

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Wiktoria Rejmak

**Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej
odporności na degradację enzymatyczną.
Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne**

Promotor:

prof. dr hab. Adam Lesner

*Praca doktorska wykonana w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej
w Katedrze Technologii Środowiska*

Gdańsk 2025

Pragnę podziękować mojemu promotorowi, prof. Adamowi Lesnerowi za wsparcie merytoryczne, formalne kierowanie moją pracą doktorską oraz za możliwość realizacji badań w ramach przewodu doktorskiego.

Serdecznie dziękuję dr hab. Magdalenie Wysockiej, prof. UG za poświęcony czas oraz cenne sugestie, które pomogły mi w planowaniu i realizacji badań komórkowych.

Chciałabym również złożyć podziękowania dr Natalii Gruba za cenne rady, których mi udzielała podczas prowadzonych badań. Jej doświadczenie i gotowość do pomocy były dla mnie ogromnym wsparciem.

Praca realizowana była w ramach projektu NCN PRELUDIUM BIS 1
pt. „Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na
degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne
(nr 2019/35/O/ST4/01142)

Kierownik projektu: prof. dr hab. Adam Lesner, UG



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Spis treści

Summary.....	8
Streszczenie.....	10
Wykaz stosowanych skrótów	12
PRZEGLĄD LITERATUROWY	15
1. Katelicydyny	15
1.1. Historia odkrycia katelicydyny	15
1.2. Struktura i klasyfikacja katelicydyn.....	16
1.3. Mechanizm działania katelicydyn.....	19
2. Peptydy antymikrobiotyczne	20
2.1. Podział AMP	20
2.2. Mechanizm antymikrobiotyczny.....	22
3. Ludzka katelicydyna	23
3.1. Ekspresja ludzkiej katelicydyny.....	23
3.2. Struktura chemiczna i mechanizm działania.....	24
3.3. Funkcje ludzkiej katelicydyny	25
3.4. Czynniki wpływające na syntezę katelicydyny.....	26
3.5. Przegląd badań prowadzonych dla LL-37.....	28
4. Odporność proteolityczna	32
4.1. Proteazy	32
4.2. PADy	35
4.2.1. Deiminaza peptydyloargininowa 2 (PAD2).....	35
4.2.2. Deiminaza peptydyloargininowa 4 (PAD4)	35

5. Metody zwiększania odporności enzymatycznej peptydów i białek	37
5.1. Środki stabilizujące wykorzystywane do zwiększania stabilności proteolitycznej	40
6. Białka wiążące DNA	42
6.1. Funkcje białek wiążących DNA i RNA	43
7. NETs.....	44
7.1. Struktura oraz tworzenie NETs	44
7.2. Czynniki wpływające na tworzenie NETs	46
8. Neutrofile.....	47
8.1. Budowa neutrofili.....	47
8.2. Funkcje ludzkich neutrofili	48
8.3. Metody aktywacji neutrofili.....	48
8.4. Modele naśladujące komórki neutrofili	49
CEL PRACY	52
1. Wpływ wprowadzonych modyfikacji na strukturę drugorzędową	53
3. Określenie stabilności enzymatycznej	53
4. Wpływ peptydomimetyków na cytotoksyczność wobec linii komórkowych	53
5. Określenie wpływu analogów LL-37 na komórki odpornościowe.....	54
METODY PRZEPROWADZONYCH BADAŃ	55
1. Chemiczna synteza peptydomimetyków.....	55
1.1. Automatyczna synteza mikrofalowa	55
1.2. Synteza manualna.....	57
1.2.1. Test chloranilowy i test Kaisera.....	58
1.2.2. Usuwanie osłon ivDde	58
1.2.3. Usuwanie soli DCHA z pochodnych aminokwasowych	59

1.2.4.	Przylączenie pochodnych do łańcuchów bocznych związku	59
1.2.5.	Odszczepienie peptydomimetyków od nośnika.....	63
2.	Analiza metodą MS MALDI-TOF	63
3.	Analiza metodą UPLC	63
4.	Analiza metodą dichroizmu kołowego	64
5.	Elektroforeza w żelu agarozowym	64
6.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym	64
7.	Termoforeza w mikroskali	65
8.	Mikroskopia sił atomowych	66
9.	Pomiary z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła	67
10.	Spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową...	68
11.	Badania komórkowe.....	69
11.1.	Linie komórkowe.....	69
11.2.	Różnicowanie komórek linii HL-60	70
11.3.	Testy cytotoksyczności	71
11.4.	Ocena wpływu peptydomimetyków na aktywację komórek HL-60	72
12.	Aktywność enzymatyczna	74
WYNIKI I DYSKUSJA.....		76
1.	Badania fizykochemiczne peptydomimetyków	76
1.1.	Analiza metodami spektrometrii mas oraz UPLC	76
1.2.	Struktury drugorzędowe peptydomimetyków	78
2.	Badania powinowactwa	81
2.1.	Elektroforeza agarozowa	81
2.2.	Elektroforeza poliakrylamidowa	83

2.3.	Pomiary metodą termoforezy w mikroskali	86
2.4.	Pomiary AFM	87
2.5.	Pomiary z wykorzystaniem dynamicznego rozproszenia światła DLS.....	89
3.	Ocena podatności na proteolizę zsyntetyzowanych analogów z wykorzystaniem techniki LC-MS.....	96
3.1.	Krzywe zaniku.....	96
3.2.	Podatność analogów na reakcje deiminacji z wykorzystaniem enzymów PAD2 i PAD4	100
4.	Cytotoksyczność peptydomimetyków względem linii komórkowych	104
4.1.	Stopień aktywacji komórek linii HL-60	110
	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	114
	Dorobek naukowy	116
	Wykaz rysunków.....	119
	Wykaz tabel	122
	Literatura cytowana	123

Summary

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of the innate immune system. AMPs are short, cationic peptide chains found in bacteria, plants, amphibians, insects, fish, and mammals. They exert their activity primarily by targeting microbial cell membranes, leading to membrane destabilization and, consequently, cell death. Due to their broad-spectrum activity, AMPs are being investigated as potential therapeutics for bacterial infections, particularly in addressing the growing problem of antibiotic resistance.

The human cathelicidin LL-37 is the only known antimicrobial peptide naturally present in humans. It exists initially as an inactive precursor, hCAP18, which is proteolytically cleaved by proteinase 3 to generate the active form. LL-37 is a linear, cationic peptide with an α -helical secondary structure. Its name refers to its primary structure, which starts with two leucine residues at the N-terminus and comprises a total of 37 amino acids. Cathelicidin exhibits multiple biological functions, including involvement in the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), angiogenesis, apoptosis, as well as antimicrobial, anticancer, and immunomodulatory activities.

As part of this doctoral dissertation, the native structure of LL-37 was modified by selectively substituting residues of arginine, lysine, isoleucine, and phenylalanine with DAPEG building blocks i.e., *L*-2,3-diaminopropionic acid (DAP) derivatives functionalized in their side chains with appropriate oxoacid residues. These modifications altered the hydrophobicity of the peptide chain, which in turn influenced its antimicrobial activity. The presence of longer side chains at the modified positions, compared to native LL-37, conferred increased resistance of the peptidomimetics to degradation by peptidylarginine deiminases.

The synthesized analogues were analyzed using circular dichroism spectroscopy to verify that the introduced modifications did not disrupt the α -helical secondary structure of the peptide. Additionally, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) confirmed that the modified peptides retained their ability to bind plasmid pUC19 DNA and double-stranded DNA (76 bp) comparably to the native LL-37.

Furthermore, the peptidomimetics were evaluated for their enzymatic activity in order to determine their functional roles in relation to HL-60 cells differentiated toward a neutrophil-like phenotype. The resulting compounds [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37, and [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 demonstrated activating effects on the differentiated cells.

Streszczenie

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides, AMPs) są głównymi składnikami wrodzonej odporności. AMPs to krótkie, kationowe łańcuchy peptydowe występujące u bakterii, roślin, płazów, owadów, ryb oraz ssaków. Wykazują działanie w stosunku do błon komórkowych drobnoustrojów prowadząc do ich destabilizacji a w następstwie do śmierci. Ze względu na szerokie spektrum działania są badane jako potencjalne leki w chorobach bakteryjnych, które zwalczą problem lekooporności.

Ludzka katelicydyna LL-37 to jedyny peptyd antymikrobiotyczny występujący u ludzi. Naturalnie przyjmuje formę nieaktywnej hCAP18, która pod wpływem proteiny 3 zostaje przekształcona w formę aktywną. LL-37 jest liniowym peptydem o kationowym charakterze oraz α -helikalnej strukturze. Jego nazwa jest ściśle związana ze strukturą pierwszorzędową w której na N-końcu występują dwie reszty leucyny a cały łańcuch składa się z 37 aminokwasów. Katelicydyna wykazuje szereg działań takich jak: udział w tworzeniu zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych, udział w procesie angiogenezy i apoptozy, działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe oraz immunomodulacyjne.

W ramach rozprawy doktorskiej strukturę natywnej katelicydyny LL-37 modyfikowałam wymieniając odpowiednio reszty: argininy, lizyny, izoleucyny oraz fenyloalaniny resztami DAPEG czyli kwasem L-2,3-diaminopropionowym modyfikowanym w łańcuchu bocznym sfunkcjonalizowanymi resztami odpowiednich oksakwasów. Wprowadzone modyfikacje zmieniały hydrofobowość łańcucha, która wpływa na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Obecność dłuższych łańcuchów bocznych w modyfikowanych pozycjach w porównaniu do natywnej katelicydyny sprawiała, że peptydomimetyki były bardziej odporne na działanie deiminaz peptydyloargininowych.

Zsyntetyzowane analogi analizowałam metodą dichroizmu kołowego sprawdzając czy wprowadzone modyfikacje nie zmieniły α -helikalnej struktury drugorzędowej peptydu. Dodatkowo wykonałam analizę elektroforetyczną na podstawie, której potwierdziłam, że modyfikowane peptydy, wiązały się z plazmidem pUC19 oraz z dsDNA (76pz) tak samo efektywnie jak natywna katelicydyna.

Peptydomimetyki poddałam również badaniom aktywności enzymatycznej w celu określenia ich roli w stosunku do komórek linii HL-60 zróżnicowanych do cech neutrofilii. Otrzymane związki: [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 i [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 pełniły funkcję aktywacyjną w przypadku zróżnicowanych komórek.

Wykaz stosowanych skrótów

W tekście posługuję się symbolami aminokwasów, ich pochodnych oraz grup ochronnych zgodnie z postanowieniami Komisji Nomenklatury Biochemicznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej oraz Międzynarodowej Unii Biochemicznej IUPAC – IUB ^I i zgodne z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Peptydowego ^{I,II,III}.

hCAP18 – nieaktywna forma ludzkiej katelicyny

LL-37 – ludzka katelicyna

AMPs – naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe

NK – komórki układu odpornościowego posiadające własności naturalnej cytotoksyczności

HIV-1 – ludzki wirus niedoboru odporności

VZV – półpasiec

EMT – przejście nabłonkowo-mezenchymalne

HCC – nowotwór wątrobowo-komórkowy

NETs – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe

APP – amyloidowe białko prekursorowe

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa

IAPP – polipeptyd amyloidu wysp trzustkowych

HNE – ludzka elastaza neutrofilowa

PR3 – proteinaza 3

PAD2 – deiminaza peptydyloargininowa 2

PAD4 – deiminaza peptydyloargininowa 4

PEG – glikol polietylenowy

PVP – glikol poliwinylpirolidonu

O1 – kwas 5-amino-3-oksapentanowy

O2 – kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy

GO1 – kwas 5-amidyno-3-oksapentanowy

GO2 – kwas 8-amidyno-3,6-dioksaoktanowy

Z-O1 – kwas 5-benzylksykarbonyloamino-3-oksapentanowy

Z-O2 – kwas 8-benzylloksykarbonyloamino-3,6-dioksaoktanowy
 MO1 – kwas 5-metoksy-3-oksapentanowy
 MO2 – kwas 8-metoksy-3,6-dioksaoktanowy
 DBP – białka wiążące DNA
 TF – specyficzne białka wiążące sekwencję
 NDBP – niespecyficzne białka wiążące sekwencję
 BRBP – białka wiążące DNA i RNA
 LPS – lipopolisacharyd
 PMA – 12-mirystynian-13-octan forbolu
 GMP – komórka progenitorowa granulocytów i monocytów
 ROS – reaktywne formy tlenu
 DMSO – dimetylosulfotlenek
 DMF – dimetyloformamid
 ATRA – kwas all-trans retinowy
 Dap – kwas *L*-2,3-diaminopropionowy
 DCHA – sól dicykloheksyloamoniowa
 DIC – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid
 NMP – *N*-metylopirolidon
 OXYMA – heksafluorofosforan-(1-cyjano-2-etoksy-2-oksoetylidenoaminoalkoxy)-
 dimetyloamino-morfoliny
 TFA – kwas trifluorooctowy
 EDT – etano-1,3-ditiol
 DHB – kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
 CCA – kwas α -cyjano-4-hydroksycynomonowy
 UPLC – ultrasprawa chromatografia cieczowa
 TFE – 2,2,2-trifluoroetanolu
 EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy
 MST – termoforeza w mikroskali
 AFM – mikroskopia sił atomowych
 DLS – metoda dynamicznego rozproszenia światła
 MTT – kolorometryczny test cytotoksyczności

ABZ – kwas 2- aminobenzoesowy

Dap(Dnp)-NH₂ – amid kwasu (N-β-2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diaminopropionowego

Bt – biotyna

FRET – transfer energii wzbudzenia elektronowego

CD – metoda dichroizmu kołowego

pDC – komórki plazmacytoidalne

T1D – cukrzyca typu 1

Cy5 – cyanine 5 (fluorofor)

PDI – wskaźnik polidispersyjności

[I]. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Eur. J. Biochem., 138, 9, (1984)

[II]. Jones J.H., A short guide to abbreviations and their use in peptide science, J. Pept. Sci., 5, 465, (1999).

[III]. Jones J.H., A revised guide to abbreviations in peptide science and a plea for conformity, J. Pept. Sci., 9, 1, (2003)

[IV]. Jones J.H., Abbreviations and symbols peptide science: a revised guide and commentary, J. Pept. Sci., 12, 1, (2006)

PRZEGLĄD LITERATUROWY

1. Katelicydyny

Katelicydyny i defensyny są najstarszymi elementami mechanizmów odpornościowych. Obie rodziny zaliczane są do peptydów przeciwdrobnoustrojowych i pełnią rolę cząsteczek efektorowych. Związki te wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze oraz przeciwpasożytnicze. Katelicydyny to grupa peptydów antybakteryjnych, które występują u ludzi i innych organizmów. Są częścią naturalnego systemu obronnego i pełnią kluczową rolę w zwalczaniu infekcji. Pozostają wytwarzane przez ssaki w odpowiedzi na szereg czynników [1].

1.1. Historia odkrycia katelicydyny

Białka o właściwościach przeciwbakteryjnych zaczęto badać w latach 80. i 90. XX wieku. Badacze po raz pierwszy w latach 90. zaczęli odkrywać peptydy przeciwdrobnoustrojowe u różnych gatunków. Wtedy zidentyfikowano obecność tych związków u ssaków, ptaków i innych organizmów, podkreślając ich rolę w odporności wrodzonej. Cząsteczka katelicydyny została odkryta w 1995 roku po izolacji z neutrofilii bydlęcego peptydu Bac5, pochodzącego z nieaktywnych prekursorów [2]. Pojęcie katelicydyny zostało przypisane dla klasy peptydów przeciwdrobnoustrojowych obejmującej podobne cząsteczki występujące u różnych gatunków.

Od początku XXI wieku wiele grup badawczych przebadalo sekwencję, struktury trójwymiarowe i mechanizmy działania katelicydyn przeciwko patogenom. Dodatkowo pojawiły się pierwsze doniesienia o ich roli w stanach zapalnych, gojeniu ran i immunomodulacji. Wzrosło zainteresowanie ich potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym, zwłaszcza w zwalczaniu lekoopornych infekcji bakteryjnych.

Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako cząsteczek efektorowych wrodzonej odporności wciąż się rozszerza. Obecnie związki te pełnią rolę antybiotyków endogennych, wielofunkcyjnych mediatorów, wzmacniających pierwszą linię obrony gospodarza [3].

1.2. Struktura i klasyfikacja katelicydyn

Katelicydyny są to małe kationowe antybiotyki peptydowe, które ulegają ekspresji w skórze i nabłonkach. Ludzka katelicydyna (hCAP18/LL-37) składa się z prosekwencji zwanej domeną katelicydynopodobną i C-końcowego peptydu o nazwie LL-37. Odkrycia sugerują, że po rozszczepieniu proteolitycznym domena katelicydynopodobna może brać udział w tworzeniu struktury, która wywołuje zahamowanie wzrostu bakterii i ograniczanie uszkodzeń tkanek [4].

Katelicydyny posiadają w sekwencji od 12-100 reszt aminokwasowych. W strukturze występują aminokwasy hydrofilowe oraz hydrofobowe, co warunkuje ich właściwości fizykochemiczne. Wielokrotnie w składzie występują reszty aminokwasów o ładunku dodatnim, co nadaje im właściwości kationowych. Jest to istotne, ponieważ pozwala na interakcję z błonami komórkowymi patogenów, które często są naładowane ujemnie. Niektóre katelicydyny zawierają reszty cysteiny, które pozwalają na tworzenie mostków disulfidowych, które odgrywają rolę podczas stabilizacji struktury trzeciorzędowej peptydu. Posiadają one fragmenty o strukturze helisy, elementy β -struktury i są podzielone na cztery grupy:

- tworzące α -helisy (np. ludzki LL-37) [5];
- tworzące β -kartki posiadające wiązania disulfidowe (np. protegrany świńskie) [6];
- struktury pętlowe posiadające większą ilość wiązań disulfidowych (np. bektecyna) [7];
- posiadające w sekwencji proliny lub argininy (np. bydlęce Bac) oraz bogate w tryptofan i indolicydynę [8].

Struktury te pozostają niekiedy w interakcji z błonami komórkowymi i wykazują działanie biologiczne. W zależności od specyficznej struktury i sekwencji aminokwasów, różne katelicydyny mogą wykazywać różne aktywności: przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe czy przeciwgrzybicze. Ich budowa chemiczna wpływa na efektywność w zwalczaniu różnych rodzajów patogenów [9].

Ponadto katelicydyny są zróżnicowane w zależności od gatunku organizmu u którego występują. Poszczególne rodzaje mogą mieć różne domeny odpowiedzialne za aktywność przeciwbakteryjną, interakcję z lipidami czy inne funkcje.

Dotychczas zidentyfikowano 30 przedstawicieli katelicydyn. W pracy magisterskiej mojego autorstwa pod tytułem „Synteza katelicydyny (LL-37) oraz jej analogów o zwiększonej stabilności proteolitycznej” możemy zapoznać się z tabelą przedstawiającą występowanie niektórych z niżej wymienionych odmian. Tabela 1. stanowi rozszerzenie opracowania umieszczonego w pracy magisterskiej.

Tabela 1. Przedstawiciele katelicydyn.

<i>Pochodzenie</i>	<i>Rodzaj katelicydyny</i>	<i>Miejsce występowania</i>	<i>Odnosnik literaturowy</i>
<i>Człowiek</i>	CAMP	Leukocyty, jądra, tkanki, płyny ustrojowe	[10]
<i>Małpa</i>	CAMP	Nabłonek narządów układu oddechowego oraz trawienneego	[11]
<i>Królik</i>	CAP18, P15R, P15H	Neutrofile	[12]
<i>Bawół</i>	CATH	Szpik kostny, układ rozrodczy	[13]
<i>Niemrawiec pospolity</i>	Katelicydyna BF	Gruczoł jadowy, żołądek, tchawica, skóra, mięśnie, serce, nerki, płuca, mózg, jelito, śledziona, wątroba i jajnik	[14]
<i>Bydło</i>	BAC1, BAC5, BAC7, BMAP28, BMAP27, BMAP34	Neutrofile	[15]
<i>Koza</i>	BAC5, BAC7, ATHL2, MAP28, MAP34-A, MAP34-B	Szpik kostny	[15]
<i>Świnka morska</i>	CAP11	Neutrofile	[16]

<i>Koń</i>	eCATH-1, eCATH-2, eCATH-3	Szpik kostny	[17]
<i>Drób</i>	CATHL1, CATHL2, CATHL3, CATHB1	Szpik kostny	[18]
<i>Śluzica pospolita</i>	CATH29, CATH37	Tkanki jelitowe	[19]
<i>Owca</i>	BAC6, BAC7.5, BAC11, CATHL1A, CATHL1B, CATHL2, CATHL3, SMAP-29, MAP34	Szpik kostny, wątroba	[20]
<i>Pstrąg tęczowy</i>	rtCATH-1, rtCATH-2	Skrzela, nerka, śledziona	[21]
<i>Szczur</i>	Camp	Szpik kostny	[22]
<i>Łosoś atlantycki</i>	asCATH, asCATH-2		[21]
<i>Świnia hodowlana</i>	PMAP23, PMAP36, PMAP37, PR39, PF-1, PF- 2, NPG1, NPG2, NPG3, NPG4, NPG5	Szpik kostny	[23]

Katelicydyny różnych gatunków ssaków mają podobne struktury genu, z czterema eksonami i trzema intronami, gdzie czwarty ekson koduje wariant peptydu przeciwdrobnoustrojowego [24]. Ulegają one ekspresji w neutrofilach, szpiku kostnym i na powierzchniach nabłonkowych [10-22].

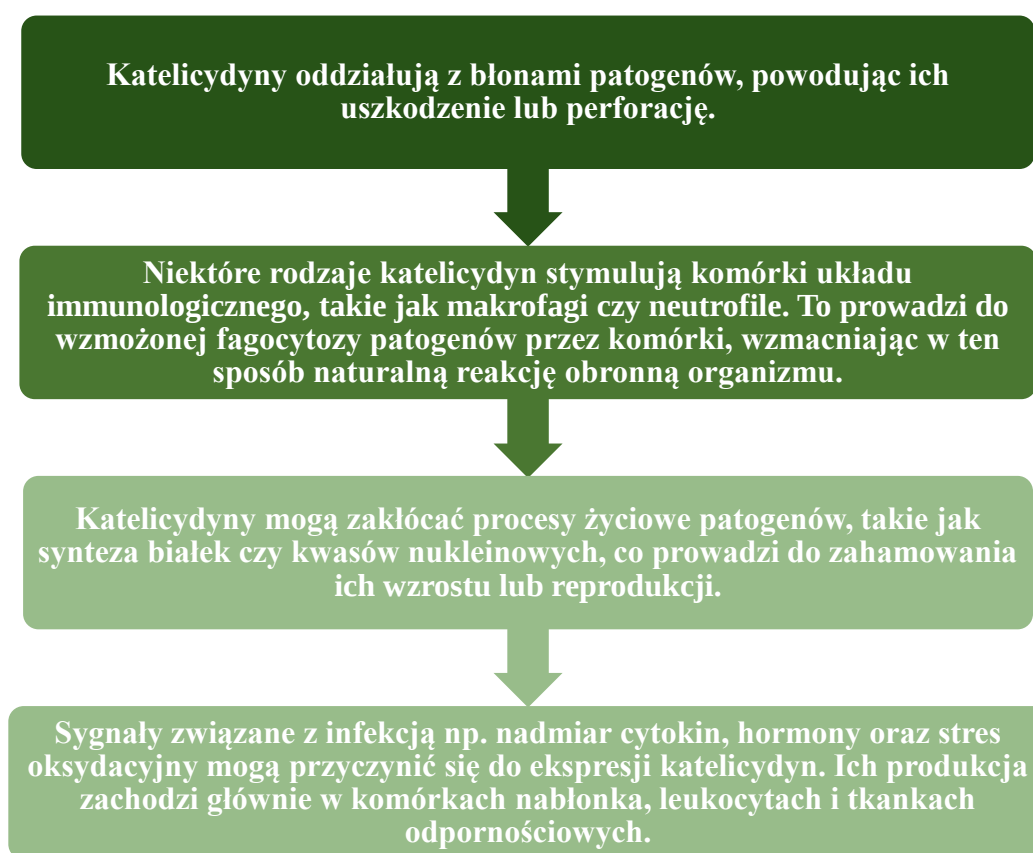
W neutrofilach, katelicydyny są syntetyzowane w postaci prekursorów o masie 16-26 kDa a następnie w tej formie są przechowywane w granulkach neutrofilii. Po stymulacji powstaje pełnej długości białko katelicydyny przetwarzane proteolitycznie w celu uaktywnienia działania bakteriobójczego peptydu C-końcowego z domeny katelicydynopodobnej.

Wewnątrzkomórkowe formy (propeptydy) zawierają: strukturalnie zróżnicowany C-końcowy kationowy region odpowiadający peptydowi przeciwdrobnoustrojowemu, połączony z konserwatywną domeną tzw. procząstką zawierającą około 100 reszt

aminokwasowych. Dojrzały peptyd można uwolnić z formy przechowywania w wyniku proteolizy w miejscach rozszczepianych przez elastazę lub proteinazę 3 [25], [26].

1.3. Mechanizm działania katelicydyn

Głównym zadaniem katelicydyn jest obrona organizmu przed patogenami np. bakteriami, wirusami, grzybami czy pierwotniakami. Są one kationowymi peptydami, które dzięki swojemu ładunkowi dodatniemu są w stanie oddziaływać z błonami komórkowymi bakterii, które posiadają ujemnie naładowane lipidy na swojej powierzchni. Mechanizm obronny obejmuje kilka etapów (Rys. 1).



Rysunek 1. Mechanizm działania katelicydyn.

Dodatkowo katelicydyny odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy mikrobiologicznej w organizmie. Ich nadmiar lub niedobór może prowadzić do większej podatności na infekcje lub być związany z chorobami zapalnymi, autoimmunologicznymi, infekcjami układu oddechowego, infekcjami skóry czy układu moczowego.

Katelicydyny stanowią część naturalnej odporności organizmu i działają w synergii z innymi składnikami układu immunologicznego. Ich zdolność do zwalczania patogenów bezpośrednio, jak i poprzez aktywację reakcji immunologicznych, czyni je kluczowymi w zapobieganiu infekcjom i utrzymaniu homeostazy mikrobiologicznej organizmu [27].

Badania nad katelicydynami trwają nadal, a ich potencjalne zastosowania obejmują terapię przeciwbakteryjną, leczenie infekcji opornych na antybiotyki, a nawet możliwość wykorzystania ich w produkcji nowoczesnych leków. Katelicydyny są więc niezwykle ważnym elementem naszego systemu obronnego, a zrozumienie ich funkcji i regulacji jest kluczowe dla rozwoju nowych terapii i leków.

2. Peptydy antymikrobiotyczne

Peptydy antymikrobiotyczne występują we wszystkich formach życia, od kręgowców po owady i rośliny. Biorą udział w walce z drobnoustrojami, które atakują organizmy odgrywając tym samym obronną rolę. Peptydy kationowe z rodziny defensyn i katelicydyn występują u ssaków w ziarnistościach fagocytów oraz na powierzchniach błon śluzowych i w skórze [28], [29], [30]. Miejsce występowania tych związków jest ściśle związane z ich rolą pierwszej linii obrony w kontakcie z patogenem.

2.1. Podział AMP

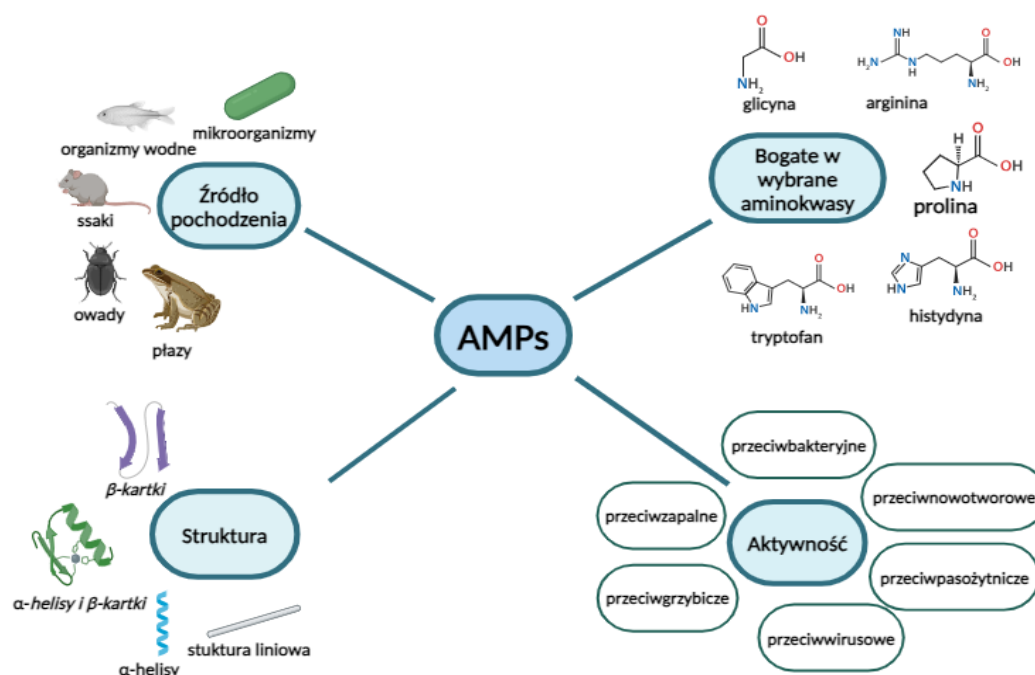
Peptydy przeciwdrobnoustrojowe cechują się ogromną różnorodnością, posiadają jedną cechę wspólną, wszystkie przyjmują formę z oddzielonymi od siebie fragmentami hydrofobowymi oraz hydrofilowymi. Większość peptydów antymikrobiotycznych jest zróżnicowana pod względem wielkości i kolejności sekwencyjnej ale wykazują pewne wspólne wzorce strukturalne, i można je odpowiednio podzielić w dwie główne grupy: peptydy liniowe i cykliczne.

