frac{(S_i(R) - S_i(R(t')))^2}{2\sigma_i^2} \right) \quad (\text{II. 5.4})$$

gdzie ω opisuje szybkość z jaką dodawany jest potencjał, d oznacza liczbę współrzędnych opisujących, $S_i(R)$ jest jedną z funkcji położenia zestawu atomów R , a σ odchyleniem standardowym dodawanej krzywej Gaussa [65].

Szybkość przyrastania potencjału można zdefiniować jako:

$$\omega = \frac{W}{\tau} \quad (\text{II. 5.5})$$

gdzie W jest wysokością dodawanego potencjału, natomiast τ to okres, co który potencjał $V(s, t)$ jest powiększany o kolejną krzywą Gaussa.

Dla wystarczająco długich czasów symulacji, dodatkowy potencjał można przyjąć jako pewnego rodzaju oszacowanie profilu energii swobodnej wzdłuż wybranej współrzędnej reakcji, gdyż jego wartość nie uzbieżnia się do jej bezwzględnej wartości, a oscyluje wokół. Sytuację tę można zapisać następująco:

$$V_G(s, t) = -F(s) + C \quad (\text{II. 5.6})$$

W celu zminimalizowania powyższego efektu, zaproponowano zastosowanie skalowania dokładanego potencjału w czasie według poniższego wzoru:

$$W = W_0 \exp \left(- \frac{V(s, t)}{k_B \Delta T} \right) \quad (\text{II. 5.7})$$



gdzie W_0 jest początkową wysokością dodawanego potencjału, natomiast ΔT parametrem o wymiarze temperatury. Wysokość dodawanego potencjału w trakcie symulacji spada, a parametr ΔT opisuje szybkość tego spadku. Łącząc ze sobą powyższe elementy otrzymujemy, uzbieżniony potencjał można zapisać jako:

$$V_G(s, t \rightarrow \infty) = -\frac{\Delta T}{\Delta T + T} F(S) + C \quad (\text{II. 5.8})$$

Obecnie często stosuje się tzw. czynnik skalujący potencjał (ang. *bias factor*), który zastępuje parametr ΔT wyrażeniem:

$$\gamma = \frac{\Delta T + T}{T} \quad (\text{II. 5.9})$$

Dokładny opis teoretyczny metody wraz z możliwościami jej wykorzystania można znaleźć w literaturze [65–67].

II. 6. Podsumowanie

Poszukiwanie lepszego i skuteczniejszego leku przeciwko układowym infekcjom grzybiczym od lat jest istotnym wyzwaniem dla świata nauki. Związki z grupy aromatycznych makrolidów polienowych charakteryzuje wysoki potencjał terapeutyczny, jednakże ze względu na ich wysoką toksyczność wymaga on ukierunkowania i doprecyzowania. Dla lepszego zrozumienia wpływu antybiotyków z tej grupy związków na żywe komórki istotne jest przede wszystkim pogłębienie wiedzy na temat ich interakcji z błoną oraz zachowania się w środowisku zawierającym jednocześnie różne lipidy, w tym sterole. Dzięki wyjaśnieniu mechanizmów mających wpływ na to zjawisko, możliwe będzie zaproponowanie terapii w walce z systemowymi zakażeniami wywołanymi przez patogeny grzybowe.

Mając na uwadze kompleksową naturę aromatycznych makrolidów polienowych, wysoką precyzję wymaganą przy ich izolacji, a także delikatny charakter antybiotyków w natywnej formie, wykorzystanie technik modelowania molekularnego do odkrycia podstaw aktywności tej grupy fungicydów staje się naturalnym wyborem. Zastosowanie metod komputerowych jest korzystne nie tylko ze względu na możliwość rozpoczęcia eksperymentów obliczeniowych bez konieczności posiadania fizycznej próbki związku, ale przede wszystkim dlatego, ponieważ dostarcza informacji o zachowaniu się AH na poziomie molekularnym. Powyższe aspekty sprawiają, iż jest to idealne narzędzie do badań sposobu działania tej grupy antybiotyków. Co więcej, symulacje pozwolą na weryfikację hipotezy o wpływie geometrii chromoforu (*cis-trans* vs. *all-trans*) na różnicowe powinowactwo do sterolu występujące w błonie komórkowej gospodarza i patogenu.

III. CEL I ZAKRES PRACY

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie wpływu zmiany geometrii chromoforu związków należących do aromatycznych heptaenów (AH) na oddziaływanie na poziomie molekularnym ze sterolami zawartymi w błonie lipidowej. Poznanie sposobu w jaki aromatyczne antybiotyki polienowe wpływają na biwarstwę lipidową może przyczynić się do wyjaśnienia obserwowanej wysokiej aktywności przeciwgrzybowej wykazywanej przez tę grupę związków.

Są to pierwsze badania wykorzystujące techniki modelowania molekularnego w studiach nad tą podgrupą antybiotyków polienowych. Prezentowane wyniki dotyczą trzech przedstawicieli AH: kandycydyny D, partrycyny A oraz partrycyny B. Antybiotyki analizowane są w dwóch wersjach: natywnej (chromofor o geometrii *cis-trans*) oraz izomerycznej (chromofor o geometrii *all-trans*). Symulacje dynamiki molekularnej dotyczące zachowania AH w błonie lipidowej zawierającej sterole (cholesterol bądź ergosterol) przeprowadzone zostały z wykorzystaniem jednowymiarowej techniki Umbrella Sampling oraz dwuwymiarowej metadynamiki jako metod udokładniających wyznaczanie energii swobodnej interakcji dwóch cząsteczek wchodzących w skład binarnego kompleksu.

Eksperymenty obliczeniowe miały na celu otrzymanie profili bądź map energii swobodnej opisujących interakcje monomeru antybiotyku z wybranym steroidem w środowisku błony lipidowej, na podstawie których możliwe było zdefiniowanie wpływu geometrii chromoforu AH (*cis-trans* vs. *all-trans*) na powinowactwo do cholesterolu oraz ergosterolu. Ponadto, wyniki przeprowadzonych symulacji pozwoliły na ustalenie optymalnej geometrii kompleksów AH/sterol, a także wyznaczenie struktur reprezentatywnych tych kompleksów. W oparciu o uzyskane dane podjęta została próba określenia nieznanej dotąd roli aromatycznego łańcucha bocznego AH w oddziaływaniach ze sterolami.



IV. METODY

IV. 1. Modelowanie molekularne

W trakcie badań z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego przeanalizowano zachowanie trzech natywnych przedstawicieli aromatycznych makrolidów polienowych: kandycydyny D, partrycyny A i partrycyny B oraz ich pochodnych w wersji zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol bądź ergosterol (w sumie 12 układów symulacyjnych). We wszystkich przypadkach jako podstawową technikę symulacji zastosowano dynamikę molekularną. Obliczenia wykonano na superkomputerach Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej „Tryton” oraz „Prometheus” w ramach infrastruktury PLGrid Akademickiego Centrum Komputerowego AGH.

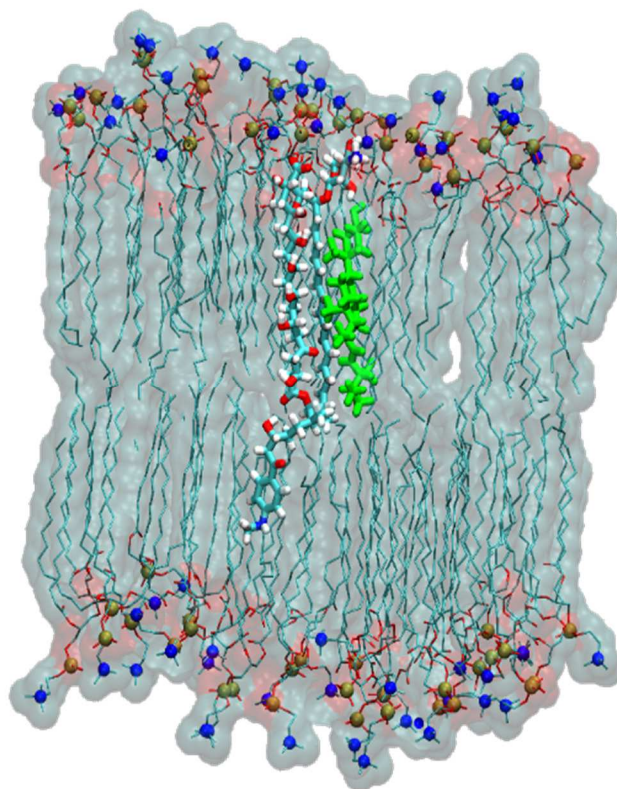
1. 1. Parametryzacja

Podstawowe parametry dla modeli atomistycznych wszystkim aromatycznym heptaenów zostały zaczerpnięte z pola siłowego CHARMM36 Generalized ForceField [68] przy wykorzystaniu interfejsu dostępnego na paramchem.org. Następnie parametry zostały udokładnione z wykorzystaniem programu GAUSSIAN09 [69]. Najpierw ładunki cząstkowe zostały przeliczone *ab initio* na poziomie teorii MP2/6-31G*. Następnie kilka kątów dwuściennych, które otrzymały najwyższą wartość funkcji kary przy nakładaniu pola siłowego CHARMM36, zostały ponownie sparametryzowane przy wykorzystaniu skanera kąta dwuściennego zaimplementowanego w programie GAUSSIAN09 na poziomie teorii MP2/6-31G* ze skokiem kąta co 5 stopni. Uzyskane profile energetyczne zostały opracowane przy pomocy programu ForceField ToolKit (ffTK) [70] w ramach programu VMD [71]. Dodatkowo, parametry określające właściwości dwóch kątów dwuściennych tworzących wiązanie glikozydowe między aglikonem a ugrupowaniem mykozaminy zaczerpnięto z wcześniejszych badań nad amfoterycyną B, jako że te fragmenty dla wszystkich aromatycznych heptaenów były strukturalnie identyczne z amfoterycyną B [72].



1. 2. Przygotowanie układów symulacyjnych

Wszystkie 12 układów symulacyjnych zbudowano przy pomocy serwera Charmm-Gui Membrane Builder [73]. Pojedynczą cząsteczkę każdego z analizowanych związków umieszczono w prostokątnym pudełku, a następnie zanurzone w błonie lipidowej zbudowanej z dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) oraz cząsteczek cholesterolu lub ergosterolu w stosunku (70:30), rys IV.1.1. Następnie, do układu dodano dwie warstwy wody poniżej oraz powyżej badanych błon. Do warstw wodnych wprowadzono jony chlorkowe i potasowe w celu uzyskania stężenia odpowiadającego fizjologicznej sile jonowej. Pole siłowe CHARMM36 zostało wykorzystane dla cząsteczek antybiotyków, steroli oraz cząsteczek DPPC, natomiast dla wody zastosowano model TIP3P [74], tabela IV.1.1.



Rys. IV. 1.1. Układ symulacyjny monomeru antybiotyku ze steroidem przedstawiony na przykładzie parvancyny A z ergosterolem. Ze względu na czytelność pominięto cząsteczki wody i jony nieorganiczne.

Tabela IV. 1.1. Zestawienie parametrów dla 12 układów symulacyjnych.

Układ	Wymiary początkowe pudełka [nm]	Liczba cząsteczek sterolu	Liczba cząsteczek DPPC	Liczba jonów K ⁺ /Cl ⁻
<i>iso</i> --CndD/Chol	67,53 / 67,53 / 74,97	48	112	15/15
<i>iso</i> --CndD/Erg	65,68 / 65,68 / 74,97	42	98	14/14
CndD/Chol	67,62 / 67,62 / 72,61	48	112	14/14
CndD/Erg	67,62 / 67,62 / 72,61	42	98	13/13
<i>iso</i> --ParA/Chol	67,58 / 67,58 / 71,00	48	112	9/9
<i>iso</i> --ParA/Erg	65,76 / 65,76 / 71,67	42	98	9/9
ParA/Chol	67,64 / 67,64 / 72,28	48	112	10/10
ParA/Erg	65,76 / 65,76 / 74,28	42	98	14/14
<i>iso</i> --ParB/Chol	67,62 / 67,62 / 85,00	48	112	15/15
<i>iso</i> --ParB/Erg	67,62 / 67,62 / 85,00	48	112	15/15
ParB/Chol	67,65 / 67,65 / 71,75	48	112	10/10
ParB/Erg	67,65 / 67,65 / 71,75	48	112	10/10

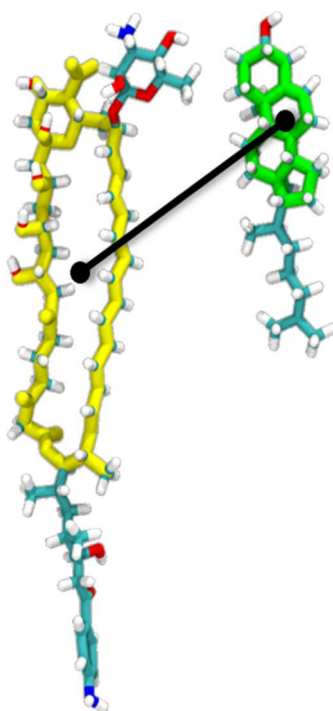
1. 3. Procedura symulacyjna

Wszystkie symulacje zostały przeprowadzone w zespole NPT z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM36 oraz pakietu GROMACS [75] (wersje 5.1.4 oraz 2020.4) z wtyczką PLUMED [76] (wersja 2.2.3 oraz 2.6.2). Dla zachowania ciągłości symulowanego układu zastosowano okresowe warunki brzegowe dla wszystkich trzech wymiarów. Temperatura układów w trakcie symulacji wynosiła 310 K przy zastosowaniu termostatu Nose-Hoover'a [77], natomiast ciśnienie utrzymywane było na poziomie 1 bara przy zastosowaniu metody Parrinello-Rahmana [78]. Oddziaływania elektrostatyczne wyznaczone były przy pomocy algorytmu PME z promieniem obcięcia równym 12 Å [79]. Oddziaływania van der Waalsa były szacowane przy poziomie obcięcia wynoszącym 12 Å przy zastosowaniu funkcji przełączającej dla odległości 10 Å. Równania ruchu były całkowane przy zastosowaniu algorytmu Verleta z krokiem czasowym wynoszącym 2 fs [80].

Uzyskane układy symulacyjne poddano 7-etapowej procedurze równoważenia zgodnie z zaleceniami z programu CHARMM Membrane Builder. Następnie, dla każdego z nich przeprowadzono 500 ns równowagowe symulacje dynamiki molekularnej.

a) 1D – Umbrella Sampling

Metoda Hamiltonian Replica Exchange Umbrella Sampling została zastosowana w celu uzyskania profili energii swobodnej oddziaływania antybiotyku-sterol w środowisku biwarstwy lipidowej. Jako współrzędną reakcji wybrano odległość, ξ , pomiędzy centrami mas wyznaczanymi poprzez pierścień makrolidowy antybiotyku oraz układ pierścieniowy sterolu, rzutowany na płaszczyznę XY (rys. IV.1.2).



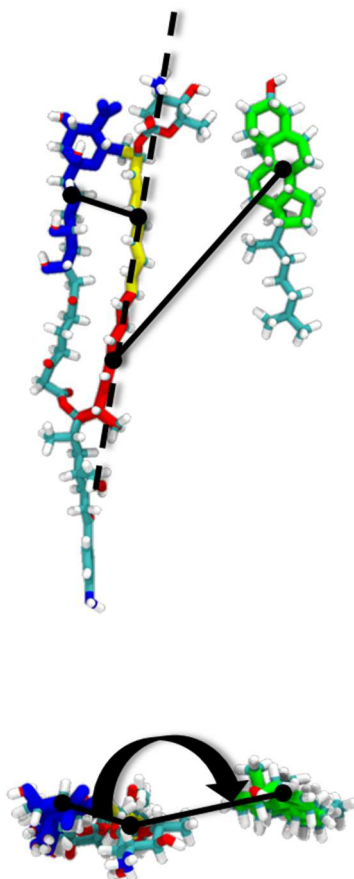
Rys. IV. 1.2. Współrzędna reakcji dla której wyznaczana była energii swobodna w symulacjach z zastosowaniem metody US na przykładzie izo-kandycydyny D z cholesterolem.

Struktury początkowe wybrano na podstawie dodatkowych 100 ns symulacji, w trakcie których odległość była zwiększana z 5 do 15 Å przy nałożonym

potencjale harmonicznym z stałą siłową równą $2500 \text{ kJ/mol}\cdot\text{\AA}^2$. W każdym przypadku współrzędna reakcji została podzielona na 10 równych okien rozmieszczonych co 1 \AA . Każde z okien poddano uprzednio 100 ns równoważeniu, a następnie symulowano przez $1 \mu\text{s}$. W celu uzyskania profili energii swobodnej zastosowano metodę ważonych histogramów (WHAM).

b) 2D – Metadynamika

Dla dokładniejszego poznania preferowanej orientacji kompleksu antybiotyku/sterol zastosowano metodę dwuwymiarowej metadynamiki w wariacie *well-tempered* (2D–WT–MTD). Jako dodatkową współrzędną opisującą proces wybrano kąt θ , opisujący wzajemne ułożenie sterolu względem antybiotyku, tak jak przedstawiono na rysunku IV.1.3.



Rys. IV. 1.3. Dodatkowa współrzędna reakcji dla której wyznaczana była energii swobodna w symulacjach z zastosowaniem metody MTD na przykładzie izo-kandycydyny D z cholesterolem.

Symulacje przeprowadzono dla 10 orientacji kompleksu z wartościami kąta rozłożonymi od 0° do 360° , co 36° . Wartość czynnika skalującego ustawiono na

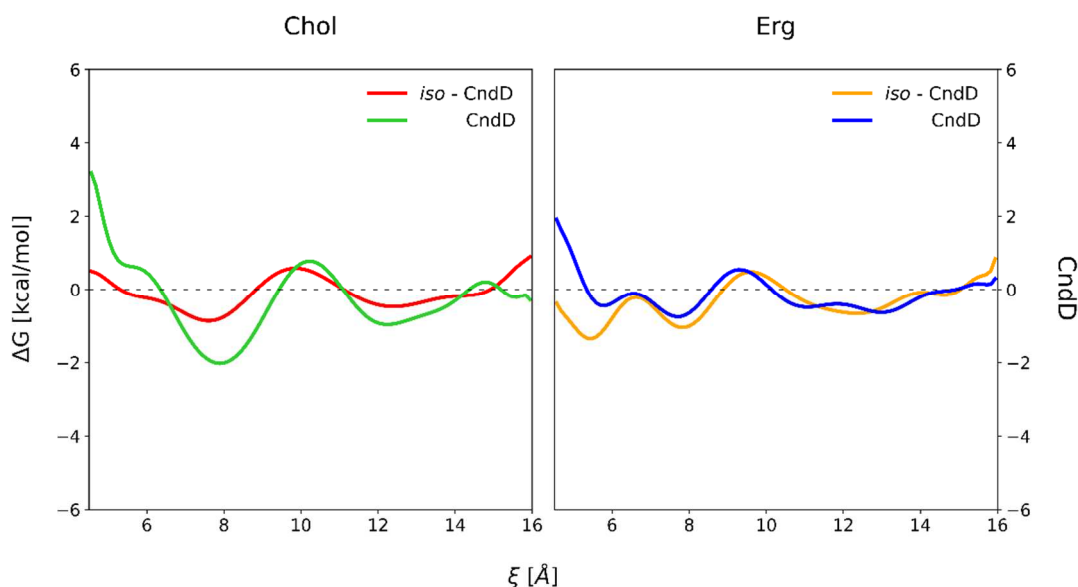
10, natomiast jako temperaturę odniesienia przyjęto wartość 310 K. Potencjał w postaci krzywych Gaussa o szerokości 0,2 Å dla odległości i 0,5 rad dla kąta oraz początkowej wysokości 0,1 kJ/mol był dodawany co 10 ps. Dla każdej z orientacji przeprowadzono 2 μ s symulacje.

