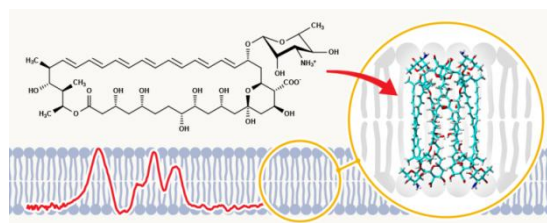


Mechanizm molekularny toksyczności antybiotyku przeciwgrzybiczego amfoterycyny B

1. Cel naukowy

Sformułowanie problemu

Grzybice wewnątrzustrojowe stanowią poważne zagrożenie życia pacjentów, w szczególności w związku z transplantacją organów oraz wobec obniżenia odporności, w tym nabytego braku odporności związanego z pandemią HIV¹. Antybiotyk polienowy amfoterycyna B (AmB, Rys. 1) stanowi złoty standard w leczeniu grzybic systemowych, co klasyfikuje ten farmaceutyk do grupy antybiotyków ratujących życie². Lek ten jest znany i stosowany już nieomalże od 60 lat, pomimo wyjątkowo silnych efektów ubocznych, w tym nefrotoksyczności oraz hepatotoksyczności, włącznie z nierzadkimi przypadkami śmierci pacjentów. Pomimo tak długiego okresu stosowania leku, oraz prowadzonych prac badawczych, szczegółowe mechanizmy molekularne odpowiedzialne za pożądane efekty farmakologiczne amfoterycyny B oraz toksyczne efekty uboczne antybiotyku, nie są w pełni poznane. Według powszechnie akceptowanej koncepcji, miejscem działania AmB są błony biologiczne. Najnowsze wyniki badań wskazują, iż zasadniczym mechanizmem molekularnym, na którym opiera się aktywność farmakologiczna AmB, jest sekwestracja steroli, stanowiących niezbędny składnik błon biologicznych, prowadząca do utraty ich fizjologicznej funkcjonalności³. Otwarty pozostaje wciąż jednak problem dotyczący możliwości rozdzielenia pożądanych efektów terapeutycznych AmB od toksycznych efektów ubocznych oraz skutecznej minimalizacji tych ostatnich. Temu właśnie problemowi poświęcony jest przedstawiany projekt badawczy. Wyniki naszych ostatnich prac badawczych wskazują na powszechne i wydajne formowanie struktur tetramerycznych AmB, które spełniając wszelkie wymagania strukturalne, wbudowując się mogą do dwuwarstw lipidowych, na zasadzie autonomicznych kanałów błonowych, zaburzając równowagę elektrofizjologiczną komórek^{4,5}. W naszej opinii, mechanizm ten stanowić może jeden z kluczowych czynników odpowiedzialnych za toksyczne efekty uboczne antybiotyku. W ramach niniejszego projektu, zamierzamy poddać tę koncepcję gruntownej i wieloaspektowej weryfikacji.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający strukturę chemiczną cząsteczki amfoterycyny B, ideę specyficznego widma CD formy tetramerycznej antybiotyku oraz strukturę tetramerycznej w błonie lipidowej.

Hipoteza

Cząsteczki amfoterycyny B w środowisku wodnym spontanicznie samoorganizują się do form dimerycznych, które mogą asocjować do tetramerycznych. Powierzchnia błon lipidowych stanowi platformę katalityczną formowania tetramerycznych, które wbudowując się do wnętrza membrany funkcjonują jako kanały jonowe zaburzające równowagę elektrofizjologiczną komórek. Mechanizm ten należy do zasadniczych, odpowiedzialnych za silną toksyczność antybiotyku dla pacjentów.

Cel projektu

Zasadniczym celem naukowym projektu jest poznanie oraz zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczność AmB dla pacjentów, w szczególności zaś weryfikacja centralnej hipotezy badawczej dotyczącej związku pomiędzy formowaniem struktur tetramerycznych AmB z toksycznością leku.