- 1) Peptydy liniowe tworzą amfipatyczne helisy α , w których dominującymi aminokwasami są Pro, Trp, His, Gly.
- 2) Peptydy cykliczne obejmują te, które składają się głównie z arkusza β lub pętli, stabilizowanych różną liczbą wiązań disulfidowych [31].

Istnieje również inny podział peptydów antymikrobiotycznych ze względu na ich strukturę chemiczną.

- 1) Peptydy β -strukturalne – zbudowane głównie z reszt aminokwasowych tworzących β -struktury, które umożliwiają tworzenie kanałów w błonach komórkowych mikroorganizmów.
- 2) Peptydy α -helikalne – posiadające strukturę złożoną z α -helis, które mogą wchodzić w interakcje z błonami komórkowymi i zakłócać ich integralność.
- 3) Peptydy cykliczne – zawierające wiązania peptydowe w zamkniętych strukturach cyklicznych, zmieniając ich aktywność oraz stabilność.
- 4) Peptydy lipopeptydowe – zbudowane są z części peptydowej i lipidowej, co może również wpływać na ich interakcje z błonami komórkowymi.

Podział ten jest ściśle związany z mechanizmem działania w organizmie. Istnieją liczne podziały peptydów antymikrobiotycznych ze względu na różne czynniki m.in. miejsce występowania, właściwości, funkcję biologiczną (Rys. 2) [32].

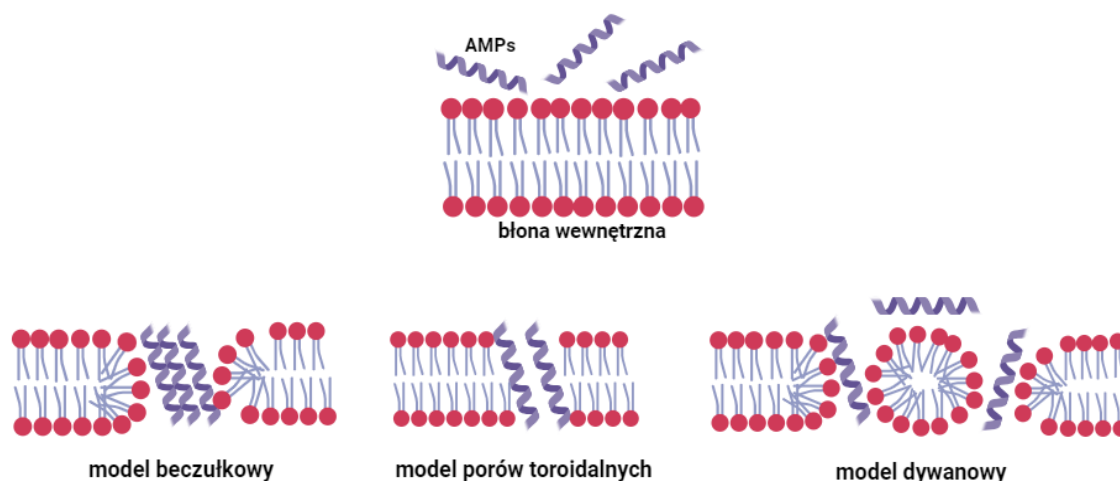


Rysunek 2. Podział peptydów antymikrobiotycznych, rysunek wykonany w oparciu o źródło [33].

2.2. Mechanizm antymikrobiotyczny

Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides, AMPs) są niestabilne i mają krótki okres półtrwania w organizmie. Większość z AMPs bez względu na różnice strukturalne powoduje dezintegrację błony komórkowej. W wyniku oddziaływania z błoną komórkową, następuje jej depolaryzacja i powstawanie tzw. „jam”. Poznane zostały trzy modele tego zjawiska: model beczułkowy, model porów toroidalnych, model dywanowy (Rys. 3).

W literaturze możemy odnaleźć również inne mechanizmy działania peptydów antymikrobiotycznych, nie wszystkie dotyczą interakcji z błoną komórkową. Sposób działania AMP jest warunkowany przez szereg czynników m.in. stężenie peptydu, gatunek drobnoustrojów, fazę rozwoju atakowanej komórki [33], [34].



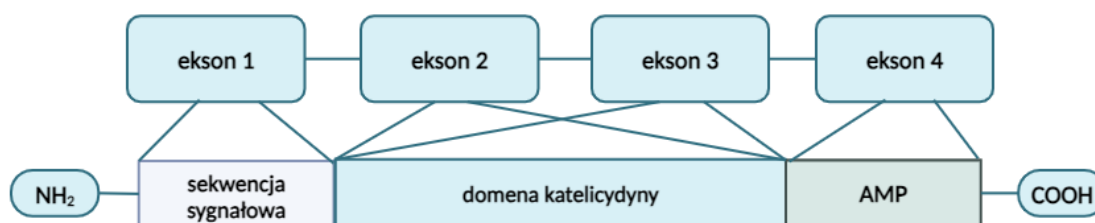
Rysunek 3. Modele oddziaływania peptydów antymikrobiotycznych z błoną komórkową, rysunek wykonany w oparciu o źródło [33].

3. Ludzka katelicydyna

Ludzka katelicydyna jest peptydem przeciwdrobnoustrojowym kluczowym dla obrony wrodzonego układu odpornościowego przed patogenami. Peptyd LL-37, pochodzący z białka prekursorowego hCAP18, odgrywa kluczową rolę w zwalczaniu drobnoustrojów, wykazując ogromną wszechstronność mechanizmów i funkcji. Dojrzały aktywny peptyd LL-37 wyizolowano po raz pierwszy w 1996 z granulocytów [35].

3.1. Ekspresja ludzkiej katelicydyny

Gen kodujący ludzką katelicydynę jest zbudowany z 4 eksonów. Trzy pierwsze są odpowiedzialne za kodowanie sekwencji sygnałowej i domeny katelicydyny (Rys. 4). Natomiast czwarty ekson koduje dojrzały peptyd. Ludzki peptyd przeciwdrobnoustrojowy katelicydyna (CAMP, hCAP-18) jest to jedyne białko z rodziny katelicydynowych występujące u człowieka [36]. W wyniku rozszczepienia proteolitycznego hCAP-18 (o masie 18 kDa) jest przetwarzany do bioaktywnej katelicydyny LL-37 poprzez specyficzne proteazy serynowe, takie jak proteinaza 3, kalikreina 5 i kalikreina 7 [37]. Nieaktywna forma hCAP-18 ulega ekspresji w różnych komórkach nabłonkowych i komórkach odporności wrodzonej (neutrofilach, monocytach, makrofagach, komórkach dendrytycznych, limfocytach oraz komórkach naturalny zabójca (NK)) [38], [39]. Jest to peptyd o szerokiej ekspresji, którego poziom może ulegać zwiększeniu podczas odpowiedzi immunologicznej [40].



Rysunek 4. Lokalizacja genu katelicydyny w genomie człowieka i jego struktura, rysunek wykonany w oparciu o źródło [41].

3.2. Struktura chemiczna i mechanizm działania

W wodzie LL-37 tworzy strukturę przypominającą cewkę. W roztworach soli o stężeniach milimolowych lub w obecności membrany związek ten przybiera postać kationowej, amfipatycznej struktury α -helikalnej, składającej się z 3 części: *N*-końcowej α -helisy, po której następuje *C*-koniec α -helisy i *C*-końcowy ogon.

W fizjologicznym pH katelicydyna posiada wypadkowy ładunek +6 uwarunkowany obecnością w strukturze 11 hydrofobowych aminokwasów i 5 hydrofilowych. Początkowe doniesienia dowodziły, że *C*-końcowy fragment katelicydyny zbudowany był z 39 reszt aminokwasowych i nosił nazwę FALL-39. W kolejnych latach udowodniono, że po izolacji peptydu z neutrofili był on o 2 reszty krótszy i rozpoczynał się od dwóch reszt leucyn [47]. Sekwencja natywnej struktury LL-37: LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ-RIKDFLRNLPRTES [41], [42].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe wykazują silną aktywność przeciwko mikroorganizmom poprzez bezpośrednią lizę bakterii oraz permeabilizację błon komórkowych [43]. Permeabilizacja polega na podwyższeniu przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórek w celu zwiększenia ilości wydzielanych przez nią metabolitów. Peptyd LL-37 zabija organizmy docelowe zakłócając integralność błony. Katelicydyna w swojej strukturze ma znaczną ilość aminokwasów zasadowych co warunkuje dodatni ładunek cząsteczki. Natomiast powierzchnia mikroorganizmów wykazuje przeważnie ujemny ładunek. Ze względu na kationowy charakter katelicydyna hCAP-18/LL-37 jest przyciągana elektrostatycznie do ujemnych grup fosfolipidów znajdujących się na powierzchni błon u bakterii nie posiadających ścian komórkowych. W przypadku bakterii posiadających ścianę komórkową oddziałują przez kwasy teichojowe w przypadku bakterii Gram-dodatnich oraz przez lipopolisacharydy u bakterii Gram-ujemnych. Dochodzi wtedy do zmian w strukturze błony a tym samym do tworzenia kanałów jonowych lub porów wodnych. Prowadząc w kolejnym etapie do śmierci drobnoustrojów w wyniku lizy hipoosmotycznej [44].

3.3. Funkcje ludzkiej katelicydyny

Ludzka katelicydyna uczestniczy w licznych procesach fizjologicznych i immunologicznych, co sprawia, że jest często badanym związkiem. Testy nad LL-37 wykazały, że *N*-końcowa helisa uczestniczy w chemotaksji, oligomeryzacji białek, oporności proteolitycznej i aktywności hemolitycznej. LL-37 indukuje proces angiogenezy, aktywuje komórki do proliferacji a następnie do tworzenia struktur przypominających naczynia krwionośne [45].

Jedną z głównych funkcji ludzkiej katelicydyny jest zwalczanie bakterii. To helisa *C*-końcowa jest odpowiedzialna za efekt przeciwbakteryjny. Peptyd działa niszcząc błony komórkowe bakterii lub zaburzając ich strukturę, prowadząc do śmierci komórek bakteryjnych. Katelicydyna posiada działanie przeciwbakteryjne przeciwko szerokiej gamie bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich [46]. Wang i współpracownicy ustalili, że długość peptydu wykazującego działanie antybakteryjne (ilość hydrofobowych reszt aminokwasowych) ma bardzo duże znaczenie. Jednak kolejność aminokwasów w sekwencji peptydów już nie wpływa znacząco na pełnioną rolę [47].

Dodatkowo LL-37 posiada właściwości hamujące wzrost biofilmu i może wyeliminować wcześniej utworzony biofilm *in vitro*. Gojenie ran i sprzyjanie infekcjom może być hamowane przez mikrobiologiczne błony powierzchniowe [48].

Oprócz działania antybakteryjnego, ludzka katelicydyna wykazuje również działanie przeciwgrzybicze wobec *Candida albicans* [46]. Tsai i współpracownicy zaobserwowali, że LL-37 zmienił integralność ściany komórkowej patogenu i wpływał na ekspresję genów związanych z regulacją procesów biologicznych, reakcją na stres lub bodziec chemiczny [49].

Ponadto ludzka katelicydyna LL-37 wykazuje działanie przeciwwirusowe przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV-1), grypie, ospie wietrznej, półpaścowi (VZV) i wirusowi opryszczki pospolitej. Funkcja ta jest warunkowana przez helisę *C*-końcową, która bezpośrednio wchodzi w interakcję z kapsydem białkowym wirusa. LL-37 hamuje infekcję wirusową, blokując wejście wirusa do komórek gospodarza lub poprzez tłumienie ekspresji genów wirusa [46], [50], [51]. Grupa naukowców Wang i in. sprawdzali aktywność fragmentów LL-37 przeciw wirusowi HIV i udowodnili, że centralny fragment, GI-20 o sekwencji GIKEFKRIVQRIKDFLRNLV wykazał największą aktywność [52].

Apoptoza to proces programowanej śmierci komórkowej. Jest ona niezbędna do utrzymania równowagi w organizmie, ze względu na eliminację uszkodzonych komórek czy regulację procesów rozwoju i wzrostu. Peptyd LL-37 ma zdolność do indukowania procesu programowanej śmierci komórek T regulatorowych, które są odpowiedzialne za hamowanie nasilonej autoreaktywnej odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo proces ten dotyczył komórek typu „Treg” są to specjalnego rodzaju komórki układu odpornościowego, które biorą udział w regulacji procesów odpornościowych oraz w rozwoju i utrzymaniu tolerancji immunologicznej, zarówno na poziomie poszczególnych tkanek, jak i całego organizmu. Zapobiegają nadmiernym reakcjom immunologicznym oraz autoimmunologicznym [53].

Katelicydyny wykazują także właściwości przeciwzapalne. Hamują proces wydzielania cytokin prozapalnych regulując w ten sposób reakcje zapalne. LL-37 jest wytwarzany przez nabłonkowe komórki skóry, komórki odpornościowe (neutrofile) w miejscach zainfekowanych. Ekspresja katelicydyny jest praktycznie niewykrywalna w zdrowej skórze, natomiast podczas infekcji lub urazu obserwujemy jej nadekspresję. W przypadku gojenia się kości LL-37 stymuluje monocyty krwi do migracji do złamania kości i różnicowania się do monoosteofilów [53], [54].

Katelicydyny mogą odgrywać rolę w utrzymaniu równowagi w tkankach poprzez kontrolowanie mikroorganizmów, które mogłyby prowadzić do stanów chorobowych. Wszystkie wyżej wymienione funkcje ludzkiej katelicydyny podkreślają jej znaczenie jako elementu naturalnej obrony organizmu przed infekcjami i procesami zapalnymi.

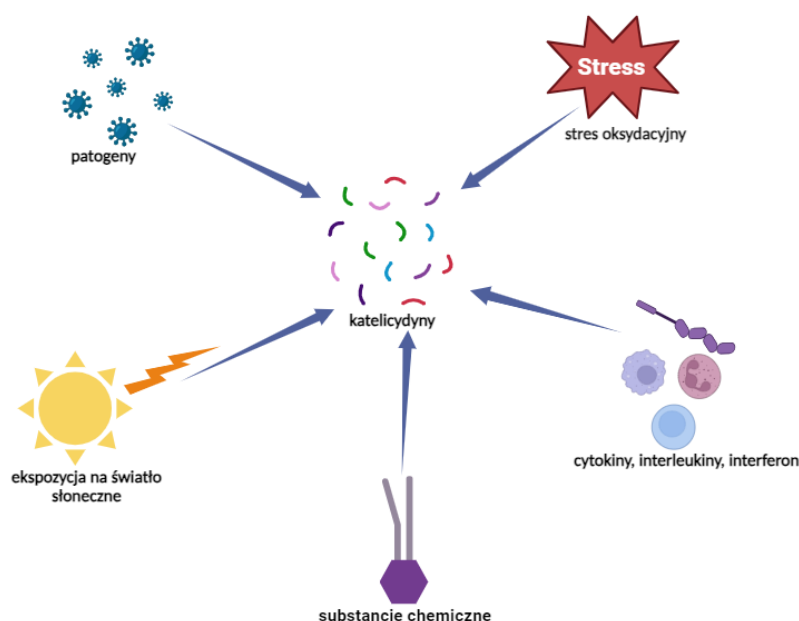
3.4. Czynniki wpływające na syntezę katelicydyny

Cały proces produkcji katelicydyny jest mocno skomplikowany. Wiele czynników wpływa na jego regulację. Większość z nich jest związana z sygnałami zapalnymi, obecnością patogenów oraz czynnikami środowiskowymi, które mogą wpływać na system immunologiczny.

Do czynników regulujących produkcję katelicydyny zaliczamy (Rys. 5):

- Obecność patogenów, które inicjują odpowiedź immunologiczną organizmu m.in. bakterie, wirusy, grzyby.
- Ekspozycja na światło słoneczne (fotony ultrafioletowe B);
- Stres oksydacyjny powodowany przez reakcje tlenowe w organizmie;

- Sygnały chemiczne wydzielane w odpowiedzi na stan zapalny lub infekcje m.in. cytokiny, interleukiny, interferon, czynniki wzrostu;
- Obecność substancji chemicznych na powierzchni patogenów, które aktywują receptory w komórkach układu odpornościowego np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, maślan, jony Zn^{2+} , które są metabolitami bakterii;
- Hormony, takie jak kortykosteroidy czy hormony stymulujące wzrost [55], [56], [57], [58].



Rysunek 5. Czynniki wpływające na syntezę katelicydyn.

Ekspozycja na światło słoneczne, zwłaszcza fotony ultrafioletowe B, inicjuje konwersję prowitaminy D3 do prewitaminy D3 w skórze. Drugim etapem aktywacji witamin jest tworzenie 1,25-dihydroksyvitaminy D (aktywna witamina D3). Produkcja LL-37 może być indukowana przez napromienianie ultrafioletem B i jego poziom ulega podwyższeniu u osób z uszkodzoną skórą lub zakażonych. Zespół badawczy Gant’a odkrył, że ultrafiolet B i witamina D może zmniejszać ryzyko kilku chorób autoimmunologicznych i niektórych nowotworów [59].

Czynniki wyżej wymienione wpływają znacząco na zdolność organizmu do zwalczania infekcji. Utrzymywanie zdrowego stanu układu odpornościowego i odpowiedniego środowiska życiowego może być kluczowe dla optymalnej produkcji tych substancji obronnych [60].

3.5. Przegląd badań prowadzonych dla LL-37

Ludzka katelicydyna LL-37 będąca kluczowym elementem wrodzonego układu odpornościowego człowieka stanowi temat przewodni licznych publikacji, ze względu na szerokie spektrum działania.

a) Potencjalny środek terapeutyczny przeciwko COVID-19

Wang i inni w swoich pracach opisali jak działa LL-37 wobec SARS-CoV-2. Ich badania potwierdziły, że wykazywał on zdolność do hamowania wejścia wirusa do komórek oraz do modulowania odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie wyników badacze wyciągnęli wniosek, że ludzka katelicydyna LL-37 zmniejsza replikację SARS-CoV-2, co sprawia, że może być wykorzystywana jako potencjalny środek terapeutyczny w walce z COVID-19 [61].

A. Barron w roku 2024 opisał szczegółowo potencjalne korzyści wynikające z podwyższonego poziomu ludzkiej katelicydyny LL-37 podczas infekcji wirusa powodującego COVID-19. LL-37 oprócz tego, że jest peptydem wykazującym właściwości immunomodulacyjne i antybakteryjne, hamował replikację wirusa oraz przeciwdziałał tworzeniu mikrozatorów, które występowały w ciężkich przypadkach COVID-19. Autorzy publikacji udowodnili, że zwiększenie ekspresji LL-37 może być związane z usprawnieniem procesu usuwania sieci zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofili (ang. neutrophil extracellular traps, NETs). Dodatkowo odkryli, że przyspiesza naprawę śródbłonna po uszkodzeniu zapalnym. LL-37 tworzył bezpośrednie wiązanie z wirusem SARS-CoV-2, ograniczając jego zdolność do infekowania komórek. Badacze sugerują, że kontrolowane zwiększanie poziomu LL-37 może stanowić dodatkową skuteczną strategię terapeutyczną w walce z COVID-19 [62].

b) Infekcje bakteryjne

Obecnie ogromnym problemem pojawiającym się na całym świecie jest lekooporność. Grupa profesora Coorensa zajęła się badaniami analizującymi rolę ludzkiej katelicydyny w walce z infekcjami bakteryjnymi w kontekście modulacji odpowiedzi immunologicznej neutrofili. W 2020 roku przeprowadzili badania przeciwko wieloopornym szczepom bakterii między innymi MRSA (*Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*), które dowiodły, że ludzka katelicydyna może niszczyć komórki bakteryjne oraz zakłócać biofilm bakteryjny [63].

Ponadto w pracy opublikowanej w 2019 roku zbadano wpływ LL-37 na biofilmy tworzone przez *Staphylococcus aureus*. Badania udowodniły, że LL-37 może działać synergistycznie z tradycyjnymi antybiotykami. Wyniki pokazały, że w połączeniu z antybiotykami, LL-37 zwiększa przepuszczalność błony komórkowej bakterii, co umożliwia lepszą penetrację leku do wnętrza komórki bakteryjnej tym samym poprawiając jego skuteczność [64].

Ludzka katelicydyna działa według kilku mechanizmów, pierwszy polega na tym, że wykazuje zdolność do integracji z błoną komórkową bakterii co prowadzi do lizy komórkowej. Drugim mechanizmem jest neutralizacja endotoksyn w wyniku oddziaływania z lipopolisacharydami występującymi na powierzchni bakterii Gram-ujemnych. Dodatkowo LL-37 moduluje odpowiedź immunologiczną wpływając na podwyższoną produkcję cytokin prozapalnych.

W 2022 roku grupa badawcza C. Demir opisała skuteczność działania peptydu LL-37 przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus*. Jako pierwsi zajęli się określeniem mechanizmu molekularnego tworzących się biofilmów pomiędzy szczepami *S. aureus metycylino-wrażliwym (MSSA)* o biofilmie dodatnim lub szczepami *S. aureus metycylino-opornym (MRSA)* i ludzką katelicydyną. Dotychczasowe badania donosiły, że kationowy peptyd przeciwdrobnoustrojowy mógł być wykorzystywany do walki z aktywnością biofilmu w zakażonych ranach. Wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) sprawdzano metodą mikrorozcieńczeń i wynosiły dla LL-37 odpowiednio 89,6 mg/L i 132,3 mg/L dla szczepów *MSSA* i *MRSA*.

c) Choroby nowotworowe

W ostatnich latach badania nad LL-37 koncentrowały się na jego roli w rozwoju i progresji nowotworów. W zależności od rodzaju nowotworu oraz czynników zewnętrznych ludzka katelicydyna może pełnić dwie funkcje: przeciwnowotworowe oraz promujące nowotwory. W przypadku nowotworu płuc i prostaty ludzka katelicydyna działa jako czynnik przeciwnowotworowy, hamując proliferację komórek oraz indukując ich programowaną śmierć czyli apoptozę. Pełniona przez nią funkcja jest uwarunkowana zdolnością do tworzenia bezpośrednich oddziaływań z komórkami nowotworowymi. W przypadku raka piersi LL-37 działa jako promotor nowotworowy. Badania wykazały, że obecność peptydu wspomaga proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych czyli angiogenezę co jest ściśle związane z reakcjami LL-37 z receptorami

występującymi na powierzchni komórek nowotworowych. Interakcja ta przyczynia się do aktywacji szlaków sygnałowych oraz rozprzestrzeniania się nowotworu (przerzutów). Badania te są wstępem do określenia możliwości terapeutycznych w terapii nowotworowej ludzkiej katelicydyny LL-37 [65].

Kluczowym procesem przyczyniającym się do rozprzestrzeniania się i tworzenia przerzutów nowotworów jest przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. epithelial mesenchymal transition, EMT). Polega ono na utracie przez komórki nabłonkowe charakterystycznych właściwości i przekształcenia ich w komórki mezenchymalne, które są bardziej ruchliwe i łatwiej jest im wnikać do tkanek. Dodatkowo są one odporne na apoptozę. Y. Chen wraz ze swoim zespołem zajął się badaniami wpływu LL-37 na nowotwór wątrobowo-komórkowy (ang. hepatocellular carcinoma, HCC). HCC jest późno diagnozowanym nowotworem i to w zaawansowanych stadiach, co decyduje o jego wysokim indeksie śmiertelności. Przerzuty w jego przypadku dotyczą płuc, węzłów chłonnych, kości oraz nadnerczy. Dotychczasowe terapie obejmują leczenie ukierunkowane oraz zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego. Nowe badania dotyczą leczenia skojarzonego, gdzie peptyd LL-37 ma wpływać na tworzące się przerzuty HCC. Badania grupy Y. Chena wykazały, że hCAP18/LL-37 odgrywa rolę w promowaniu wzrostu guza w przypadku kilku typów nowotworów poprzez bezpośrednią stymulację komórek złośliwych, inicjację angiogenezy lub tłumienie odporności w mikrośrodkowisku guza. Dodatkowo kilka badań wykazało również, że katelicydyna promuje migrację i przerzuty w przypadku nowotworu piersi, nowotworu jajnika, i czerniaka [66].

d) Działanie immunomodulacyjne

Działanie immunomodulacyjne jest to funkcja ściśle związana z wpływaniem na wrodzoną oraz nabytą odpowiedź immunologiczną. LL-37 posiada zdolność aktywacji monocytów oraz makrofagów, poprzez stymulację ich do produkcji cytokin prozapalnych. Kolejnym elementem ludzkiej odporności są neutrofile, które również mogą być pobudzane przez katelicydynę do fagocytozy oraz tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych.

W licznych doniesieniach literaturowych przedstawione jest działanie immunomodulacyjne peptydu LL-37. Praca M. Seila skupia się na korelacji ludzkiej katelicydyny z sepsą. Ich badania udowadniają, że LL-37 oddziałuje

z lipopolisacharydami znajdującymi się na błonie bakteryjnej bakterii Gram-ujemnych co zapobiega nadmiernym reakcjom zapalnym [67].

Z kolei badania zespołu Barriere omawiają rolę LL-37 oraz innych peptydów antymikrobiotycznych w patogenezie sepsy. Eksperymenty wykazały, że peptyd odgrywa ochronną rolę w przypadku sepsy i szoku septycznego, będących skutkiem nadmiernej i niekontrolowanej odpowiedzi zapalnej. Katelicydyna moduluje odpowiedź immunologiczną, chroniąc tkanki przed nadmiernym stanem zapalnym.

Publikacja I. Nagaoka przedstawia terapeutyczne znaczenie peptydu LL-37 w przypadku sepsy na podstawie modelu myszy. Udowodniono, że LL-37 hamuje pyroptozę (programowana śmierć komórek) w makrofagach co wpływa na obniżenie poziomu produkcji prozapalnych cytokin. Katelicydyna oprócz tego pobudza powstawanie NETs przez co przyczynia się do zmniejszenia obciążenia bakteryjnego i poprawy stanu zapalnego podczas sepsy. Ostatnią pełnioną funkcją jest stymulacja ektosomów przez neutrofile zawierające w składzie peptydy antymikrobiotyczne. Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wniosek, że LL-37 ze względu na zakres pełnionych funkcji może posłużyć jako potencjalny lek w terapii sepsy [68].

Liczni naukowcy przebadali również zdolność LL-37 do interakcji z β -amyloidem ($A\beta$), jest to fragment białka powstający w wyniku rozpadu amyloidowego białka prekursorowego (APP) występujący w błonach neuronów. Badania te miały na celu sprawdzenie związku ludzkiej katelicydyny z patogenezą choroby Alzheimera. Grupa badawcza De Lorensi zbadała wpływ LL-37 na agregację amyloidu $A\beta_{42}$. Eksperymenty *in vitro* przeprowadzone z wykorzystaniem obrazowania powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. surface plasmon resonance, SPR) dowiodły, że LL-37 wiąże się specyficznie z $A\beta$. Naukowcy wykonali analizę otrzymanych agregatów za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. transmission electron microscopy, TEM), która wykazała, że LL-37 hamuje zdolność $A\beta_{42}$ do tworzenia struktur włóknkowych amyloidu, co jest związane z patogenezą choroby Alzheimera [69]. Natomiast zespół V. Armiento zajął się badaniem związku pomiędzy LL-37 a polipeptydem amyloidu wysp trzustkowych (IAPP). Jest to hormon, który tworzy fibryle amyloidu w komórkach trzustkowych. W procesie samoorganizacji IAPP powstają oligomery będące toksyczne dla komórek. Liczne grupy badawcze obecnie zajmują się poszukiwaniem inhibitorów, które mogą zapobiegać agregacji IAPP.

V. Amiento i współpracownicy odkryli, że peptyd LL-37 wykazuje wysokie powinowactwo wiązania z IAPP przy czym hamuje agregację amyloidu IAPP, jak i jego toksyczne działanie na komórki [70].