V. WYNIKI I WNIOSKI

V. 1. Badania oddziaływania antybiotyków – sterol

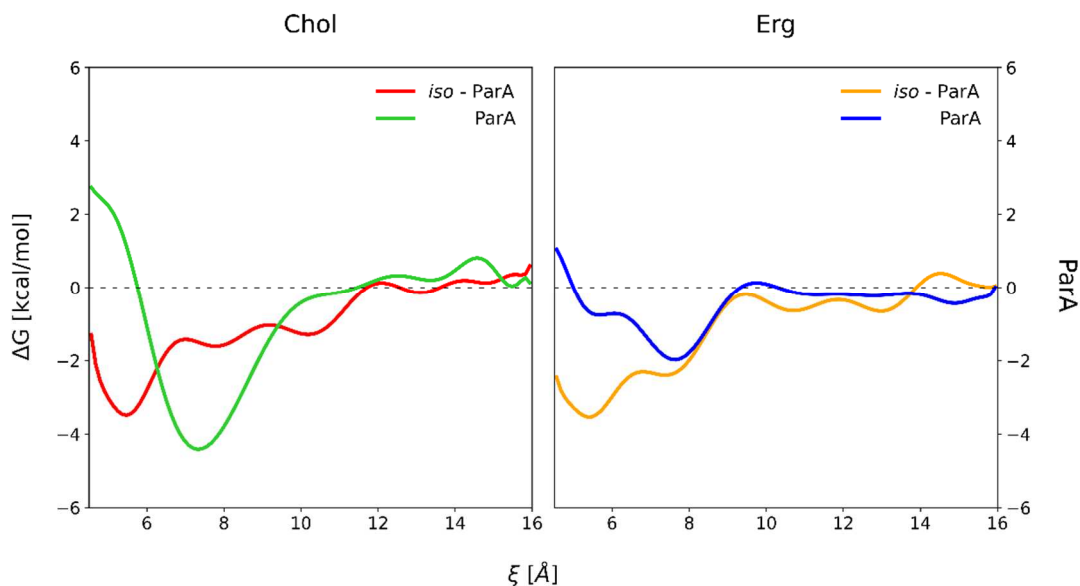
1. 1. Umbrella Sampling

Na podstawie przeprowadzonych 1 μ s symulacji z zastosowaniem metody US uzyskano profile energii swobodnej dla 3 analizowanych cząsteczek w wersji natywnej oraz zizomeryzowanej w środowisku błonowym zawierającym cholesterol lub ergosterol, rys. V.1.1.



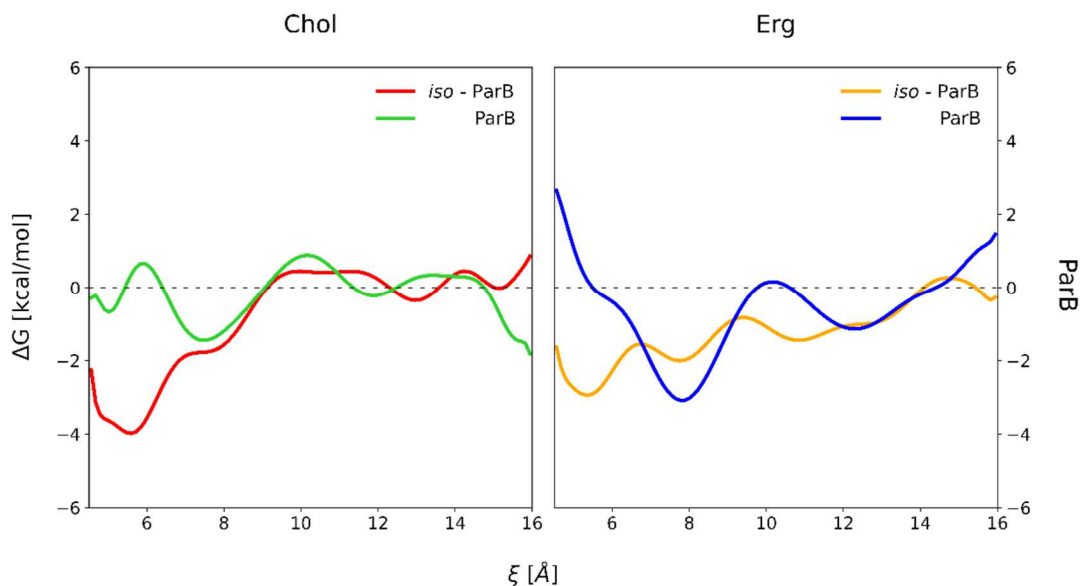
Rys. V. 1.1. Przebiegi profili energii swobodnej dla kandycydyny D w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).

W przypadku układów zawierających cząsteczkę kandycydyny D w przebiegach profili energii swobodnej dotyczących oddziaływania antybiotyków – sterol nie można wskazać znaczących różnic. Co ciekawe, zarówno dla antybiotyków w formie natywnej, jak i zizomeryzowanej uzyskiwane kształty krzywych są do siebie zbliżone. Biorąc po uwagę rodzaj sterolu (Chol vs. Erg) z jakim oddziałuje cząsteczka antybiotyku można zauważyć, że w przypadku interakcji z ergosterolem możliwe jest wyróżnienie dwóch minimów energetycznych (przy współrzędnej reakcji około 5 Å i 8 Å), natomiast w wersji z cholesterolom jest to tylko jedno minimum, około 8 Å.



Rys. V. 1.2. Przebiegi profili energii swobodnej dla partrycyny A w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).

Profile energii swobodnej uzyskane na podstawie symulacji dynamiki molekularnej przeprowadzonych dla układów zawierających partrycynę A wskazują na występowanie zauważalnych różnic w ich przebiegach, rys V.1.2. Dla natywnej partrycyny A (*cis-trans*) zaobserwować można występowanie głównego minimum energetycznego przy około 8 Å, przy czym w przypadku oddziaływania z cząsteczką cholesterolu jest ono o ok. 2 kcal/mol głębsze w porównaniu do ergosterolu. Konwersja chromoforu partrycyny A do formy *all-trans* prowadzi do pojawienia się globalnego minimum energetycznego przy ok. 5 Å. Minima te są na zbliżonym poziomie energetycznym dla obu steroli (ok. 3,5 kcal/mol). Dla układu zawierającego cholesterol zaobserwować można jeszcze dwa płytkie minima przy ok. 8,5 i 10,5 Å. W przypadku błony zawierającej ergosterol widoczne jest również dodatkowe, oddzielone niewielką barierą, minimum przy ok 8 Å. Jego położenie jest analogiczne jak dla natywnej formy antybiotyku.



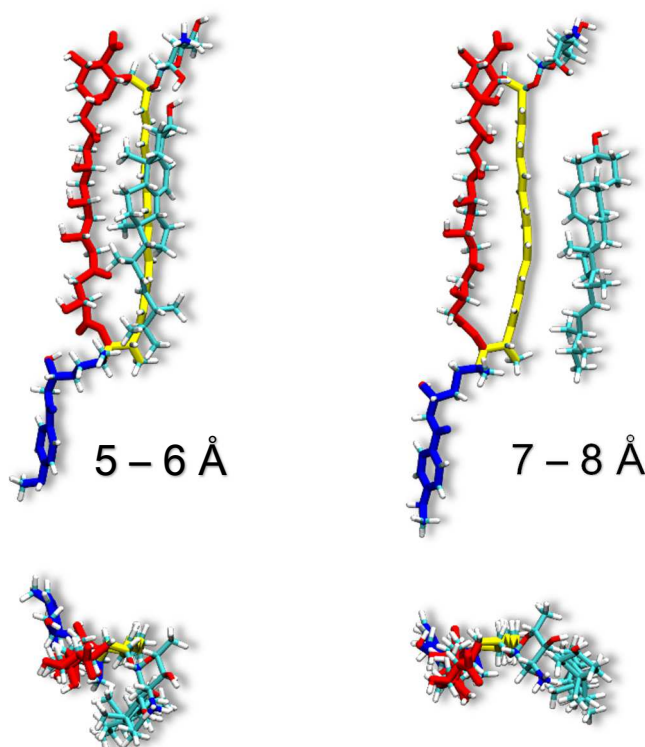
Rys. V. 1.3. Przebiegi profili energii swobodnej dla partrycyny B w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).

Podobnie jak w przypadku partrycyny A, również dla partrycyny B profile energii swobodnej otrzymane dla cząsteczek o wyprostowanym chromoforze odbiegają od tych uzyskanych dla antybiotyku w formie niezizomeryzowanej, rys V.1.3. Wynikowe profile oddziaływania natywnej partrycyny B zarówno z cholesterolem, jak i z ergosterolem wykazują minimum energetyczne przy 8 Å, przy czym dla układu zawierającego ergosterol jest ono o około 2 kcal/mol głębsze. Dla wersji antybiotyku z wyprostowanym chromoforem, podobnie jak w przypadku partrycyny A, również zaobserwowano wystąpienie głównego minimum energetycznego przy ok. 5 Å oraz dodatkowego, płytszego minimum dla odległości ok. 8 Å. Nowe minimum występujące dla układu z cholesterolem jest szersze i nieco głębsze (o ok. 1 kcal/mol) w stosunku do minimum dla układu z ergosterolem.

Analizując zbiorczo otrzymane profile można stwierdzić, iż zmiana geometrii chromoforu w wyniku jego fotoizomeryzacji prowadzi do zmiany w oddziaływaniu antybiotyków – sterol dla większości badanych aromatycznych makrolidów. Płytkie minima lokalne pojawiające się w zakresie 5–6 Å dla niektórych antybiotyków w wersji natywnej, stają się minimami globalnymi dla wszystkich badanych antybiotyków w formie izomerów *all-trans*. Wynik ten oznacza, iż w przypadku cząsteczek o wyprostowanym chromoforze możliwe jest bliższe podejście sterolu

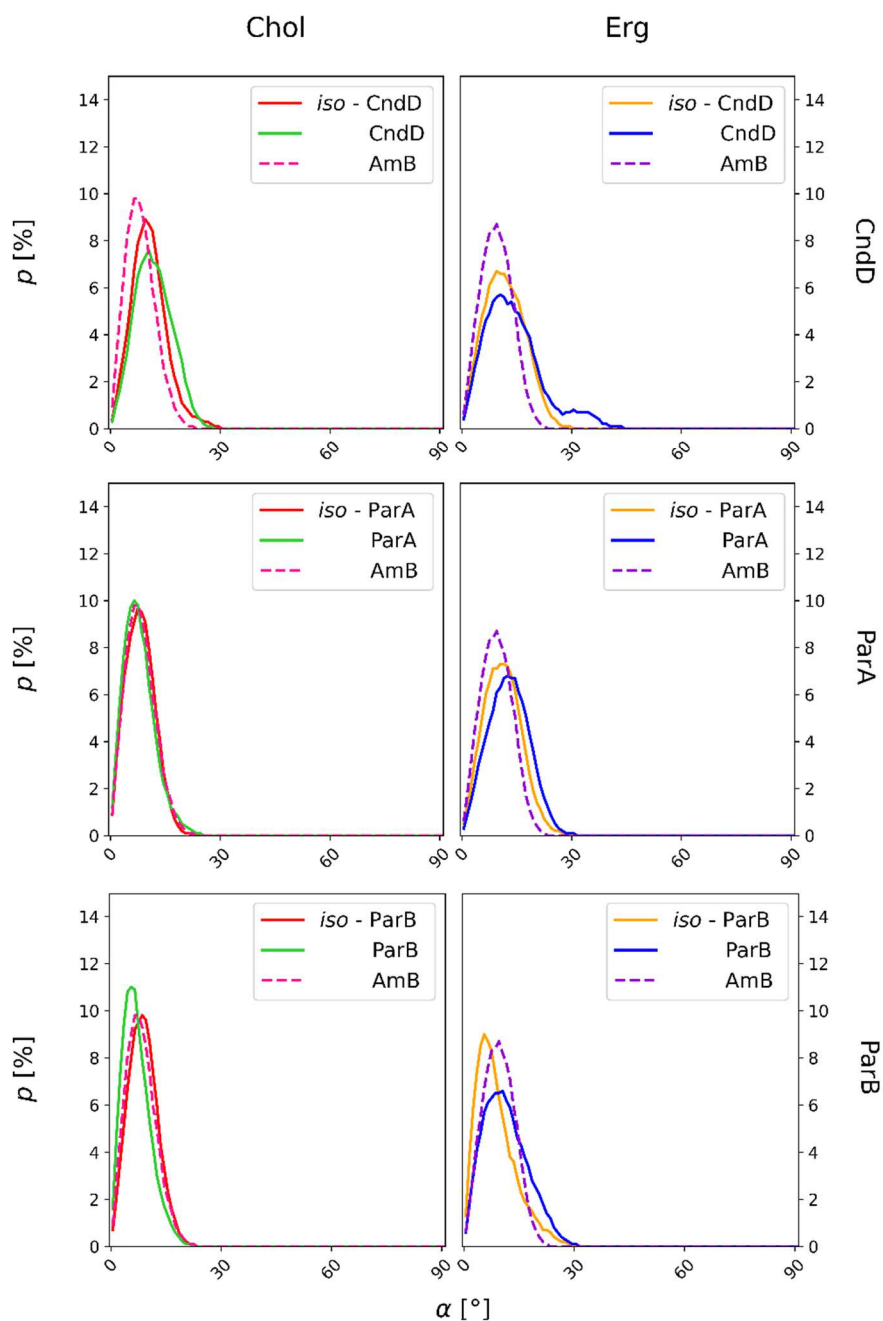
prowadzące do tworzenia bardziej ścisłego kompleksu. Zmiana w sposobie oddziaływania z wybranym steroidem (Chol vs. Erg) najslabiej widoczna jest dla kandycydyny D, a najlepiej dla partrycyny A. Niemniej jednak obserwowane różnice w energiach są na poziomie kilku kcal/mol, co nie może być podstawą do wyjaśnienia odnotowanych różnic w aktywności przeciwgrzybowej oraz hemolitycznej tej grupy związków.

Na podstawie przeprowadzonych symulacji i w oparciu o uzyskane profile energii swobodnej wyznaczono struktury reprezentatywne odpowiadające minimom energetycznym z zakresów 5–6 Å oraz 7–8 Å (Dodatek A). Uzyskane struktury reprezentatywne świadczą o tym, że minima występujące przy większych odległościach odpowiadają oddziaływaniu sterolu „od zewnątrz” poprzez fragment polienowy antybiotyku, natomiast dla bliższych minimów sterol lokuje się w płaszczyźnie pierścienia makrolidowego pomiędzy fragmentem polienowym i polioliowym pierścienia makrolidowego, tak jak jest to widoczne na przykładzie układu zawierającego partrycynę A z ergosterolem na rysunku V.1.4 poniżej.



Rys. V. 1.4 Struktury reprezentatywne dla minimów energetycznych odpowiadających zakresom odległości 5-6 Å (po lewej) i 7-8 Å (po prawej) dla układu zawierającego partrycynę A z ergosterolem.

Zakładając, iż nie samo oddziaływanie ze sterolem, ale również orientacja antybiotyku względem błony może mieć wpływ na aktywność tej grupy związków wobec patogenów grzybowych, przeanalizowano rozkład odchylenia (α) głównej osi pierścienia makrolidowego wyznaczonej względem wiązań C₂₂-C₂₃ i C₂₆-C₂₇ fragmentu heptaenowego antybiotyku od osi Z, prostopadłej do biwarstwy lipidowej, w czasie, rys V.1.5.

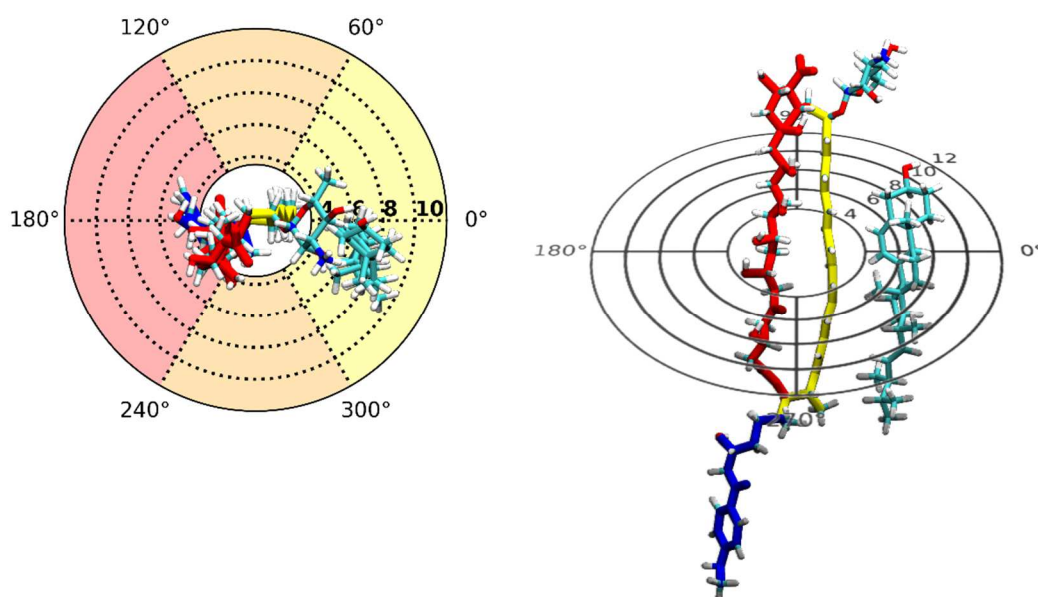


Rys. V. 1.5. Rozkłady gęstości prawdopodobieństwa odchylenia kąta głównej osi antybiotyku względem osi biwarstwy lipidowej (osi Z) dla kandycydyny D, partrycyny A i partrycyny B oraz ich izomerów all-trans w odniesieniu do amfoterycyny B w błonach zawierających cholesterol (lewy panel) lub ergosterol (prawy panel).

Rozkłady odniesiono do wyników otrzymanych dla amfoterycyny B [56] Jak było to wcześniej wykazywane, w przypadku amfoterycyny B nie obserwuje się znaczących różnic w odchyleniu w błonie w zależności od zawartego w niej sterolu [81]. Podobne obserwacje można poczynić dla aromatycznych heptaenów. Biorąc pod uwagę otrzymane rozkłady, można jedynie stwierdzić, iż natywne aromatyczne heptaeny w błonach zawierających cholesterol są ułożone bardziej pionowo, w porównaniu do układów z ergosterolem. Natomiast po izomeryzacji pionizacja antybiotyku w błonie z ergosterolem wzrasta. Niestety, podobnie jak w przypadku uzyskanych przebiegów profili energii swobodnej dla symulacji US, również w tym przypadku zaobserwowane różnice są na tyle niewielkie, iż wnioski stawiane na ich podstawie należy przyjmować z pewną dozą ostrożności.