W powiązaniu z głównym celem projektu, zaprojektowane badania powinny przynieść jednoznaczne odpowiedzi dotyczące następujących podstawowych problemów poznawczych, związanych z funkcjonowaniem antybiotyku AmB w środowisku biologicznym:

1. Jakie determinanty strukturalne AmB oraz typy oddziaływań międzycząsteczkowych odpowiedzialne są za asocjację dimerów antybiotyku do struktur tetramerycznych?
2. Jaka jest kinetyka formowania tetramerycznych w środowisku wodnym oraz w środowisku membran lipidowych?

3. Jaka jest kinetyka transmembranowego transferu jonów przez błony lipidowe zawierające zintegrowane z fazą lipidową formy tetrameryczne AmB?
4. Jakie formy organizacji molekularnej AmB przenoszone być mogą przez białka transportowe?
5. Czy wiązanie molekuł AmB ze sterolami w środowisku błon lipidowych stanowi mechanizm konkurencyjny do formowania struktur dimerycznych i tetramerycznych?
6. Czy możliwe jest przenoszenie AmB przez białka transportowe do biomembran w postaci monomerycznej antybiotyku i wiązanie ze sterolowymi składnikami błon?
7. W jakim stopniu poszczególne formy spektralne są cytotoksyczne w stosunku do komórek ludzkich?