Powyższy przegląd aktualnej literatury, przybliży wielofunkcyjną rolę ludzkiej katelicydyny w różnych stanach patologicznych co wpływa na zainteresowanie tą tematyką wielu grup badawczych.

4. Odporność proteolityczna

Białka biorą czynny udział w procesach biologicznych a ich struktura jest ściśle odpowiedzialna za pełnione funkcje. Enzymy proteolityczne (proteazy) to substancje powodujące rozkład białek a tym samym zmianę ich funkcji. Specyficzna struktura białek jest związana z odpornością proteolityczną, ponieważ może utrudniać dostęp proteazom do kluczowych miejsc hydrolizy [71].

4.1. Proteazy

Proteazy są to enzymy, które katalizują hydrolizę wiązań peptydowych w białkach. Kontrolują one reakcje komórkowe w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych poprzez rozszczepienie substratów białkowych. Przecinają łańcuchy peptydowe, co prowadzi do rozpadu białek na mniejsze fragmenty zwane peptydami lub aminokwasami. Proteazy odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, regulując aktywność i funkcje białek. Istnieje wiele różnych rodzajów proteaz, gdzie każda z nich może mieć specyficzne miejsca wiązania i substraty.

Proteinazy serynowe to jeden z rodzajów enzymów proteolitycznych, który zawiera reszty seryny w swoim miejscu aktywnym. Miejsce aktywne bierze udział w tworzeniu interakcji z substratem i odpowiada za katalizę reakcji enzymatycznej [72].

Wśród proteinaz serynowych na podstawie specyficzności substratowej można wyróżnić trzy główne podrodziny proteaz serynowych:

- trypsynopodobne proteazy serynowe, niektóre granzymy (Gzms) i tryptaza rozszczepiają substraty białkowe po resztach lizyny i argininy o ładunkach dodatnich
- chymotrypsynopodobne rozszczepiają substraty po dużych hydrofobowych aminokwasach, takich jak alanina i leucyna.
- proteazy serynowe podobne do elastazy rozszczepiają substraty po małych resztach hydrofobowych, takich jak walina.

Do ostatniej podrodziny należą ludzka elastaza neutrofilowa (ang. human neutrophil elastase, HNE) oraz proteinaza 3 (ang. proteinase 3, PR3). Proteinazy serynowe biorą również udział w regulacji wielu procesów biologicznych poza układem trawiennym, takich jak regulacja układu krzepnięcia krwi, odporność. Różne rodzaje proteaz serynowych są specyficzne wobec różnych substratów co wiąże się z możliwością kontroli procesów biologicznych zachodzących w organizmach. Są one wytwarzane i czasami przechowywane jako nieaktywne zymogeny, które aby stać się aktywnymi, muszą zostać rozszczepione. Dodatkowo aktywność proteaz jest regulowana przez ich lokalizację.

Trypsyna, chymotrypsyna oraz peptydazy to kluczowe enzymy w procesie trawienia, ponieważ odgrywają rolę w rozkładaniu białek na mniejsze fragmenty w przewodzie pokarmowym [72], [73].

Proteinaza 3 zaliczana jak już wcześniej wspominałam do neutrofilnych proteinaz serynowych, kodowana jest przez gen PRTN3. Struktura tego enzymu składa się z dwóch antyrównoległych łańcuchów β -katek. W miejscu aktywnym posiada trzy reszty aminokwasowe: histydyna (57), seryna (195) i kwas asparaginowy (102). Proteinaza 3 hydrolizuje wiązania peptydowe po reszcie: alaniny, leucyny, waliny, seryny, cysteiny oraz metioniny. Wykazuje ona właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych [74], [75].

Elastaza jest zbudowana z pojedynczego łańcucha białkowego złożonego z 218 reszt aminokwasowych, który jest stabilizowany czterema wewnątrzcząsteczkowymi mostkami disulfidowymi. W miejscu aktywnym występują te same reszty aminokwasowe, które były obecne w proteinazie 3. Elastaza hydrolizuje wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie hydrofobowych reszt aminokwasowych: alaniny, leucyny, izoleucyny, waliny, seryny, cysteiny i metioniny. Jest ona niezbędnym enzymem

wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, kontroluje proces apoptozy oraz bierze udział w niszczeniu drobnoustrojów chorobotwórczych [75], [76].

Proteazy serynowe tj. elastaza neutrofilna oraz proteinaza 3 (PR3) są składnikami ziarnistości azurofilowych neutrofili i uczestniczą w nieoksydacyjnym szlaku wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym niszczenie patogenów. Te neutrofilne proteazy serynowe (NSP) obecne w fagolizosomach, trawią fagocytowane mikroorganizmy w połączeniu z peptydami bakteriobójczymi [77]. Biorą one również czynny udział w dodatkowym zewnątrzkomórkowym mechanizmie przeciwdrobnoustrojowy, zewnątrzkomórkowych pułapkach neutrofilowych (NET) [78].

Funkcje biologiczne ludzkiej proteazy neutrofilowej 3 (PR3) różnią się od tych dla elastazy neutrofilowej pomimo ich podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego. Chociaż obie proteazy są silnie kationowe, ich sekwencje różnią się głównie rozkładem naładowanych reszt. NSP są zaangażowane w stany zapalne u człowieka, w tym przewlekłe choroby płuc (przewlekła obturacyjna choroba płuc, mukowiscydoza). Trójwymiarowa struktura HNE oraz PR3 składa się z dwóch homologicznych beczek i C-końcowej helisy [79]. Każda z beczek zawiera sześć połączonych ze sobą antyrównoległych arkuszy. Triada katalityczna w obu enzymach zbudowana jest z reszt: Ser, Asp i His i znajduje się na styku beczek. Takie rozmieszczenie aminokwasów w miejscu aktywnym prawdopodobnie umożliwia atak nukleofili na węgiel karbonylowy (CO) wiązania rozrywanego, a zatem uruchomienie procesu katalizy. HNE i PR3 są wysoce kationowymi proteazami ze względu na dużą zawartość dodatnio naładowanych aminokwasów w pętlach domeny aktywacyjnej [80]. Ich trójwymiarowa struktura jest w 57 % homologiczna. PR3 i HNE mają rozszerzone miejsca interakcji, które odgrywają rolę podczas wiązania substratu i określenia specyficzności [81]. Ze względu na fakt, iż miejsca aktywne proteazy są również bardzo podobne i obie preferencyjnie są w stanie pomieścić w nich małe reszty alifatyczne [82]. Problemem był brak substratu, który by rozróżniał dwie proteazy. W celu odróżnienia tych dwóch enzymów od siebie wykorzystano substraty wykazujące FRET. Można ten pomiar wykorzystać do określenia specyficzności po obu stronach miejsca rozszczepienia [83]. Liczne badania kinetyczne i strukturalne wykazały, że miejsce wiązania w PR3 jest bardziej polarne niż w HNE [81]. To częściowo wyjaśnia dlaczego PR3, nie jest hamowana przez inhibitory o niskiej masie cząsteczkowej obecne w górnych drogach oddechowych [82].

4.2. PADy

Deiminazy peptydyloargininowe (ang. peptidylarginine deiminase, PADs) to enzymy, które katalizują przekształcanie reszt argininy w reszty cytrulinowe w procesie deiminacji. Biokatalizatory te występują w różnych tkankach i komórkach organizmu, a ich aktywność jest regulowana w odpowiedzi na zróżnicowane bodźce fizjologiczne i patologiczne. Proces deiminacji białek jest związany z procesami tj. zapalnym, apoptozy oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej [84].

W warunkach fizjologicznych PADy pozostają nieaktywne, dopóki nie zostaną pobudzone obecnością jonów wapnia. W momencie kiedy zostaną zaktywowane, enzymy cytrulinują białka strukturalne (np. wimentynę, filagrynę i keratynę) oraz białka biorące udział w regulacji transkrypcji genów (np. histony H1, H2A, H3 i H4) [85]. Zmieniając rozkład ładunku w białku, zmieniają również zdolność interakcji substratu z innymi cząsteczkami [86].

4.2.1.

Deiminaza peptydyloargininowa 2 (PAD2) to enzym, który odgrywa istotną rolę w procesach zapalnych. Bierze udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modyfikację białek zaangażowanych w procesy zapalne. PAD2 można znaleźć w wielu tkankach i narządach np. w mózgu, rdzeniu kręgowym, śledzionie, trzustce, mięśniach szkieletowych, komórkach układu odpornościowego. Reguluje on wiele procesów komórkowych, takich jak transkrypcja genów, antygenów, tworzenie pułapek zewnątrzkomórkowych (NETożę).

N-koniec PAD2 składa się z dwóch domen immunoglobulinopodobnych, domena 1 (N- końcowa), domena 2 (C- końcowa) oraz dodatkowej domeny katalitycznej. W PAD2 występuje sześć miejsc wiązania wapnia (Rys. 6). Strukturalnie jest podobny do PAD4 [87].

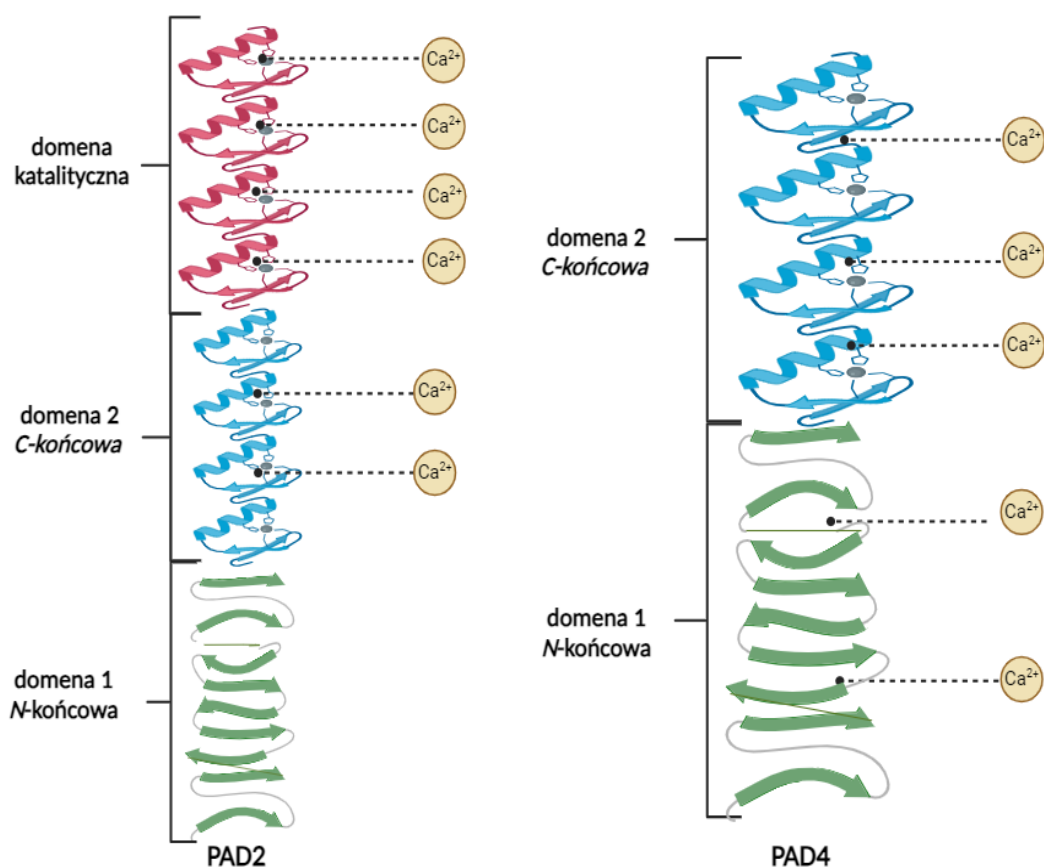
4.2.2.

Deiminaza peptydyloargininowa 4 (PAD4) jest potranslacyjnym enzymem modyfikującym, katalizującym konwersję argininy do reszt cytruliny. Proces ten osłabia interakcję pomiędzy histonem a ujemnie naładowanym DNA, w wyniku czego następuje rozluźnienie chromatyny i pęknięcie błony jądrowej. Dodatkowo pośredniczy w tworzeniu zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs). PAD4 odgrywa

istotną rolę w występowaniu i rozwoju chorób układu krążenia, chorób autoimmunologicznych i różnych nowotworów.

Ludzki PAD4 składa się z 663 aminokwasów. Pierwszy raz został odkryty w komórkach ludzkiej białaczki szpikowej HL-60. PAD4 zbudowany jest z unikalnej domeny *N*- i *C*-końcowej. Domena *N*- jest zróżnicowana na dwie immunoglobulinopodobne domeny. Domena 1 posiada dwa miejsca wiązania wapnia, podczas gdy domena 2 posiada trzy miejsca wiązania Ca^{2+} (Rys. 6).

PAD4 jest wytwarzany głównie w makrofagach, granulocytach i monocytach w mózgu, macicy i tkankach stawów. Wiąże się on z histonami w jądrze tym samym zmieniając swoje biologiczne znaczenie [88].



Rysunek 6. Struktury: deiminazy peptydyloarginionowej 2 i deiminazy peptydyloargininowej 4, rysunek wykonany w oparciu o źródło [70].

5. Metody zwiększania odporności enzymatycznej peptydów i białek

Peptydy i białka odgrywają istotną rolę w wielu organizmach i procesach fizjologicznych. Pełnią rolę hormonów, inhibitorów, substratów, neuroprzekazników, stymulatorów oraz inhibitorów wzrostu. Obecnie wykorzystywane są jako leki w dziedzinach neurologii, endokrynologii oraz hematologii. Niestety ze względu na wysokie koszty i niską biodostępność oraz biostabilność nie jest to łatwe zadanie. Fakt ten przyczynił się do tego, że liczni naukowcy skupiają się na projektowaniu syntetycznych analogów bazujących na natywnych AMP. Natywne peptydy ulegają szybkiej degradacji przez proteazy oraz są problematyczne podczas transportu przez błony komórkowe. Dlatego naukowcy próbują odkryć małe białkowe łańcuchy tzw. peptydomimetyki [89].

Leki peptydowe i białkowe są obecnie niezastąpione ze względu na ich szerokie zastosowanie terapeutyczne, pomimo ograniczeń związanych z ich właściwościami fizykochemicznymi tj. wysoka masa cząsteczkowa i hydrofilowość, które są bezpośrednio związane z niską biodostępnością, słabym przenikaniem przez błony biologiczne i niską stabilnością w krwiobiegu. Większość peptydów oraz białek ma krótkie okresy półtrwania, dlatego wymagane są wielokrotne dawki leków peptydowych [90].

Jak wspomniałam powyżej, stabilność proteolityczna naturalnych peptydów jest jednym z głównych ograniczeń stosowania ich jako leków. Krew ludzka składa się w 44 % z czerwonych krwinek, 1 % to białe krwinki i 55 % osocze. To właśnie w osoczu obecne są liczne enzymy proteolityczne, takie jak esterazy i peptydazy. W procesie hydrolizy peptydów bierze udział wiele ludzkich enzymów proteolitycznych (peptydaz) [18], [19]. Największe zagrożenie dla peptydów terapeutycznych występuje w świetle jelita cienkiego, które zawiera dużą ilość peptydaz wydzielanych przez trzustkę, a także peptydaz komórkowych z błony śluzowej komórki. Drugą ważną barierą enzymatyczną jest błona komórek nabłonkowych, która zawiera co najmniej 15 peptydaz [20].

Jeśli peptyd ma służyć jako środek terapeutyczny musi posiadać kluczowe parametry tj. efekt działania, profil farmakokinetyczny i niską immunogenność. Dlatego sprawdzane są różne strategie chemiczne, które mogą pokonać ograniczenia, wydłużając czas

przebywania w osoczu *in vivo*. Wiele cyklicznych peptydów, pseudopeptydów (modyfikacja wiązania peptydowego) i peptydomimetyków zachowujących właściwości biologiczne peptydów były i są szeroko rozwijane w celu zwiększenia ich odporność na degradację, eliminację, biodostępność i selektywność aby mogły posłużyć jako przyszłe leki. W rzeczywistości w modelowym peptydzie często konieczna jest optymalizacja składu chemicznego oraz struktury.

Optymalizacja chemiczna peptydu może odbywać się na podstawie wyszukania aktywnego fragmentu sekwencji. Najpierw identyfikuje się aktywny fragment sekwencji peptydu, wykorzystując skanowanie Ala, gdzie każdy aminokwas jest zastępowany alaniną w celu określenia, które reszty są kluczowe dla aktywności [91].

Innym sposobem jest wprowadzenie modyfikacji chemicznych, takich jak stabilizacja końców peptydu przez acetylację lub amidację. Można również zastąpić naturalny aminokwas jego analogiem D co powoduje zwiększenie stabilności i biodostępności peptydu [92].

Inne podejście jest ściśle związane ze słabymi siłami, takimi jak wiązania wodorowe, siły van der Waalsa i oddziaływania hydrofobowe występującymi w peptydach, są one niewystarczające do uzyskania stabilnych konformacji struktur drugorzędowych. Aby zwiększyć stabilność wprowadzane są dodatkowe modyfikacje szkieletu peptydowego, końców *N* lub *C* oraz łańcuchów bocznych. Cyklizacja peptydów jest popularną techniką modyfikacji, która obejmuje różne strategie: cyklizację od głowy do ogona, od łańcucha głównego do łańcucha bocznego oraz od łańcucha bocznego do łańcucha bocznego. Cyklizacja peptydu może znacząco zwiększyć jego stabilność proteolityczną oraz przepuszczalność komórkową [93]. Umożliwia ona również naśladowanie i stabilizację struktur drugorzędowych peptydu, takich jak pętle i zwroty. Bez cyklizacji pojedyncza sekwencja peptydowa często nie jest w stanie utworzyć takich struktur, ale cyklizacja ułatwia organizowanie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań, co sprzyja tworzeniu stabilnych konformacji drugorzędowych. Cyklizacja przyczynia się do zwiększenia stabilności proteolitycznej, przepuszczalności komórkowej oraz umożliwia stabilizację struktury drugorzędowej [94].

F.M. Veronese opisuje wprowadzenie modyfikacji PEGylacji w celu zwiększenia stabilności w osoczu i zmniejszenia immunogenności. PEGylacja ma również na celu wytworzenie peptydów większych (na ogół > 50 kDa) co jest powiązane ze

zmniejszonym wydalaniem leku przez nerki. Omawia on metody wiązania PEG z różnymi grupami funkcyjnymi w makrocząsteczkach [95]. Dodatkowo w literaturze występuje informacja, że obecność ugrupowania PEG może chronić białka przed trawieniem przez enzymy proteolityczne poprzez zwiększoną zawadę przestrzenną [96].

M. Pelay-Gimeno opisał, że w białkach, *N*-metylacja zazwyczaj dotyczy tylko modyfikacji łańcucha bocznego. Jednakże, w naturalnych peptydach nierybosomalnych, szczególnie tych pochodzenia morskiego lub grzybowego, często obserwuje się *N*-metylację szkieletu. Przykładem jest cyklosporyna A, *N*-metylowany naturalny peptyd cykliczny stosowany jako lek doustny. *N*-metylacja wpływa na właściwości strukturalne peptydów poprzez zmianę układu wiązań wodorowych i równowagę *cis-trans* wiązań amidowych, co może prowadzić do stabilizacji konformacji. Badania Kesslera i innych wykazały, że *N*-metylacja może ograniczać różnorodność konformacyjną peptydów cyklicznych, co może prowadzić do ustalenia jednej dominującej konformacji. Dodatkowo *N*-metylacja przyczynia się do zwiększonej oporności na proteazy, co w połączeniu z innymi modyfikacjami może prowadzić do powstania peptydów o wysokiej zdolności do wywoływania określonego efektu biologicznego, jak ma to miejsce w przypadku Cilengitide, kandydata na lek kliniczny [97].

Optymalizacja chemiczna peptydu może być powiązana również z innymi strategiami takimi jak [91], [98], [99]:

- delecją jednej lub kilku reszt aminokwasowych w sekwencji;
- określaniem grup funkcyjnych biorących udział w interakcji z celem molekularnym;
- wymianą wiązania amidowego między dwoma aminokwasami;
- zastępowaniem wiązania --CO--NH-- amidowego wiązaniem z udziałem:
 --O-- (depsipeptyd, --CO--O--), --S-- (tioester, --CO--S--) lub --CH_2 (ketometylen, $\text{--CO--CH}_2\text{--}$);
- blokowaniem końców *N*- lub *C*- poprzez: *N*-acylowanie, *N*-piroglutaminian, *C*-amidowanie lub dodanie łańcuchów węglowodanowych (glikozylacja: glukoza, ksylloza, heksoza itd.) w celu zwiększenia stabilności w osoczu;
- estryfikacja *N*-końca (fosfoester).

Obecnie problemem o zasięgu globalnym jest występowanie licznych gatunków mikroorganizmów opornych na dostępne na rynku antybiotyki.

Peptydy antymikrobiotyczne mogą posłużyć do walki z tym problemem. Dezintegracja błon bakterii spowodowana jest specyficznym oddziaływaniem elektrostatycznym pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami *L*-argininy oraz *L*-lizyny występującymi w sekwencji AMP a ujemnie naładowanymi błonami bakterii. Wprowadzenie modyfikacji w sekwencjach natywnych AMP poprawia ich właściwości fizykochemiczne i stabilność enzymatyczną.

5.1. Środki stabilizujące wykorzystywane do zwiększania stabilności proteolitycznej

Czynnikiem ograniczającym zastosowanie peptydów o określonym działaniu terapeutycznym jest fakt, że są łatwo metabolizowane przez proteazy osocza występujące w obwodowym układzie krążenia. Obecne badania dowodzą, że dodanie środka stabilizującego umożliwia pokonanie bariery biofarmaceutycznej związanej z niską stabilnością peptydów.

P. K. Tsai wraz ze swoją grupą badawczą udowodnili, że dodatek cukrów np. sacharozy, maltozy, glukozy lub soli fosforanu potasu, cytrynianu sodu, siarczanu amonu, a także heparyna zwiększają stabilność termiczną peptydów, powodując samoasocjację i modulując rozpuszczalność [100].

Dodatkowo naukowiec O. L. Johnson w swoich badaniach określił, że dodatek środków chelatujących, takich jak EDTA powoduje redukcję działania katalitycznego. Określił, że dostarczanie dodatkowych jonów cynku prowadzi do kompleksowania białka [101].

Peptydy wykazują dużą tendencję do samoagregacji co powoduje modyfikowanie ich właściwości wewnętrznych. Grupa profesora A. Semalty udowodniła, że niejonowe środki powierzchniowo czynne np. Pluronic F 68 zapobiegają samoagregacji. Dodatkowo określili, iż kationowe (cetrimidy) i anionowe środki powierzchniowo czynne ułatwiają wchłanianie peptydów i białek przez błony biologiczne [102].

Wśród badań pojawiła się również informacja, że dodatek obojętnych polimerów zwiększa stabilność proteolityczną. Dodatkowo rozpuszczalne polimery, są wykorzystywane ze względu na możliwość ich przyłączenia do cząsteczek białka terapeutycznego, co sprawia, że organizm przestaje rozpoznawać te cząsteczki jako obce. Wprowadzenie tych modyfikacji jest związane z utworzeniem stabilnych wiązań, które

zwiększą rozpuszczalność w wodzie oraz wydłużą okres półtrwania z zachowaniem aktywności biologicznych.

Na rynku dostępnych jest kilka biofarmaceutyków sprzężonych z polimerami wykorzystywanych do podawania dożylnego. Wykazano, że przyłączanie glikolu polietylenowego (PEG), poliwinylpirolidonu (PVP) i albuminy do preparatów peptydowych zwiększyło ich odporność na proteolizę, przez zmniejszenie immunogenność peptydu. Modyfikacja powoduje wydłużenie okresu półtrwania *in vivo* [103].

Grupa A. Semalty [104] odkryła, że jednym ze sposobów zwiększenia stabilności peptydów jest wzbogacenie składu farmaceutyku o inhibitory proteaz. Wprowadzenie inhibitora proteaz spowodowało blokowanie aktywność enzymów odpowiedzialnych za rozkład peptydów i białek. Dodatkowo wpłynęło również znacząco na stabilność i wydłużyło okres półtrwania farmaceutyków.

Zespół N. Senvicens i M. P. Marco opracował, technikę kapsułkowanie peptydów w mikro- lub nanocząsteczkę w celu ochrony leku przed rozkładem w organizmie [105]. Takie struktury oparte na nanocząsteczkach mogą stanowić barierę fizyczną, która chroni peptyd przed działaniem enzymów proteolitycznych występujących w układzie krążenia. Peptydy kapsułkowane mają zwiększoną biodostępność i charakteryzują się zwiększoną stabilnością leków w organizmie oraz łatwiejszym pokonywaniem barier błon biologicznych [106].

Innym środkiem stosowanym do stabilizacji peptydów jest wydłużanie łańcuchów bocznych aminokwasów w sekwencji natywnych peptydów antymikrobiotycznych. W 2016 roku grupa badawcza A. Lesnera opublikowała pracę dotyczącą syntezy nowego typu peptydomimetyków, zawierających reszty kwasu diaminopropionowego modyfikowane na grupie aminowej heterobiofunkcyjnymi łańcuchami glikolu polietylenowego (DAPEG). Heterobiofunkcyjne łańcuchy które zostały wówczas wykorzystane to: kwas 5-(tert-butyloksykarbonyloamino)-3-oksapentanowy (O1), kwas 8-(tert-butyloksykarbonylamino)-3,6-dioksaooktanowy (O2), kwas 5-[N-tert-butyloksykarbonyl-*N'*-(2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzofurano-5-sulfonyl)]amidinowy-3-oksopentanowy (GO1), kwas 8-[N-tert-butyloksykarbonyl-*N'*-(2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzofurano-5-sulfonyl)]amidinowy-3,6-dioksaooktanowy (GO2), kwas 5-(benzyloksykarbonylamino)-3-oksapentanowy (CbzO1), kwas 8-

(benzyloksykarbonyloamino)-3,6-dioksaoktanowy (CbzO2), kwas 5-metoksy-3-oksapentanowy (MO1), kwas 8-metoksy-3,6-dioksaoktanowy (MO2). Wprowadzenie powyższych modyfikacji obejmuje szeroki zakres interakcji między enzymami a peptydami. Ugrupowania GO1 i GO2 przypominają wydłużony łańcuch reszty argininy. MO1 i MO2 są strukturami mogącymi tworzyć oddziaływania hydrofobowe. Natomiast O1 i O2 zdolne są do tworzenia wiązań wodorowych. Ugrupowania CbzO1 i CbzO2 oddają charakter zastępowanych aromatyczny aminokwasów. Obecność funkcjonalnych łańcuchów bocznych glikolu zwiększa selektywność peptydomimetyków wobec enzymów proteolitycznych [107].

Podsumowując zastosowanie odpowiednich środków stabilizujących jest kluczowe dla zwiększenia stabilności proteolitycznej peptydów oraz białek. Dodatkowo są to modyfikacje ściśle powiązane z poprawieniem efektywności i stabilności peptydów wykorzystywanych w celach terapeutycznych.

6. Białka wiążące DNA

Białka wiążące DNA (ang. DNA binding proteins, DBP) regulują ekspresję genów, replikację, transkrypcję oraz procesy naprawcze związane z DNA komórkowym. Posiadają one zdolność do łączenia się z konkretnymi sekwencjami nukleotydów w DNA, co umożliwia pełnienie wyżej wymienionych funkcji [108]. Białka te możemy podzielić na klasy, z których każda ma unikalną strukturę i funkcję. Specyficzne białka wiążące sekwencje (ang. transcription factors, TFs) łączą się z określonymi sekwencjami DNA, tzw. motywami regulatorowymi, w regionach promotorowych genów i wpływają na aktywność transkrypcji (np. czynniki transkrypcyjne, które kontrolują transkrypcję genów aktywując ją lub hamując). Niespecyficzne białka wiążące sekwencje (ang. non-specific sequence binding proteins, NDBPs) nie posiadają określonych sekwencji, z którymi się łączą, ich rolą jest utrzymanie integralności strukturalnej DNA prowadząc do kondensacji lub dekondensacji (np. histony, które owijają wokół siebie DNA tworząc nukleosomy a następnie chromatynę) [109]. Inną klasą są helikazy, które biorą udział w rozplataniu podwójnej helisy DNA, co jest niezbędne podczas replikacji DNA oraz procesów naprawczych [110]. Białka wiążące kohezyny są odpowiedzialne za wiązanie dwóch nici DNA zapewniając utrzymanie struktury chromatyny [111]. Białka wiążące krzyżowo, tworzą wiązanie między różnymi fragmentami DNA lub pomiędzy DNA a inną strukturą co wspomaga interakcję między chromatynowe [112]. Ostatnia klasa to

białka naprawcze DNA, które są zaangażowane w procesy naprawy uszkodzeń DNA, rozpoznają uszkodzenia DNA i naprawiają je, aby utrzymać integralność genomu. Białka wiążące DNA są niezwykle zróżnicowaną klasą białek, które odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych. Są one zaangażowane w regulację struktury, funkcji i ekspresji genomu. Wyżej wymienione klasy są tylko niektórymi przykładami białek wiążących DNA [108].