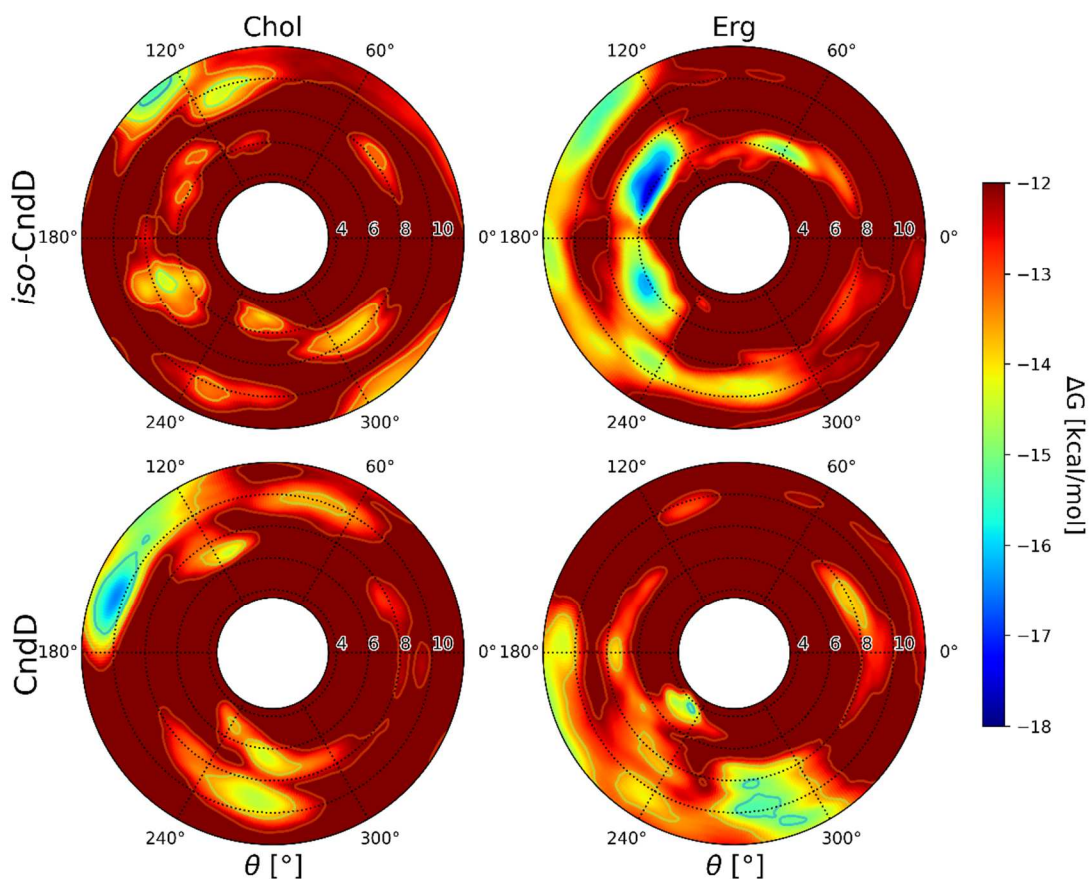
1. 2. Metadynamika

W celu dokładniejszego określenia interakcji między cząsteczką antybiotyku i wybranym steroidem w dwuwarstwie lipidowej przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej z zastosowaniem dwuwymiarowej metadynamiki.



Rys. V. 1.6. Schematyczne przedstawienie metody tworzenia wynikowych map energii swobodnej dla analizowanych układów.

Na ich podstawie sporządzono mapy powierzchni energii swobodnej w zależności od odległości (ξ) centrów mas antybiotyku i śledzonego wariantu sterolu, a także wartości kąta (θ) ułożenia tego sterolu względem antybiotyku. Na rysunku V.1.6 przedstawiono schematycznie sposób ich tworzenia. Biorąc pod uwagę cząsteczkę antybiotyku, otrzymywane mapy można podzielić na cztery regiony: pierwszy, przy fragmencie polienowym (kolor żółty), dwa obszary, gdy sterol umiejscawia się pomiędzy fragmentem polienowym i polioliowym (kolor pomarańczowy) oraz ostatni, czwarty obszar, gdy sterol znajduje się w pobliżu fragmentu polioliowego antybiotyku (kolor czerwony).

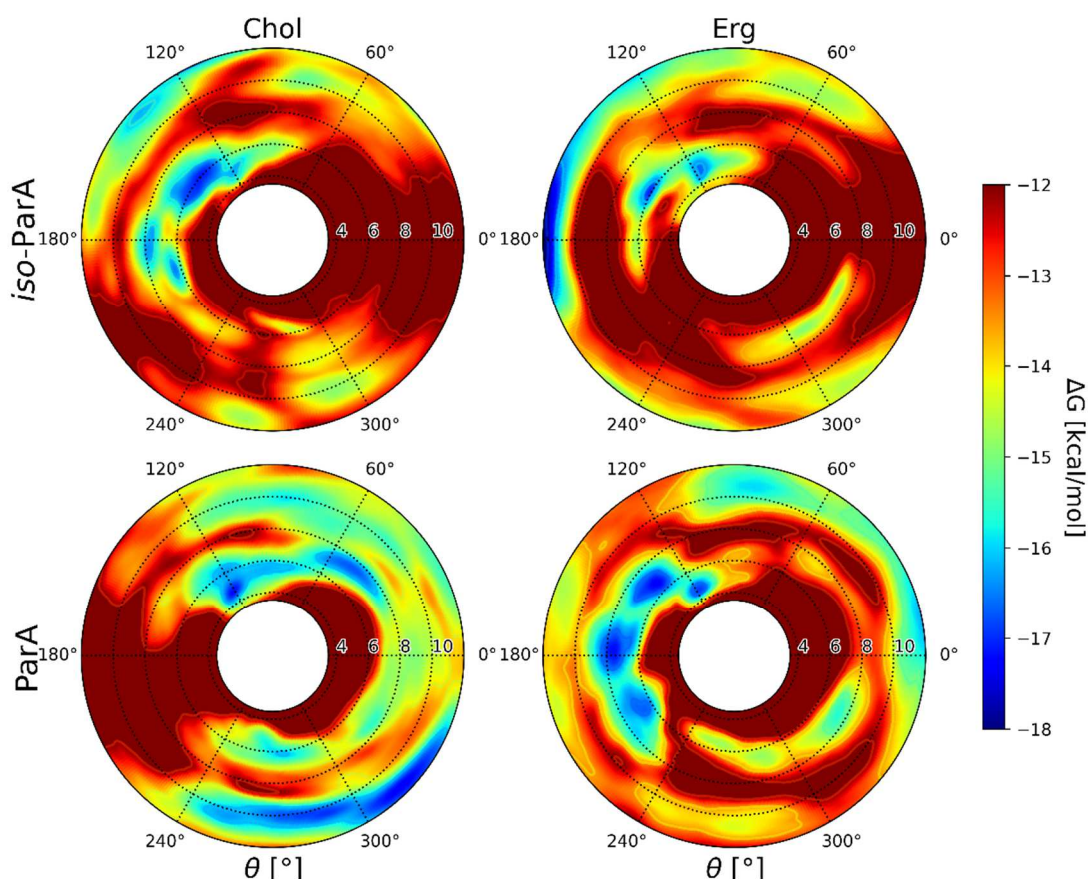


Rys. V. 1.7 Mapy powierzchni energii swobodnej dla kandycydyny D.

Uzyskane mapy energii swobodnej dla kandycydyny D przedstawiono na rysunku V.1.7. W rejonie fragmentu polienowego, dla odległości ok. 8 Å, odnotowano kilka minimów energetycznych dla wszystkich 4 wersji układów symulacyjnych, jednakże są one stosunkowo płytkie. Nieco głębsze minima pojawiają się w obszarach odpowiadających lokowaniu się sterolu pomiędzy fragmentem polienowym i polioliowym antybiotyku. Są one szczególnie zauważalne dla antybiotyków w formie natywnej. Dla kandycydyny D zanurzonej w błonie zawierającej ergosterol w tym obszarze występuje dość szerokie minimum obejmujące zakres odległości od 8 do 11 Å, natomiast dla błony zawierającej cholesterol pojawiają się dwa dodatkowe, lecz również szerokie minima po przeciwnej stronie antybiotyku. W przypadku związków w wersji *all-trans* również pojawiają się minima w tych dwóch regionach. Dla układu *iso-CndD/Chol* najgłębsze w tym zakresie minimum pojawia się przy ok. 10 Å, z kolei dla *iso-CndD/Erg* jest to odległość 6 Å oraz szerokie minimum przy ok. 10 Å po drugiej stronie cząsteczki. W obszarze w pobliżu fragmentu polioliowego dla układu

CndD/Chol widoczne jest szerokie i głębokie minimum przy odległości ok. 11 Å. Dla błony ergosterolowej pojawia się jedno bliskie minimum przy ok 5 Å oraz dwa rozmyte minima przy 8 i 10 Å. Dla antybiotyków w wersji *all-trans* widoczne są dwa minima w zakresie 6–8 Å, które w przypadku błony ergosterolowej są zdecydowanie głębsze, ale i szersze w porównaniu z kompleksem *iso*-CndD/Chol.

Biorąc pod uwagę wpływ zmiany geometrii chromoforu na preferowaną orientację antybiotyk/sterol można stwierdzić, iż wyprostowanie fragmentu polienowego cząsteczki makrolidu prowadzi do lepszego zdefiniowania korzystnych konformacji kompleksów z obydwoma wersjami steroli, przy czym dla ergosterolu jest to oddziaływanie silniejsze.

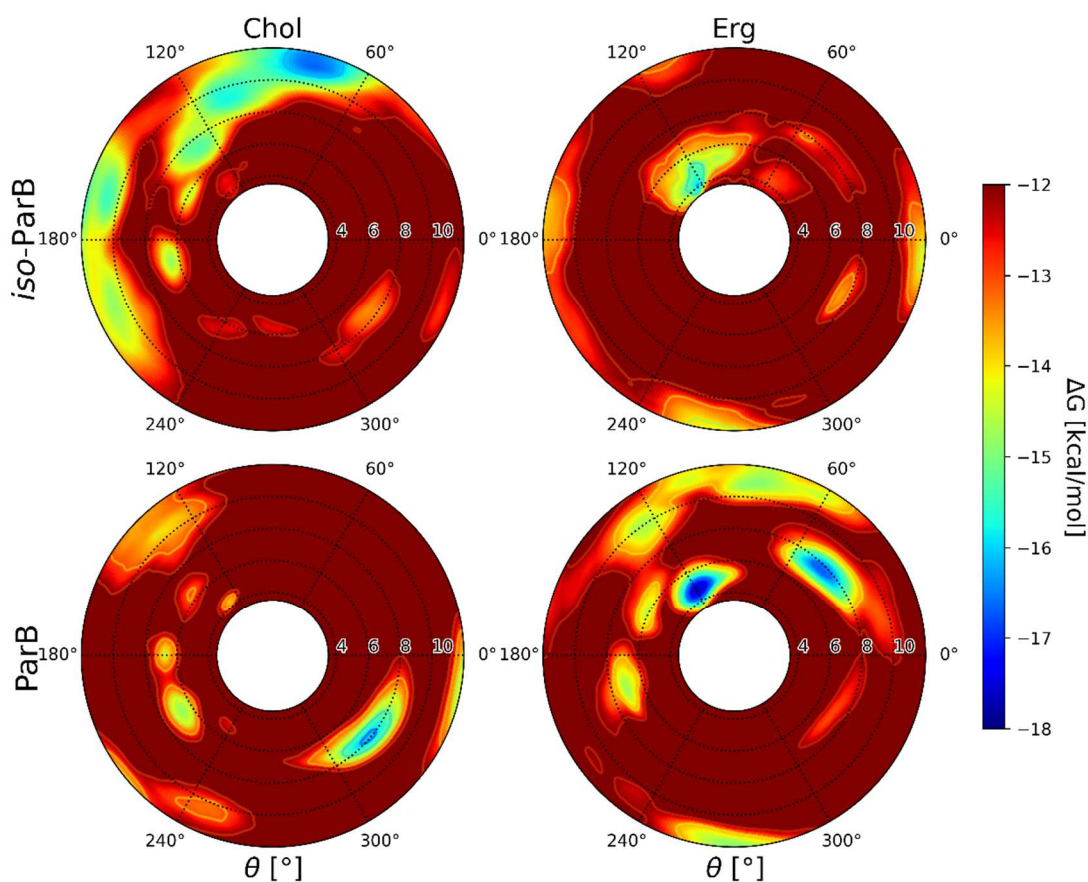


Rys. V. 1.8 Mapy powierzchni energii swobodnej dla partrycyny A.

Mapy energii swobodnej sporządzone dla partrycyny A zaprezentowano na rys. V.1.8. W przypadku natywnej partrycyny A oddziałującej z cholesterolem brak jest specyficzności. Minima energetyczne pojawiają się zarówno dla obszaru

polienowego (płytsze minima), jak i dla orientacji pomiędzy fragmentami polienowym i polioliowym z obu stron cząsteczki (głębsze minima). Dla kompleksu ParA/Erg pojawiające się główne minima energetyczne są głębokie, ale również dość rozmyte. Występują głównie dla obszaru w pobliżu fragmentu polioliowego, ale pojawia się również jedno minimum odpowiadające zakresowi pomiędzy charakterystycznymi fragmentami makrolaktonu przy granicy z częścią polioliową. Podobne minima w tym obszarze można również zaobserwować dla antybiotyków w wersji *all-trans*, przy czym dla kompleksu z ergosterolem są one zdecydowanie węższe.

Uwzględniając zależność pomiędzy geometrią chromoforu a ilością i charakterem preferowanych ułożeń antybiotyk/sterol, podobnie jak w przypadku kandycydyny D, również dla partrycyny A można stwierdzić, iż izomeryzacja pierścienia makrolidowego prowadzi do ujednoczenia oddziaływania z obiema wersjami sterolu.



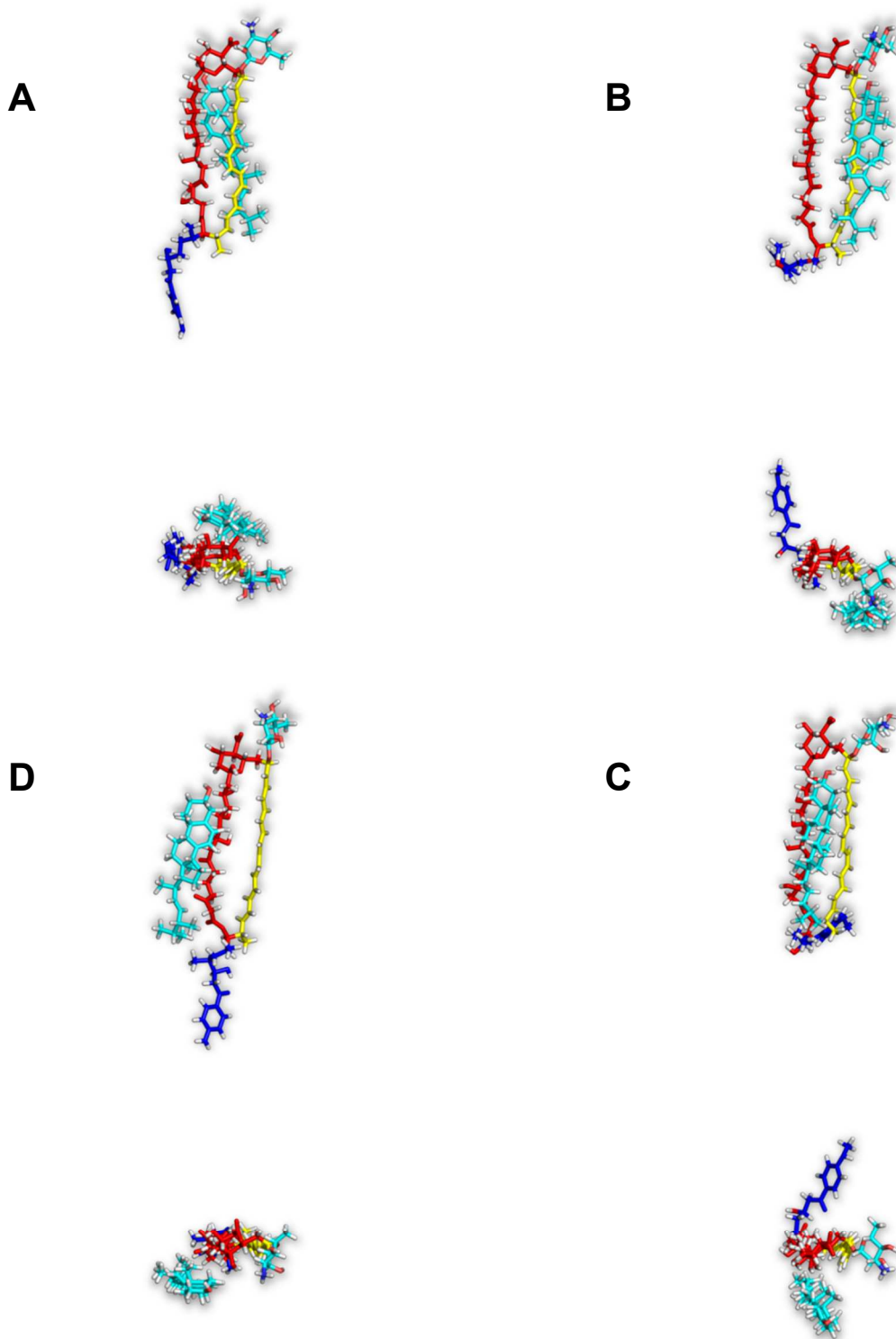
Rys. V. 1.9 Mapy powierzchni energii swobodnej dla partrycyny B.

Mapy energii swobodnej otrzymane na podstawie przeprowadzonych symulacji 2D-metadynamiki dla partrycyny B przedstawiono na rys. V.1.9. Na powierzchni energii swobodnej uzyskanej dla antybiotyku o geometrii chromoforu *cis-trans* zanurzonego w błonie zawierającej cholesterol można zauważyć główne, szerokie minimum przy odległości ok. 8 Å dla obszaru w pobliżu fragmentu polienowego. Podobne – lecz nieco płytsze – minima pojawiają się również na mapach dla pozostałych wersji symulowanych układów. Mapa uzyskana dla natywnej partrycyny B w błonie ergosterolowej wskazuje na występowanie dwóch głównych ułożeń antybiotyk/sterol odpowiadających głębokim minimom w obszarze heptaenowym oraz przy granicy z obszarem polioliowym. Analogiczne, lecz nieco płytsze minima pojawiają się dla kompleksu *iso-ParB/Erg*. W przypadku *all-trans* partrycyny B oddziałującej z cholesterolem zakres występowania minimów obejmuje obszar pomiędzy fragmentem polienowym i polioliowym (wartości kątów 60 – 120°) oraz polioliowym. Minima są dość szerokie (odległości od 6 do ponad 12 Å).

Analizując uzyskane mapy powierzchni energii swobodnej, mając na uwadze efekt wyprostowania fragmentu heptaenowego makrolidu na geometrię powstającego kompleksu AH/sterol, w przypadku partrycyny B można odnotować niewielkie osłabienie oddziaływania z ergosterolem oraz znaczącą zmianę w charakterze jej oddziaływania z cholesterolem.