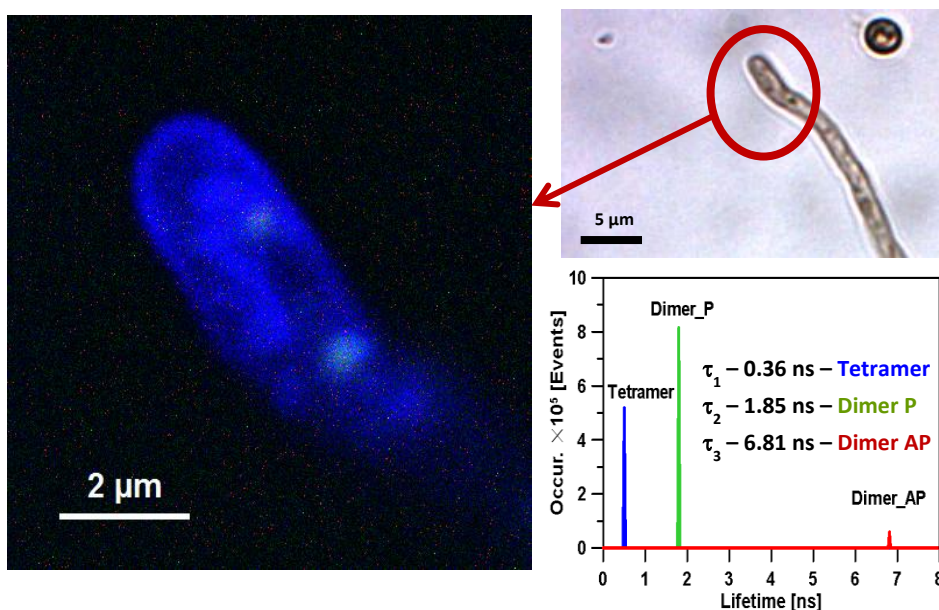
2. Znaczenie projektu

Zgodnie z najnowszymi koncepcjami dotyczącymi aktywności biologicznej AmB, zasadniczym miejscem oddziaływania antybiotyku na żywe organizmy są błony lipidowe, w których cząsteczki AmB oddziałując ze sterolami tworzą formy „pół-kanalów” (cylindrycznych agregatów molekularnych w pojedynczej monowarstwie lipidowej), formy pojedynczych heterodimerów typu AmB-sterol oraz dystalnych w stosunku do membrany, gigantycznych gąbko-podobnych agregatów sterolowo-amfoterycynowych.⁶ Wszystkie te formy organizacyjne, wbudowując do swojej struktury molekuly steroli membranowych, w sposób naturalny eliminują ich obecność w fazie lipidowej błony, zaburzając stabilizowane przez sterole własności strukturalne oraz dynamiczne dwuwarstw lipidowych. Taka destabilizująca aktywność AmB, jest w stanie obniżyć barierę dla transmembranowego transportu jonów, zaburzając równowagę elektrofizjologiczną żywych komórek. Wyniki badań prowadzonych na układach modelowych, wskazują również na wpływ AmB, w różnych formach organizacji molekularnej, na własności błon lipidowych nie zawierających steroli.⁷⁻⁹ Wśród wielu form organizacji molekularnej AmB, specyficzne

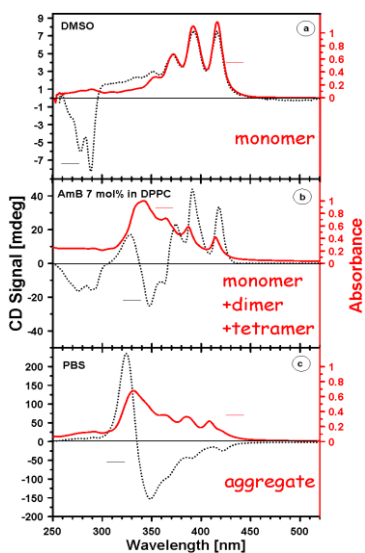
tetramery, uformowane z dwóch dimerów o antyrównoległej geometrii, wydają się posiadać wyjątkowe własności strukturalne, w aspekcie aktywności biologicznej antybiotyku⁴ (Rys. 1). Przeprowadzone przez nas analizy wskazują na to, iż struktury takie mogą wbudowywać się do dwuwarstw lipidowych jako autonomiczne, transmembranowe kanały, umożliwiające transfer małych jonów. W świetle tych analiz, wydaje się wysoce prawdopodobne, iż struktury takie formują się w warunkach naturalnych, wpływając na toksyczność leku dla wszystkich komórek. Tezę tę potwierdzają badania oddziaływania AmB, podawanej w popularnym leku przeciwgrzybiczym Fungizone[®], z grzybnią *Aspergillus niger* (wyniki nie publikowane, Rys. 2).

Wyniki analizy czasów życia fluorescencji pokazały jednoznacznie, iż cząsteczki antybiotyku przyłączają się do strzępek głównie w formie tetramerycznej. W ramach opracowywania obecnego projektu przeprowadziliśmy serię badań pilotażowych oraz zaprojektowaliśmy eksperymenty, w celu pełnego zbadania procesu samoorganizacji AmB do form specyficznych, transmembranowych tetramerów oraz zbadania wpływu tych struktur na własności funkcjonalne błon lipidowych (w szczególności transmembranowy transport jonów oraz własności strukturalne i dynamiczne dwuwarstw lipidowych). Zaplanowane badania przyniosą również precyzyjne informacje dotyczące mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za formowanie tego typu struktur oraz ich oddziaływanie z biomembranami.

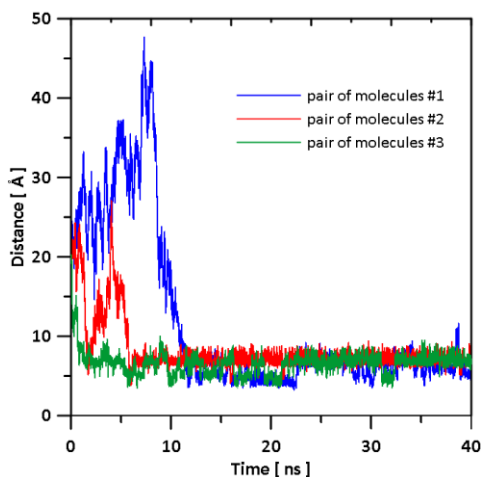
Wyniki analizy czasów życia fluorescencji pokazały jednoznacznie, iż cząsteczki antybiotyku przyłączają się do strzępek głównie w formie tetramerycznej. W ramach opracowywania obecnego projektu przeprowadziliśmy serię badań pilotażowych oraz zaprojektowaliśmy eksperymenty, w celu pełnego zbadania procesu samoorganizacji AmB do form specyficznych, transmembranowych tetramerów oraz zbadania wpływu tych struktur na własności funkcjonalne błon lipidowych (w szczególności transmembranowy transport jonów oraz własności strukturalne i dynamiczne dwuwarstw lipidowych). Zaplanowane badania przyniosą również precyzyjne informacje dotyczące mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za formowanie tego typu struktur oraz ich oddziaływanie z biomembranami.