6.1. Funkcje białek wiążących DNA i RNA

Białka wiążące DNA i RNA (ang. double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein, DRBP) wykorzystują swoją strukturę do pełnienia różnych funkcji poprzez działanie na pojedyncze geny. Takie białka regulują procesy komórek, w tym transkrypcję, translację, wyciszanie genów, biogenezę mikroRNA. Białka wiążące RNA kiedyś były uważane za funkcjonalnie odrębne od białek wiążących DNA i badano je niezależnie.

Główne funkcje biologiczne DRBP:

- Regulacja transkrypcji;
- Przetwarzanie mRNA;
- Regulacja telomerów z wykorzystaniem telomerazy;
- Regulacja cyklu komórkowego;
- Regulacja replikacji DNA;
- Stymulacja apoptozy;
- Odpowiedź na czynniki temperaturowe;
- Odpowiedź na metylację DNA wirusa;
- Odpowiedź na promieniowanie jonizujące.

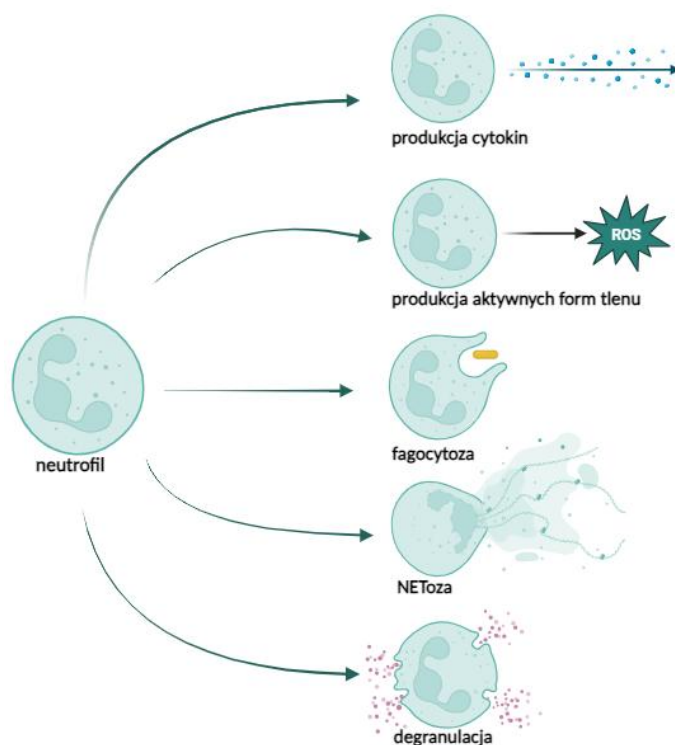
Ostatecznie funkcje DRBP są regulowane przez ich wrodzoną strukturę i biochemię [113].

7. NETs

Zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (ang. neutrophil extracellular traps, NETs) to nici zdekondensowanego DNA w kompleksie z histonami i białkami granulek neutrofilii. Po raz pierwszy zostały opisane w 2004 roku przez grupę badawczą V. Brinkmanna [114]. NETs powstają *in vitro* po stymulacji izolowanych neutrofilii lipopolisacharydem (LPS) będącym składnikiem bakterii Gram-ujemnych lub 12-mirystynian-13-octan forbolu (PMA). Struktury te powstają podczas zapalenia i infekcji *in vivo* [115].

7.1. Struktura oraz tworzenie NETs

Neutrofile stanowią pierwszą linię obrony gospodarza przed mikroorganizmami. Rozwijają się w szpiku kostnym z komórek progenitorowych granulocytów i monocytów (ang. granulocyte and monocyte progenitor, GMP), z których powstają również monocyty, komórki dendrytyczne i inne granulocyty. Dodatkowo wykorzystując fagocytozę działają przeciwdrobnoustrojowo i zabijają mikroorganizmy przez działanie reaktywnych form tlenu lub peptydów w postaci granulek przeciwdrobnoustrojowych [116]. Neutrofile wykorzystują różne mechanizmy do walki z infekcjami (Rys. 7) [117].

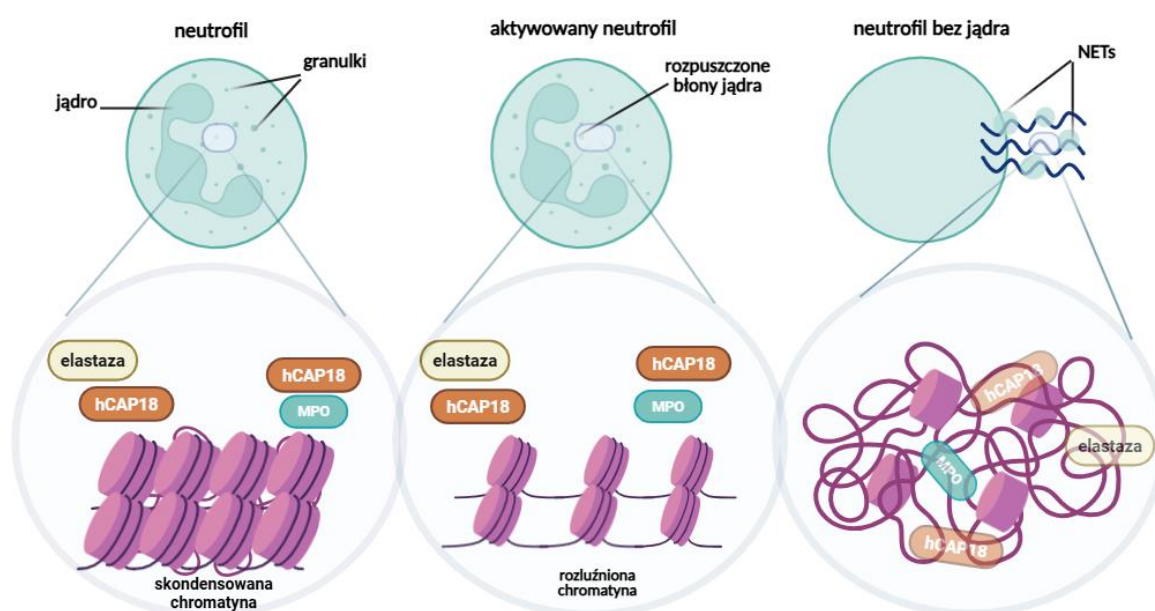


Rysunek 7. Mechanizmy obronne neutrofilii, rysunek wykonany w oparciu o źródło [73].

Dotychczas zidentyfikowano trzy mechanizmy tworzenia sieci NETs:

- 1) Obecność chromatyny jądrowej a następnie jej dekondensacja, uwolnienie NET, pęknięcie błony i śmierć komórki (rysunek 7);
- 2) Po uwolnieniu NET, neutrofil pozostaje nienaruszony i fagocytarny;
- 3) W mitochondrialnym DNA, które wyzwała tworzenie NET z mitochondriów DNA zamiast z DNA jądrowego [118].

Szczegółowo chciałabym się skupić na jednym z wyżej wymienionych mechanizmów programowanej śmierci tzw. NETosis. Jest to funkcja, która warunkuje zdolności neutrofilów do obrony immunologicznej nawet po śmierci. Neutrofile są komórkami aktywnymi transkrypcyjnie, w większości ich DNA jest skondensowane w heterochromatynie w jądrze. DNA jest wówczas owinięte wokół histonów tworząc w ten sposób nukleosomy a następnie chromatynę. W dekondensacji heterochromatyny pośredniczy deiminaza peptydyloargininowa 4 (PAD4), która katalizuje konwersję reszt arginin występujących w białkach histonowych do reszt cytrulin, zmniejszając ładunek dodatni i tym samym osłabiając wiązanie histonów z DNA. W związku z osłabionym oddziaływaniem następuje rozpakowanie nukleosomów i utworzenie sieci zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (Rys. 8) [115].



Rysunek 8. Proces formowania NETs, rysunek wykonany w oparciu o źródło [71],
MPO-mieloperoksydaza, hCAP18- nieaktywna forma ludzkiej katelicydyny.

7.2. Czynniki wpływające na tworzenie NETs

Zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe są bardzo ważnym elementem obrony organizmu przed zakażeniami. W normalnych warunkach neutrofile są odpowiedzialne za fagocytozę czyli pochłanianie i trawienie drobnoustrojów. W odpowiedzi na poniżej wymienione czynniki zaczynają one formować NETs, które posiadają zdolność walki z patogenami.

Czynniki wpływające na wytwarzanie NETs:

- Infekcje grzybicze:
 - *Candida albicans*
 - *Cryptococcus gattii*
 - *Cryptococcus neoformans*
- Infekcje bakteryjne:
 - *Enterococcus faecalis*
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus dysgalactiae*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Streptococcus pyogenes*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Enterococcus faecalis*
- Infekcje wirusowe:
 - wirus grypy Influenza A
 - wirus niedoboru odporności typu 1 (HIV-1)
- Infekcje pasożytnicze:
 - *Leishmania amazonensis*
 - *Leishmania donovani*
- Stany zapalne
- Obecność składników układu immunologicznego
- Mechaniczne uszkodzenie tkanek
- Autoimmunologiczne choroby
- 12-mirystynian-13-octan forbolu (PMA)
- Lipopolisacharyd (LPS) [119], [120].

Proces ten jest nadal badany przez wielu naukowców, ponieważ jest to bezpośredni obszar związany z walką z chorobami autoimmunologicznymi.

8. Neutrofile

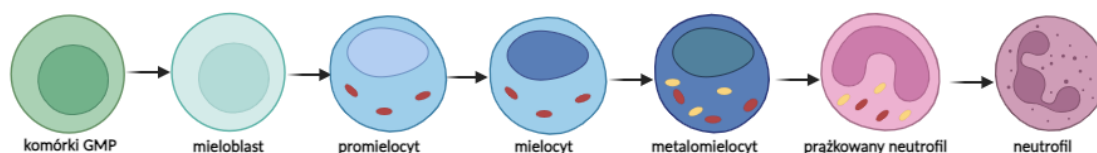
Ludzkie neutrofile polimorfojądrowe są głównym składnikiem pierwszej linii obrony wrodzonego układu odpornościowego, stanowią 35-75 % całkowitej liczby leukocytów. Jest to najliczniejsza grupa białych krwinek występujących u ssaków [121]. Są one klasyfikowane jako granulocyty ze względu na zawartość wewnątrzcytoplazmatycznych granulek. Neutrofile rozwijają się z progenitorowych granulocytów i monocytów (GMP) w szpiku kostnym gdzie są różnicowane a następnie uwalniane do krwioobiegu. Ich okres półtrwania w układzie krążenia jest rzędu kilku godzin, po czym migrują do tkanek gdzie żyją kilka dni. Odgrywają one kluczową rolę we wrodzonej obronie immunologicznej przed inwazją patogenów i należą do głównych mediatorów odpowiedzi zapalnej. W ostrej fazie zapalenia pierwszymi komórkami zapalnymi, które opuszczają układ krążenia są neutrofile. Migrują one w kierunku miejsc zapalenia, po gradiencie bodźców zapalnych. Są odpowiedzialne za krótkotrwałą fagocytozę w początkowych stadiach infekcji [77], [121], [122].

8.1. Budowa neutrofili

Neutrofile są strukturami okrągłymi o średnicy 12-15 μm , występujące u ludzi mają średnio 8 μm . Dopiero po aktywacji przyjmują kształt „ameby”, co jest związane z wykształceniem pseudopodiów, które wykorzystują do ataku patogenów. Komórki te są najmniejszymi z granulocytów, posiadają charakterystyczne jądro zbudowane z 3-5 płatów, co jest uzależnione od czasu ich przebywania w układzie krążenia. W miarę dojrzewania neutrofili ich jąderko zanika w strukturze w pełni wykształconych komórek. W cytoplazmie neutrofili występują liczne azurofilne granulki, które posiadają działanie bakteriobójcze oraz ziarnistości wtórne zawierające lizozymy oraz inne enzymy.

W procesie granulocytopoezy następuje stopniowy rozwój neutrofili z komórek progenitorowych (Rys. 9). Podczas dojrzewania w szpiku kostnym można podzielić granulki na następujące trzy kategorie: granulki azurofilowe (pierwotne), specyficzne (wtórne) granulki i granulki żelatynazy (trzeciorzędowe).

Przykładami azurofilowych białek ziarnistych są mieloperoksydaza, elastaza neutrofilowa oraz katepsyna G. Do specyficznych ziarnistych białek można zaliczyć laktoferynę. Do ziarnistości żelatynazy zaliczamy metaloproteinazę macierzy 9 [123].



Rysunek 9. Formowanie neutrofilów na drodze procesu granulocytopoezy, rysunek wykonany w oparciu o źródło [112].

8.2. Funkcje ludzkich neutrofilów

Jak już wcześniej wspomniałam jest to najliczniejsza grupa wśród granulocytów. Neutrofile są pierwszą linią obrony więc jako pierwsze mają kontakt z infekcją. Są one wyspecjalizowane w pochłanianiu i trawieniu bakterii, wirusów oraz innych drobnoustrojów na drodze fagocytozy. Komórki te wydzielają szereg białek, które pełnią rolę przeciwdrobnoustrojową. Podczas walki z infekcją dochodzi do ich degradacji, ze względu na krótką żywotność. Poziom neutrofilów jest regulowany w sposób ciągły, ponieważ są one stale produkowane w szpiku kostnym. Dodatkowo są zaangażowane w gojenie ran ze względu na udział w procesach naprawczych tkanek. Produkują cytokiny oraz mediatory zapalne dzięki czemu regulują procesy zapalne w organizmie. Neutrofile są zdolne do komunikowania się z innymi komórkami układu odpornościowego np. z limfocytami T co umożliwia wzmocnienie reakcji układu odpornościowego na patogen. Ostatnią ich funkcją jest czynny udział w tworzeniu zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych [77].

8.3. Metody aktywacji neutrofilów

Aktywacja neutrofilów może odbywać się różnymi metodami i przebiegać w miejscu zapalnym jako proces wieloetapowy. Rozpoczyna się w momencie przechodzenia przez śródbłonek naczyń krwionośnych. Po wnikięciu do tkanki zapalnej neutrofile ulegają pełnej aktywacji w wyniku kontaktu z bodźcami prozapalnymi. Poniżej przedstawiam metody aktywacji neutrofilów:

- Kontakt bodźca z receptorami neutrofilów różnych czynników tj. cytokiny, chemokiny, lipopolisacharyd, immunoglobuliny, czynniki chemotaktyczne np. interleukina-8 IL-8;

- Obecność reaktywnych form tlenu (ROS) o właściwościach bakteriobójczych;
- Proces degranulacji polegający na uwalnianiu substancji np. lizozymu, defensyn w celu walki z patogenami;
- Tworzenie struktur zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych;
- Aktywacja szlaków sygnałowych [123].

Połączenie tych metody umożliwia skuteczną walkę neutrofili z patogenami. Niekontrolowana aktywacja tych komórek może być podstawą patogenezы przewlekłego stanu zapalnego [124].

Linia komórkowa HL-60 jest często wykorzystywana jako model neutrofili, ponieważ posiada wspólne cechy z neutrofilami np. morfologię limfoblastyczną. Fenotypowo przypominają komórki w stadium promielocytów i mieloblastów. Na drodze różnicowania z wykorzystaniem dimetylosulfotlenku (DMSO) lub dimetyloformamid (DMF) można je upodobnić do neutrofilii, monocytów lub makrofagów [125]. W innych badaniach jako materiał służą neutrofile wyizolowane z krwi ludzkiej lub zwierzęcej. Niestety posiadają one ograniczoną żywotność i są bardzo wrażliwe. Najnowsze doniesienia informują o urządzeniu mikroprzepływowym, które naśladuje mikrośrodowisko neutrofili w tkankach lub naczyniach krwionośnych. Tradycyjna hodowla komórkowa odbywa się na płaskich powierzchniach co nie jest odzwierciedleniem środowiska naturalnego. W związku z tym obecnie badania na liniach komórkowych są prowadzone na modelach 3D np. sferoidach.

8.4. Modele naśladujące komórki neutrofili

Neutrofile, będące podtypem leukocytów, należą do najliczniejszej grupy komórek odpornościowych obecnych we krwi. Rozwijają się w szpiku kostnym z komórek progenitorowych granulocytów i monocytów (GMP) na drodze procesu granulopoezy. Komórki te charakteryzują się, krótką długością życia, co przyczyniło się do rozwoju procesu izolacji komórek z krwi obwodowej. Charakterystyczną cechą neutrofilii jest również ich segmentowane jądro oraz obecność granulek w cytoplazmie.

Neutrofile odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, co jest ściśle związane z ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Trudnością w pracy z neutrofilami jest ich, krótki okres życia. Obecnie naukowcy wykorzystują do badań linię komórkową białaczki HL-60 oraz linię PLB-985 (subklon HL-60) jako model *in vitro*. Naukowcy dowiedli, że komórki PLB-985 oraz HL-60 zróżnicowane

dimetyloformamidem dostatecznie odwzorowują modele komórkowe neutrofilii [126]. W 1958 roku linię komórkową PLB-985 opisano jako odrębną linię uzyskaną od pacjenta z ostrą białaczką szpikową [127]. W 2003 roku Drexler i współpracownicy dowiedli, że jest to linia będąca subklonem linii komórkowej HL-60. Niestety nie jest jednoznacznie określony stopień podobieństwa ekspresji genów w zróżnicowanych komórkach do pierwotnych neutrofilii [128].

Grupa S.R. Collinsa porównała skuteczność różnych protokołów różnicowania komórek HL-60 i PLB-985 substancjami takimi jak DMF i DMSO dostępnych wówczas w literaturze. Potwierdzili, że protokół różnicowania z wykorzystaniem DMSO dla linii komórkowej HL-60 i PLB-985 zapewnia najlepszą ekspresję markerów różnicowania oraz przeżywalność komórek w porównaniu do innych substancji. Opisali również że, zastosowanie pożywki z suplementacją NutridomaTMCS (zamiast FBS) i dodatkiem DMSO skutkowało zwiększoną odpowiedzią chemotaktyczną, aktywnością fagocytarną oraz ekspresją markerów neutrofilów FPR1 oraz CD11b na powierzchni komórek. Wykonana analiza sekwencjonowania RNA komórek przed i po zróżnicowaniu wykazała, że różnicowanie znacząco zwiększa podobieństwo ekspresji genów pomiędzy liniami komórkowymi a pierwotnymi neutrofilami. Badacze stworzyli publicznie dostępną bazę danych dotyczącą ekspresji genów, którą można przeszukiwać według nazwy genu i zawartości domeny białkowej, umożliwiając użytkownikom porównywanie ekspresji genów w HL-60, PLB-985 oraz pierwotnych neutrofilach ludzkich i mysich [129].

W 2018 roku naukowcy z grupy A. Manda-Hyndzlik rozpoczęli poszukiwanie związku najskuteczniej różnicującego komórki białaczki promielocytowej (HL-60) w kierunku komórek granulocytopodobnych zdolnych do uwalniania NETs. Badacze sprawdzali działanie kwasu all-trans retinowego (ATRA), sulfotlenku dimetylu (DMSO) oraz dimetyloformamidem (DMF). Następnie stymulowano komórki wykorzystując 12-mirystynian 13-octan forbolu (PMA) lub jonofor wapnia A23187 (Cl). Kwas ATRA najskuteczniej różnicował komórki HL-60 w komórki podobne do granulocytów. Komórki zróżnicowane za pomocą ATRA uwalniały NETs tylko po stymulacji PMA. Komórki zróżnicowane za pomocą DMSO reagowały na wzrost stężenia Ca^{2+} , co było bezpośrednio związane z procesem uwalniania NETs. Natomiast komórki zróżnicowane za pomocą DMF uwalniały NETs w odpowiedzi na oba bodźce. Wszystkie zróżnicowane komórki wykazywały wybuch oksydacyjny po stymulacji PMA. Jednak tylko komórki zróżnicowane za pomocą DMF reagowały na jonofor wapniowy i obserwowany był

wybuch oksydacyjny. Zwiększoną cytrulinację histonów zaobserwowano w stymulowanych komórkach zróżnicowanych za pomocą DMSO i DMF, ale nie w komórkach zróżnicowanych za pomocą ATRA. Komórki zróżnicowane za pomocą DMF intensywnie tworzyły autofagosomy po stymulacji PMA. Komórki zróżnicowane za pomocą ATRA miały wyższy indeks fagocytarny w porównaniu do komórek kontrolnych.

Badania podkreślają, że czynniki różnicujące znacząco wpływają na odpowiedzi funkcjonalne komórek HL-60, szczególnie na ich zdolność do uwalniania NETs, co jest istotne dla badań nad funkcjami neutrofili i związanymi z nimi chorobami [130].

CEL PRACY

Głównym celem rozprawy doktorskiej była synteza nowych analogów ludzkiej katelicydyny LL-37 o zwiększonej stabilności enzymatycznej. Proteazy, kalikreiny i deiminazy argininowe to enzymy biorące udział w degradacji proteolitycznej lub deiminacji reszt argininy, które są kluczowe dla aktywności biologicznej LL-37. Ludzka katelicydyna bierze udział w stymulacji układu odpornościowego. W celu otrzymania stabilniejszych analogów LL-37, wybrane reszty aminokwasowe (Arg, Lys, Ile, Phe) zastąpiłam blokami budulcowymi DAPEG, czyli resztami kwasu L-2,3-diaminopropionowego modyfikowanego sfunkcjonalizowanymi oksakwasami. W trakcie syntezy wprowadzałam następujące bloki konstrukcyjne: Dap(O1), Dap(O2) jako mimetykami Lys; Dap(GO1), Dap(GO2) naśladujące reszty Arg; Dap(MO1) i Dap(MO2) zastąpiły alifatyczny łańcuch boczny Ile; Dap(Z-O1), Dap(Z-O2) zastosowałam w przypadku reszt Phe [107].

Związek 1a

LLGDFFDap(GO1)SKEKIGKEFKDap(GO1)IVQDap(GO1)IKDFLDap(GO1)NLVP Dap(GO1)TES

Związek 1b

LLGDFFDap(GO2)SKEKIGKEFKDap(GO2)IVQDap(GO2)IKDFLDap(GO2)NLVP Dap(GO2)TES

Związek 2a

LLGDFFRDap(O1)SDap(O1)EDap(O1)IGDap(O1)EFDap(O1)RIVQRIDap(O1)DFLRNLVPRTES

Związek 2b

LLGDFFRDap(O2)SDap(O2)EDap(O2)IGDap(O2)EFDap(O2)RIVQRIDap(O2)DFLRNLVPRTES

Związek 3a

LLGDFFRKSKEKDap(MO1)GKEFKRDap(MO1)VQRDap(MO1)KDFLRNLVPRTES

Związek 3b

LLGDFFRKSKEKDap(MO2)GKEFKRDap(MO2)VQRDap(MO2)KDFLRNLVPRTES

Związek 4a

LLGDZDap(Z-O1)Dap(Z-O1)RKSKEKIGKEDap(Z-O1)KRIVQRIKDDap(Z-O1) LRNLVPRTES

Związek 4b

LLGDZDap(Z-O2)Dap(Z-O2)RKSKEKIGKEDap(Z-O2)KRIVQRIKDDap(Z-O2) LRNLVPRTES

1. Wpływ wprowadzonych modyfikacji na strukturę drugorzędową

Ludzka katelicydyna LL-37 charakteryzuje się zdefiniowaną strukturą drugorzędową (α -helisa), która jest ściśle związana z jej aktywnością oraz zależna od pH i stężenia. W tym etapie celem było określenie struktur drugorzędowych zsintetyzowanych analogów za pomocą techniki dichroizmu kołowego.

2. Ocena oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami a DNA

Natywna katelicydyna ze względu na swój dodatni ładunek wypadkowy posiada zdolność do wiązania DNA w stężeniach mikromolarnych. W celu określenia oddziaływania otrzymanych peptydomimetyków z DNA wykorzystałam techniki MST, elektroforezę agarozową oraz poliakrylamidową. Dodatkowo do zwizualizowania tworzonych kompleksów użyłam techniki AFM.

3. Określenie stabilności enzymatycznej

Jedną z głównych wad LL-37 jest stosunkowo krótki czas utrzymywania się peptydu w organizmie, szacowany na kilka godzin. Nowe, bardziej stabilne enzymatycznie analogi LL-37 mogłyby wydłużyć ten czas, co czyni takie związki potencjalnymi nowymi środkami terapeutycznymi. W celu określenia odporności na degradację enzymatyczną otrzymane analogi poddałam działaniu proteinazy 3. Dodatkowo analogi ze zmodyfikowanymi resztami argininy [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37, zostały przeanalizowane pod kątem podatności na działanie PAD2 i PAD4.

4. Wpływ peptydomimetyków na cytotoksyczność wobec linii komórkowych

Katelicydyna (LL-37) stanowi jeden ze składników odpowiedzi immunologicznej człowieka zaangażowanym w bezpośrednią i pośrednią walkę z mikroorganizmami. Wykazuje szerokie działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz immunomodulacyjne. Otrzymane peptydomimetyki poddałam ocenie cytotoksyczności wobec linii komórkowych: HDFa, CRL-1472, HB2, HL-60 oraz HL-60 zróżnicowanych w hodowlach *in vitro* w celu określenia potencjału terapeutycznego oraz stopnia toksyczności wobec badanych komórek.

5. Określenie wpływu analogów LL-37 na komórki odpornościowe

Ludzka katelicydyna pełni w organizmie działanie chemotaktyczne co oznacza, że powoduje wzrost stężenia komórek odpornościowych w miejscu infekcji, stanu zapalnego lub uszkodzonej tkanki. Jest to ważny mechanizm w obronie organizmu ze względu na swoją dynamikę. LL-37 w kompleksie z DNA stymuluje ludzki układ odpornościowy poprzez uwalnianie cytokin i proteaz. Celem tego projektu było opracowanie związków, które będą kompleksować DNA i efektywnie modulować komórki układu odpornościowego.

METODY PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

1. Chemiczna synteza peptydomimetyków

Analogi ludzkiej katelicydyny syntetyzowałam na nośniku stałym z wykorzystaniem metody chemii Fmoc/tBu. Do syntezy użyłam żywicy kwasową Tenta Gel SAC z osadzoną resztą seryny. Osadzenie żywicy wynosiło 0,24 mmola/g a wielkość ziaren wynosiła 90 µm (Iris Biotech GMBH).

1.1. Automatyczna synteza mikrofalowa

Syntezę łańcucha głównego peptydomimetyków prowadziłam korzystając z automatycznego synteзаторa mikrofalowego LibertyBlue firmy CEM (Matthews). Syntezę każdego analogu wykonałam wykorzystując 0,417 g żywicy (skala 0,1 mmola). W trakcie syntezy użyłam następujące reagenty:

- rozpuszczalnik DMF
- 20 % piperydina w DMF
- pochodne aminokwasowe o stężeniu 0,2 M w DMF
- aktywator 0,5 M DIC w DMF
- zasada 1,0 M Oxyma w DMF.

Tabela 2 przedstawia szczegółowe warunki syntezy mikrofalowej.

Tabela 2. Reagenty oraz ich objętości stosowane podczas automatycznej syntezy mikrofalowej.