Podobnie jak dla symulacji przeprowadzonych z zastosowaniem metody Umbrella Sampling, również w przypadku symulacji metadynamiki, wyznaczono struktury reprezentatywne. W oparciu o uzyskane mapy energii swobodnej, wykorzystując analizę klastrową wyłoniono klatki odpowiadające konfiguracjom kompleksu dla których wystąpiły minima energetyczne. Numeracja prezentowanych struktur (dodatek B, str. 93) jest zgodna z numerami przypisanymi minimom na mapach przedstawionych w dodatkach B.1-B.3 (str. 90-92), natomiast ich przypisanie do wyróżnionych regionów wokół cząsteczki antybiotyku zestawiono w tabelach B.1-B.3 (str. 90-92).





Rys. V. 1.10. Przykładowe struktury reprezentatywne dla różnych orientacji sterolu względem antybiotyku uzyskane na podstawie symulacji 2D-MTD: A) równoległe do płaszczyzny pierścienia (60-120°), B) w pobliżu fragmentu polienowego, C) równoległe do płaszczyzny pierścienia (240-300°), D) w pobliżu fragmentu polioliowego.

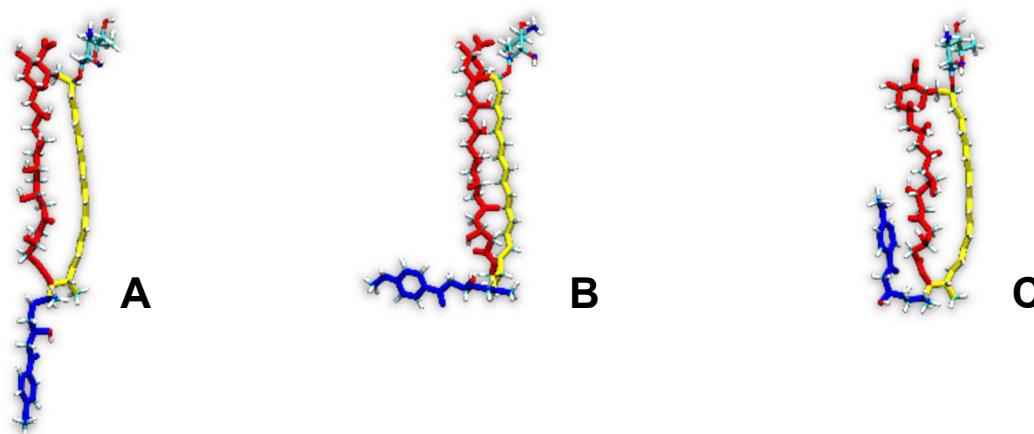
Uwzględniając najbliższe otoczenie antybiotyku, można stwierdzić, że lokowanie się sterolu równoległe do płaszczyzny pierścienia makrolidowego w zakresie 60–120° zaobserwować można dla wszystkich układów zawierających partrycynę A oraz tylko dla partrycyny B w wersji natywnej i zizomeryzowanej zanurzonej w błonie zawierającej ergosterol. Wyraźne minima odpowiadające oddziaływaniu sterolu z fragmentem polienowym antybiotyku pojawiają się dla układów ParA/Chol, ParA/Erg oraz *iso*-ParA/Erg a także dla ParB/Chol oraz ParB/Erg. Występowanie sterolu w zakresie 240–300° odnotować można dla CndD/Chol oraz CndD/Erg, a także dla wszystkich wersji dla partrycyny A. Orientacje dla których cząsteczka sterolu znajduje się w pobliżu fragmentu polioliowego pojawiają się w przypadku kandycydyny D dla układu *iso*-CndD/Erg, dla partrycyny A dla wszystkich z wyjątkiem ParA/Chol, natomiast dla partrycyny B brak jest silnych oddziaływań w tym regionie.

V. 2. Analiza zachowania się łańcucha bocznego aromatycznych makrolidów polienowych

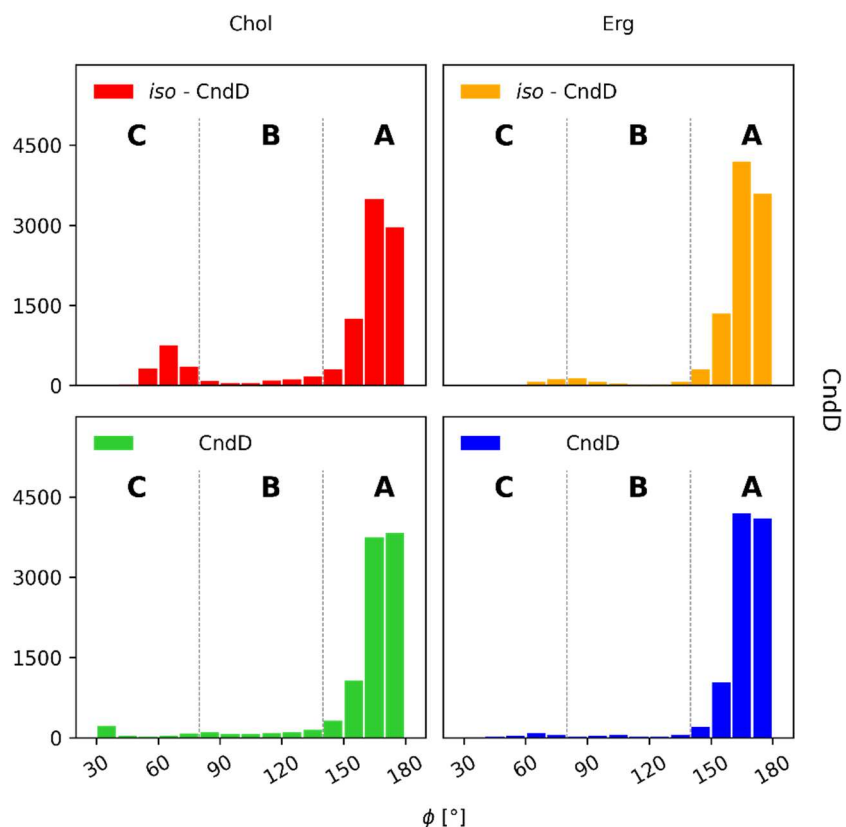
Chcąc uchwycić zachowanie się łańcucha bocznego w błonie lipidowej, na podstawie przeprowadzonych symulacji dynamiki molekularnej wyznaczono histogramy rozkładu kąta (ϕ) pomiędzy aromatycznym łańcuchem bocznym a pierścieniem makrolidowym antybiotyku, zdefiniowanego przez atom azotu p-aminoacetofenonu, atom C₃₆ węglowego łącznika oraz atom C₂₂ makrolaktonu. Definicję taką przyjęto dla wszystkich badanych układów.

2. 1. Ułożenie łańcucha bocznego

W oparciu o otrzymane wyniki, przeprowadzono analizę klastrową mającą na celu wyłonienie struktur odpowiadających poszczególnym wartościom kąta. Na jej podstawie można stwierdzić, że występują trzy ułożenia łańcucha: A) wyprostowany (ϕ ok. 180°), B) ułożony prostopadłe do pierścienia makrolaktonu (ϕ ok. 90°), oraz C) całkowicie zawinięty (ϕ ok. 0°), rys V.2.1.

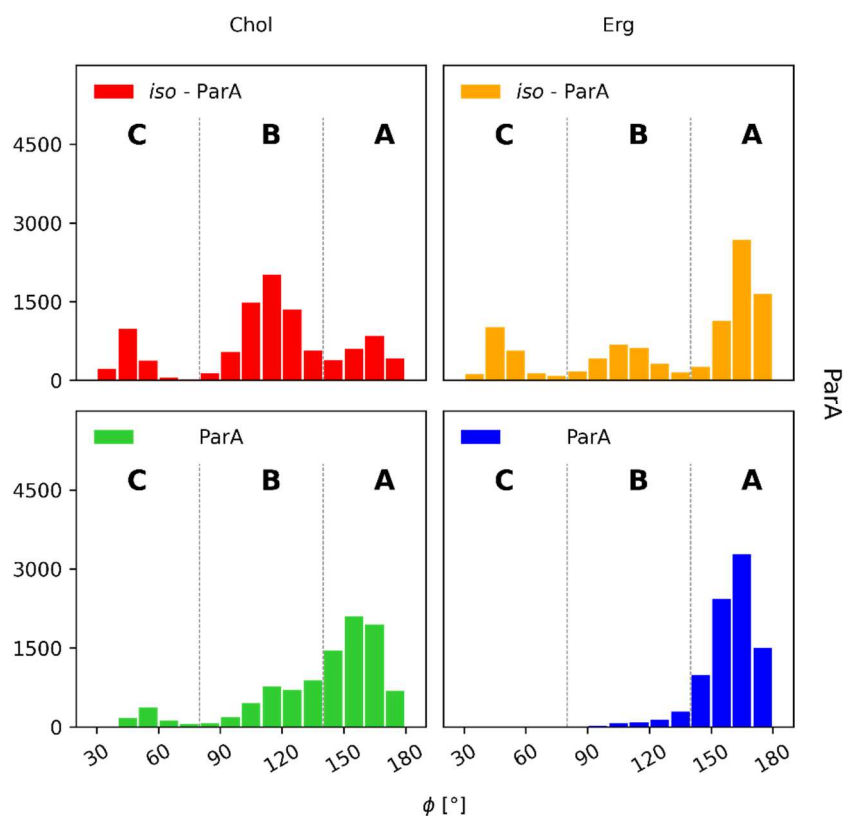


Rys. V. 2.1. Struktury reprezentatywne dla poszczególnych ułożeń łańcucha bocznego: A) wyprostowany, B) podjęty prostopadłe do osi antybiotyku, C) całkowicie zawinięty.



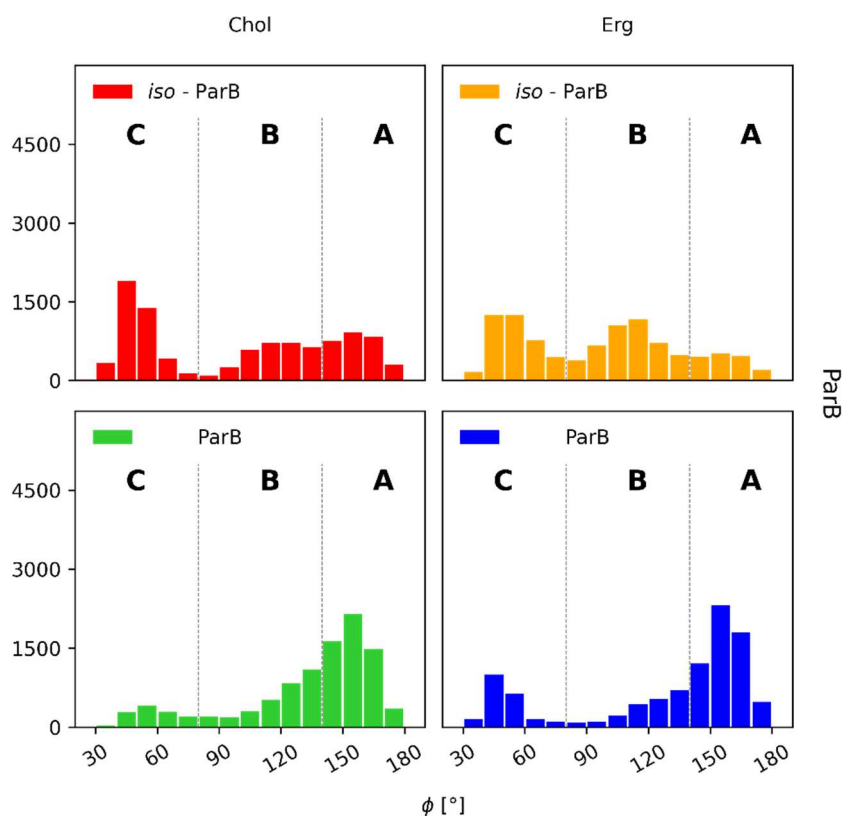
Rys. V. 2.2. Histogram rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla kandycydyny D.

W przypadku kandycydyny D (rys V.2.2) zdecydowanie przeważa jedno ułożenie reszty alkilo-aromatycznej dla wszystkich z analizowanych symulacji – jest to struktura z wyprostowanym ogonem. Dotyczy to szczególnie symulacji dla układu kandycydyny D w formie *cis-trans* w błonie z ergosterolem. W pozostałych przypadkach można wyróżnić również niewielki udział struktur z podgiętym lub całkowicie zawiniętym fragmentem aromatycznym.



Rys. V. 2.3. Histogramy rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla partrycyny A.

Rozkłady uzyskane dla układów zawierających partrycynę A (rys V.2.3) charakteryzują się większym, w porównaniu do kandycydyny D, zróżnicowaniem ułożenia łańcucha aromatycznego. Dla antybiotyku w formie natywnej udziały poszczególnych form są zbliżone dla błony cholesterolowej i ergosterolowej. W przypadku partrycyny A o geometrii chromoforu *all-trans*, histogram otrzymany dla układu z ergosterolem jest zbliżony do tego otrzymanego dla formy natywnej, natomiast wersja z cholesterolom wskazuje na występowanie dwóch konformacji (wyprostowanej i prostopadłej) ze zbliżoną częstotliwością w czasie trwania symulacji.



Rys. V. 2.4. Histogramy rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla partrycyny B.

W przypadku partrycyny B (rys V.2.4) widoczne jest największe zróżnicowanie w uzyskiwanych histogramach spośród wszystkich analizowanych układów. Dla natywnej partrycyny B zanurzonej w błonie z ergosterolem w trakcie symulacji przeważa struktura antybiotyku z wyprostowanym łańcuchem bocznym, pojawia się również niewielka reprezentacja struktur z całkowicie zawiniętym fragmentem aromatycznym. Natomiast dla błony cholesterolowej są to przede wszystkim struktura z wyprostowanym oraz podgiętym ogonem (na zbliżonym poziomie). Dla partrycyny B w formie *all-trans* zarówno w błonie z cholesterolem, jak i ergosterolem obserwuje się największą różnorodność pod względem występujących konformacji łańcucha bocznego w czasie prowadzonych obliczeń, z delikatną przewagą struktur z wyprostowanym łańcuchem bocznym w obu wersjach biwarstwy.

Biorąc pod uwagę wszystkie uzyskane rozkłady dla badanych antybiotyków, można zaobserwować, że dla kandycydyny D brak jest znaczących różnic pomiędzy wszystkimi wersjami układów. Dla antybiotyków wchodzących w skład kompleksu Partrycyny, przede wszystkim dla partrycyny B widoczny jest wpływ zmiany geometrii chromoforu na częstość wystąpień aromatycznego łańcucha bocznego w danym ułożeniu w trakcie symulacji. Może to wynikać z większego usztywnienia fragmentu makrolidowego antybiotyku w wersji *all-trans* i kompensacją naprężeń wewnątrzcząsteczkowych w postaci większej ruchomości łańcucha bocznego.

2. 2. Zanurzenie łańcucha bocznego w błonie lipidowej w trakcie symulacji

Ponadto, przeanalizowano zanurzenie łańcucha bocznego w dolnym listku biwarstwy lipidowej w trakcie symulacji dla wszystkich badanych układów. W tabeli V.2.1 zestawiono procent czasu symulacji, w jakim możliwe jest oddziaływanie łańcucha bocznego z lipidami zawartymi w dolnej warstwie błony dla wszystkich dwunastu analizowanych układów.

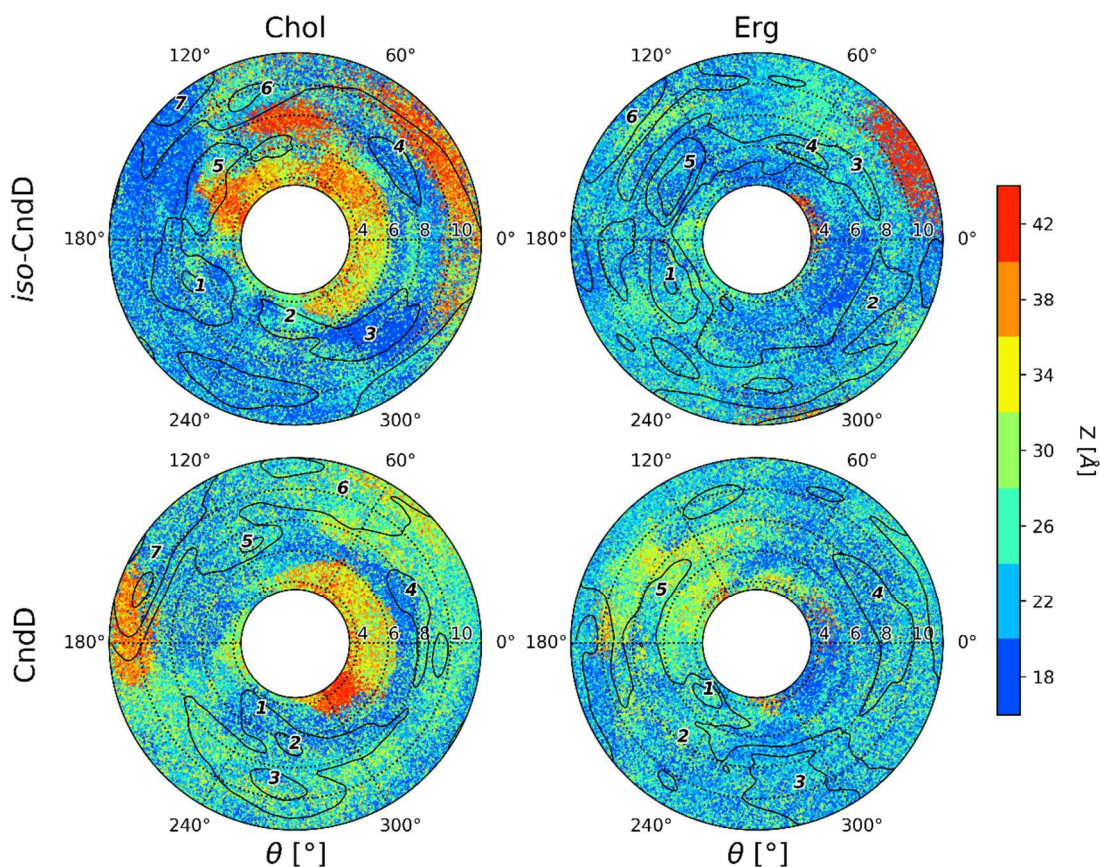
Tabela V. 2.1. Czas zanurzenia aromatycznego łańcucha bocznego w drugim listku biwarstwy lipidowej w trakcie symulacji wyrażony w procentach dla wszystkich badanych układów.

	<i>all-trans</i>		<i>cis-trans</i>	
	Chol	Erg	Chol	Erg
CndD	52.83 %	64.23 %	46.45 %	58.59 %
ParA	16.15 %	48.97 %	49.68 %	73.18 %
ParB	24.08 %	20.92 %	46.90 %	48.13 %

Podobnie jak w wyniku poprzednich analiz, również w tym przypadku zaobserwować można podobne zależności. Dla układu zawierającego kandycydynę D nie zaobserwowano znaczących różnic - ani pod względem geometrii chromoforu antybiotyku, ani wersji sterolu zanurzonego w błonie. Dla kompleksu Partrycyny widoczne jest zróżnicowanie z uwagi na konformacje fragmentu polienowego antybiotyku (ParA i B), a także typu sterolu (ParA).