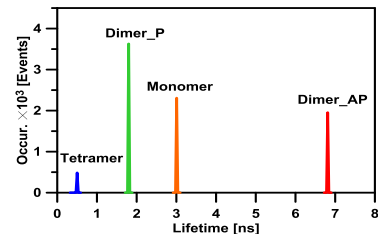
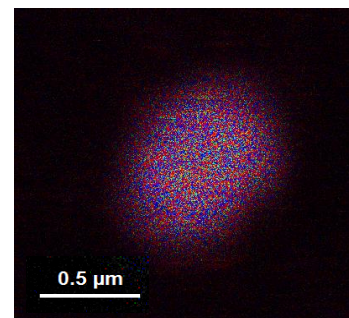
Rysunek 2. Wyniki analizy czasów życia fluorescencji AmB dodanej do hodowli *Aspergillus niger* w postaci roztworu preparatu Fungizone[®]. Obrazowanie FLIM wskazuje na obecność form dimerycznych AmB w roztworze oraz form tetramerów związanych ze strzępkami grzybni.



Rysunek 3. Widma absorpcji elektronowej oraz CD roztworu AmB, rejestrowane w czasie, obrazujące samoorganizację molekularną antybiotyku.



Rysunek 4. Wyniki symulacji komputerowych w ramach dynamiki molekularnej, dotyczących spontanicznego formowania dimerów AmB w środowisku wodnym. Szczegóły modelowania w pozycji literatury 5.



Rysunek 5. Analiza FLIM pojedynczego liposomu, przeprowadzona po wbudowaniu cząsteczek AmB. Wzbudzenie 405 nm, emisja >430 nm.

Wiedza ta jest istotna do określenia kierunków w projektowaniu modyfikacji struktury chemicznej amfoterycyny B, formuły farmakologicznej antybiotyku oraz sposobów jego dostarczenia do zaatakowanych grzybami komórek pacjentów, w celu minimalizacji toksycznych efektów ubocznych, przy zachowaniu maksymalnej aktywności terapeutycznej.

3. Koncepcja i plan badań

Dowód słuszności koncepcji i badania pilotażowe

W trakcie poprzednich badań dokonaliśmy szeregu obserwacji wskazujących na samoorganizację cząsteczek AmB do form dimerów, o geometrii równoległej oraz antyrównoległej. Wyniki tych badań wskazały również na asocjację tych ostatnich do form tetramerycznych. Proces asocjacji zaobserwowany został w środowisku wodnym oraz, przede wszystkim, w środowisku modelowych błon lipidowych. Analiza anizotropii fluorescencji, połączona z analizą FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) tetramerów AmB w środowisku błonowym wskazuje na transbłonową lokalizację oraz orientację tych struktur. Usytuowanie takie stwarza warunki do specyficznej aktywności biologicznej form tetramerycznych AmB. Odkryciu temu i szczegółowemu wyjaśnieniu wszelkich jego aspektów, zarówno strukturalnych jak i funkcjonalnych, poświęcić chcemy nasze badania w ramach niniejszego projektu. Wyniki badań pilotażowych, wskazujących na poprawność przyjętych założeń badawczych oraz wyznaczające kierunki zaplanowanych działań, są następujące:

1. Analizy roztworów AmB w formie monomerycznej, przeprowadzone z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego (CD), wskazują na spontaniczną dimeryzację cząsteczek antybiotyku oraz asocjację powstałych dimerów do form tetramerycznych, w środowisku błon lipidowych (Rys. 3).⁵
2. Tendencja cząsteczek AmB do spontanicznej samoorganizacji do stabilnych form dimerycznych potwierdzona została na drodze obliczeń przeprowadzonych przez członków naszego zespołu z zastosowaniem metody dynamiki molekularnej (MD, Rys. 4).⁵
3. Analiza mikroskopowa FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) potwierdza proces samoorganizacji cząsteczek AmB, obserwowany z zastosowaniem spektroskopii CD oraz symulacji numerycznych, do form dimerów oraz tetramerów.⁵
4. Wyniki analiz przeprowadzonych przez członków naszego zespołu z zastosowaniem techniki PALS (Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy), potwierdzają samoorganizację cząsteczek AmB prowadzącą do formowania wolnych objętości o strukturze kanałów, których średnice mieszczą się w przedziale 0.16 - 0.26 nm.
5. Analiza czasów życia fluorescencji AmB wprowadzonej w postaci monomerycznej do zawiesiny liposomów za pośrednictwem białek transportowych (BSA), połączona z obrazowaniem techniką FLIM, wskazuje na wbudowywanie się cząsteczek antybiotyku w struktury dwuwarstw lipidowych w postaci monomerycznej ale również w formie dimerów oraz tetramerów (Rys. 5).⁵

6. Mikroskopowa analiza anizotropii fluorescencji AmB wbudowanej do dwuwarstw lipidowych wskazuje na istnienie dwóch wyraźnych subfrakcji: cząsteczek zorientowanych w płaszczyźnie membrany oraz prostopadłych do tej płaszczyzny. Poziom anizotropii fluorescencji wskazuje na niezbyt silne związanie z membraną cząsteczek antybiotyku z frakcji lateralnej (prawdopodobnie zlokalizowanej w rejonie głów polarnych) oraz zdecydowaną polaryzację frakcji prostopadłej: bardzo silne ograniczenie swobody ruchów frakcji wewnątrz błonowej AmB oraz stosunkowo słabe ograniczenie ruchliwości frakcji zewnątrz błonowej. We frakcji wewnątrz błonowej obserwowane są, przede wszystkim, formy dimerów równoległych oraz tetramerów. Frakcja AmB wbudowanej do błony dominowała w obecności ergosterolu oraz cholesterolu.

Plan badań

Problemy badawcze, przedstawione powyżej, w sekcji *Cel projektu*, badane będą w ramach pięciu grup tematycznych, reprezentowanych przez pięć zadań badawczych (Work Packages): WP_1 do WP_5. Poniżej, przedstawiony jest zwięzły opis poszczególnych zadań badawczych.

WP_1 Spektroskopowa analiza samoorganizacji AmB w środowiskach o znaczeniu biologicznym.

Procesy samoorganizacji AmB badane będą w środowisku modelowych błon lipidowych oraz roztworów albuminy ludzkiej (HSA), z zastosowaniem technik CD, FLIM oraz FCS. Zastosowanie analizy anizotropii fluorescencji w pomiarach FLIM umożliwi określenie lokalizacji oraz orientacji poszczególnych struktur molekularnych AmB w stosunku do błony.

WP_2 Symulacje dynamiki molekularnej, procesu samoorganizacji AmB w środowisku błon lipidowych.

Badania pilotażowe, które wskazały możliwość spontanicznego formowania stabilnych dimerów AmB, kontynuowane będą w celu analizy procesu asocjacji tych struktur do form tetramerycznych.

WP_3 Badanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za formowanie struktur dimerycznych oraz tetramerycznych AmB w środowisku błonowym.

Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni (FTIR) oraz mikroskopia obrazowania Ramana wykorzystane będą do weryfikacji mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za stabilizację poszczególnych form organizacyjnych AmB, przewidzianych na podstawie obliczeń prowadzonych w ramach zadania WP_2.

WP_4 Badanie wpływu poszczególnych form organizacji molekularnej AmB na własności strukturalne oraz dynamiczne błon lipidowych oraz na cytotoksyczność.

Techniki znaczników spinowych EPR oraz mikrokalorymetrii DSC wykorzystane zostaną do szczegółowej analizy modelowych błon lipidowych modyfikowanych selektywnie przez cząsteczki AmB, w postaci różnych form organizacyjnych. Modyfikacja realizowana będzie na drodze oddziaływania z białkami transportowymi skompleksowanymi z różnymi formami AmB (monitorowanymi na drodze pomiarów CD oraz czasów życia fluorescencji). Cytotoksyczność różnych form organizacyjnych AmB badana będzie w hodowlach ludzkich linii komórkowych THP-1 oraz CCD-841 CoTr.

WP_5 Badanie wpływu różnych form organizacji molekularnej AmB na transmembranowy transport jonów.

Zamknięty wewnątrz liposomów znacznik fluorescencyjny, czuły na stężenie jonów, zastosowany będzie do monitorowania transferu jonów (H^+ , Ca^{2+} , K^+) przez błony lipidowe modyfikowane selektywnie monomerami, dimerami oraz tetramerami AmB. Modyfikacja membran realizowana będzie poprzez oddziaływanie z białkami transportowymi (jak w WP_4). Pojedyncze liposomy badane będą techniką FLIM. Zadanie to obejmowało będzie również obliczenia, w ramach dynamiki molekularnej, profili energii swobodnej dla transportu jonów przez transmembranowe struktury AmB.

Struktura projektu

Zadania badawcze WP_1, WP_2 oraz WP_3 realizowane będą równolegle, jako pierwsze, przez trzy współpracujące ściśle zespoły badawcze, każdy złożony z eksperta oraz badacza. Ponadto, w realizację zadania WP_1 oraz WP_3 zaangażowany będzie doktorant.

Zadania badawcze WP_4 oraz WP_5 realizowane będą w drugiej kolejności, w oparciu o wyniki uzyskane w



trakcie realizacji pierwszych trzech zadań. Zespoły do realizacji zadań WP_4 oraz WP_5 powołane zostaną dynamicznie, spośród realizatorów, w oparciu o indywidualne doświadczenia zdobyte w początkowej fazie realizacji projektu.

Kierownik projektu odpowiedzialny będzie za koordynację badań oraz dynamiczne określanie zadań cząstkowych, wynikających z planu realizacji projektu.

Wymiernym kryterium sukcesu w projekcie będzie uzyskanie precyzyjnych informacji dotyczących właściwości strukturalnych oraz funkcjonalnych badanych struktur AmB, które stanowiąc będą podstawę publikacji naukowych. Wyniki badań prezentowane będą również na konferencjach naukowych.

Plan awaryjny

W oparciu o pozytywne wyniki wszystkich przeprowadzonych badań wstępnych, sądzimy iż wysokie jest prawdopodobieństwo potwierdzenia postawionej hipotezy badawczej. Jesteśmy jednakże świadomi faktu, iż szczegółowe wyniki, szeroko zakrojonych oraz zaawansowanych badań, odkryć mogą inne mechanizmy molekularne oraz inne struktury niż te postulowane w oparciu o obecny stan wiedzy. Jesteśmy otwarci na wszelkie informacje dotyczące badanych elementów strukturalnych oraz ich związku z aktywnością biologiczną AmB. Jesteśmy również przekonani, że wszelkie uzyskane informacje dotyczące szczegółowych mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia własności strukturalnych i dynamicznych błon lipidowych, na drodze oddziaływania z AmB, w szczególności funkcjonalności membran w aspekcie fizjologicznego transportu jonów, okażą się wartościowe z punktu widzenia planowania kierunków aktywności związanej z obniżeniem toksycznych efektów ubocznych antybiotyku.