<i>Objętość naczynia reakcyjnego</i>	<i>30 mL</i>
<i>Objętość 20 % piperydyny</i>	4 mL
<i>Czas trwania deprotekcji</i>	65 sekund
<i>Temperatura deprotekcji</i>	90 °C
<i>Plukanie po deprotekcji</i>	4 × 4 mL
<i>Objętość roztworu aminokwasów (DMF)</i>	2,5 mL
<i>Objętość aktywatora (DIC)</i>	1 mL
<i>Objętość zasady (Oxyma)</i>	0,5 mL
<i>Czas trwania sprzęgania</i>	165 sekund
<i>Temperatura sprzęgania</i>	90 °C
<i>Plukanie po sprzęganiu</i>	4 × 4 mL

Syntezy związków z wymienioną resztą argininy wykonałam w ramach pracy magisterskiej pod tytułem: „Synteza katelicydyny (LL 37) oraz jej analogów o zwiększonej stabilności proteolitycznej”, której promotorem była dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG. Natomiast pozostałe związki wymienione poniżej zsyntetyzowałam w ramach wykonywania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Sekwencja natywnego LL-37:

LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES

(związek 1) Modyfikacja reszt Arg w pozycjach ^{7,19, 23, 29, 34}

LLGDFFR^{R7}KSKEKIGKEFK^{R19}IVQR^{R23}IKDFLR^{R29}NLVPR^{R34}TES

LLGDFFDap(*iv*Dde)SKEKIGKEFKDap(*iv*Dde)IVQDap(*iv*Dde)IKDFLDap(*iv*Dde)NLVP
Dap(*iv*Dde)TES

(związek 2) Modyfikacja reszt Lys w pozycjach ^{8, 10, 12, 15, 18, 25}

LLGDFFR^{K8}S^{K10}E^{K12}IG^{K15}EF^{K18}RIVQR^{K25}DFLRNLVPRTES

LLGDFFRDap(*iv*Dde)SDap(*iv*Dde)EDap(*iv*Dde)IGDap(*iv*Dde)EFDap(*iv*Dde)RIVQRI
Dap(*iv*Dde)DFLRNLVPRTES

(związek 3) Modyfikacja reszt Ile w pozycjach ^{13, 20, 24}

LLGDFFRKSKEK^{I13}GKEFKR^{I20}VQR^{I24}KDFLRNLVPRTES

LLGDFFRKSKEKDap(*iv*Dde)GKEFKRDap(*iv*Dde)VQRDap(*iv*Dde)KDFLRNLVPRTES

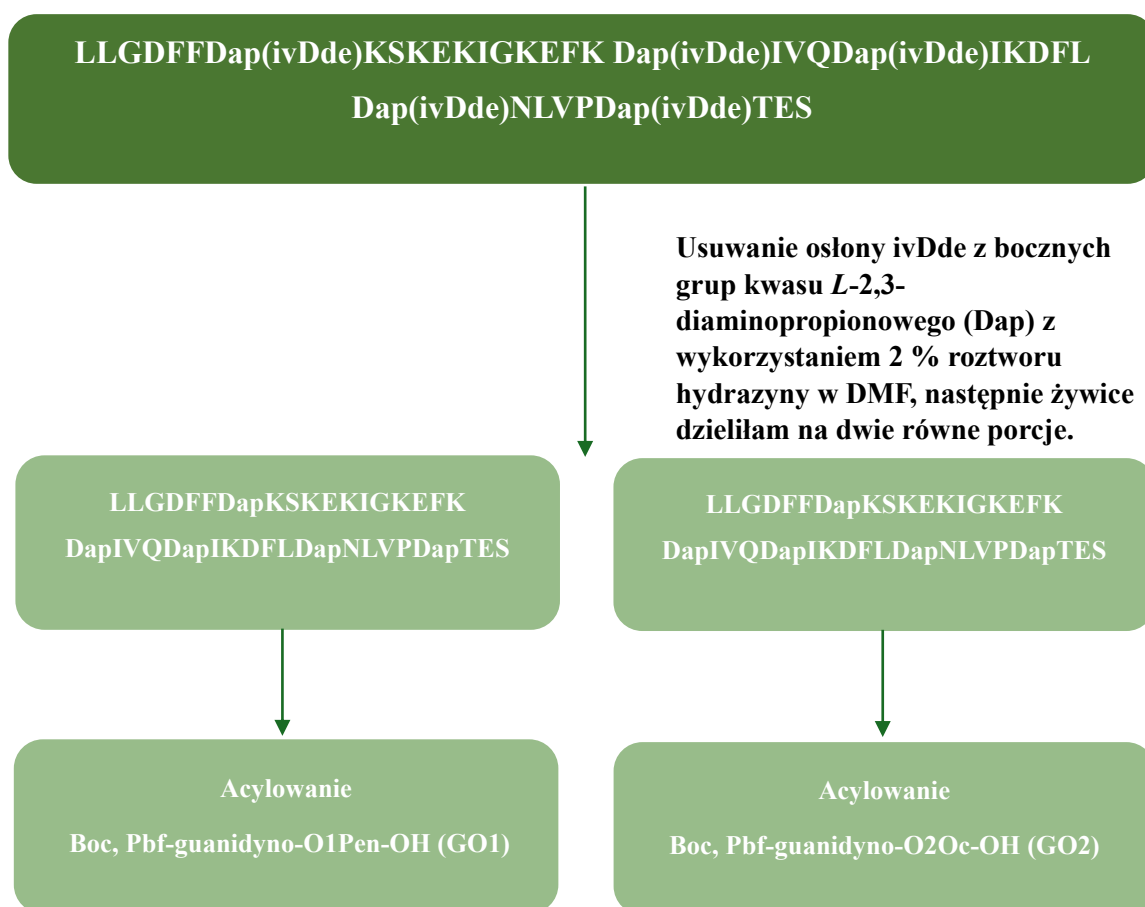
(związek 4) Modyfikacja reszt Phe w pozycjach ^{5, 6, 17, 27}

LLGD^{F5}F^{F6}RKSKEKIGKE^{F17}KRIVQRIKD^{F27}LRNLVPRTES

LLGDDap(*iv*Dde)Dap(*iv*Dde)RKSKEKIGKEDap(*iv*Dde)KRIVQRIKDDap(*iv*Dde)LRNLVPRT
ES

1.2. Synteza manualna

Każdą z peptydydożywiec otrzymanych w pierwszym etapie (1.1. Automatyczna synteza mikrofalowa) dzieliłam na dwie części a następnie prowadziłam syntezę w strzykawkach polipropylenowych zakończonych spiekami szklanymi. Schemat przedstawiony poniżej przedstawia etapy syntezy peptydomimetyku zawierającego modyfikacje reszt Arg w pozycjach ^{7,19, 23, 29, 34} (Rys. 10). Wszystkie pozostałe związki były syntetyzowane analogicznie do opisanej procedury. W celu uproszczenia na schemacie przedstawiłam tylko usuwane w tym etapie osłony łańcuchów bocznych.



Rysunek 10. Schemat procesu syntezy chemicznej.

1.2.1. Test chloranilowy i test Kaisera

W celu określenia skuteczności prowadzonych manualnie procesów acylowania lub deprotekcji przeprowadzałam dwa rodzaje testów, których składy prezentuję w tabeli 3.

- a) Test chloranilowy, który służy do wykrywania obecności wolnych grup aminowych w peptydach. Chloranil bierze udział w reakcji z wolną grupą aminową zmieniając zabarwienie. Pozytywny wynik testu obserwujemy w postaci zielonych ziaren co wskazuje na obecność wolnych grup aminowych. Jeśli test jest wykonywany po deprotekcji pozytywny wynik testu świadczy o tym, że można przystąpić do acylowania kolejnej reszty lub zakończyć syntezę. W przypadku testu wykonywanego w trakcie acylowania pozytywny wynik sugeruje, że należy powtórzyć reakcję.
- b) Test Kaisera nazywany również testem ninhydrynowym, także wykorzystuje się do wykrywania obecności wolnych pierwszorzędowych grup aminowych. Ninhydryna obecna w teście reaguje z wolną grupą aminową dając granatowe zabarwienie ziaren żywicy. Natomiast jeśli grupa aminowa jest zablokowana ziarna pozostają bezbarwne.

Tabela 3. Skład testów monitorujących proces syntezy.

TEST CHLORANILOWY	TEST KAISERA		
Roztwór chloranilu w toluenie	50 µL	6 % ninhydryna w etanolu	50 µL
Acetaldehyd	100 µL	80 % fenol w etanolu	50 µL
		1 mM cyjanek potasu	50 µL
		w wodzie	
7 minut, 25 °C		10 minut, 100 °C	

1.2.2. Usuwanie osłon ivDde

Po zakończeniu syntez z wykorzystaniem syntezyatora, umieściłam peptydydożywicę w strzykawkach polipropylenowych i przystąpiłam do usunięcia osłony ivDde z łańcuchów bocznych kwasu L-2,3-diaminopropionowego stosując 2 % roztwór uwodnionej hydrazyny w DMF. Etap usuwania trwał 15 minut z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej (Laboratory shaker type 358A, Elpin Plus), czynności tę powtórzyłam sześciokrotnie. Po usunięciu osłon ivDde, zawartość strzykawek

przemywałam według następującego cyklu płukań: 3 × 2 min DMF, 3 × 2 min izopropanol, 3 × 2 min DCM a następnie wykonałam test chloranilowy oraz test Kaisera.

1.2.3. Usuwanie soli DCHA z pochodnych aminokwasowych

Pochodne Boc-O1Pen-OH×DCHA i Boc-O2Oc-OH×DCHA, które w kolejnych etapach wykorzystałam do dalszych modyfikacji zaprojektowanych analogów LL-37 posiadały grupę α-COOH w postaci soli dicykloheksyloamoniowej (DCHA). Usuwanie soli DCHA wykonałam w następujących etapach:

1. Naważyłam 1 gram pochodnej i rozpuściłam w 50 mL schłodzonego octanu etylu.
2. Następnie dodałam 10 mL schłodzonego 10 % H₃PO₄,
3. Całość umieściłam na mieszadle magnetycznym do całkowitego rozpuszczenia.
Po chwili zaobserwowałam pojawienie się dwóch oddzielnych warstw w kolbie.
4. Mieszaninę przenieśliśmy do rozdzielacza, usunęłam warstwę wodną.
5. Do warstwy organicznej dodałam 120 mL 10 % H₃PO₄.
6. W kolejnym kroku warstwę organiczną przemyłam 3-krotnie 120 mL solanki.
7. Warstwę organiczną zagęściłam z wykorzystaniem rotatora.

Otrzymane pochodne Boc-O1Pen-OH oraz Boc-O2Oc-OH poddałam analizie MS MALDI-TOF a następnie wykorzystałam do modyfikacji peptydomimetyków.

1.2.4. Przyłączanie pochodnych do łańcuchów bocznych związku

Po usunięciu osłon *ivDde* z grup aminowych łańcuchów bocznych reszt kwasu L-2,3-diaaminopropionowego rozpoczęłam przyłączania do nich poniższych pochodnych (Rys. 11):

Analogi z modyfikacją reszt aminokwasowych Lys^{8,10,12,15,18,25}:

- Boc-O1Pen-OH, kwas 5-amino-3-oksapentanowy (O1),
analog: [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37,
- Boc-O2Oc-OH kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy (O2),
analog: [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37,

Analogi z modyfikacją reszt aminokwasowych Arg^{7,19,23,29,34} :

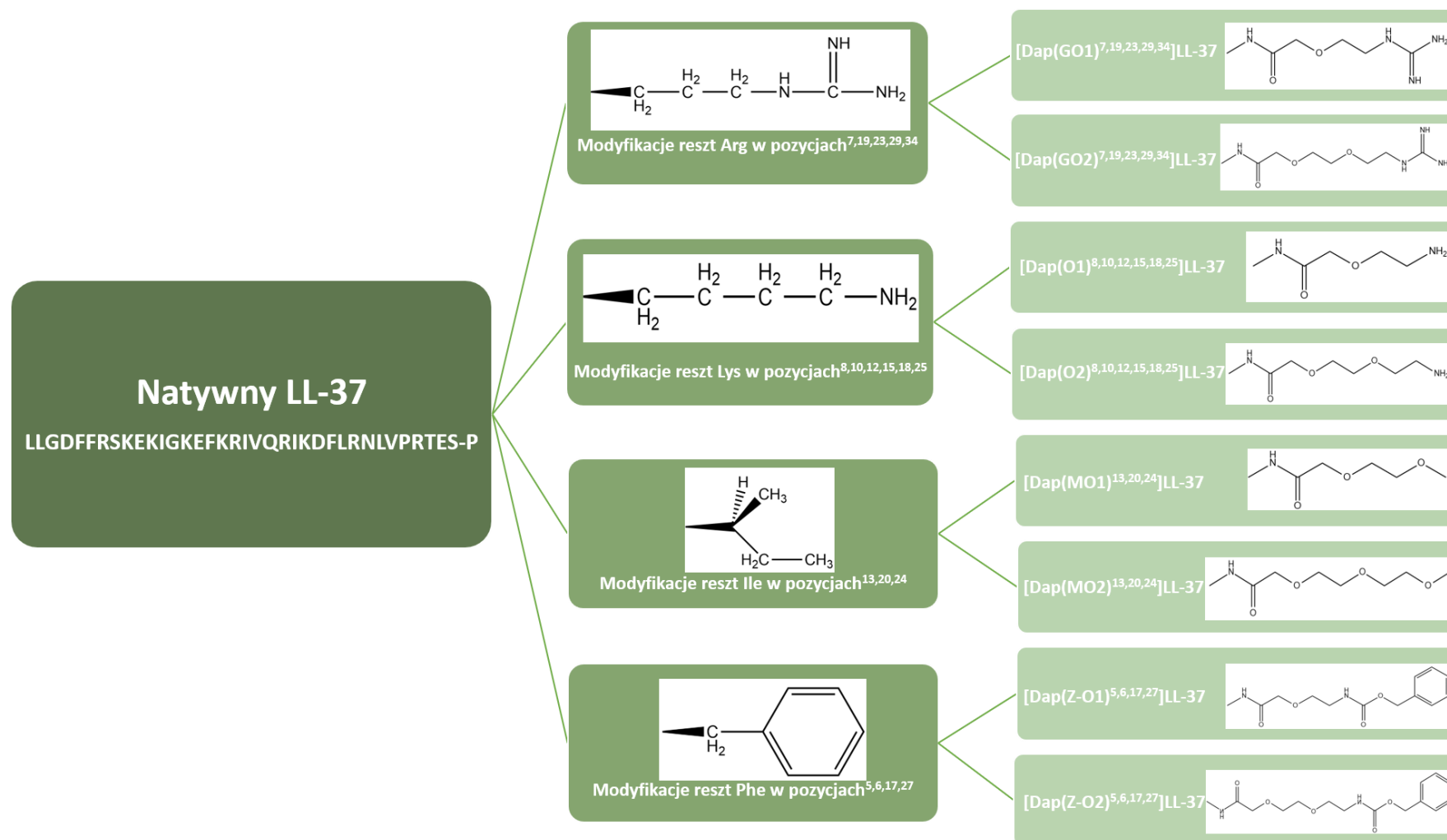
- Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH, kwas 5-guanidyno-3-oksapentanowy (GO1), analog: [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37,
- Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH, kwas 8-guanidyno-3,6-dioksaoktanowy (GO2), analog: [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37,

Analogi z modyfikacją reszt aminokwasowych Phe^{5,6,17,27}:

- Z-O1Pen-OH kwas 5-amino-3-oksapentanowy (Z-O1), analog: [Dap(Z-O1)^{5,6,17,27}]LL-37,
- Z-O2Oc-OH kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy (Z-O2), analog: [Dap(Z-O2)^{5,6,17,27}]LL-37,

Analogi z modyfikacją reszt aminokwasowych Ile^{13,20,24}:

- kwas 5-metoksy-3-oksapentanowy (MO1), analog: [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37,
- kwas 8-metoksy-3,6-dioksaoktanowy (MO2), analog: [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37



Rysunek 11. Schemat wprowadzanych modyfikacji

Podczas syntezy manualnej wykorzystałam mieszaniny acylujące wskazane w tabeli 4.

Tabela 4. Warunki przyłączania pochodnych.

WARUNKI REAKCJI	ZWIĄZEK	
	[Dap(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37	[Dap(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37
<i>I acylowanie</i>	2* × Boc-O1Pen-OH	2* × Boc-O2Oc-OH
	2* × Oxyma	2* × Oxyma
	2* × DIC	2* × DIC
<i>II acylowanie</i>	1,5* × Boc-O1Pen-OH	1,5* × Boc-O2Oc--OH
	1,5* × Oxyma	1,5* × Oxyma
	1,5* DIC	1,5* DIC
<i>III acylowanie</i>	1* × Boc-O1Pen-OH	1* × Boc-O2Oc-OH
	1* × Oxyma	1* × Oxyma
	1* × DIC	1* DIC
	[Dap(MO1) ^{13,20,24}]LL-37	[Dap(MO2) ^{13,20,24}]LL-37
<i>I acylowanie</i>	2* × MO1	2* × MO2
	2* × Oxyma	2* × Oxyma
	2* × DIC	2* × DIC
<i>II acylowanie</i>	1,5* × pochodna MO1	1,5* × pochodna MO2
	1,5* × Oxyma	1,5* × Oxyma
	1,5* × DIC	1,5* × DIC
<i>III acylowanie</i>	1* × pochodna MO1	1* × pochodna MO1
	1* × Oxyma	1* × Oxyma
	1* × DIC	1* × DIC
<i>IV acylowanie</i>	1* × pochodna MO1	1* × pochodna MO1
	1* × Oxyma	1* × Oxyma
	1* × DIC	1* × DIC
	[Dap(Z-O1) ^{5,6,17,27}]LL-37	[Dap(Z-O2) ^{5,6,17,27}]LL-37
<i>I acylowanie</i>	2* × pochodna Z-O1	2* × pochodna Z-O2
	2* × Oxyma	2* × Oxyma
	2* × DIC	2* × DIC
<i>II acylowanie</i>	2* × pochodna Z-O1	2* × pochodna Z-O2
	2* × Oxyma	2* × Oxyma
	2* × DIC	2* × DIC
<i>III acylowanie</i>	2* × pochodna Z-O1	2* × pochodna Z-O2
	2* × Oxyma	2* × Oxyma
	2* × DIC	2* × DIC
<i>IV acylowanie</i>	1* × pochodna Z-O1	1* × pochodna Z-O2
	1* × Oxyma	1* × Oxyma
	1* × DIC	1* × DIC

* - nadmiar molowy odczynnika w stosunku do wolnych grup aminowych w sekwencji analogu

DIC – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid

OXYMA – heksafluorofosforan-(1-cyjano-2-etoksy-2-oksoetylidenoaminoalkoxy)-dimetyloamino-morfoliny

Reagenty rozpuszczałam w mieszaninie rozpuszczalników DMF: NMP: DCM, 1:1:1 (V/V/V) z dodatkiem Tritonu X-100. Reakcje acylowania prowadziłam przez 24 h w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem wytrząsarki Laboratory shaker type 358A.

1.2.5. Odszczepienie peptydomimetyków od nośnika

W kolejnym kroku przystąpiłam do odszczepienia peptydomimetyków od nośnika z jednoczesnym usunięciem osłon z grup bocznych aminokwasów. W tym celu przygotowałam mieszaninę składającą się z 82,5 % kwasu trifluorooctowego (TFA), 5 % fenolu, 5 % H₂O, 5 % tioanizolu, 2,5 % etano-1,3-ditiolu (EDT). Stosowałam 10 mL mieszaniny ściągającej na 1 g peptydydłożywicy. Reakcje prowadziłam 4 h w temperaturze pokojowej po upływie, których mieszaninę odsączałam na lejku Schotta. Do przesączu dodawałam schłodzonego w ciekłym azocie eteru dietylowego w celu wytrącenia otrzymanego peptydu. Mieszaninę z osadem wirowałam z wykorzystaniem wirówki (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Niemcy) parametry: 6500 RPM, 15 min, 4 °C. Następnie osad rozpuszczałam w wodzie dejonizowanej i poddawałam procesowi liofilizacji.

2. Analiza metodą MS MALDI-TOF

W celu potwierdzenia mas cząsteczkowych, zsyntetyzowane peptydomimetyki analizowano metodą MALDI-TOF, wykonywaną z użyciem spektrometru mas typu Biflex III firmy Bruker w Pracowni Pomiarów Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jako matrycę wykorzystano kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB) lub kwas α -cyjano-4-hydroksycynomonowy (CCA).

3. Analiza metodą UPLC

W celu określenia czystości otrzymanych związków poddałam je analizie metodą ultrasprawną chromatografii cieczowej (UPLC) z wykorzystaniem chromatografu Nexera X2 LC-30AD firmy Shimadzu. Rozdział prowadziłam w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem kolumny Aeris Peptide o wymiarach 150 × 2,1 mm (Peptide XB-C18 firma Phenomenex) o wielkości ziaren 1,7 μ m. Analizę prowadziłam w gradiencie 3-90 % B w czasie 22 minut, szybkość przepływu wynosiła 0,4 mL/min. Parametry wykorzystane podczas pomiarów to faza A 0,1 % TFA w wodzie, faza B 80 % acetonitryl w roztworze A.

4. Analiza metodą dichroizmu kołowego

Natywny LL-37 oraz jego analogi poddano analizie metodą dichroizmu kołowego w Pracowni Pomiarów Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Wszystkie analizy zostały wykonane dla próbek o stężeniu 0,2 mg/mL w roztworze 50 % TFE w wodzie.

5. Elektroforeza w żelu agarozowym

W celu sprawdzenia możliwości tworzenia kompleksów przez zsyntetyzowane peptydomimetyki z plazmidem pUC19, o 2688 parach zasad (Thermo-Scientific™) wykonałam rozdział elektroforetyczny w 0,8 % żelu agarozowym z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego, Midori Green. Próbki przygotowałam w 2 różnych stosunkach dodatniego ładunku peptydomimetyku (N) do ujemnego ładunku plazmidu (P) N/P = 1:1; 5:1. Mieszaninę peptydomimetyku oraz plazmidu w stosunku ładunków 1:1 oraz 5:1 poddawałam 30 minutowej inkubacji w temperaturze 37 °C, a następnie do kompleksów dodawałam 4 µl buforu obciążającego 6 × (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze TBE o składzie 89 mM TRIS, 89 mM kwas borowy, 1 mM EDTA przy stałym napięciu 80 V, przez 2 h 20 min. Dodatek barwnika fluorescencyjnego umożliwił obserwację migracji plazmidowego DNA za pomocą zestawu do detekcji żeli Fusion FX-7.

6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

W kolejnym kroku przeprowadziłam rozdział w żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem próbki dsDNA zbudowanej z 76 par zasad. Przygotowany przeze mnie żel składał się z 4 % żelu zagęszczającego oraz 8 % żelu rozdzielającego o składzie przedstawionym w tabeli 5. Do nanoszonych próbek dodawałam po 4 µL buforu ładujący w składzie (4,1 M glicerolu, 35,5 mM Tris, 35,6 mM kwasu borowego, 0,8 mM EDTA oraz 0,25 % błękitu bromofenolowego). Do obu żeli dodałam barwnika fluorescencyjnego – Midori Green (abo, Gdańsk, Polska) umożliwiającego rejestrację migracji DNA za pomocą zestawu do detekcji żeli Fusion FX-7.

Tabela 5. Skład żeli zagęszczającego i rozdzielającego.

%	30% AKRYLAMID [mL]	H ₂ O [mL]	5 x TAE [mL]	10 % APS [μL]	TEMED [μL]
4 %	1,6	8	2,4	200	10
8 %	3,2	6,4	2,4	200	10

5x TAE – bufor zawierający: 200 mM Tris, 200 mM kwas octowy, 5 mM EDTA

APS – persodisiat azotanowy

TEMED - N, N, N', N' - tetrametyloetylenodiamina

Próbki przygotowałam analogicznie jak do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym: N/P = 1:1 i 5:1. Próbki peptydomimetyków oraz DNA inkubowałam przez 30 min w temperaturze 37 °C , po tym czasie dodawałam bufor ładujący o składzie: 30 % glicerolu w buforze TBE, błękit bromofenolowy. Rozdział prowadziłam w buforze TAE o składzie: 40 mM TRIS, 40 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA przy stałym napięciu 70 V przez 1 h 55 min.

7. Termoforeza w mikroskali

Na podstawie wyników uzyskanych z rozdzielania elektroforetycznego, postanowiłam wyznaczyć siłę powinowactwa zsyntetyzowanych peptydomimetyków do kwasu nukleinowego znakowanego fluoroforem. Pomiar siły oddziaływania ludzkiej katelicydyny z DNA są możliwe z wykorzystaniem technologii MST. Metoda ta umożliwia precyzyjne określenie powinowactwa LL-37 oraz analogów do nici DNA w naturalnych warunkach jakie występują w organizmie. W pomiarach można wykorzystać obecność jonów soli oraz zróżnicowaną wartość pH, które wpływają na stabilność próbki. Wykorzystanie techniki MST do określenia powinowactwa LL-37 do kwasów nukleinowych do tej pory nie zostało opisane w literaturze. Liczne badania naukowe skupiają się na określeniu powinowactwa małych cząsteczek lub też peptydów co sugeruje, że technikę tę można wykorzystać do pomiarów wykonanych z wykorzystaniem LL-37 [131]. Analizę MST wykonałam z użyciem dsDNA zbudowanego z 76 par zasad znakowanego barwnikiem Cyanine5 (Cy5) na 5' końcu, która została zsyntetyzowana komercyjnie przez Oligo (Kraków). Pomiar prowadziłam w buforze EDBS o składzie: 25 mM Tris-HCl pH 8, 4 % sacharoza, 4 mM DTT, 80 μg/mL BSA. Innymi buforami, z których korzystałam były roztwór PBS zawierający 0,05 % TWEEN oraz PBS + 0,1 % Pluronic F-127. Stężenie DNA w trakcie analiz wynosiło

100 nM. Stężenie wyjściowe peptydomimetyku wynosiło 200 μ M, które następnie rozcieńczyłam 16-krotnie w odpowiednim buforze.

Próbki analityczne składały się z buforu pomiarowego, peptydomimetyku oraz DNA przygotowanych w proporcjach 1:1:1, (V:V:V). Próbki inkubowałam przez 1 h w temperaturze 37 °C, następnie wirowałam przy obrotach 14000 RPM przez 15 minut (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Niemcy). Pomiary wykonałam na urządzeniu Monolith NT. 115, NanoTemper Technologies GmbH, z wykorzystaniem kapilar premium Monolith. Każdy pomiar wykonałam w temperaturze 25 °C w 3 powtórzeniach.

8. Mikroskopia sił atomowych

Metoda mikroskopii sił atomowych jest wykorzystywana w chwili obecnej jako narzędzie do pomiaru oddziaływań między pojedynczymi parami wybranych biomolekuł. N. Sewald w swoich pracach omówił jak ta technika umożliwia precyzyjny pomiar sił oddziaływania między molekułami DNA i peptydami, przydatny w modelowaniu procesów molekularnych. W badaniach wykorzystał peptydy amfifilowe, które wykazywały zdolność wiązania się z DNA dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym z ujemnie naładowanym szkieletem fosforanowym DNA. Wyniki opisane w pracy udowodniły, że peptydy te mają tendencję do wiązania się w dużym rowku podwójnej helisy DNA [132].

Elektroforegramy otrzymane w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej dowiodły, że otrzymane peptydomimetyki tworzą kompleksy z plazmidem pUC19. Wykorzystując technikę mikroskopii sił atomowych (AFM) dr Katarzyna Bury z Zakładu Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed wykonała obrazowanie powyższych struktur. Kompleksy peptydomimetyków z plazmidem pUC19 zostały utworzone w stosunkach N/P = 0,2:1 w 8 mM MgCl₂. Kompleksy składały się z 5 nM pUC19 oraz próbek peptydomimetyków o stężeniu 0,875 nM. Czas inkubacji przygotowanych kompleksów wynosił 30 min w temperaturze pokojowej. Zdjęcia wykonano z wykorzystaniem mikroskopu BioScope Resolve AFM (firmy Bruker, Bremen), wyposażonego w sondę ScanAsystFluid+. Wyniki zostały opracowane przy użyciu oprogramowania NanoScope Analysis v1.9.

9. Pomiary z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła

Metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS) jest wykorzystywana do charakteryzacji wielkości cząsteczek takich jak peptydy czy kompleksy peptydów z DNA w roztworach. Pomiary DLS pozwalają określić rozkład rozmiarów peptydów w roztworze, które mogą wykazywać tendencję do tworzenia agregatów w zależności od warunków środowiskowych.

Ludzka katelicydyna LL-37, jako kationowy peptyd antybakteryjny, wykazuje tendencję do agregacji głównie w wyższych stężeniach. Pomiary DLS mogą określić rozkłady wielkości cząsteczek, sugerując obecność monomerów, dimerów lub struktur zagregowanych w zależności od stężenia i warunków fizykochemicznych [133].

Pomiary metodą dynamicznego rozproszenia światła zostały wykonane w Zespole Pracowni Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego przez dr inż. Beatę Szafrank z wykorzystaniem aparatu Litesizer DLS 500 (Antony Paar). W celu wykonania analizy wielkości cząstek i potencjału Zeta przygotowałam roztwory peptydomimetyków o stężeniu 200 μM . W kolejnym etapie analizie poddano kompleksy peptydomimetyków z dsDNA (76pz) lub pUC19. W przypadku pomiarów wykonanych na kompleksach wykorzystałam 200 μM stężenie peptydomimetyków, 8,09 μM dsDNA (N/P = 12:1) oraz 0,573 nM pUC19 (N/P= 170:1).

Dodatkowo metodą DLS (pomiar promienia hydrodynamicznego) określiłam wpływ rosnącego stężenia peptydomimetyku na kondensację i agregację dwuniciowego DNA (dsDNA). W tym celu wykorzystałam 8,09 μM dsDNA oraz peptydomimetyki o stężeniach: 0,9; 5; 6,67; 7,5; 8,0; 8,33; 8,57; 8,75; 8,89; 9,0; 9,09 μM .

10. Spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową

W celu określenia szybkości hydrolizy peptydomimetyków przez proteinazę 3 wykorzystałam technikę LC-MS. Analiza LC-MS, która została przeprowadzona w Zespole Pracowni Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego przez mgr. Kingę Sikorę z wykorzystaniem aparatury MS Bruker Daltonics HCT Ultra oraz LC Agilent Technologies 1200series. Analizy wykonano z wykorzystaniem kolumny Gemini- NX 5u C18 o wymiarach $4,6 \times 150$ mm (Phenomenex), zastosowano gradient rozpuszczalników 10-90 % B w czasie 50 min i przepływ 0,5 mL/min. Składy rozpuszczalników: faza A 0,1 % HCOOH w H₂O, faza B 0,1 % HCOOH w acetonitrylu. Widma mas uzyskano przy użyciu spektrometrii masowej z jonizacją ESI.