Przeanalizowano również zależność odległości (Z) środków mas wyznaczanych przez atomy węgla aromatycznego pierścienia łańcucha bocznego oraz atomów fosforu fosfolipidów z drugiego listka biwarstwy od orientacji kompleksu

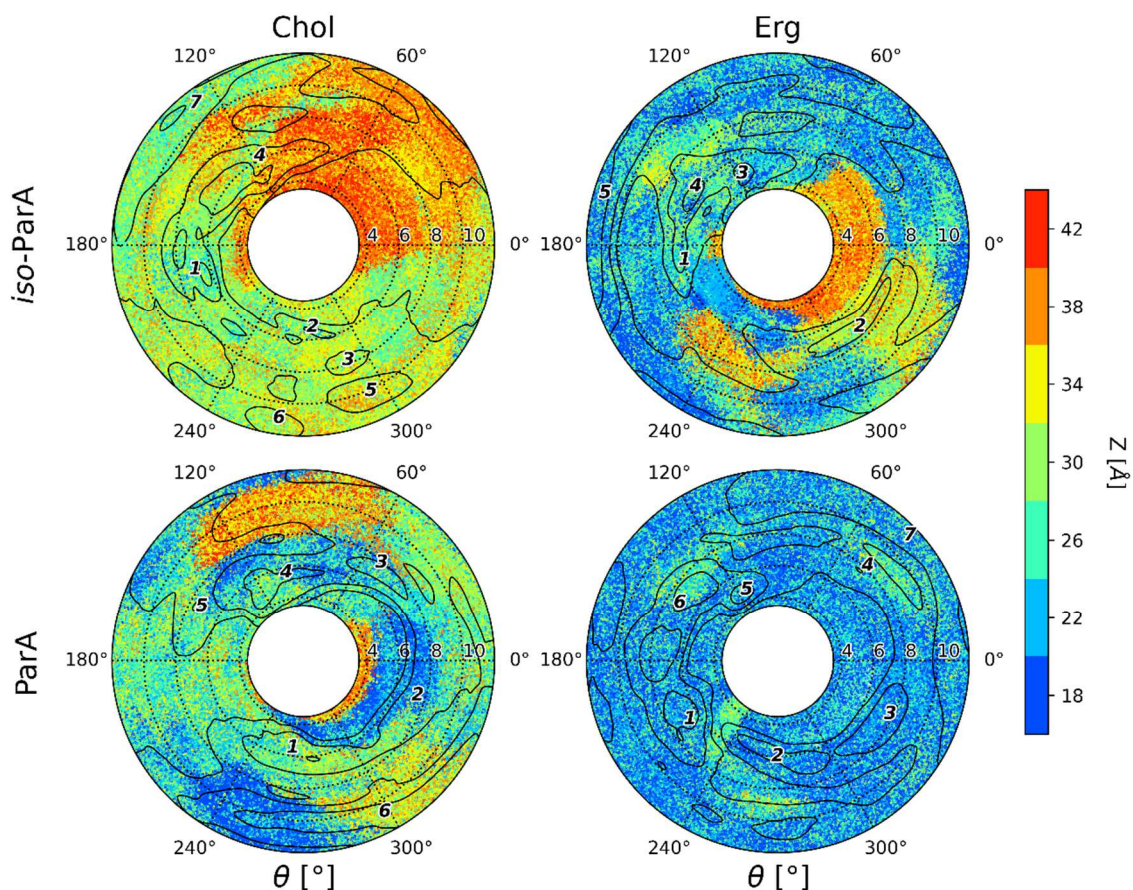
binarnego antybiotku sterol w trakcie symulacji. Wyniki zestawiono z danymi otrzymanymi dla symulacji 2D-metadynamiki i przedstawiono poniżej na rysunkach V.2.5-7. Odległości poniżej 26 Å odpowiadają sytuacji, gdy łańcuch boczny znajduje się na granicy dwóch warstw, natomiast poniżej 22 Å, gdy oddziałuje z fosfolipidami dolnej warstwy błony (łańcuch boczny jest wyprostowany).



Rys. V. 2.5. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla kandycydyny D.

Otrzymane mapy zanurzenia łańcucha bocznego dla kandycydyny D wskazują, że dla antybiotku w wersji natywnej można zauważyć nieznaczną różnicę pomiędzy analizowanymi wersjami błon lipidowych. Układ zawierający cząsteczki cholesterolu wskazuje na rzadsze występowanie antybiotku w konformacji pozwalającej na oddziaływanie ze składnikami dolnej warstwy lokując się głównie na granicy dwóch warstw. Dla kandycydyny D w formie *all-trans* dla obu wariantów błony zależność ta jest na zbliżonym poziomie. W przypadku błon zawierających cholesterol dla obu geometrii chromoforu można zauważyć

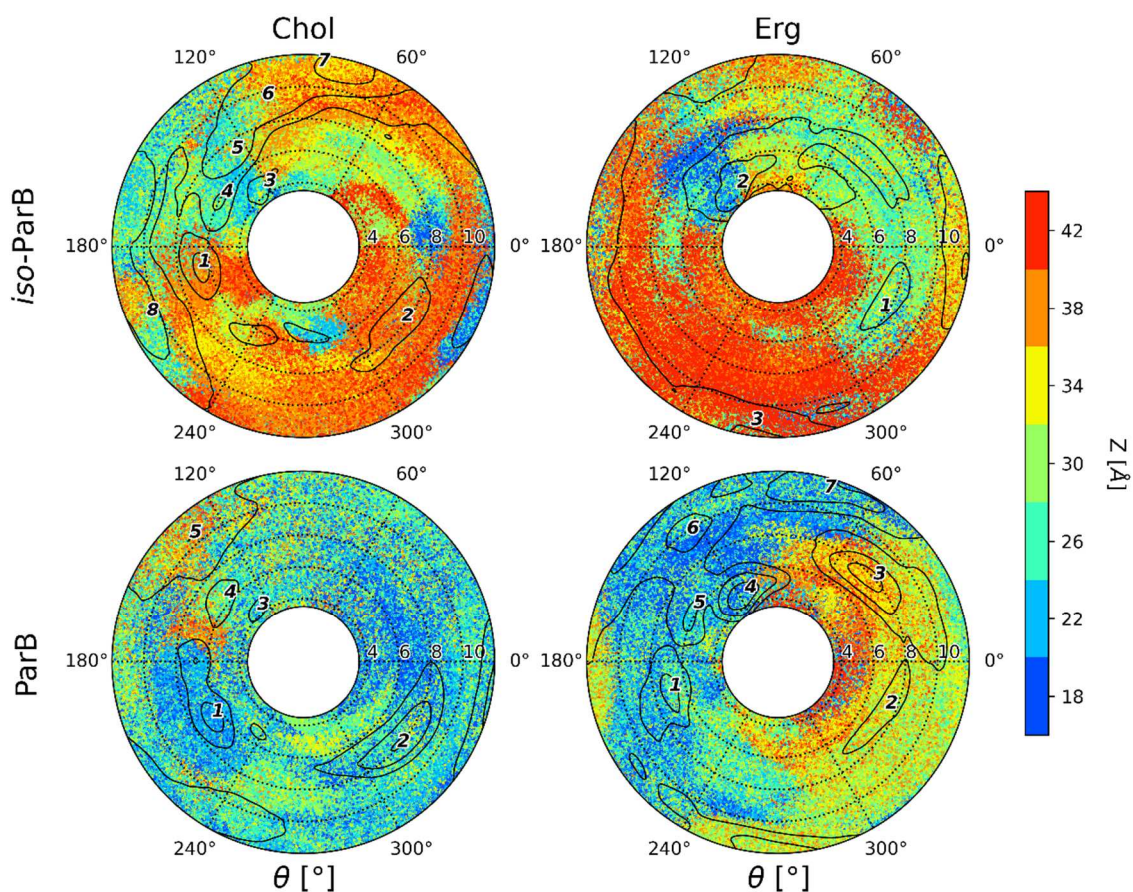
podginanie się łańcucha bocznego podczas bliskiego (odległość pomiędzy centrami mas $\xi < 6 \text{ \AA}$) lokowania się sterolu w pobliżu fragmentu polienowego ($\theta \approx 0^\circ$). W przypadku minimum energetycznych odnotowanych we wszystkich wersjach badanych układów zauważyć można, iż dla kandycydyny D odpowiadają one ułożeniom antybiotyku, gdy łańcuch boczny jest zanurzony w drugim listku biwarstwy bądź w mniejszym stopniu lokuje się na granicy dwóch warstw.



Rys. V. 2.6. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimumami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla partrycyny A.

Wyniki uzyskane dla partrycyny A wskazują na największe zróżnicowanie wśród czterech analizowanych układów. Dla natywnej partrycyny A zanurzonej w błonie z ergosterolem łańcuch boczny przeważnie znajduje się w drugim listku biwarstwy lipidowej. W przypadku kompleksu ParA/Chol oddziaływanie z dolną warstwą błony lipidowej również występuje, jednak jest to lokowanie się głównie na granicy dwóch warstw. Ponadto, pojawiają się również regiony, w których

łańcuch boczny znajduje się w całości w górnym listku biwarstwy. Dla układu *iso*-partrycyna A – ergosterol otrzymany obraz jest zbliżony do tego dla antybiotyku w formie natywnej. Aromatyczny łańcuch boczny w większości orientacji znajduje się w drugim listku biwarstwy, natomiast występują również obszary, gdzie antybiotyk w całości znajduje się w górnej warstwie błony. Układ *iso*-ParA/Chol najbardziej odbiega od pozostałych wyników dla tego antybiotyku. Przeważa lokowanie się antybiotyku w całości w górnym listku lub pomiędzy górną i dolną warstwą. Odniesienie uzyskanych wyników do minimów energetycznych wytypowanych na podstawie map energii swobodnej dla partrycyny A potwierdzają zależność odnotowaną dla kandycydyny D. Obszary minimów energetycznych odpowiadają lokowaniu aromatycznego łańcucha bocznego w dolnym listku lub na granicy pomiędzy warstwami błony lipidowej.



Rys. V. 2.7. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla partrycyny B.



Analizując mapy zanurzenia uzyskane dla partrycyny B widoczna jest różnica pomiędzy wynikami uzyskanymi dla antybiotyku w wersji natywnej i po izomeryzacji. Dla cząsteczek o geometrii chromoforu *cis-trans* widoczne jest częstsze występowanie łańcucha bocznego w drugim listku w porównaniu do formy *all-trans*, zarówno dla błony zawierającej cholesterol jak i ergosterol. W przypadku izo-partrycyny A aromatyczny ogon antybiotyku lokuje się w pobliżu drugiego listka biwarstwy (na granicy dwóch warstw lub bezpośrednio w dolnej warstwie) głównie dla orientacji odpowiadających minimom energetycznym wyznaczonym na podstawie symulacji 2D-MTD.

Zestawiając ze sobą wyniki uzyskane dla wszystkich 12 układów można stwierdzić, że zauważalne różnice w poziomie zanurzenia aromatycznego łańcucha bocznego w drugim listku biwarstwy lipidowej występują w przypadku Partrycyny, natomiast w przypadku kandycydyny D nie można wskazać znaczących różnic ani pomiędzy wersjami antybiotyku, ani sterolami znajdującymi się w środowisku błony.

Warto zwrócić uwagę, iż istnieje zależność pomiędzy wystąpieniem minimum energetycznego, a lokalizacją aromatycznego łańcucha bocznego w pobliżu drugiego listka błony lipidowej.

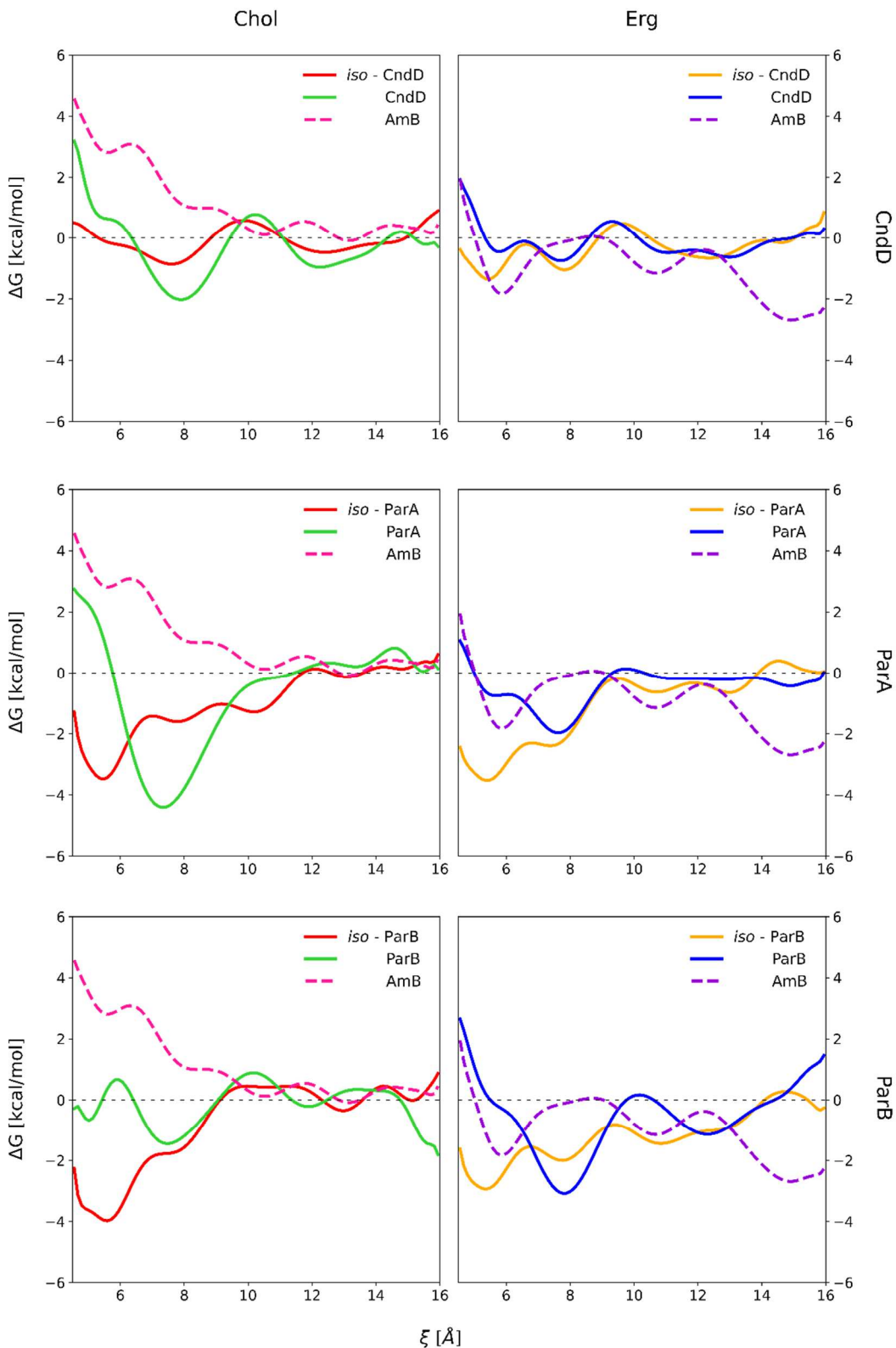
Otrzymane wyniki mogą wskazywać na wykorzystywanie przez aromatyczne makrolidy heptaenowe w środowisku błony lipidowej łańcucha bocznego w charakterze „kotwicy” ułatwiającej interakcje antybiotyku ze składnikami biwarstwy.

VI. DYSKUSJA

Prezentowane wyniki dotyczą badań wpływu zmiany geometrii chromoforu aromatycznych makrolidów heptaenowych (AH) na oddziaływanie ze sterolami zawartymi w błonie lipidowej. Warto nadmienić, iż są to pierwsze badania prowadzone z zastosowaniem najnowszych metod modelowania molekularnego dla tej podgrupy antybiotyków i ich nowo otrzymanych izomerów *all-trans*. Przeprowadzone eksperymenty obliczeniowe miały na celu weryfikację hipotezy o zmianie sposobu oddziaływania antybiotyk-sterol w błonie lipidowej w wyniku fotochemicznej izomeryzacji chromoforu cząsteczki makrolidu, prowadzącej do uzyskania struktury o geometrii chromoforu identycznej z amfoterycyną B. Prowadzone symulacje uwzględniały oddziaływanie pojedynczej cząsteczki antybiotyku z wybranym steroidem zanurzonych w błonie lipidowej. W trakcie badań nad tą grupą związków wykorzystano dwie metody polepszenia oszacowania energii swobodnej: 1D-Umbrella Sampling oraz 2D-metadynamikę.

VI. 1. 1D-Umbrella Sampling

Na podstawie wyników otrzymanych z symulacji z zastosowaniem 1D-US można stwierdzić, iż wyprostowanie chromoforu cząsteczki makrolidu wpływa na oddziaływanie antybiotyk-sterol, w większości przypadków umożliwiając bliższe podejście sterolu do cząsteczki makrolidu i prowadząc do powstawania bardziej ścisłego kompleksu, co jest szczególnie widoczne dla partrycyny A oraz partrycyny B. Otrzymane profile energii swobodnej dla wszystkich 12 analizowanych układów zestawiono z wynikami symulacji dla amfoterycyny B przeprowadzonych w identycznych warunkach [56], rys. VI.1.1.



Rys. VI. 1.1. Zestawienie przebiegów profili energetycznych dla kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B i ich izomerów *all-trans* w odniesieniu do amfoterycyny B dla układów zawierających cholesterol i ergosterol.

Na jego podstawie można stwierdzić, że uzyskiwane przebiegi profili energii swobodnej dla izomerów *all-trans* AH są zbliżone do profilu dla kompleksu

AmB/Erg (obserwowane we wszystkich przypadkach minimum energetyczne pojawiające się przy ok. 6 Å). Niestety brak jest rozróżnienia pod względem typu sterolu z jakim cząsteczka wchodzi w interakcję.

Porównując relacje AmB/sterol i natywny AH/sterol na podstawie symulacji 1D-US można stwierdzić, iż energetyczny opis tych oddziaływań mógłby – przynajmniej częściowo – stanowić wyjaśnienie molekularnych podstaw selektywnej toksyczności tych cząsteczek. Profile energii swobodnej AmB/Chol i AmB/Erg różnią się znacząco między sobą, co znajduje odzwierciedlenie w obserwowanej aktywności hemolitycznej oraz przeciwgrzybowej. Jednocześnie, przebiegi profili energii swobodnej oddziaływania natywnych AH z cholesterolem i z ergosterolem są na zbliżonym poziomie, co można byłoby uznać za molekularną podstawę niskiej selektywnej toksyczności AH. Hipotezę tę poddają jednak w wątpliwość wyniki otrzymane dla oddziaływania izoform AH z Chol oraz Erg. *All-trans* AH w dalszym ciągu oddziałują podobnie z obydwoma wersjami steroli. Z drugiej strony, wstępne badania biologiczne pokazały, iż wyprostowanie chromoforu radykalnie poprawia selektywną toksyczność tej grupy związków (przy jednoczesnym, niewielkim obniżeniu aktywności przeciwgrzybowej) [56]. Sytuacja ta może wskazywać, iż oddziaływanie sterolu z cząsteczką antybiotyku od strony polienowej nie stanowi podstawy selektywnej toksyczności tej grupy związków na poziomie molekularnym lub też mechanizm asocjacji polienów z podgrupy aromatycznych heptaenów do formy funkcjonalnych kanałów jest inny, niżli dla amfoterycyny B.

VI. 2. 2D-Metadynamika

Aby podjąć próbę rozstrzygnięcia tego zagadnienia, należy na wstępie zadać pytanie, czy binarny kompleks antybiotyku/sterol, w którym Chol/Erg znajduje się po stronie polienowej, stanowi optymalną geometrię oddziaływań dla obydwu wersji analizowanych cząsteczek.