4. Metodyka

Oczyszczanie AmB oraz preparatyka biochemiczna

AmB będzie kupowana oraz oczyszczana w naszym laboratorium z zastosowaniem techniki HPLC, w oparciu o opracowane wcześniej i stosowane rutynowo procedury. Modelowe błony lipidowe formowane będą zgodnie z opracowanymi wcześniej i stosowanymi procedurami, z czystych lipidów oraz z frakcji lipidowej zawierającej sterole (ergosterol oraz cholesterol). Planujemy również badania cytotoksyczności prowadzone na hodowlach komórkowych (linie THP-1 oraz CCD-841) w oparciu o metodologię stosowaną w laboratorium przy badaniach cytotoksyczności nanocząstek metalicznych stabilizowanych polienami.

Techniki eksperymentalne i badania obliczeniowe

Wszystkie badania, w tym spektroskopowe, oraz te związane z obrazowaniem molekularnym, przeprowadzone zostaną w oparciu o bazę aparaturową naszego laboratorium, to jest między innymi:

1. Zestaw mikroskopowy obrazowania czasów życia fluorescencji FLIM (MicroTime 200, PicoQuant) sprzężony z mikroskopem AFM (JPK). System jest wyposażony w 6 laserów impulsowych m.in. femtosekundowy (Coherent).
2. Mikroskopowy zestaw ramanowski (inVia, Renishaw, z czterema liniami laserowymi) sprzężony z AFM (JPK).
3. Czasoworozdzielczy spektrometr fluorescencyjny (FluoTime 300, PicoQuant) wyposażony w 4 lasery impulsowe.
4. Spektrometry absorpcyjne w obszarze IR typu FTIR (Vector 33, Bruker oraz Nicolet iS50R, Thermo Scientific).
5. Spektrometr dichroizmu kołowego CD (Chirascan plus, Applied Photophysics).
6. Spektrometr EPR (CMS 8400, ADANI)
7. Mikrokalorymetr typu DSC (MicroCal VP-Capillary, GE HealthCare)

Badania obliczeniowe dynamiki molekularnej przeprowadzone będą przez członka naszego zespołu, dr. Jacka Czuba z Zakładu Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej oraz jednego członka jego grupy, w oparciu o założenia badawcze oraz udokumentowane doświadczenie w tym obszarze.^{5,10}

5. Literatura

- (1) Casadevall, A. In *Public workshop, "Fungal Diseases: An Emerging Challenge to Human, Animal and Plant Health"* Forum on Microbial Threats; Institute of Medicine: Washington, D.C., 2010.
- (2) Torrado, J. J.; Espada, R.; Ballesteros, M. P.; Torrado-Santiago, S. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2405.
- (3) Gray, K. C.; Palacios, D. S.; Dailey, I.; Endo, M. M.; Uno, B. E.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 2234.
- (4) Wasko, P.; Luchowski, R.; Tutaj, K.; Grudzinski, W.; Adamkiewicz, P.; Gruszecki, W. I. *Mol Pharm* **2012**, *9*, 1511.
- (5) Starzyk, J.; Gruszecki, M.; Tutaj, K.; Luchowski, R.; Szlczak, R.; Wasko, P.; Grudzinski, W.; Czuba, J.; Gruszecki, W. I. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13821–13832.
- (6) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 400.
- (7) Gabrielska, J.; Gagos, M.; Gubernator, J.; Gruszecki, W. I. *FEBS Lett* **2006**, *580*, 2677.
- (8) Gagos, M.; Gabrielska, J.; Dalla Serra, M.; Gruszecki, W. I. *Molec. Memb. Biol.* **2005**, *22*, 433.
- (9) Fournier, I.; Barwicz, J.; Tancrede, P. *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1373*, 76.
- (10) Neumann, A.; Baginski, M.; Czuba, J. *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 18266.