Warunki przeprowadzonych analiz:

Próbki peptydomimetyków o stężeniu C= 50 µM przygotowane w buforze 10 mM TRIS-HCl, 0,01 % CH₃COONH₄, pH 7,5. Próbkę poddawana analizom zawierała peptydomimetyk o stężeniu 45 µM i proteinazę 3 o stężeniu 0,2 µM. Inkubację prowadziłam odpowiednio przez 1, 2, 4, 6, 24 godziny w temperaturze 37 °C dodatkowo wykonałam analizę od razu po zmieszaniu składowych. Proteinaza 3 jest enzymem katalizującym hydrolizę wiązań peptydowych po krótkich alifatycznych resztach aminokwasowych, które występują w sekwencjach peptydomimetyków.

Peptydomimetyki, w których modyfikowałam reszty Arg: [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 oraz [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 poddałam reakcji (czas inkubacji: 1, 2, 4, 6, 8, 24 h) z wykorzystaniem enzymu deiminazy peptydyloargininowej 4 (PAD4) oraz deiminazy peptydyloargininowej 2 (PAD2). Jako próbę kontrolną wykorzystałam natywny LL-37. Enzym PAD4 katalizuje konwersję reszt argininy w reszty cytruliny w wyniku procesu deiminacji. Reakcję enzymatyczną przeprowadziłam w buforze 0,24 M TRIS-HCl z dodatkiem 0,05 M CaCl₂, pH 7,6. Stężenie składników wynosiło: 1,35 µM PAD4, 50 µM peptydomimetyk. W drugim przypadku 3,34 µM PAD2 oraz ponownie 50 µM analogu.

11. Badania komórkowe

Hodowlę komórkową prowadziłam w specjalnie przeznaczonych do tego naczyniach hodowlanych, wykonanych z polistyrenu zaopatrzonych w korek z filtrem HEPA. W czasie prowadzenia hodowli korzystałam z inkubatora CellXpert CO₂ (firmy Eppendorf) zachowującego stałe warunki 37 °C oraz stężenie CO₂ o wartości 5 %. Hodowlę komórkową prowadziłam z wykorzystaniem komory laminarnej Maxi Safe 2020 II klasy bezpieczeństwa mikrobiologicznego firmy Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, Stany Zjednoczone), która zapewniała jałowe warunki.

11.1. Linie komórkowe

Badania komórkowe wykonałam z zastosowaniem poniższych linii komórkowych:

- Linia komórkowa HB2 (ang. human breast epithelial cells) jest to linia powstająca z komórek nabłonka gruczołu sutkowego. Zespół naukowy M.J. Stampfera jako pierwszy opisał powyższą linię w latach 80. XX wieku. Hodowlę prowadziłam w pożywce DMEM HG wzbogaconej 10 % inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS) oraz 1 % antybiotyków: penicyliny i streptomycyny. Dodatkowo pożywkę suplementowałam 5 µg/ml insuliny oraz 5 µg/ml hydrokortyzolu. Jest to linii komórek adherentnych.
- Linia komórkowa CRL-1472 (komórki adherentne) jest to linia ludzkich komórek nowotworowych nabłonka pęcherza moczowego, III stadium, która została zdeponowana przez S. Rasheeda w 1977 roku. Do hodowli wykorzystywałam pożywkę DMEM HG wzbogaconą 10 % inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS) oraz 1 % antybiotyków: penicyliny i streptomycyny.
- Linia komórkowa HDFa (komórki adherentne) jest to linia ludzkich pierwotnych fibroblastów skórnych. Nie ma jednoznacznej daty odkrycia pojedynczej linii komórkowej, jest to związane z opracowaniem metod izolacji fibroblastów ze skóry człowieka w połowie XX wieku. Do hodowli wykorzystywałam pożywkę DMEM UG wzbogaconą 10 % inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS) oraz 1 % antybiotyków: penicyliny, streptomycyny.
- Linia komórkowa HL-60 jest to linia komórek nowotworu ostrej białaczki promielocytowej. Komórki z tej linii zostały odkryte w 1976 roku przez zespół Roberta C. Gallagher'a. Do hodowli wykorzystywałam pożywkę RPMI-1640 z dodatkową

suplementacją 10 % inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową (FBS) oraz 1 % antybiotyków: penicyliny i streptomycyny. Istotną informacją jest, fakt że jest to linia zawieszinowa, co oznacza, że w odróżnieniu do wyżej wymienionych te komórki nie przylegają do podłoża naczynia a swobodnie pływają w medium.

11.2. Różnicowanie komórek linii HL-60

Proces różnicowania komórek polega na wprowadzaniu zmian w obrębie ich morfologii oraz fizjologii. Cechą charakterystyczną komórek HL-60 jest ich zdolność do różnicowania się *in vitro* do różnych typów komórek linii mielomonocytarnej. Do czynników indukujących różnicowanie komórek HL-60 do granulocytów należą:

- dimetylosulfotlenek (DMSO),
- dimetyloformamid (DMF),
- inne np. kwas all-trans retinowy (ATRA),
- aktynomycyna D.

Natomiast 1,25-dihydroksywitamina D₃, estry forbolu i maślan sodu indukują różnicowanie do monocytów lub makrofagów [134].

W ramach badań różnicowałam komórki linii HL-60 w komórki nowotworowe podobne do neutrofilii z wykorzystaniem DMSO, który jest silnie różnicującym środkiem. Y. Guo i współpracownicy opisali proces różnicowania HL-60 z wykorzystaniem szeregu związków chemicznych. Zastosowanie w hodowli HL-60 DMSO przez 5 dni skutkowało w dalszych badaniach najwyższą wydajnością tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilnych (ang. neutrophil extracellular traps, NETs) oraz produkcją reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) [135].

Komórki hodowałam w pożywce RPMI-1640 zawierającej 10 % FBS, 1 % antybiotyków oraz 1,25 % DMSO. W naczynku umieszczałam 10 mln komórek w 20 mL pożywki RPMI-1640 zawierającej 1,25 % DMSO. Różnicowanie komórek prowadziłam kolejno przez 5 dni, codziennie wymieniając pożywkę. Monitorowałam liczbę komórek w naczynku i regulowałam ją do 10 mln [135], [136].

Zróżnicowane komórki HL-60 wykorzystałam do przeprowadzenia testów cytotoksyczności otrzymanych peptydomimetyków oraz określenia aktywności

neutrofilnych proteinaz serynowych w lizatach komórkowych i medium zewnątrzkomórkowym.

11.3. Testy cytotoksyczności

W celu określenia cytotoksyczności otrzymanych peptydomimetyków wykonałam test MTT, który opiera się na aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej rozkładającej sól MTT do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu [137]. Test MTT na liniach HB2 i CRL-1472 wykonałam z wykorzystaniem płytek 96-dółkowych, w przypadku linii HDFa oraz HL-60 zastosowałam płytki 48-dółkowe (Tabela 6). Każdy z testów wykonywałam dwukrotnie.

Tabela 6. Ilość pasażowanych komórek.

Linia komórkowa	Ilość komórek w 1 dołku [$\times 10^3$]
<i>HB2</i>	5
<i>CRL-1472</i>	8
<i>HDFa</i>	4
<i>HL-60</i>	25,5

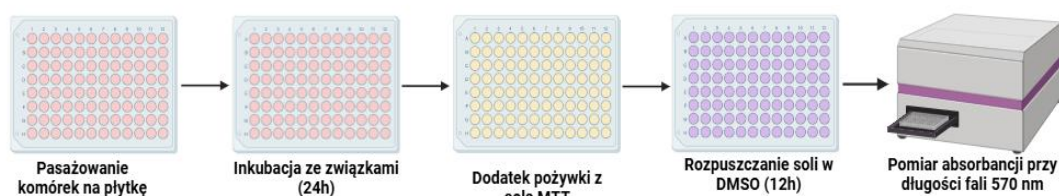
Hodowle komórek na płytce 96-dółkowej prowadziłam w 200 μ L pożywki odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po upływie 48 godzin usuwałam medium i dołki przemywałam 2-krotnie PBS. W kolejnym kroku dodawałam określone peptydomimetyki w 100 μ L pożywki. Stężenie końcowe peptydomimetyków wynosiło: 1, 5, 10, 20 i 50 μ M. Inkubację komórek z peptydomimetykami prowadziłam przez 24 h w temperaturze 37 °C w inkubatorze.

Hodowle komórek na płytce 48-dółkowej prowadziłam w 500 μ L pożywki odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po upływie 48 godzin postępowałam tak jak wyżej. W kolejnym kroku dodawałam określone peptydomimetyki w 250 μ L pożywki. Stężenie końcowe peptydomimetyków wynosiło: 1, 5, 10, 20 i 50 μ M. Inkubację komórek z peptydomimetykami prowadziłam przez 24 h w temperaturze 37 °C w inkubatorze.

Po upływie 24 h wymieniałam pożywkę na świeżą zawierającą sól MTT o stężeniu ($c=5$ mg/mL PBS). Do płytek 96-dółkowych do dołka dodawałam 250 μ L pożywki z MTT (225 μ L pożywki + 25 μ L MTT ($c= 5$ mg/mL)). Natomiast do płytek 48-dółkowych dodawałam po 500 μ L medium z MTT (450 μ L pożywki + 50 μ L MTT ($c= 5$ mg/mL)).

Następnie płytki umieszczałam w inkubatorze na 4 h, po upływie których, usuwałam zawartość i dodawałam do każdego dołka DMSO w przypadku płytek 96-dołkowych 150 μL a w przypadku płytek 48-dołkowych 300 μL . Płytki chroniłam przed dostępem światła i na 12 h umieszczałam w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku wykonywałam pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano BMG LabTech (Rys. 12).

W przypadku komórek HL-60 oraz HL-60 zróżnicowanych do neutrofilii, komórki wysiewałam na płytki pokryte wcześniej 0,1 % roztworem żelatyny rybiej. Ze względu na ich charakter zawiesinowy przed każdą wymianą pożywki, płytki poddawałam wirowaniu, aby zapobiec usunięciu komórek wraz z pożywką.



Rysunek 12. Schemat przebiegu testów cytotoksyczności.

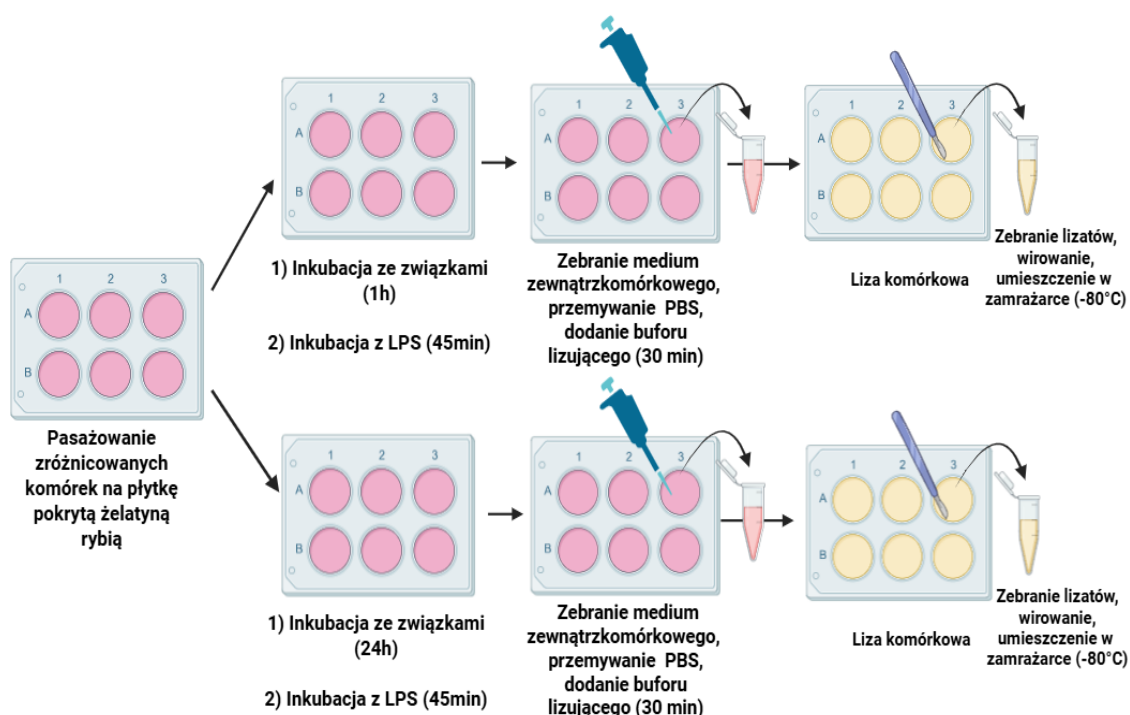
11.4. Ocena wpływu peptydomimetyków na aktywację komórek HL-60

Liza komórkowa to proces niszczenia błony komórkowej w celu uwolnienia wewnętrznych składników komórki. Istnieją trzy podstawowe metody lizy komórkowej: chemiczna wykorzystujące detergenty, mechaniczna dotycząca technik fizycznych oraz enzymatyczna. Bufor lizujący Reporter Lysis Buffer (RLB) 5 $\times$ (Promega) (rozcieńczony 5-krotnie w wodzie) jest mieszanką detergentów oraz stabilizatorów biorących udział w rozpuszczeniu błon komórkowych i uwolnieniu zawartości wewnątrzkomórkowej. Detergenty będące jego składnikami oddziałują z dwuwarstwą lipidową błony komórkowej destabilizując ją i prowadzą do jej lizy [138].

Lizę komórkową wykonałam wykorzystując zróżnicowane komórki linii HL-60. Linia komórek HL-60 to komórki zawiesinowe dlatego w 4 dniu różnicowania przenieśliśmy je na płytki 6-dołkowe wcześniej pokryte 0,1 % roztworem żelatyny rybiej (5 mln komórek/dołek) i dalej prowadziłam ich różnicowanie. Piątego dnia różnicowania do dołków dodawałam peptydomimetyki ($C = 5,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) w pożywce RPMI-1640 zawierającej 1,25 % DMSO. Do każdego z dołków dodawałam po 10 μL odpowiedniego

związku uzyskując $C_{\text{końcowe}} = 5,05 \mu\text{M}$. Komórki zostały poddane działaniu związków przez 1 h w 37°C , następnie dodawałam do każdego dołka LPS ($C_{\text{końcowe}} = 0,198 \mu\text{M}$) i inkubowałam kolejne 45 minut. Po tym czasie medium zewnątrzkomórkowe zbierałam do próbek eppendorf'a i przechowywałam w temperaturze -80°C . Następnie komórki przemywałam dwukrotnie PBS i dodałam bufor lizujący. Po upływie 30 minut za pomocą skrobaczek komórki oderwałam od dna naczynia hodowlanego i zawartość przeniosłam do próbek Eppendorf'a a następnie zwirowałam przez 2 min przy obrotach $1400 \times g$. (miniSpin plus, firmy Eppendorf). Następnie supernatanty przeniosłam do nowych próbek typu Eppendorf i umieściłam w zamrażarce -80°C (Rys. 13).

Powtórzyłam kroki z wykorzystaniem nowych zróżnicowanych komórek, ponownie pasażowałam je na płytkę w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 1,25 % DMSO. Do każdego dołka dodawałam ponownie związków ($C_{\text{końcowe}} = 5,05 \mu\text{M}$). Tym razem inkubację komórek ze związkami prowadziłam przez 24 h w 37°C i po tym czasie dodawałam LPS ($C_{\text{końcowe}} = 0,198 \mu\text{M}$) i inkubowałam 45 min. W kolejnym etapie zbierałam supernatanty znad komórek oraz dalsze kroki wykonywałam analogicznie jak we wcześniejszym eksperymencie (Rys. 13).



Rysunek 13. Etapy lizy komórkowej.

12. Aktywność enzymatyczna

W lizatach i medium komórkowym uzyskanych z komórek HL-60 zróżnicowanych do neutrofili przeprowadziłam badania aktywności neutrofilnej proteiny serynowej (PR3).

Eksperyment umożliwił mi określenie stopnia aktywacji zróżnicowanych komórek HL-60. Ocenę aktywności enzymatycznej PR3 w otrzymanym medium zewnątrzkomórkowym oraz lizatach komórkowych prowadziłam w buforze o składzie: 100 mM Tris HCl, 500 mM NaCl o pH 7,5. Pomiary aktywności wykonywałam na czarnych mikropłytkach z wykorzystaniem spektrofotometru CLARIOstar firmy BMG Labtech przy $\lambda_{\text{wzbudzenia}} = 320 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{emisji}} = 450 \text{ nm}$.

Odczynniki wykorzystane do wykonania pomiarów:

- Substrat dla proteiny 3 o sekwencji: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Dap(Dnp)-NH₂*
- Inhibitor dla proteiny 3 o sekwencji: Bt-Pro-Tyr-Asp-AbuP (O-C₆H₄-4-Cl)₂**

Gdzie: ABZ- kwas 2- aminobenzoowy (donor fluorescencji), Dap(Dnp)-NH₂ – amid kwasu (N- β -2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diaminopropionowego (akceptor fluorescencji), Bt- biotyna

**Sekwencja substratu została opracowana przez dr Jadwigę Popow-Stellmaszyk w ramach rozprawy doktorskiej „Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w charakterystyce wybranych proteinaz serynowych”, promotor prof. dr hab. Adam Lesner.*

***Inhibitor zsyntetyzowany w ramach współpracy z prof. dr hab. inż. Marcinem Sieńczykiem z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej [11]*

Syntezę wymienionego powyżej substratu przeprowadziłam na nośniku stałym Tenta Gel S-RAM, o osadzeniu 0,23 mmol/g z wykorzystaniem syntezy mikrofalowej Liberty Blue. Proteoliza wiązania peptydowego w substracie prowadzi do zwiększenia odległości pomiędzy parą donor-akceptor fluorescencji co jest związane z przerwaniem transferu energii wzbudzenia elektronowego (ang. Förster Resonance Energy Transfer, FRET) [139]. Kwas 2-aminobenzoowy (ABZ) pełni rolę donora fluorescencji, natomiast amid kwasu (N- β -2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diaminopropionowego akceptora fluorescencji.

Badania rozpoczęłam od dodania do płytki 96-dołkowej 110 μL wyżej wymienionego buforu, 10 μL inhibitora ($C_{\text{inhibitora PR3}} = 3,53 \mu\text{M}$ w DMSO) lub samego

DMSO oraz 150 μL odpowiedniego medium zewnątrzkomórkowego. Inkubację prowadziłam 30 minut ($t=37^{\circ}\text{C}$), a następnie dodawałam substrat ($c_{\text{końcowe}}=4,73\times 10^{-5}\text{ M}$). W kolejnym kroku rozpoczynałam pomiar przyrostu intensywności fluorescencji w czasie.

Ocenę aktywności enzymatycznej PR3 wykonałam również w lizatach komórkowych, uzyskanych po inkubacji komórek ze związkami w ramach realizacji punktu 11.4. W płytce 96-dołkowej umieszczałam 130 μL buforu, inhibitor o stężeniu $C_{\text{inhibitora PR3}}=0,12\text{ }\mu\text{M}$ w DMSO lub samego DMSO oraz 10 μL odpowiedniego lizatu. Pozostałe kroki wykonywałam tak samo jak w przypadku pomiarów aktywności enzymatycznej w medium zewnątrzkomórkowym.

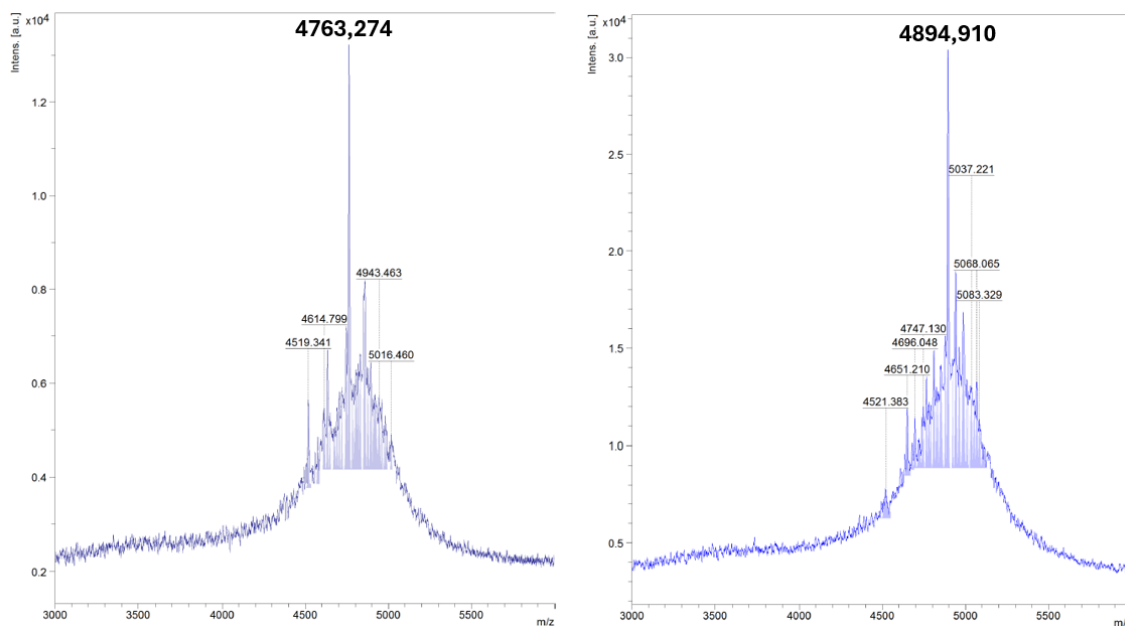
WYNIKI I DYSKUSJA

1. Badania fizykochemiczne peptydomimetyków

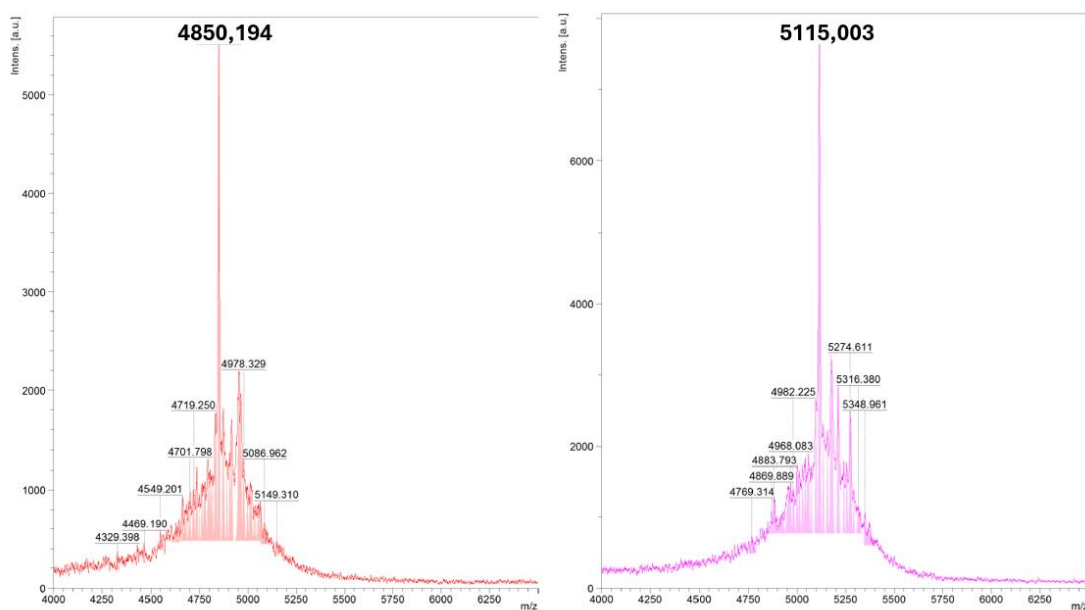
Po zakończonym procesie syntezy dla każdego peptydomimetyku przeprowadziłam analizy potwierdzające masę cząsteczkową uzyskanego związku oraz określające jego czystość. Dodatkowo wszystkie analogi poddałam analizie metodą dichroizmu kołowego w celu sprawdzenia, czy wprowadzone modyfikacje w sekwencji natywnej ludzkiej katelicydyny nie zmieniły struktury α -helisy.

1.1. Analiza metodami spektrometrii mas oraz UPLC

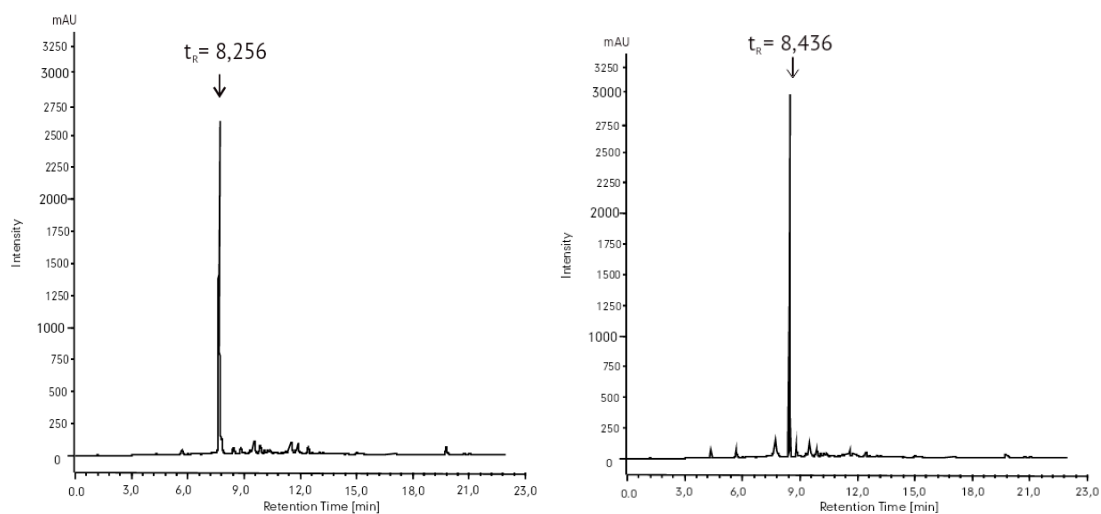
Analizy wybranych peptydomimetyków z wykorzystaniem spektrometrii mas oraz chromatogramy UPLC przedstawiłam na rysunkach 14-16. Parametry fizykochemiczne wszystkich otrzymanych związków zestawiałam w tabeli 7.



Rysunek 14. Widma mas: A) $[Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37$, B) $[Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37$.



Rysunek 15. Widma mas: A) $[Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37$, B) $[Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37$.



Rysunek 16. Chromatogramy UPLC peptydomimetyków A) $[Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37$, B) $[Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37$.

Tabela 7. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych peptydomimetyków.