W celu oszacowania preferowanej orientacji steroli względem cząsteczek antybiotyków, a także uchwycenia zachowania się aromatycznego łańcucha bocznego przeprowadzono symulację 2D-metadynamiki, w trakcie której



uwzględniono nie tylko odległość, ale również kąt ułożenia sterolu względem makrolidu.

Obserwując ilość minimów na mapach energii swobodnej oraz ich głębokość dla wszystkich dwunastu układów, można stwierdzić, iż najsłabsze pod względem energetycznym oraz najgorzej zdefiniowane pod względem geometrycznym są oddziaływania kandycydyny D ze sterolami, zaś wyprostowanie chromoforu niewiele w tej kwestii zmienia, przynajmniej w przypadku oddziaływań ścisłych (poniżej ok. 8 Å). Ponadto, nie da się zaobserwować fundamentalnych różnic w oddziaływaniu natywnej CndD z cholesterolem i ergosterolem, zaś efekty fotoizomeryzacji antybiotyku sprowadzają się do pogłębiania lub spłykania minimów wcześniej istniejących dla geometrii *cis-trans*. Podobne wnioski można wysnuć dla partrycyny B oraz jej pochodnej *all-trans*, z tą różnicą, iż obie wersje ParB chętniej oddziałują ściśle ze sterolami, tj. głębsze minima pojawiają się dla mniejszych dystansów antybiotyk-sterol. Wreszcie, prawidłowościom wyżej opisanym zupełnie nie podlegają partrycyna A oraz izo-partrycyna A. W przypadku tych czterech układów obserwuje się więcej, szerszych oraz głębszych minimów energetycznych dla wersji natywnej, zaś fotoizomeryzacja chromoforu partrycyny A właściwie odwraca geometrię oddziaływań antybiotyk/cholesterol. Choćby z tego względu, partrycyna A oraz jej izoforma jawią się jako cząsteczki najciekawsze pod względem tworzenia kompleksów binarnych ze sterolami w środowisku biwarstwy lipidowej.

Uzyskane wyniki okazały się dość zaskakujące. Z przeprowadzonych symulacji wynika, iż optymalną orientacją AH/sterol dla tej podgrupy polienów jest taka, gdy cząsteczka cholesterolu lub ergosterolu znajduje się w pobliżu fragmentu polioloowego lub w szczelinie pomiędzy częścią polioloową i polienową pierścienia makrolidowego. Minima energetyczne w regionie polienowym pojawiają się dla niektórych układów, jednak nie są to ułożenia najbardziej preferowane. Dane te wskazują na odmienną w stosunku do powszechnie przyjmowanego paradygmatu dla AmB orientację kompleksu, postulującego, iż w sterol w trakcie oddziaływanie z cząsteczką polieniu lokuje się w pobliżu fragmentu heptaenowego pierścienia makrolidowego.



W przypadku amfoterycyny B, dla utworzenia funkcjonalnego kanału konieczne jest oddziaływanie większej ilości (4–12) cząsteczek antybiotyku [31]. Możliwe jest, że w przypadku tej podgrupy makrolidów polienowych minima energetyczne obserwowane dla ułożenia sterolu w płaszczyźnie pierścienia makrolidowego odpowiadają etapowi pośredniemu tworzenia transbłonowych struktur kanałowych. Preferencja tej właśnie orientacji może być związana z przygotowywaniem kompleksu binarnego do multimeryzacji w struktury wyższego rzędu, które następnie pozwolą na powstanie pełnego kanału jonowego w błonie lipidowej, który zawierał będzie cylindrycznie rozłożone cząsteczki antybiotyku. Hipotetycznie, pomiędzy molekułami AH mogą znajdować się cząsteczki sterolu stabilizujące tę strukturę.

VI. 3. Rola aromatycznego łańcucha bocznego

Kolejnym z aspektów uwzględnianych w badaniach nad oddziaływaniem aromatycznych makrolidów ze sterolami w błonie lipidowej było zachowanie się łańcucha bocznego podczas przeprowadzonych symulacji. Analizy wskazały na możliwość występowania 3 ułożeń aromatycznego „ogona” antybiotyku: wyprostowanego, podgiętego oraz całkowicie zawiniętego (rys V.2.1, str. 53). W przypadku antybiotyków w formie natywnej przeważa konformacja z wyprostowanym łańcuchem bocznym, co jest najbardziej widoczne dla kandycydyny D, natomiast w przypadku partrycyny A oraz partrycyny B widoczny jest również udział struktur z całkowicie zawiniętym łańcuchem bocznym. Zmiana geometrii chromoforu nie wpływa znacząco na zachowanie się alkilo-aromatycznej reszty kandycydyny D. W przeciwieństwie do kandycydyny D, dla izomerów *all-trans* antybiotyków wchodzących w skład kompleksu Partrycyny widoczna jest zdecydowana zmiana w rozkładzie ułożenia się łańcucha bocznego w trakcie symulacji. Wyprostowanie chromoforu w przypadku tych cząsteczek skutkuje występowaniem reszty alkilo-aromatycznej we wszystkich trzech możliwych konformacjach na zbliżonym poziomie.

Pod względem strukturalnym w badanych cząsteczkach jako charakterystyczne można wyróżnić następujące elementy:

- ilość funkcji tlenowych we fragmencie polioliowym zdolnych do utworzenia wewnątrzcząsteczkowej sieci wiązań wodorowych (większa dla Partrycyny);
- obecność grupy metylowej na węglu C₄₀ w obrębie części alkilowej łańcucha bocznego dla kandycydyny D;
- obecność grupy metylowej na azocie p-aminoacetofenonu aromatycznego ogona (partrycyna A vs. partrycyna B).

Biorąc pod uwagę różnice pomiędzy analizowanymi cząsteczkami w obrębie fragmentu polioliowego można postulować, że jednym z elementów mających wpływ na oddziaływanie tej grupy antybiotyków ze sterolami jest usztywnienie pierścienia makrolidowego. Kandycydyna D - charakteryzująca się mniejszą, w stosunku do Partrycyny, ilością funkcji tlenowych we wspomnianym fragmencie - przejawia niewielkie różnice w wiązaniu ze sterolami pod względem energetycznym, zarówno porównując cząsteczki natywne i po izomeryzacji, jak i uwzględniając typ sterolu zawartego w błonie. Możliwe jest, że z uwagi na stosunkowo krótki fragment, w obrębie którego tworzyć się mogą wiązania wodorowe, cząsteczka kandycydyny D, nawet z wyprostowanym chromoforem, wciąż wykazuje dużą labilność konformacyjną i w efekcie brak jest preferencji pod względem oddziałującego sterolu w trakcie tworzenia kompleksu.

W obrębie aromatycznego łańcucha bocznego można wyróżnić dwie zmienne w strukturze badanych antybiotyków. Są to reszty metylowe zlokalizowane odpowiednio na węglu C₄₀ (CndD vs. ParB) oraz na azocie p-aminoacetofenonu (ParA vs. ParB). Wobec uzyskanych wyników dla kandycydyny D i partrycyny B można wysnuć wniosek, iż obecność dodatkowej grupy CH₃ we fragmencie łącznikowym zdecydowanie zmniejsza ruchomość łańcucha bocznego antybiotyku i preferowane jest głównie ułożenie, gdy łańcuch jest wyprostowany ($\theta \approx 180^\circ$). Na fakt ten może mieć wpływ zarówno zawada steryczna wynikająca z obecności grupy metylowej, jak również stabilizacja takiego ułożenia poprzez oddziaływania hydrofobowe. Natomiast, jak pokazują dane otrzymane dla partrycyny B, brak metylacji węgla C₄₀ znacząco zwiększa mobilność części alkilowej łańcucha bocznego. Z drugiej strony, obecność grupy metylowej na azocie p-aminoacetofenonu, z uwagi na zwiększenie lipofilowości tego fragmentu



cząsteczki, zdecydowanie zwiększa możliwość oddziaływania antybiotyku ze składnikami drugiego listka biwarstwy lipidowej. Może to stanowić wyjaśnienie korelacji pomiędzy wystąpieniem minimum energetycznego dla danej orientacji, a zanurzeniem łańcucha bocznego w dolnej części błony. Zależność ta najbardziej widoczna jest dla partrycyny A. Co więcej, również właśnie dla tego antybiotyku można odnotować zauważalną różnicę pomiędzy wynikami uzyskiwanymi dla kompleksów z cholesterolem i ergosterolem – na korzyść oddziaływania z ergosterolem zarówno w wersji natywnej, jak i po izomeryzacji.

Obserwowana zależność pomiędzy wystąpieniem minimum energetycznego, a lokowaniem się łańcucha bocznego w pobliżu drugiej warstwy błony lipidowej może wskazywać na rolę aromatycznego „ogona” w oddziaływaniu tej grupy związków ze składnikami biwarstwy. Być może obecność reszty p-aminoacetofenonu w strukturze AH pozwala na wykorzystanie jej jako molekularnej „kotwicy”. Aromatyczny łańcuch boczny może przyczyniać się do 1) efektywniejszego wnikania cząsteczki antybiotyku do błony poprzez oddziaływania hydrofobowe, 2) szybszego formowanie struktury kanału oraz 3) jego polepszonej stabilizacji, co w efekcie prowadzi do obserwowanej wyższej aktywności przeciwgrzybowej w badaniach *in vitro*.

Na podstawie otrzymanych wyników dla zachowania się łańcucha bocznego pojedynczej cząsteczki antybiotyku w trakcie symulacji można stwierdzić, że w przypadku oddziaływania tej grupy związków ze sterolami zawartymi w środowisku biwarstwy lipidowej obecność grupy metylowej na węglu C₄₀ nie jest korzystna, natomiast występowanie grupy CH₃ na atomie azotu aromatycznego łańcucha bocznego jest sytuacją jak najbardziej pożądaną zarówno pod względem lokalizacji cząsteczki w błonie, jaki i energetyki tworzenia kompleksu.

VI. 4. Podsumowanie

Analizując zbiorczo wszystkie uzyskane wyniki dla 12 układów symulacyjnych można wnioskować, że w przypadku kandycydyny D brak jest wyraźnego wpływu izomeryzacji fragmentu polienowego makrolidu na oddziaływanie ze sterolem



w środowisku błony lipidowej, a także na zachowanie się aromatycznego łańcucha bocznego. Wyraźne różnice pomiędzy formami *cis-trans* i *all-trans* można natomiast zaobserwować dla składników kompleksu Partrycyny, w szczególności dla partrycyny A. Obserwacja ta znajduje, przynajmniej częściowe, przełożenie w postaci wyników badań aktywności biologicznej badanej grupy związków, co czyni partrycynę A najbardziej interesującą cząsteczką z punktu widzenia dalszych badań i modyfikacji w celu opracowania skuteczniejszej terapii infekcji grzybiczych.

Trzeba jednakże podkreślić, z całą stanowczością, że uzyskane różnice w otrzymanych wynikach wskazują, że przeprowadzone eksperymenty obliczeniowe nie pozwalają w pełni, w sposób jednoznaczny wyjaśnić molekularnych podstaw rezultatów badań biologicznych. Należy przy tym mieć na uwadze, iż były to pierwsze badania dla aromatycznych heptaenów oraz ich izomerów *all-trans* wykorzystujące metody obliczeniowe oraz uwzględniające dodatkowo ułożenie cząsteczki cholesterolu lub ergosterolu względem makrolidu. Wszystkie dotychczasowe badania *in silico* dla pojedynczej cząsteczki AmB zakładały tylko kanoniczną orientację kompleksu.

Jak pokazują wyniki przeprowadzonych badań i analiz, aspekty takie jak tworzenie kompleksów binarnych, problem pionowości antybiotyku w błonie i zachowanie łańcucha bocznego dla pojedynczej cząsteczki, choć wykazują pożądane trendy, to nie tłumaczą w sposób bezpośredni wyników otrzymywanych w badaniach *in vitro*. Zagadnienie aktywności biologicznej aromatycznych heptaenów jest tematem o wiele bardziej złożonym i wieloczynnikowym. Być może, jak pokazują doniesienia literaturowe dla AmB [27], również w tym przypadku głównym celem molekularnym antybiotyku nie jest cząsteczka sterolu, a struktura biwarstwy lipidowej sama w sobie, natomiast różnice w obserwowanej aktywności wynikają z różnych właściwości błon zawierających cholesterol lub ergosterol. Możliwe, że cząsteczki sterolu pełnią pośrednią rolę w tworzeniu lub stabilizacji kanału jonowego.

W ramach dalszych prac mających na celu pogłębienie wiedzy na temat molekularnych podstaw aktywności AH warto byłoby przeprowadzić badania



dotyczące zjawiska samoasocjacji tej grupy związków. Informacje dotyczące preferowanej wzajemnej orientacji cząsteczkę antybiotyku w strukturze dimeru (równoległa vs. antyrównoległa), a także zachowania się dimeru w środowisku błony lipidowej oraz eksperymenty uwzględniające większą ilość cząsteczek antybiotyku z pewnością znacząco przyczynią się do lepszego pojmowania mechanizmów leżących u podstaw obserwowanej aktywności przeciwgrzybowej oraz selektywnej toksyczności aromatycznych heptaenów.

Obiecującą koncepcją wydaje się wykorzystanie metod spektroskopowych do badań nad AH, które z powodzeniem stosowane są dla AmB. Dla określenia modelu samoasocjacji wykorzystać można spektroskopię dichroizmu kołowego [82–84]. Natomiast zastosowanie stymulowanej spektroskopii Ramana pozwoli na uzyskanie informacji na temat lokalizacji oraz dynamiki antybiotyków polienowych w błonach lipidowych w czasie rzeczywistym [33]. Otrzymane dane spektralne dla izomerów *cis-trans* i *all-trans* mogą stać się podstawą do zaproponowania modelu struktury kanału jonowego przy wykorzystaniu metod modelowania molekularnego.

LITERATURA

- [1] L.A. Olsen, E.R. Choffnes, D.A. Relman, L. Pray, Fungal Diseases: An Emerging Threat to Human, Animal, and Plant Health: Workshop Summary, 2011.
- [2] B.P. Mathew, M. Nath, Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses, *ChemMedChem*, 4 (2009) 310–323.
- [3] T.C. White, K.A. Marr, R.A. Bowden, Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 (1998) 382–402.
- [4] S.B. Zotchev, Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy, *Curr. Med. Chem.*, 10 (2003) 211–23.
- [5] M. Roudbary, S. Kumar, A. Kumar, L. Černáková, F. Nikoomanesh, C.F. Rodrigues, Overview on the prevalence of fungal infections, immune response, and microbiome role in COVID-19 patients, *J. Fungi*, 7 (2021) 1–28.
- [6] A. Fekkar, A. Lampros, J. Mayaux, C. Poignon, S. Demeret, J.-M. Constantin, A.-G.E. Marcelin, A. Monsel, C.-E. Luyt, M. Blaize, Occurrence of Invasive Pulmonary Fungal Infections in Patients with Severe COVID-19 Admitted to the ICU, *Am J Respir Crit Care Med*, 203 (2021) 307–317.
- [7] G. Segrelles-Calvo, G.R. De S Araújo, E. Llopis-Pastor, J. Carrillo, M. Hernández-Hernández, L. Rey, N.R. Melean, I. Escribano, E. Antón, C. Zamarro, M. García-Salmones, S. Frases, *Candida* spp co-infection in COVID-19 patients with severe pneumonia: Prevalence study and associated risk factors, *Respir. Med.*, 188 (2021) 106619.
- [8] E.E. Seagle, B.R. Jackson, S.R. Lockhart, O. Georgacopoulos, N.S. Nunnally, J. Roland, D.M. Barter, H.L. Johnston, C.A. Czaja, H. Kayalioglu, P. Clogher, A. Revis, M.M. Farley, L.H. Harrison, S.S. Davis, E.C. Phipps, B.L. Tesini, W. Schaffner, T.M. Markus, M.M. Lyman, The Landscape of



Candidemia During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic, *Clin. Infect. Dis.*, (2021).

- [9] P.G. Pappas, M.S. Lionakis, M.C. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, B.J. Kullberg, Invasive candidiasis, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 4 (2018) 1–20.
- [10] A. Chowdhary, C. Sharma, J.F. Meis, *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally, *PLOS Pathog.*, 13 (2017) e1006290.
- [11] S.R. Lockhart, K.A. Etienne, S. Vallabhaneni, J. Farooqi, A. Chowdhary, N.P. Govender, A.L. Colombo, B. Calvo, C.A. Cuomo, C.A. Desjardins, E.L. Berkow, M. Castanheira, R.E. Magobo, K. Jabeen, R.J. Asghar, J.F. Meis, B. Jackson, T. Chiller, A.P. Litvintseva, Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses, *Clin. Infect. Dis.*, 64 (2017) 134–140.
- [12] C.J. Clancy, M.H. Nguyen, Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms, *Clin. Infect. Dis.*, 64 (2017) 141–143.
- [13] G.M. Eliopoulos, S. Perea, T.F. Patterson, Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi, *Clin. Infect. Dis.*, 35 (2002) 1073–1080.
- [14] E. Romanowska, Mechanizmy oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze Fungal resistance mechanisms on antifungal agents, (2008) 497–507.
- [15] G.C. d. O. Santos, C.C. Vasconcelos, A.J.O. Lopes, M. do S. d. S. Cartágenes, A.K.D.B. Filho, F.R.F. do Nascimento, R.M. Ramos, E.R.R.B. Pires, M.S. de Andrade, F.M.G. Rocha, C. de A. Monteiro, *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents, *Front. Microbiol.*, 9 (2018) 1351.
- [16] M. Slisz, B. Cybulska, J. Grzybowska, J. Czub, R. Prasad, E. Borowski, The mechanism of overcoming multidrug resistance (MDR) of fungi by amphotericin B and its derivatives, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 60 (2007) 436–46.

- [17] N.P. Wiederhold, Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, *Infect. Drug Resist.*, 10 (2017) 249.
- [18] E. Borowski, Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity, *Farmaco*, 55 (2000) 206–208.
- [19] J. Vandeputte, J.L. Wachtel, E.T. Stiller, Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces* II The isolation and properties of the crystalline amphotericins, *Antibiot. Annu.*, 3 (1955) 587–591.
- [20] E.L. Hazen, R. Brown, Fungicidin, an Antibiotic Produced by a Soil Actinomycete, *Exp. Biol. Med.*, 76 (1951) 93–97.
- [21] S. Ōmura, *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, Academic Press, 2002.
- [22] J. Zielińska, M. Wieczór, T. Baczek, M. Gruszecki, J. Czub, Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 1–11.
- [23] J.M. Hamilton-Miller, Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics, *Bacteriol. Rev.*, 37 (1973) 166–196.
- [24] J. Szlinder-Richert, B. Cybulska, J. Grzybowska, J. Bolard, E. Borowski, Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method, *Farmaco*, 59 (2004) 289–296.
- [25] J. Szlinder-Richert, J. Mazerski, B. Cybulska, J. Grzybowska, E. Borowski, MFAME , N-methyl-N- D -fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1528 (2001) 15–24.
- [26] D. Gottlieb, H.E. Carter, J.H. Sloneker, A. Ammann, Protection of Fungi

against Polyene Antibiotics by Sterols, *Science* (80-.), 128 (1958) 361–361.

- [27] H. Carolus, S. Pierson, K. Lagrou, P. Van Dijck, Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance, *J. Fungi*, 6 (2020) 1–20.
- [28] A. Finkelstein, R. Holz, Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B, *Membranes (Basel)*., 2 (1973) 377–408.
- [29] L. Kristanc, B. Božič, G. Gomišček, The role of sterols in the lipid vesicle response induced by the pore-forming agent nystatin, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1838 (2014) 2635–2645.
- [30] M. Baginski, H. Resat, E. Borowski, Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B – cholesterol / ergosterol membrane channels, 1567 (2002) 63–78.
- [31] D.M. Kamiński, Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments, *Eur. Biophys. J.*, 43 (2014) 453–467.
- [32] T. Yamamoto, Y. Umegawa, H. Tsuchikawa, S. Hanashima, N. Matsumori, K. Funahashi, S. Seo, W. Shinoda, M. Murata, The Amphotericin B-Ergosterol Complex Spans a Lipid Bilayer as a Single-Length Assembly, *Biochemistry*, 58 (2019) 5188–5196.
- [33] P.T. Dong, C. Zong, Z. Dagher, J. Hui, J. Li, Y. Zhan, M. Zhang, M.K. Mansour, J.X. Cheng, Polarization-sensitive stimulated Raman scattering imaging resolves amphotericin B orientation in *Candida* membrane, *Sci. Adv.*, 7 (2021).
- [34] R. Mouri, K. Konoki, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, Complex Formation of Amphotericin B in Sterol-Containing Membranes As Evidenced by Surface Plasmon Resonance †, *Biochemistry*, 47 (2008) 7807–7815.

- [35] T.M. Anderson, M.C. Clay, A.G. Cioffi, K.A. Diaz, G.S. Hisao, M.D. Tuttle, A.J. Nieuwkoop, G. Comellas, N. Maryum, S. Wang, B.E. Uno, E.L. Wildeman, T. Gonen, C.M. Rienstra, M.D. Burke, Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge, *Nat. Chem. Biol.*, 10 (2014) 400–6.
- [36] X. Guo, J. Zhang, X. Li, E. Xiao, J.D. Lange, C.M. Rienstra, M.D. Burke, D.A. Mitchell, Sterol Sponge Mechanism Is Conserved for Glycosylated Polyene Macrolides, *ACS Cent. Sci.*, 7 (2021) 781–791.
- [37] A.J. Phillips, I. Sudbery, M. Ramsdale, Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2003) 14327–14332.
- [38] F. Sangalli-Leite, L. Scorzoni, A.C. Mesa-Arango, C. Casas, E. Herrero, M.J. Soares Mendes Gianinni, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, O. Zaragoza, Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst, *Microbes Infect.*, 13 (2011) 457–467.
- [39] M.T. Lamy-Freund, V.F. Ferreira, S. Schreier, Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B Evidence for radical formation in the process of autooxidation, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 38 (1985) 753–7.
- [40] A.C. Mesa-Arango, L. Scorzoni, O. Zaragoza, C.P. Taborda, M. Rodrigues, O. Cruz, G. Benard, It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug, (2012).
- [41] H. Lechevalier, R.F. Acker, C.T. Corke, C.M. Haenseler, S.A. Waksman, Candicidin, A New Antifungal Antibiotic, *Mycologia*, 45 (1953) 155–171.
- [42] S.A. Waksman, H.A. Lechevalier, C.P. Schaffner, Candicidin and other polyenic antifungal antibiotics, *Bull. World Health Organ.*, 33 (1965) 219–26.
- [43] G.-M. LIU, L.E. MCDANIEL, G.P. SCHAFFNER, STUDIES ON

CANDICIDIN BIOGENESIS, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 25 (1972) 116–121.

- [44] W. Mechlinski, C.P. SCHAFFNER, Characterization of aromatic heptaene macrolide antibiotics by high performance liquid chromatography, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 33 (1980) 591–599.
- [45] J. Borzyszkowska-Bukowska, P. Szczeblewski, A. Konkol, J. Grynda, K. Szwarc-Karabyka, T. Laskowski, The complete stereochemistry of the antibiotic candicidin A3 (syn ascosin A3, levorin A3), *Nat. Prod. Res.*, 0 (2019) 1–11.
- [46] K. Szwarc, P. Szczeblewski, P. Sowiński, E. Borowski, J. Pawlak, The structure, including stereochemistry, of levorin A1, *Magn. Reson. Chem.*, 53 (2015) 479–484.
- [47] P. Szczeblewski, W. Andrałojć, J. Polit, A. Żabka, K. Winnicki, T. Laskowski, Ipertrofan revisited—the proposal of the complete stereochemistry of mepartricin a and b, *Molecules*, 26 (2021).
- [48] P. Szczeblewski, T. Laskowski, B. Kubacki, M. Dziergowska, M. Liczmańska, J. Grynda, P. Kubica, A. Kot-Wasik, E. Borowski, Analytical studies on ascosin, candicidin and levorin multicomponent antifungal antibiotic complexes The stereostructure of ascosin A2, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 40158.
- [49] V. V. Belakhov, A. V. Garabadzhiu, Polyene macrolide antibiotics: Mechanisms of inactivation, ways of stabilization, and methods of disposal of unusable drugs (Review), *Russ. J. Gen. Chem.*, 85 (2015) 2985–3001.
- [50] P. Szczeblewski, T. Laskowski, A. Bałka, E. Borowski, S. Milewski, Light-Induced Transformation of the Aromatic Heptaene Antifungal Antibiotic Candicidin D into Its All-Trans Isomer, *J. Nat. Prod.*, 81 (2018) 1540–1545.
- [51] P. Szczeblewski, J. Górka, W. Andrałojć, P. Janke, K. Wąsik, T. Laskowski, Iso-partricin, an aromatic analogue of amphotericin b: How shining light on old drugs might help create new ones, *Antibiotics*, 10

(2021).

- [52] E.J. OSWALD, D.W. POCURULL, Comparative in vitro effectiveness of tennecetin and candicidin against selected fungi, *Antibiot. Chemother.* (Northfield, Ill.), 10 (1960) 285–6.
- [53] H. LECHEVALIER, Comparison of the in vitro activity of four polyenic antifungal antibiotics, *Antibiot. Annu.*, 7 (1959) 614–615.
- [54] B. Cybulska, T. Ziminski, E. Borowski, C.M. Gary-Bobo, The influence of electric charge of aromatic heptaene macrolide antibiotics on their activity on biological and lipidic model membranes, *Mol. Pharmacol.*, 24 (1983) 270–6.
- [55] B. Cybulska, J. Mazerski, E. Borowski, C.M. Gary-Bobo, Haemolytic activity of aromatic heptaenes A group of polyene macrolide antifungal antibiotics, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (1984) 41–46.
- [56] J. Borzyszkowska-Bukowska, J. Górska, P. Szczeblewski, T. Laskowski, I. Gabriel, J. Jurasz, K. Kozłowska-Tylingo, P. Szweda, S. Milewski, Quest for the molecular basis of improved selective toxicity of all-trans isomers of aromatic heptaene macrolide antifungal antibiotics, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 10108.
- [57] J. Durrant, J.A. McCammon, Molecular dynamics simulations and drug discovery, *BMC Biol.*, 9 (2011) 1–9.
- [58] H. Zhao, A. Caflisch, Molecular dynamics in drug design, *Eur. J. Med. Chem.*, 91 (2015) 4–14.
- [59] J. Mortier, C. Rakers, M. Bermudez, M.S. Murgueitio, S. Riniker, G. Wolber, The impact of molecular dynamics on drug design: Applications for the characterization of ligand-macromolecule complexes, *Drug Discov. Today*, 20 (2015) 686–702.
- [60] D.L. Beveridge, F.M. DiCapua, Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems, *Annu. Rev. Biophys.*

Biophys. Chem., 18 (1989) 431–492.

- [61] J. Kästner, Umbrella sampling, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 1 (2011) 932–942.
- [62] S. Kumar, J.M. Rosenberg, D. Bouzida, R.H. Swendsen, P.A. Kollman, THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules I The method, *J. Comput. Chem.*, 13 (1992) 1011–1021.
- [63] S.E. Nelson, H.I. Sair, R.D. Stevens, Magnetic Resonance Imaging in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Current Evidence and Future Directions, *Neurocrit. Care*, 91 (2018) 275–282.
- [64] W.K. den Otter, Revisiting the Exact Relation between Potential of Mean Force and Free-Energy Profile, *J. Chem. Theory Comput.*, 9 (2013) 3861–3865.
- [65] A. Barducci, M. Bonomi, M. Parrinello, Metadynamics, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 1 (2011) 826–843.
- [66] A. Laio, F.L. Gervasio, Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science, *Reports Prog. Phys.*, 71 (2008) 126601.
- [67] Y. Zhang, G.A. Voth, Combined metadynamics and umbrella sampling method for the calculation of ion permeation free energy profiles, *J. Chem. Theory Comput.*, 7 (2011) 2277–2283.
- [68] J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A.D. MacKerell, R.W. Pastor, Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types, *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 7830–7843.
- [69] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, et al., Gaussian09 Revision

D01, Gaussian Inc Wallingford CT, Gaussian 09 Revis. C.01, (2010).

- [70] C.G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J.C. Gumbart, Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit, *J. Comput. Chem.*, 34 (2013) 2757–2770.
- [71] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, 14 (1996) 33–38.
- [72] A. Neumann, M. Baginski, J. Czub, How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 18266–18272.
- [73] E.L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K.C. Song, E.M. Dávila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R.M. Venable, J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations, *J. Comput. Chem.*, 35 (2014) 1997–2004.
- [74] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 79 (1983) 926–935.
- [75] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindah, Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 1–2 (2015) 19–25.
- [76] G.A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, G. Bussi, PLUMED 2: New feathers for an old bird, *Comput. Phys. Commun.*, 185 (2014) 604–613.
- [77] S. Nosé, Nosé, Shuichi, A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods, *JChPh*, 81 (1984) 511–519.
- [78] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *JAP*, 52 (1981) 7182–7190.

- [79] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, 98 (1998) 10089.
- [80] W.C. Swope, H.C. Andersen, P.H. Berens, K.R. Wilson, A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters, *J. Chem. Phys.*, 76 (1998) 637.
- [81] A. Neumann, M. Wieczor, J. Zielinska, M. Baginski, J. Czub, Membrane Sterols Modulate the Binding Mode of Amphotericin B without Affecting Its Affinity for a Lipid Bilayer, *Langmuir*, 32 (2016) 3452–3461.
- [82] A. Vertut-Croquin, J. Bolard, M. Chabbert, C. Gary-Bobo, Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles A circular dichroism and permeability study, *Biochemistry*, 22 (1983) 2939–2944.
- [83] A. Rajini Balakrishnan, K.R.K. Easwaran, CD and NMR studies on the aggregation of amphotericin-B in solution, *BBA - Biomembr.*, 1148 (1993) 269–277.
- [84] J. Mazerski, J. Bolard, E. Borowski, Circular dichroism study of the interaction between aromatic heptaene antibiotics and small unilamellar vesicles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116 (1983) 520–526.

WYKAZ RYSUNKÓW

<i>Rys. II.1.1. Schematyczne przedstawienie celi molekularnych w komórce grzybowej najczęściej stosowanych środków przeciwgrzybowych wraz z mechanizmem działania. Opracowane na podstawie [15].</i>	10
<i>Rys. II.1.1. Struktura Amfoterycyny B z zaznaczonymi charakterystycznymi fragmentami: 1) hydrofilowy fragment polioliowy, 2) hydrofobowy fragment polienowy, 3) hydrofilowy ogon, 4) polarna głowa składająca się z reszty mykozaminy i ugrupowania karboksylowego [21].</i>	13
<i>Rys. II.1.2. Schematy zaproponowanych modeli oddziaływań AmB-ergosterol: A1) kanał jonowy, A2) półkanał jonowy, B1) wylapywanie steroli przez cząsteczki AmB zaadsorbowane na powierzchni błony, B2) sterolowa gąbka [26].</i>	14
<i>Rys. II. 1.3 Schematy zaproponowanych modeli oddziaływań AmB-ergosterol: A1) kanał jonowy, A2) półkanał jonowy, B1) wylapywanie steroli przez cząsteczki AmB zaadsorbowane na powierzchni błony, B2) sterolowa gąbka [26].</i>	14
<i>Rys. II.2.1. Zestawienie różnic pomiędzy strukturami amfoterycyny B, kandycydyny D, partrycyny A i partrycyny B.</i>	17
<i>Rys. II.2.2. Struktury chemiczne składników kompleksu Kandycydyny obrazujące zróżnicowanie w obrębie fragmentu polioliowego.</i>	19
<i>Rys. II.2.3. Struktura partrycyny A (syn. gedamycyny) (R=Me) i partrycyny B (syn. wacydyny) (R=H).</i>	19
<i>Rys. II.3.1. Struktura izo-kandycydyny D (u góry) oraz amfoterycyny B (u dołu).</i>	22
<i>Rys. IV.1.1. Układ symulacyjny monomeru antybiotyku ze steroidem przedstawiony na przykładzie partrycyny A z ergosterolem. Ze względu na czytelność pominięto cząsteczki wody i jony nieorganiczne.</i>	35
<i>Rys. IV.1.2. Współrzędna reakcji dla której wyznaczana była energii swobodna w symulacjach z zastosowaniem metody US na przykładzie izo-kandycydyny D z cholesterolem.</i>	37
<i>Rys. IV.1.3. Dodatkowa współrzędna reakcji dla której wyznaczana była energii swobodna w symulacjach z zastosowaniem metody MTD na przykładzie izo-kandycydyny D z cholesterolem.</i>	38

<i>Rys. V.1.1. Przebiegi profili energii swobodnej dla kandycydyny D w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).....</i>	<i>40</i>
<i>Rys. V.1.2. Przebiegi profili energii swobodnej dla partrycyny A w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).....</i>	<i>41</i>
<i>Rys. V.1.3. Przebiegi profili energii swobodnej dla partrycyny B w wersji natywnej i zizomeryzowanej w błonach lipidowych zawierających cholesterol (po lewej) i ergosterol (po prawej).....</i>	<i>42</i>
<i>Rys. V.1.4 Struktury reprezentatywne dla minimów energetycznych odpowiadających zakresom odległości 5-6 Å (po lewej) i 7-8 Å (po prawej) dla układu zawierającego partrycynę A z ergosterolem.</i>	<i>43</i>
<i>Rys. V.1.5. Rozkłady gęstości prawdopodobieństwa odchylenia kąta głównej osi antybiotyku względem osi biwarstwy lipidowej (osi Z) dla kandycydyny D, partrycyny A i partrycyny B oraz ich izomerów all-trans w odniesieniu do amfoterycyny B w błonach zawierających cholesterol (lewy panel) lub ergosterol (prawy panel).....</i>	<i>44</i>
<i>Rys. V.1.6. Schematyczne przedstawienie metody tworzenia wynikowych map energii swobodnej dla analizowanych układów.</i>	<i>46</i>
<i>Rys. V.1.7 Mapy powierzchni energii swobodnej dla kandycydyny D.</i>	<i>47</i>
<i>Rys. V.1.8 Mapy powierzchni energii swobodnej dla partrycyny A.....</i>	<i>48</i>
<i>Rys. V.1.9 Mapy powierzchni energii swobodnej dla partrycyny B.....</i>	<i>49</i>
<i>Rys. V.1.10. Przykładowe struktury reprezentatywne dla różnych orientacji sterolu względem antybiotyku uzyskane na podstawie symulacji 2D-MTD: A) równoległe do płaszczyzny pierścienia (60-120°), B) w pobliżu fragmentu polienowego, C) równoległe do płaszczyzny pierścienia (240-300°), D) w pobliżu fragmentu polioliowego.</i>	<i>51</i>
<i>Rys. V.2.1. Struktury reprezentatywne dla poszczególnych ułożeń łańcucha bocznego: A) wyprostowany, B) podgięty prostopadle do osi antybiotyku, C) całkowicie zawinięty.</i>	<i>53</i>
<i>Rys. V.2.2. Histogram rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla kandycydyny D.</i>	<i>54</i>
<i>Rys. V.2.3. Histogramy rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla partrycyny A.....</i>	<i>55</i>

<i>Rys. V.2.4. Histogramy rozkładu odległości aromatycznego łańcucha bocznego od makrolaktonu dla partrycyny B.....</i>	<i>56</i>
<i>Rys. V.2.5. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla kandycydyny D.....</i>	<i>58</i>
<i>Rys. V.2.6. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla partrycyny A.....</i>	<i>59</i>
<i>Rys. V.2.7. Zależność odległości łańcucha bocznego od fosforów dolnego listka biwarstwy lipidowej od orientacji kompleksu binarnego z naniesionymi minimami energetycznymi uzyskanymi na podstawie 2D-MTD dla partrycyny B.....</i>	<i>60</i>
<i>Rys. VI.1.1. Zestawienie przebiegów profili energetycznych dla kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B i ich izomerów all-trans w odniesieniu do amfoterycyny B dla układów zawierających cholesterol i ergosterol.....</i>	<i>63</i>
<i>Rys. B. 1 Mapy energii swobodnej dla kandycydyny D wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi.....</i>	<i>90</i>
<i>Rys. B. 2 Mapy energii swobodnej dla partrycyny A wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi.....</i>	<i>91</i>
<i>Rys. B. 3 Mapy energii swobodnej dla partrycyny B wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi.....</i>	<i>92</i>

WYKAZ TABEL

<i>Tabela II. 4.1 Aktywność wybranych antybiotyków polienowych (wyrażona jako MIC) względem drobnoustrojów z rodzaju Candida, Saccharomyces i Aspergillus [52,53] .</i>	23
<i>Tabela II. 4.2 Aktywność przeciwgrzybowa względem drobnoustrojów S.cerevisiae ATCC9763 i hemolityczna wobec ludzkich erytrocytów dla wybranych antybiotyków polienowych [54,55].</i>	23
<i>Tabela II. 4.3 Aktywność przeciwgrzybowa in vitro kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B, ich all-trans izomerów oraz amfoterycyny B.</i>	24
<i>Tabela II. 4.4 Aktywność hemolityczna kandycydyny D, partrycyny A i B, ich all-trans izomerów oraz amfoterycyny B.</i>	24
<i>Tabela II. 4.5 Indeksy selektywnej toksyczności dla kandycydyny D, partrycyny A, partrycyny B, ich izomerów all-trans oraz amfoterycyny B. STI = EH50/MIC dla C. albicans</i>	25
<i>Tabela IV. 1.1 Zestawienie parametrów dla 12 układów symulacyjnych</i>	36
<i>Tabela V. 2.1 Czas zanurzenia aromatycznego łańcucha bocznego w drugim listku biwarstwy lipidowej w trakcie symulacji wyrażony w procentach dla wszystkich badanych układów.</i>	57
<i>Tabela B. 1 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla kandycydyny D względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku.</i>	90
<i>Tabela B. 2 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla partrycyny A względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku.</i>	91
<i>Tabela B. 3 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla partrycyny B względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku.</i>	92

DOROBEK NAUKOWY

Artykuły w czasopismach z listy JCR

Julia Borzyszkowska-Bukowska & Justyna Górka, Paweł Szczeblewski, Tomasz Laskowski, Iwona Gabriel, Jakub Jurasz, Katarzyna Kozłowska-Tylingo, Piotr Szweda, and Sławomir Milewski "Quest for the Molecular Basis of Improved Selective Toxicity of All-Trans Isomers of Aromatic Heptaene Macrolide Antifungal Antibiotics" *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 18: 10108. <https://doi.org/10.3390/ijms221810108>