Nr	Związek	Masa wyznaczona [M]	Masa teoretyczna [M]	Czas retencji* [min]
1a	[Dap(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37	4860,38	4858,60	8,467
1b	[Dap(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37	5079,98	5078,86	8,059
2a	[Dap(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37	4850,19	4847,41	8,521
2b	[Dap(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37	5115,05	5111,72	8,426
3a	[Dap(MO1) ^{13,20,24}]LL-37	4763,05	4760,41	8,256
3b	[Dap(MO2) ^{13,20,24}]LL-37	4894,99	4892,57	8,436
4a	[Dap(Z-O1) ^{5,6,17,27}]LL-37	5176,23	5189,88	-
4b	[Dap(Z-O2) ^{5,6,17,27}]LL-37	5235,18	5366,09	-

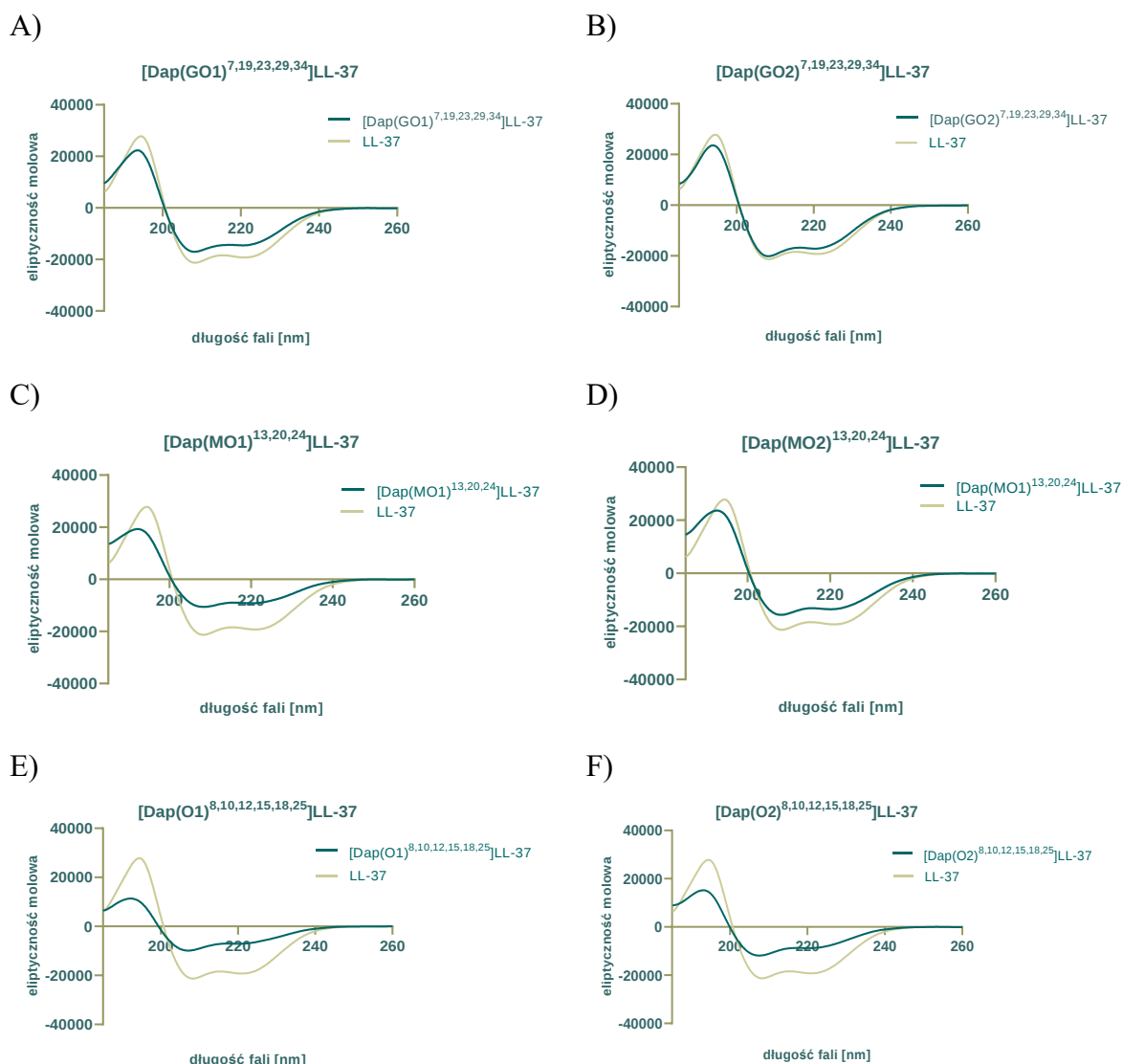
*Czasy retencji określiłam z wykorzystaniem techniki UPLC przy użyciu chromatografu Nexera X2 LC-30AD, firmy Shimadzu, stosując metodę: 3 – 90 % B w czasie 22 minut.

W przypadku peptydomimetyków [Dap(Z-O1)^{5,6,17,27}]LL-37 i [Dap(Z-O2)^{5,6,17,27}]LL-37 nie udało się potwierdzić mas molekularnych uzyskanych związków z masami teoretycznymi.

1.2. Struktury drugorzędowe peptydomimetyków

Metoda dichroizmu kołowego (CD) jest kluczowym narzędziem wykorzystywanym do analizy strukturalnej, pozwalającym na badanie chiralności molekuł oraz struktur drugorzędowych peptydów i ich analogów. Dzięki charakterystycznym widmom CD, które są wynikiem różnicy w absorpcji światła spolaryzowanego kołowo, mogą porównywać właściwości strukturalne peptydomimetyków z ich naturalnym odnośnikiem. Rysunek 17A i B przedstawia widma CD potwierdzające, że wprowadzone zmiany w pozycjach reszt arginin w sekwencji ludzkiej katelicydyny nie wpłynęły na zmianę jej α -helikalnej struktury. Analiza struktury analogów: [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 oraz [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 (Rys. 17C-D) przedstawia zmniejszoną intensywność minimów oraz maksimum, co może wskazywać, że wprowadzone modyfikacje zmniejszyły zawartość struktury α -helikalnej w tych analogach. Może to świadczyć o częściowej destabilizacji helisy, jej skróceniu lub zmianie konformacji przestrzennej peptydu. Analiza CD analogów [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 oraz [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 wskazuje na zachowanie charakterystycznego kształtu dla struktury α -helikalnej czyli dwa minima w okolicach 208 nm i 222 nm, jednak ich

intensywność sygnału jest istotnie obniżona w porównaniu do formy natywnej (Rys. 17E-F). Może to być związane z tym, że struktura drugorzędowa analogów nadal ma charakter helikalny, jednak jej udział w całkowitej strukturze peptydu jest znacznie mniejszy. W tych przypadkach obniżona intensywność może być również wynikiem osłabienia uporządkowania przestrzennego helisy lub obecności bardziej dynamicznych, elastycznych fragmentów cząsteczki, co prowadzi do obniżenia dichroizmu optycznego. Pomiary zostały wykonane w warunkach zbliżonych do fizjologicznych pH około 7.



Rysunek 17. Widma CD peptydomimetyków.

Jahansson i współpracownicy analizowali wpływ pH i środowiska jonowego na strukturę drugorzędową ludzkiej katelicydyny LL-37 za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Analizowali zmiany helikalności peptydu w różnych warunkach,

wykazując, że przy $\text{pH} < 5$ struktura LL-37 występuje w formie nieuporządkowanej. Natywna struktura α -helikalna tworzy się ponownie po zwiększeniu pH , a w środowisku zasadowym $\text{pH} > 13$ helikalność pozostaje stabilna. Obecność anionów takich jak SO_4^{2-} , HCO_3^- czy CF_3COO^- sprzyja formowaniu helisy poprzez mechanizm wysalania (ang. salting out), zgodny z szeregiem Hofmeistera. Jony te zwiększają napięcie powierzchniowe wody, co energetycznie wymusza agregację hydrofobowych fragmentów i stabilizację struktury helikalnej. W odróżnieniu od klasycznego wysalania białek przy wysokich stężeniach soli ($> 1 \text{ M}$), w przypadku LL-37 efekt ten obserwowany jest już przy znacznie niższych stężeniach, co wynika z jego małych rozmiarów, amfipatyczności i elastyczności strukturalnej. Ponadto, LL-37 zawiera liczne pary reszt zasadowych i kwasowych ułożone w pozycjach sprzyjających formowaniu wewnątrzłańcuchowych mostków solnych w strukturze helikalnej. Takie oddziaływania jonowe dodatkowo stabilizują helisę. Wyniki wskazują, że optymalna aktywność przeciwbakteryjna LL-37 zależy od jego struktury helikalnej, której stabilność warunkują zarówno pH , jak i obecność soli [140].

2. Badania powinowactwa

Analizy powinowactwa mają na celu zrozumienie siły i specyficzności oddziaływania między różnymi molekułami. Badania te mogą być prowadzone przy użyciu różnych technik, w zależności od charakteru analizowanego systemu.

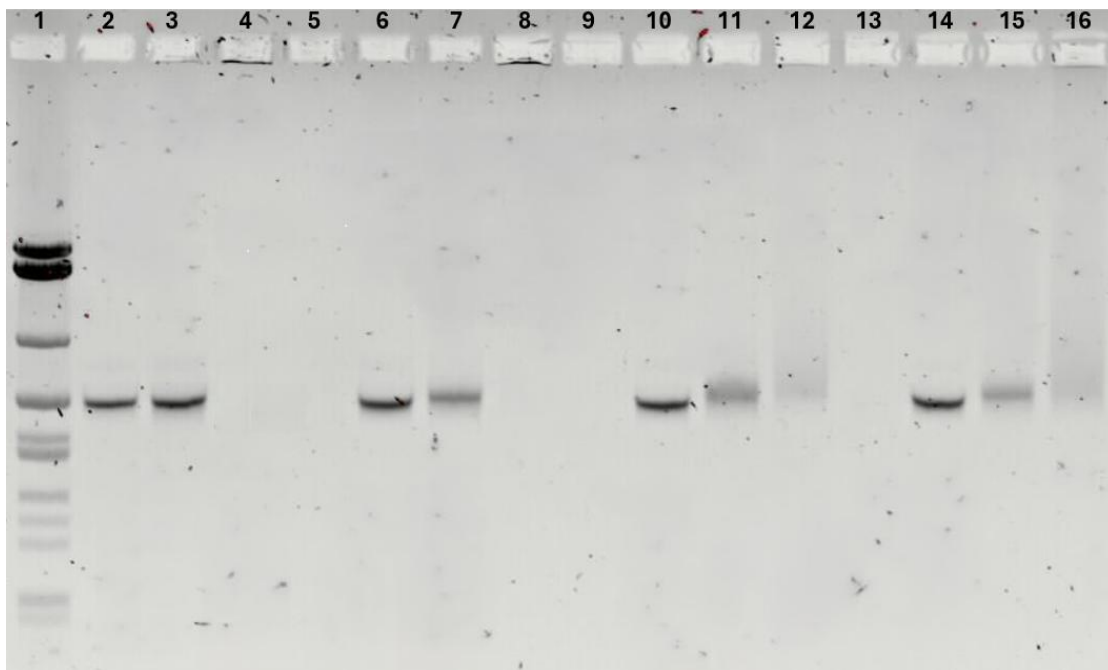
2.1. Elektroforeza agarozowa

W celu określenia zdolności peptydomimetyków do wiązania się z plazmidem pUC19 przeprowadziłam elektroforezę agarozową. Technika ta umożliwia określenie obecności kompleksów tworzonych przez DNA i peptydomimetyk, w zależności od narastającego stężenia peptydomimetyku.

Fakt, że peptyd LL-37 tworzy kompleksy z DNA został już opisany w wielu publikacjach. Katelicydyna kondensuje kwas deoksyrybonukleinowy niezależnie od sekwencji nukleotydowych. Badal D. i współpracownicy zobrazowali tworzenie kompleksów LL-37: DNA metodami elektroforezy agarozowej, elektroforezy poliakrylamidowej w żelu natywnym oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Stabilność kompleksów obserwowano przy stosunkach N/P (dodatni ładunek peptydomimetyku zlokalizowany na atomie azotu/ujemny ładunek plazmidu zlokalizowany na grupach fosforanowych) 10:1 i 5:1 (LL-37: DNA) i optymalnym czasie inkubacji wynoszącym 30 minut [141]. Dodatkowo autorzy dowiedli, że to kompleksy DNA związane z peptydem LL-37, a nie samo DNA, są odpowiedzialne za aktywację komórek układu odpornościowego, takich jak: pDC (ang. plasmacytoid dendritic cells, pDCs, komórki plazmocytoidalne) i monocytów, w chorobie autoimmunologicznej cukrzycy typu 1 (ang. type 1 Diabetes, T1D).

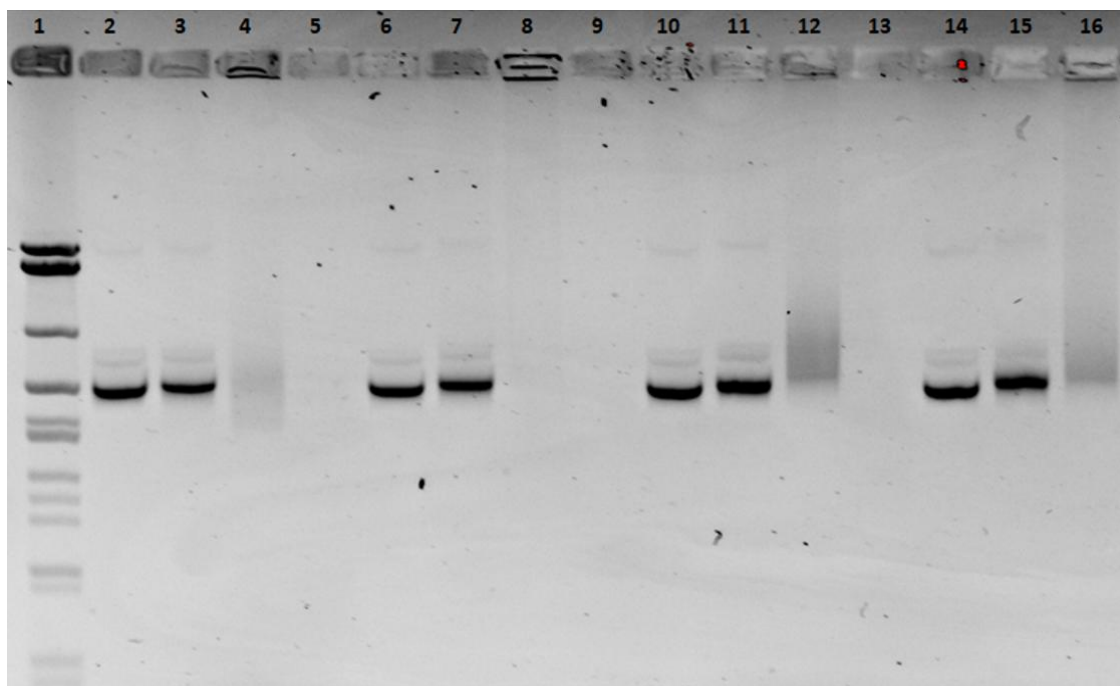
Wyniki przedstawione na rysunku 8 wskazują, że analogi [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 w kompleksie z pUC19 (N/P=1:1) wiążą się z plazmidem powodując nieznacznie zmniejszoną ruchliwość kompleksów w żelu w stosunku do kontroli (pUC19). Tworzone kompleksy migrują w żelu tak samo efektywnie jak kompleks LL-37 : pUC19 (ścieżka 3 i 4). W przypadku kompleksów utworzonych w stosunku N/P=5:1 obserwowałam ograniczoną mobilność elektroforetyczną w żelu agarozowym, co sugeruje utworzenie struktur o znacznych

rozmiarach lub masach cząsteczkowych. W efekcie nie obserwujemy ich migracji – kompleksy pozostawały w studzienkach, co może świadczyć o ich wysokim stopniu agregacji lub silnej interakcji z DNA (Rys. 18).



Rysunek 18. Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z pUC19 .
Kolejność naniesionych próbek: ścieżka 1 Marker Lambda Ava,
ścieżka 2, 6, 10, 14 pUC19 (50ng),
ścieżka 3 LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1), ścieżka 4 LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1),
ścieżka 5, 9, 13 puste ścieżki
ścieżka 7 [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1),
ścieżka 8 [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37: pUC19 (N/P = 5:1),
ścieżka 11 [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1),
ścieżka 12 [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1),
ścieżka 15 [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1),
ścieżka 16 [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1).

W przypadku analogów [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, obserwowany rozdział elektroforetyczny jest podobny do tego otrzymanego w przypadku wcześniej analizowanych peptydomimetyków. Jednak przy N/P wynoszącym 5:1 w przypadku kompleksów LL-37 oraz [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 z pUC19 tworzące się koniugaty najprawdopodobniej ze względu na swoje duże rozmiary i ładunki dodatnie nie są w stanie wnikać w głąb żelu i migrować (Rys. 19).

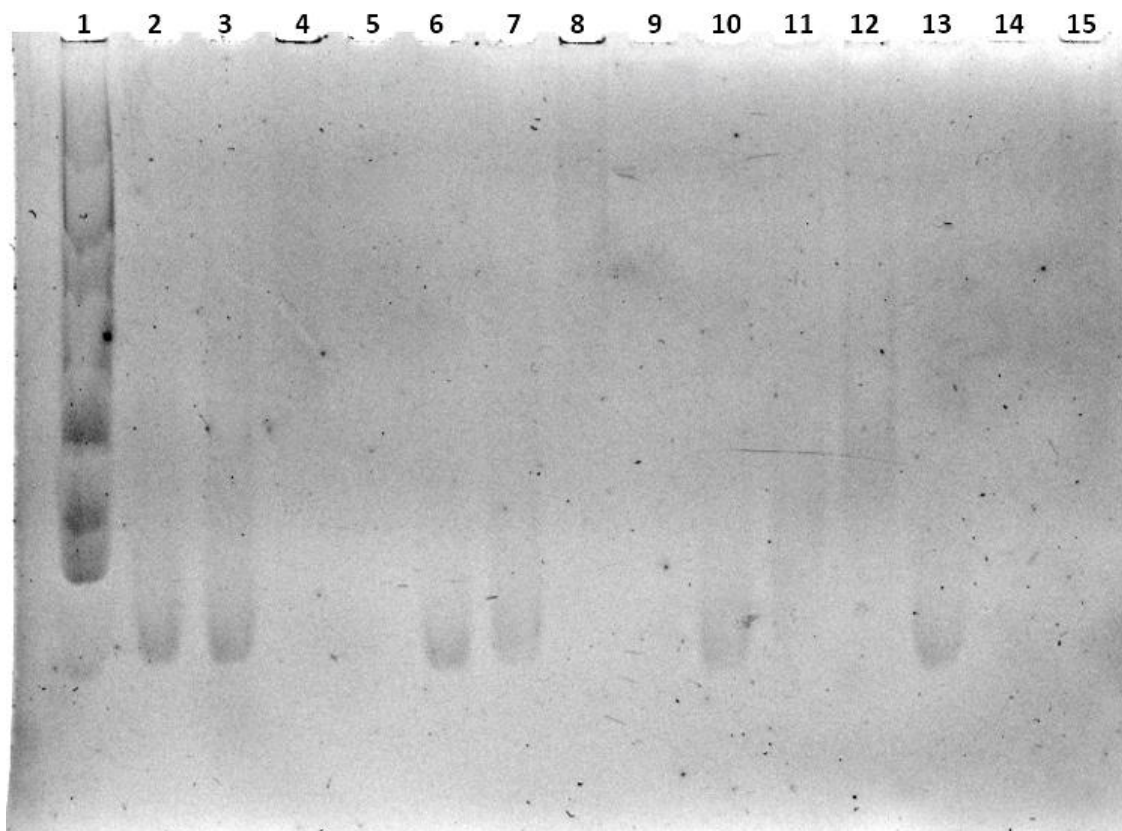


Rysunek 19. Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z pUC19 . Kolejność naniesionych próbek: ścieżka 1 Marker Lambda Ava, ścieżka 2, 6, 10, 14 pUC19 (50ng), ścieżka 3 LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1), ścieżka 4 LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1), ścieżka 5, 9, 12 puste ścieżki ścieżka 7 [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1), ścieżka 8 [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1), ścieżka 11 [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1), ścieżka 12 [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1), ścieżka 15 [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 : pUC19 (N/P = 1:1), ścieżka 16 [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 : pUC19 (N/P = 5:1).

2.2. Elektroforeza poliakrylamidowa

Dodatkowo z wykorzystaniem elektroforezy na żelu poliakrylamidowym określiłam zdolność tworzenia kompleksów zsyntetyzowanych peptydomimetyków z fragmentem dsDNA (76 pz).

Związki LL-37, [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 w kompleksie z dsDNA (76pz) przy N/P=1:1 wykazywały różnicę w ruchliwości elektroforetycznej względem samego dsDNA. Natomiast w przypadku stosunku N/P wynoszącego 5:1 możemy zauważyć, że powstające struktury osiągają tak duże rozmiary, że nie przemieszczają się w głąb żelu i pozostają w studziencie (Rys. 20).



Rysunek 20. Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z dsDNA (76pz). Kolejność naniesionych próbek:

ścieżka 1 Marker Lambda Ava,

ścieżka 2, 6, 10, 13 dsDNA (76pz),

ścieżka 3 LL-37 : dsDNA (N/P = 1:1), ścieżka 4 LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

ścieżka 5, 9 puste ścieżki

ścieżka 7 [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 8 [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

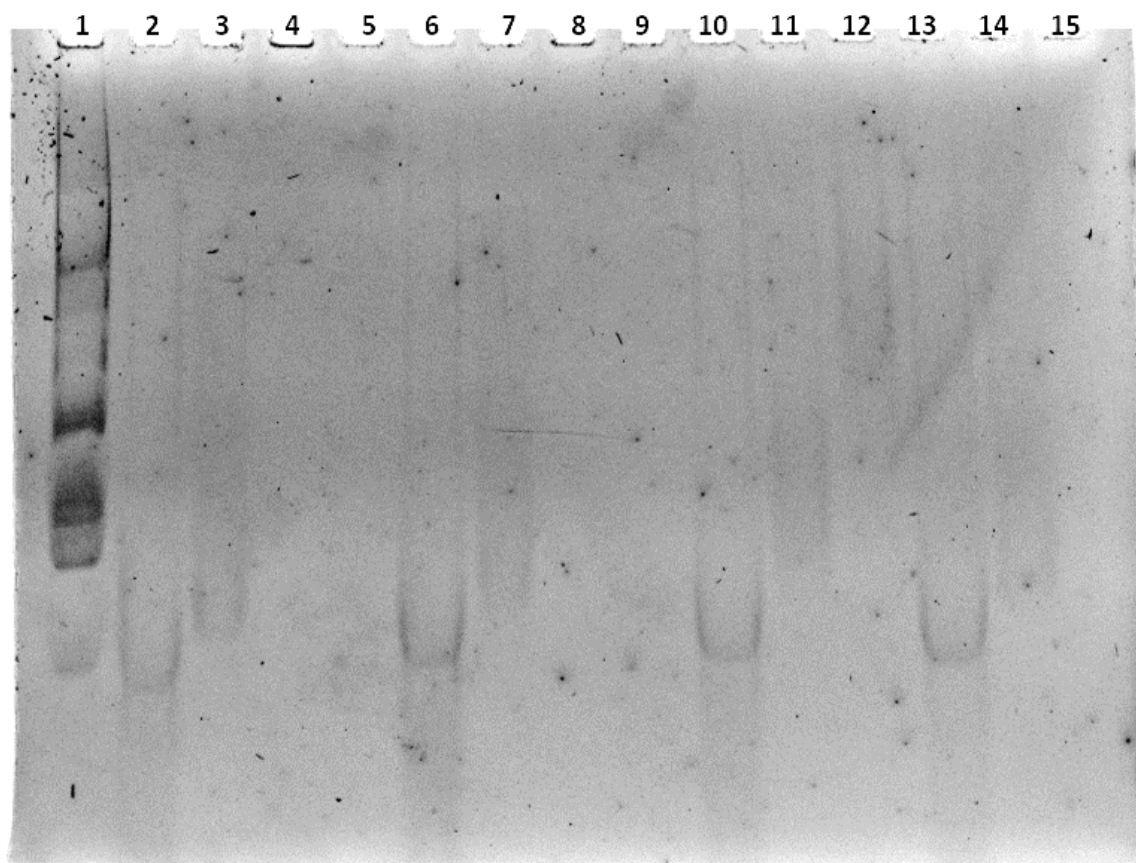
ścieżka 11 [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 12 [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

ścieżka 15 [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 16 [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1).

Kompleksy utworzone przy N/P= 5:1 (Rys. 21) nie wykazują mobilności elektroforetycznej, co sugeruje, że utworzone kompleksy są duże.—Może to być spowodowane również silniejszymi oddziaływaniami elektrostatycznymi lub hydrofobowymi z kwasem nukleinowym.



Rysunek 21. Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z dsDNA. Kolejność naniesionych próbek:

ścieżka 1 Marker Lambda Ava,

ścieżka 2, 6, 10, 13 dsDNA (76pz),

ścieżka 3 LL-37: dsDNA (N/P = 1:1), ścieżka 4 LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

ścieżka 5, 9 puste ścieżki

ścieżka 7 [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 8 [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

ścieżka 11 [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 12 [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1),

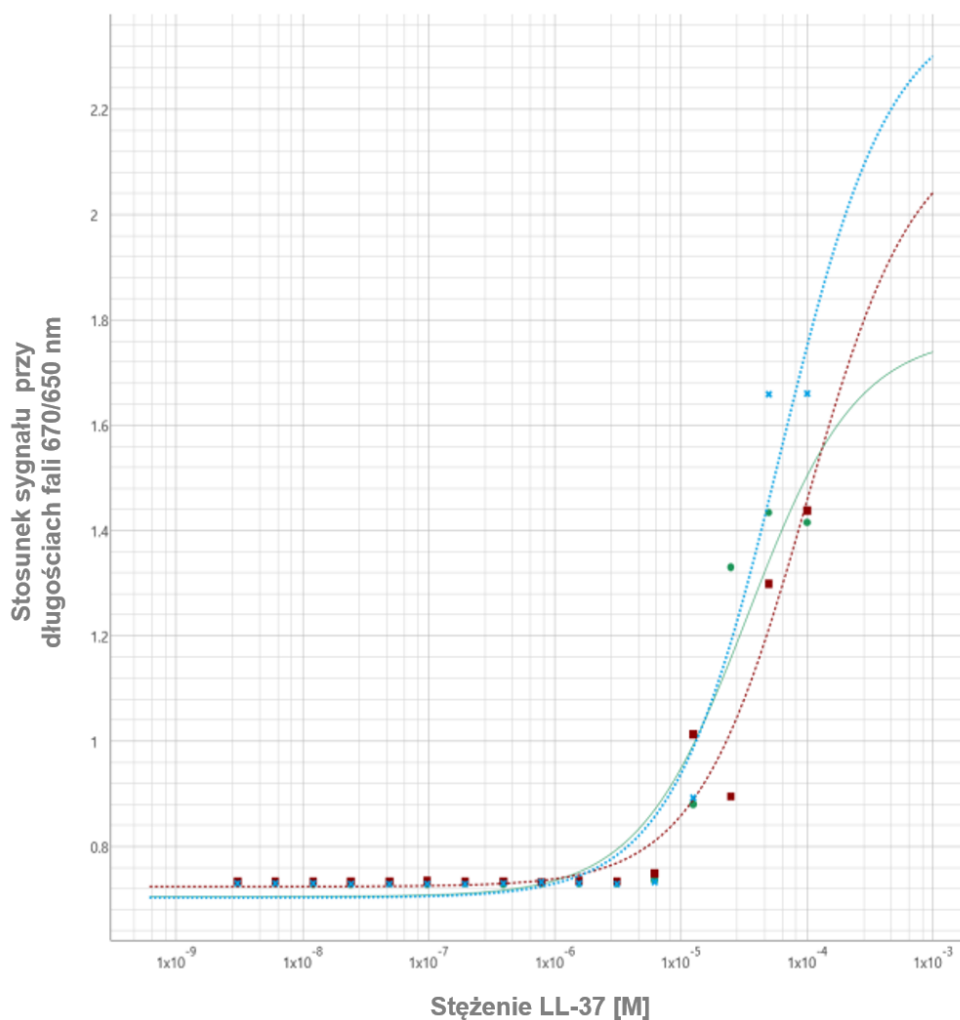
ścieżka 15 [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37: dsDNA (N/P = 1:1),

ścieżka 16 [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37: dsDNA (N/P = 5:1).

Elektroforegram umieszczony na rysunku 21 przedstawia migrację kompleksów utworzonych pomiędzy peptydomimetykami LL-37a dwuniciowy DNA (76 pz). Obserwowane przesunięcie prążków wskazuje na skuteczne wiązanie DNA przez analogi i formowanie stabilnych kompleksów. Zmniejszone przesunięcie świadczy o zwiększonych masach i zmianach w ładunku wynikających z interakcji.

2.3. Pomiary metodą termoforezy w mikroskali

W celu potwierdzenia zdolności peptydomimetyków do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi przeprowadziłam również pomiary z wykorzystaniem techniki termoforezy w mikroskali. Podjęłam próbę optymalizacji wyznaczania stałej K_d rozpoczynając od wymiany buforu pomiarowego: EDBS, PBS + 0,05 % TWEEN, PBS + 0,1 % Pluronic F-127, zmiana czasu inkubacji kompleksów (natychmiastowy pomiar, czas inkubacji wynoszący 1h), ostatecznie zmiana stężeń składowych kompleksów. Pomimo licznych prób optymalizacji warunków pomiarów, nie udało mi się wyznaczyć stałej wiązania K_d . Brak wiarygodnych wyników mógł być związany z niewystarczającą stabilnością tworzonych kompleksów lub zbyt niskim powinowactwem.



Rysunek 22. Wiązanie ludzkiej katelicydyny LL-37 ($C = 200 \mu M$) ze znakowaną fluorescencyjnie (Cy5) nicią dsDNA ($C = 100 nM$) uzyskane za pomocą techniki termoforezy w mikroskali. Zielona linia: $K_d = 33,8 \mu M$, czerwona linia: $K_d = 96,9 \mu M$, niebieska linia: $K_d = 62 \mu M$.