Julia Borzyszkowska-Bukowska & Paweł Szczeblewski, Agnieszka Konkol Jakub Grynda Katarzyna Szwarz-Karabyka and Tomasz Laskowski, The complete stereochemistry of the antibiotic candicidin A3 (syn. ascosin A3, levorin A3), *Natural Product Research*, doi: 10.1080/14786419.2019.1596095

Tomasz Laskowski, **Julia Borzyszkowska**, Jakub Grynda, Jan Mazerski, C-1311 (Symadex), a potential anti-cancer drug, intercalates into DNA between A and G moieties. NMR-derived and MD-refined stereostructure of the d(GAGGCCTC)2:C-1311 complex, *Journal of Molecular Structure*, 1141, 357-367, doi: 10.1016/j.molstruc.2017.03.115

Prezentacje ustne i postery na konferencjach:

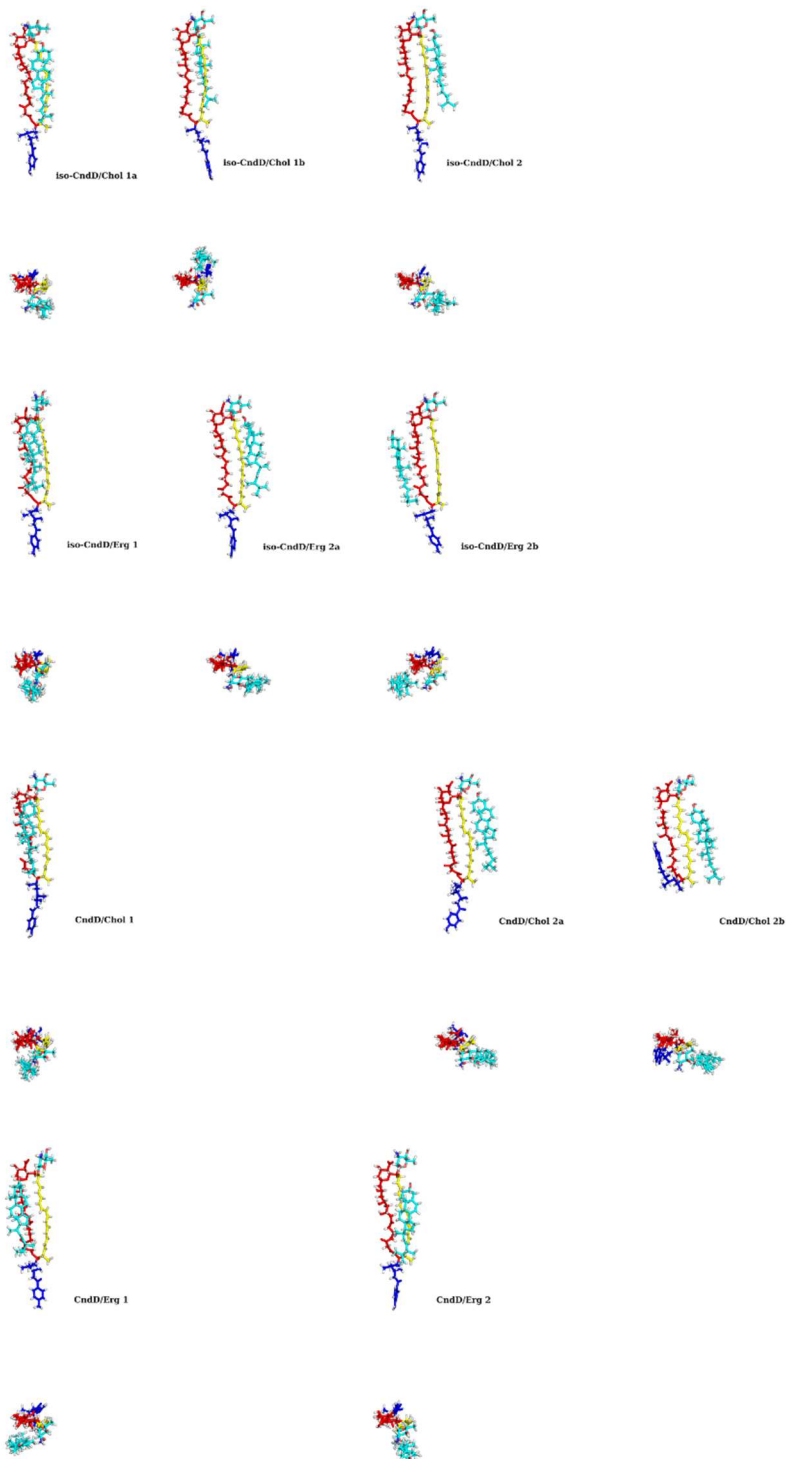
Julia Borzyszkowska-Bukowska, Paweł Szczeblewski, Agnieszka Konkol, Jakub Grynda, Katarzyna Szwarz-Karabyka, Tomasz Laskowski, ELUCIDATION OF THE COMPLETE STEREOCHEMISTRY OF THE ANTIBIOTIC CANDICIDIN A3 – AN NMR-MD COMBINED STUDY, YUPPAS NMR : Young from Universities, Polytechnics & Polish Academy of Sciences Nuclear Magnetic Resonance – materiały konferencyjne, Łódź, Polska (2019) – poster

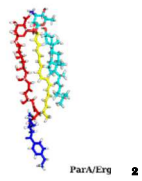
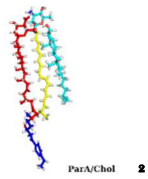
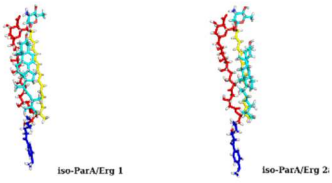
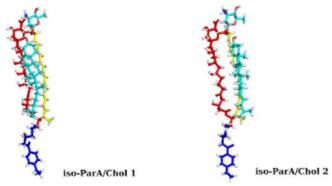
Julia Borzyszkowska-Bukowska, Tomasz Laskowski, Łukasz Nierzwicki, Sławomir Milewski, Candicidin D & Iso-Candicidin D in sterol-containing lipid bilayer environment– a molecular modelling study, Book of abstract of IX Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, Polska (2018) – poster

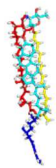
Julia Borzyszkowska-Bukowska, Candicidin D & Iso-Candicidin D in sterol-containing lipid bilayer environment – a molecular modelling study, Book of abstract of IX Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, Polska (2018) – prezentacja ustna

DODATEK A

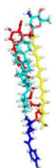
Minima energetyczne US



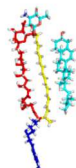




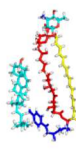
iso-ParB/Chol 1



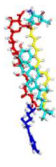
iso-ParB/Erg 1



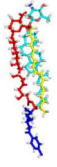
iso-ParB/Erg 2a



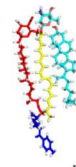
iso-ParB/Erg 2b



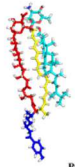
ParB/Chol 1a



ParB/Chol 1b



ParB/Chol 2

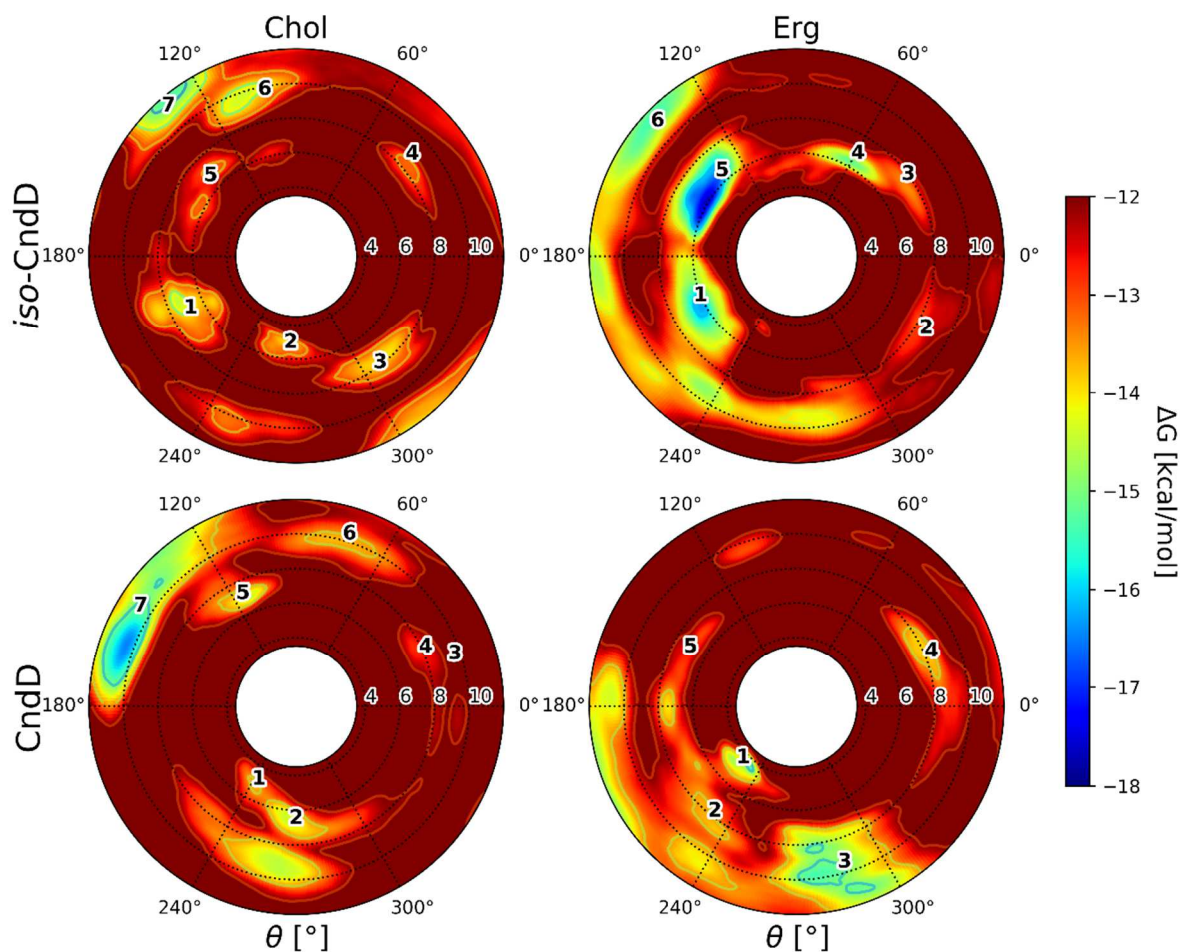


ParB/Erg 1



DODATEK B

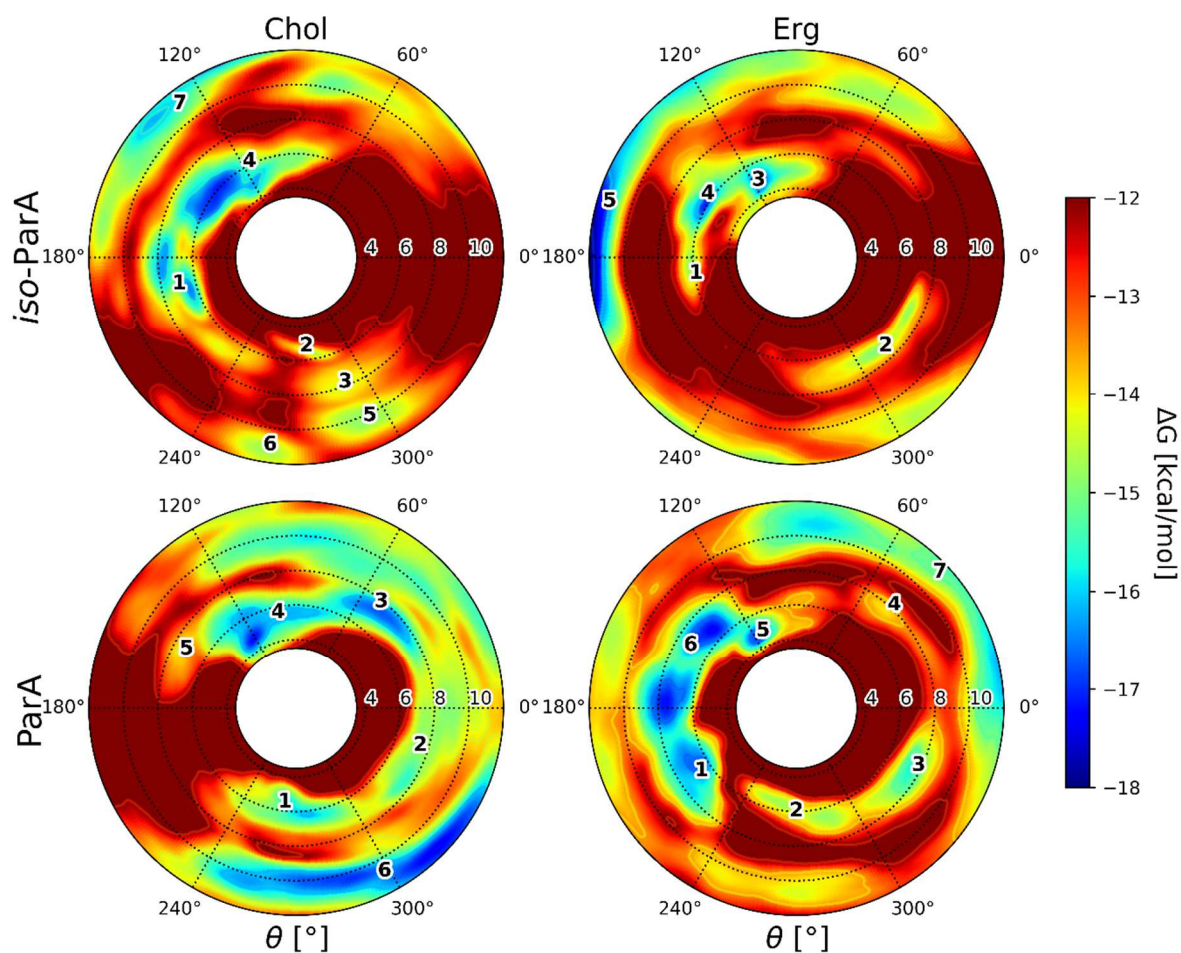
Mapy energii swobodnej wraz z minimami energetycznymi



Rys. B.1 Mapy energii swobodnej dla kandycydyny D wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi

Tabela B. 1 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla kandycydyny D względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku

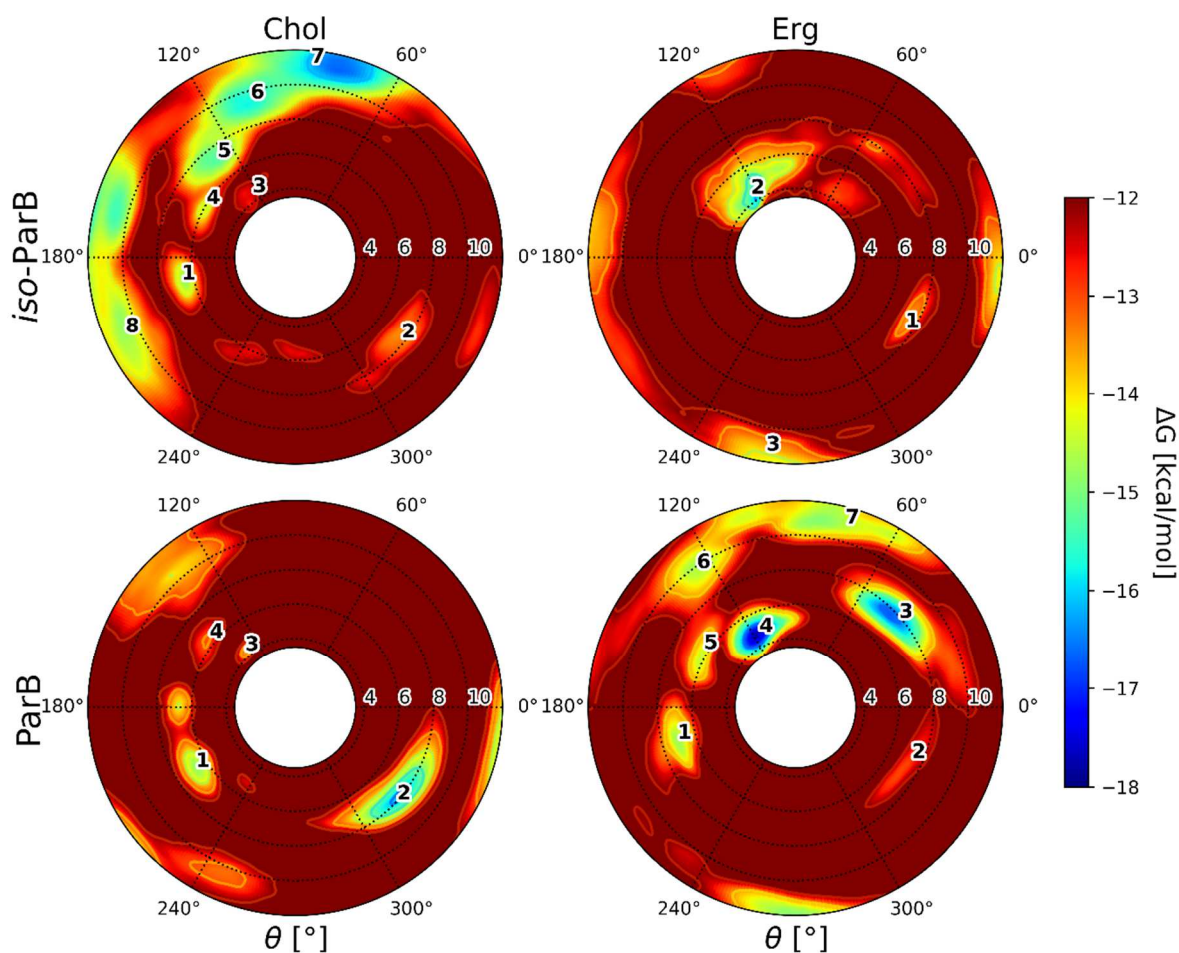
region	<i>all-trans</i>		<i>cis-trans</i>	
	Chol	Erg	Chol	Erg
	numery minimów			
polienowy	3,4	2,3,4	4	4
płaszczyzna	2,6	-	1,2,3,5,6	3
poliolowy	1,5,6,7	1,5,6	7	1,2,5



Rys. B. 2 Mapy energii swobodnej dla partrycyny A wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi

Tabela B. 2 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla partrycyny A względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku

region	<i>all-trans</i>		<i>cis-trans</i>	
	Chol	Erg	Chol	Erg
	numery minimów			
polienowy	-	2	2,3	2,3,7
płaszczyzna	2,3,5,6	3	1,4	2
poliolowy	1,4,7	1,4,5	5	1,5,6



Rys. B. 3 Mapy energii swobodnej dla partrycyny B wraz z zaznaczonymi minimami energetycznymi

Tabela B. 3 Zestawienie występowanie minimów energetycznych dla partrycyny B względem regionów wokół cząsteczki antybiotyku

region	all-trans		cis-trans	
	Chol	Erg	Chol	Erg
	numery minimów			
polienowy	2	1	2	2,3
płaszczyzna	6,7	2,3	-	4,7
poliolowy	1,3,4,5,6,8	-	1,3,4	1,5,6

Minima energetyczne 2D-MTD