2.4. Pomiary AFM

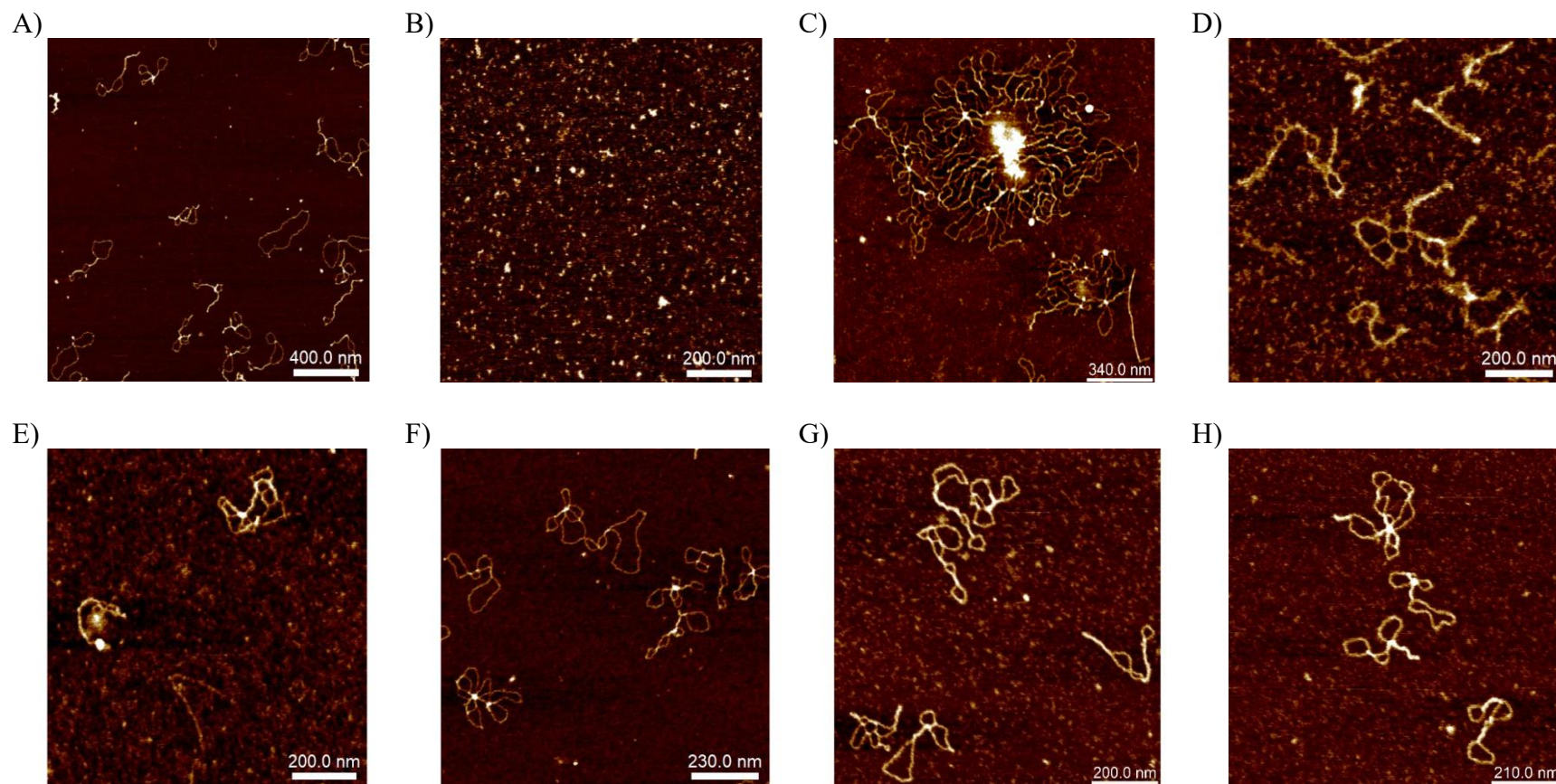
Poniżej przedstawiłam wyniki pomiarów AFM kompleksów DNA z wybranymi peptydomimetykami, które pozwoliły mi na ocenę ich struktury oraz sposobu wiązania. Dane uzyskane tą metodą pokazały zmiany morfologiczne w strukturze DNA, takie jak kondensacja, która zachodzi w wyniku interakcji z peptydomimetykami.

Zdjęcia zarejestrowane przy użyciu mikroskopu sił atomowych przedstawiają zróżnicowaną morfologię kompleksów (peptydomimetyk : pUC19) (Rys. 23).

AFM ukazuje zróżnicowaną morfologię kompleksów w zależności od zastosowanego związku. Struktura plazmidowego DNA wykazuje tendencję do lokalnego fałdowania i tworzenia struktur pętli, co potwierdza jego superzwiniętą topologię. W przypadku natywnego LL-37 oraz zsyntetyzowanych peptydomimetyków obserwowałam analogiczny obraz uzyskany z wykorzystaniem AFM (Rys. 23B).

Kompleks utworzony pomiędzy: LL-37 : pUC19 (875 nM: 5 nM) tworzy bardzo złożoną strukturę (Rys. 23C). Analiza topograficzna pokazuje nieregularną strukturę, co może świadczyć o dynamicznym charakterze oddziaływań. Widoczne są obszary o zwiększonej intensywności topograficznej, świadczące o kondensacji DNA pod wpływem peptydu. Pozostałe związki (Rys. 23D-I) tworzą zdecydowanie mniej złożone struktury z plazmidem pUC19 niż natywny LL-37.

Wyniki otrzymane z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych dowodzą, że modyfikacje wprowadzone w obrębie natywnej sekwencji LL-37 wpływają na strukturę, ładunek i właściwości hydrofilowe peptydomimetyków, co zmienia ich zdolność do oddziaływań z DNA. Wszystkie kompleksy tworzone przez zmodyfikowane analogi z pUC19 wykazują mniej złożoną morfologię w obrazach AFM, co może być związane z inną dynamikę oddziaływań i potencjalnie inny mechanizm stabilizacji tych kompleksów.

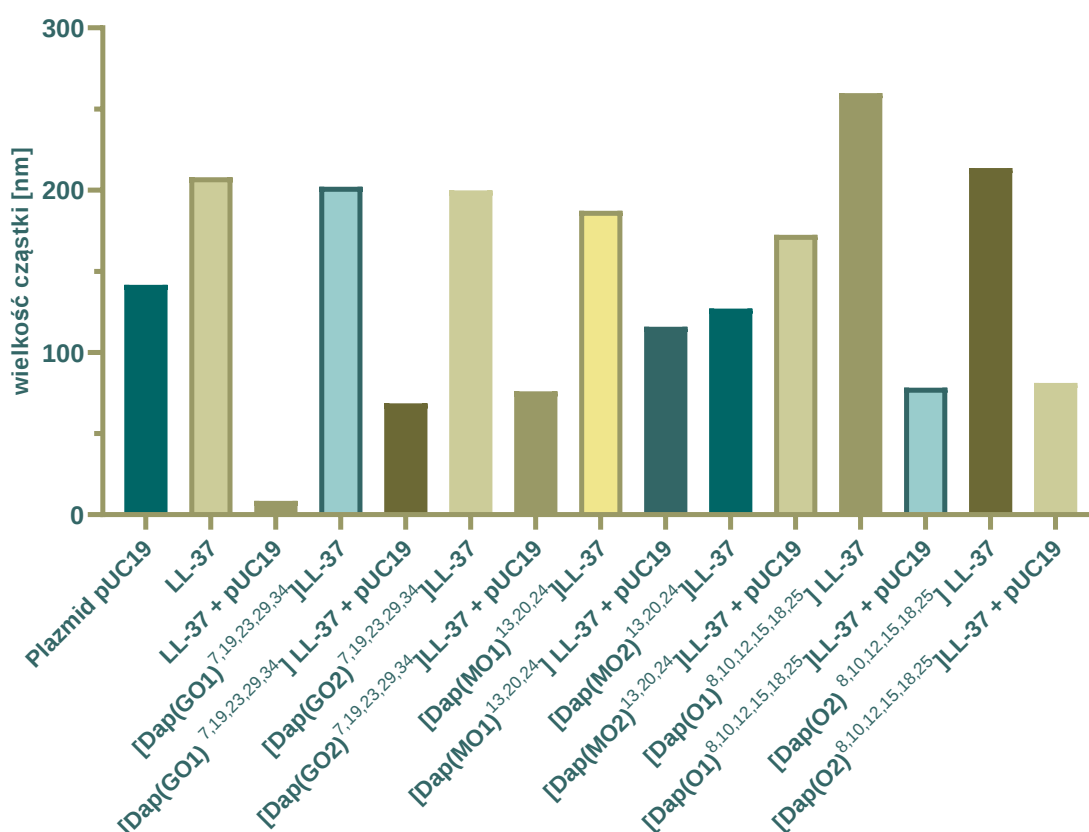


Rysunek 23. Zdjęcia z mikroskopu sił atomowych AFM: A) 5 nM DNA - 2 μ m, B) 875 nM LL-37 - 1 μ m, C) 5 nM DNA + 875 nM LL-37 - 1 μ m, D) 5 nM DNA + 4.375 μ M peptyd [Dap(GO1)]^{7,19,23,29,34}LL-37 - 1 μ m, E) 5 nM DNA + 4.375 μ M [Dap(GO2)]^{7,19,23,29,34}LL-37 - 1 μ m, F) 5 nM DNA - 875 nM [Dap(MO1)]^{13,20,24}LL-37 - 1 μ m, G) 5 nM DNA - 875 nM [Dap(O1)]^{8,10,12,15,18,25}LL-37 - 1 μ m, H) 5 nM DNA - 875 nM [Dap(O2)]^{8,10,12,15,18,25}LL-37 - 1 μ m.

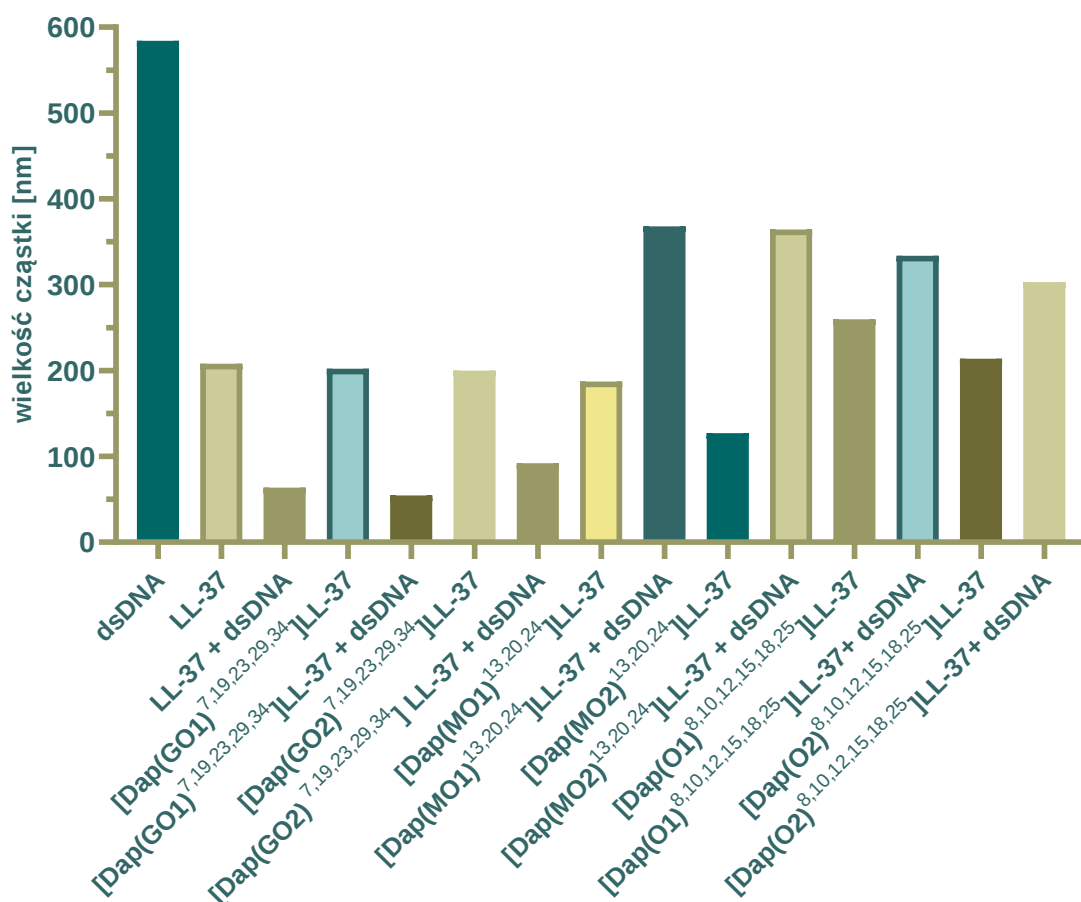
2.5. Pomiary z wykorzystaniem dynamicznego rozproszenia światła DLS

Technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS) umożliwia analizę wielkości cząstek i ich agregatów w roztworach, opierając się na pomiarze fluktuacji intensywności światła rozpraszanego przez cząstki poruszające się w roztworze. W przypadku peptydomimetyków metoda ta dostarcza informacji o ich właściwościach fizykochemicznych, takich jak średni rozmiar cząstek, polidispersyjność oraz stopień agregacji w różnych warunkach środowiskowych. Badanie z wykorzystaniem techniki DLS do analizy interakcji peptydomimetyków z plazmidowym DNA (pUC19) oraz fragmentem DNA o 76 parach zasad. Uzyskane wyniki przedstawiłam na wykresach zamieszczonych poniżej (Rys. 24).

A)



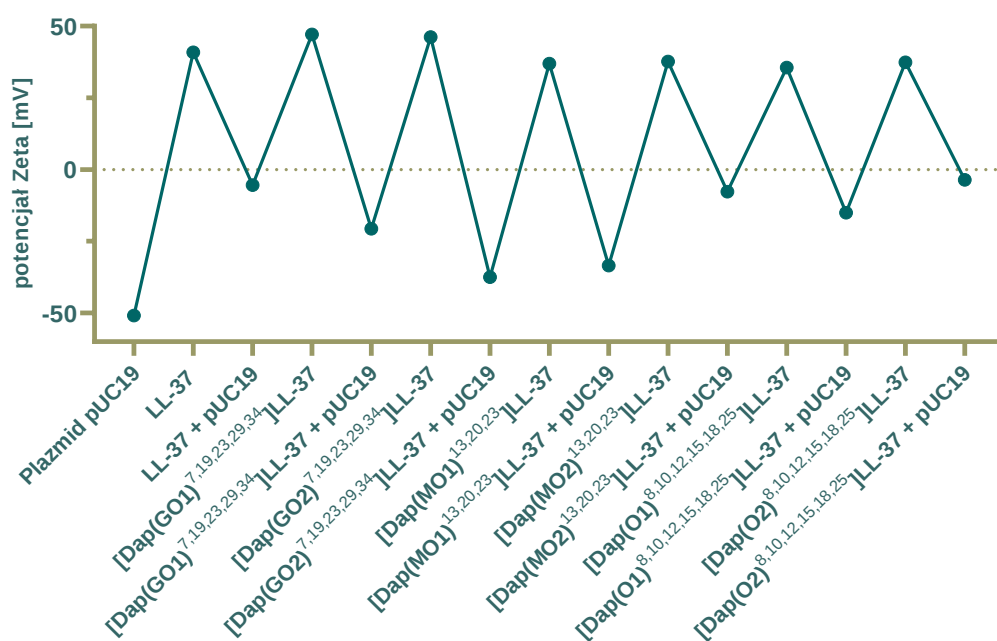
B)



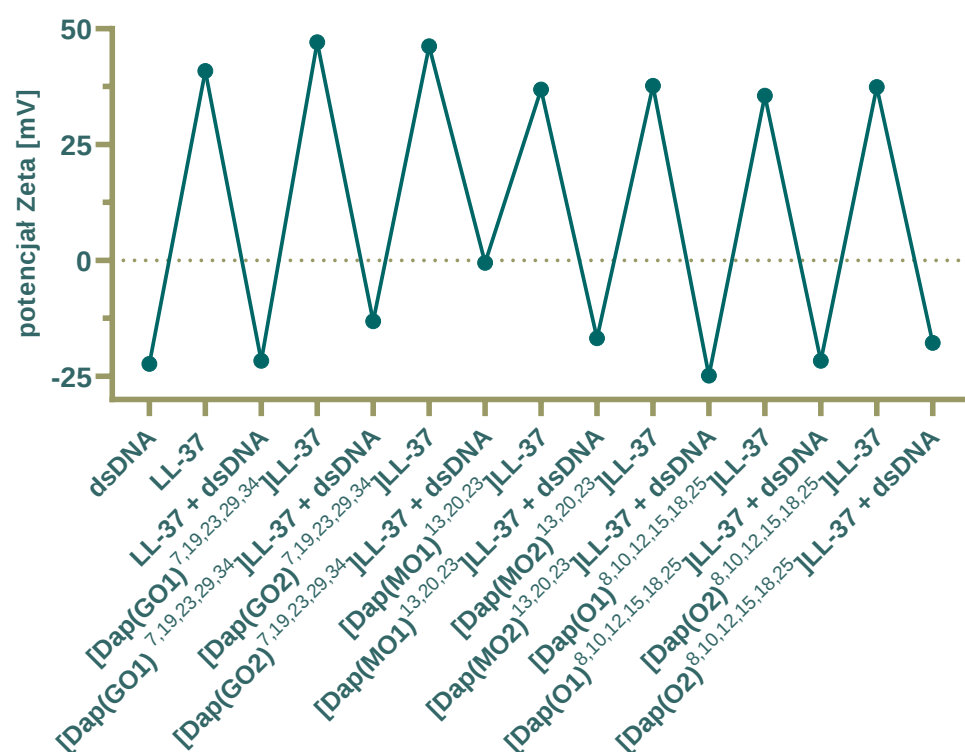
Rysunek 24. Wyniki DLS peptydomimetyków i ich kompleksów A) z plazmidem pUC19, B) z dsDNA (76pz).

Dodatkowo przeprowadziłam analizę zmiany potencjału zeta dla peptydomimetyków oraz tworzonych kompleksów z pUC19 (Rys. 25A) i dsDNA (Rys. 25B). Wzrost potencjału zeta może oznaczać większą stabilność cząsteczek w roztworze, podczas gdy zmniejszenie tego potencjału może wskazywać na tendencję do agregacji. Ponadto w tabeli 8 zestawiałam dane uzyskane podczas analiz.

A)



B)



Rysunek 25. Potencjał zeta peptydomimetyków i ich kompleksów A) z pUC19, B) z dsDNA.

Tabela 8. Średnice hydrodynamiczne i wskaźniki polidispersyjności (PDI) analogów ludzkiej katelicydyny i ich kompleksów z plazmidem pUC19 lub dsDNA. 76 pz.

	<i>Sekwencja</i>	<i>Peptydomimetyk</i>		<i>+ pUC19</i>		<i>+ dsDNA (76 pz)</i>	
		Promień hydrodynamiczny [nm]	PDI [%]	Promień hydrodynamiczny [nm]	PDI [%]	Promień hydrodynamiczny [nm]	PDI [%]
	pUC19	-	-	141,72 ± 7,24	21,46 ± 2,65	-	-
	dsDNA (76pz)	-	-	-	-	584,10 ± 14,25	29,43 ± 3,12
1	LL-37	208,03 ± 12,66	20,42 ± 1,41	8,55 ± 0,50	23,56 ± 2,68	63,79 ± 4,81	21,48 ± 2,14
2a	[Dap(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37	202,15 ± 6,40	25,48 ± 2,98	68,58 ± 4,73	23,41 ± 1,78	54,66 ± 6,56	25,14 ± 1,85
2b	[Dap(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37	199,92 ± 1,96	27,78 ± 1,51	76,01 ± 9,01	26,6 ± 1,11	92, 01 ± 4,78	26,42 ± 2,16
3a	[Dap(MO1) ^{13,20,24}]LL-37	187,33 ± 7,35	23,46 ± 2,39	115,83 ± 10,37	26,48 ± 3,1	368, 04 ± 14,33	22,65 ± 3,01
3b	[Dap(MO2) ^{13,20,24}]LL-37	127,09 ± 9,62	24,17 ± 2,29	172,51 ± 8,78	22,12 ± 1,06	364,51 ± 9,88	19,68 ± 1,45
4a	[Dap(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37	159,73 ± 17,23	22,68 ± 1,29	78,19 ± 3,58	26,8 ± 1,13	333,73 ± 6,60	23,58 ± 2,36
4b	[Dap(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37	213,68 ± 8,59	26,45 ± 1,68	81,13 ± 14,21	18,58 ± 1,48	303,05 ± 12,94	19,69 ± 1,87

Ludzka katelicydyna LL-37, wykazuje silne zdolności do wiązania dsDNA (76 pz) i plazmidowego DNA. Spadek wielkości kompleksów utworzonych pomiędzy peptydomimetykami a pUC19 jest bardziej wyraźny niż dla liniowego DNA, co może wskazywać na specyficzną interakcję LL-37 ze strukturą superzwiniętą DNA. LL-37 może powodować przejście DNA do bardziej zwartej struktury, co jest zgodne z jego znanym działaniem jako peptydu o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i zdolności do upakowania kwasów nukleinowych. Podsumowując wyniki przedstawione na rysunkach 24 i 25 dowodzą, że natywny LL-37 najskuteczniej oddziałuje z DNA, zarówno liniowym, jak i plazmidowym. Analog [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 zachowuje skuteczność zbliżoną do natywnej katelicydyny natomiast [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 wykazuje osłabioną zdolności do kondensacji pUC19. Związki [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 i [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 tworzą większe agregaty, a ich wpływ na wartość potencjałów zeta tworzonych kompleksów sugeruje słabszą neutralizację ładunku. Natomiast analogi [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 wykazują umiarkowane powinowactwo do DNA. Dodatkowo potencjał zeta wszystkich analogów jest dodatni, co potwierdza ich kationowy charakter.

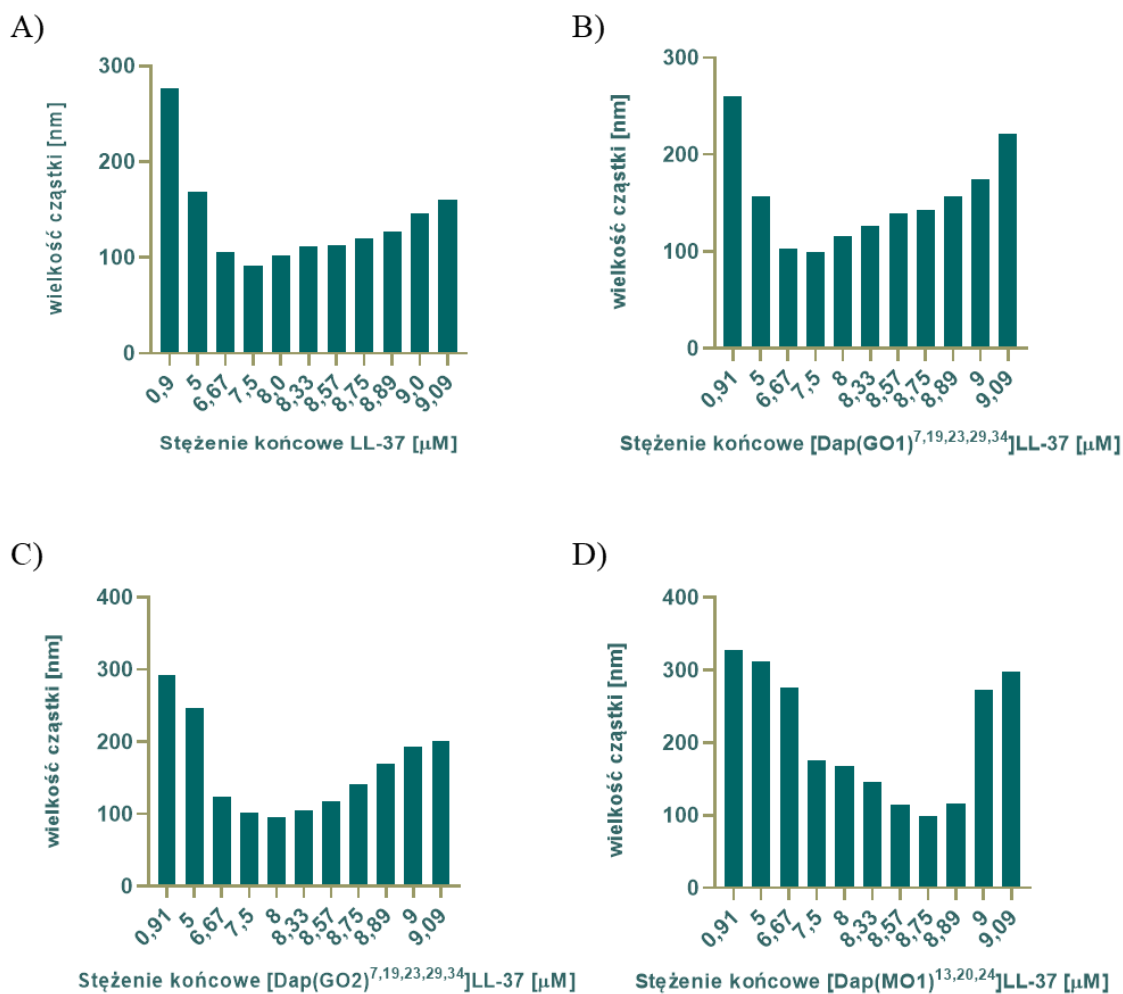
M. Craig i współpracownicy analizowali wielkość i strukturę kompleksów utworzonych pomiędzy LL-37 i oligonukleotydami DNA. W pracy tej przedstawiono szczegółowe dane dotyczące stałych dysocjacji oraz stosunków molowych w kompleksach LL-37: DNA. Uzyskane dane, dowodzą, że stała dysocjacji $K_d=10^{-8}$ M kompleksów LL-37: DNA wskazują na silne powinowactwo peptydu do kwasu nukleinowego. Wzrost stężenia ludzkiej katelicydyny powodował tworzenie większy i stabilniejszych agregatów co można uznać za potwierdzenie stopnia uporządkowania struktur kompleksów. Dodatkowo, badanie te opisują strukturę LL-37 oraz jego zdolność do oligomeryzacji i tworzenia kanałów w błonach lipidowych, głównie tych o ujemnym ładunku. Autorzy dowiedli, że stabilności kompleksów jest uzależniona od sekwencji oraz długości oligonukleotydów. Ponadto oddziaływanie LL-37 z błonami komórkowymi, co może mieć wpływ na tworzenie kompleksów z DNA. Ludzka katelicydyna ze względu na swój kationowy charakter, wykazuje wysokie powinowactwo do anionowych składników błon biologicznych, takich jak fosfatydyloglicerol czy fosfatydyloseryna. Oddziaływania te są ściśle związane z jego właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Obecność błon komórkowych lub ich

składników może tym samym prowadzić do konkurencyjnego wiązania LL-37 ograniczając jego zdolność do wiązania kwasów nukleinowych [142].

Dodatkowo przeprowadziłam analizę metodą DLS wpływu stężenia LL-37 i jego analogów na rozmiar kompleksów z dsDNA (76pz) (Rys. 26).

W przypadku kompleksów tworzonych pomiędzy LL-37: dsDNA oraz [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA zwiększenie stężeń peptydów w kompleksach do $C=7,5 \mu\text{M}$ powoduje zmniejszenie rozmiaru tworzonych struktur (Rys. 26A-B). Wskazuje to na stopniową kondensację dsDNA (76 pz) poprzez neutralizację jego ujemnego ładunku przez dodatnio naładowane reszty LL-37 i omawianego analogu. W związku z tym maksymalne upakowanie dsDNA obserwowałam przy stężeniu wynoszącym $7,5 \mu\text{M}$ w obu tych przypadkach. Dalsze zwiększanie stężenia w kompleksie ($C_{\text{końcowe}}=8-9,09 \mu\text{M}$) powoduje ponowny wzrost rozmiaru analizowanych struktur, co może sugerować, że nadmiar peptydomimetyku prowadzi do powstawania większych kompleksów lub ich agregacji. Powiększenie średnicy cząstek może być spowodowane oddziaływaniami hydrofobowymi i występowaniem mostków solnych. Liczne dane literaturowe sugerowały, że oligomeryzacja peptydu α -helikalnego LL-37 zachodzi w roztworze na skutek efektu Hofmeistera lub oddziaływań między aromatycznymi łańcuchami bocznymi reszt Phe⁵ i Phe⁶. Wyniki grupy badawczej Shahmiri M. dowodzą, że dominujący mechanizm agregacji może być związany z tworzeniem stabilizujących strukturę mostków solnych, a nie wymienione wcześniej oddziaływania [143].

Rozmiar kompleksu utworzonego pomiędzy [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA przy stężeniu $8 \mu\text{M}$ wynosi $95,44 \text{ nm}$ (Rys. 26C). Natomiast w przypadku analogu [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 poziom maksymalnej kondensacji pojawia się przy zdecydowanie wyższym stężeniu niż względem natywnej LL-37 bo przy wartości $8,75 \mu\text{M}$ (Rys. 26D). W przypadku dwóch analogów dalsze zwiększanie stężenia prowadzi do wzrostu średnicy cząstki, analogicznie do wcześniejszych obserwacji, co wskazuje na zachodzącą agregację kompleksów peptydowo-DNA zamiast dalszego ich upakowywania w bardziej zwartą strukturę. Dodatkowo możliwe, że w układzie pojawiają się efekty elektrostatyczne prowadzące do reagregacji.



Rysunek 26. Zależność wielkości kompleksu od stężenia peptydomimetyków A) LL-37: dsDNA, B) [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA, C) [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA, D) [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37: dsDNA [μM].

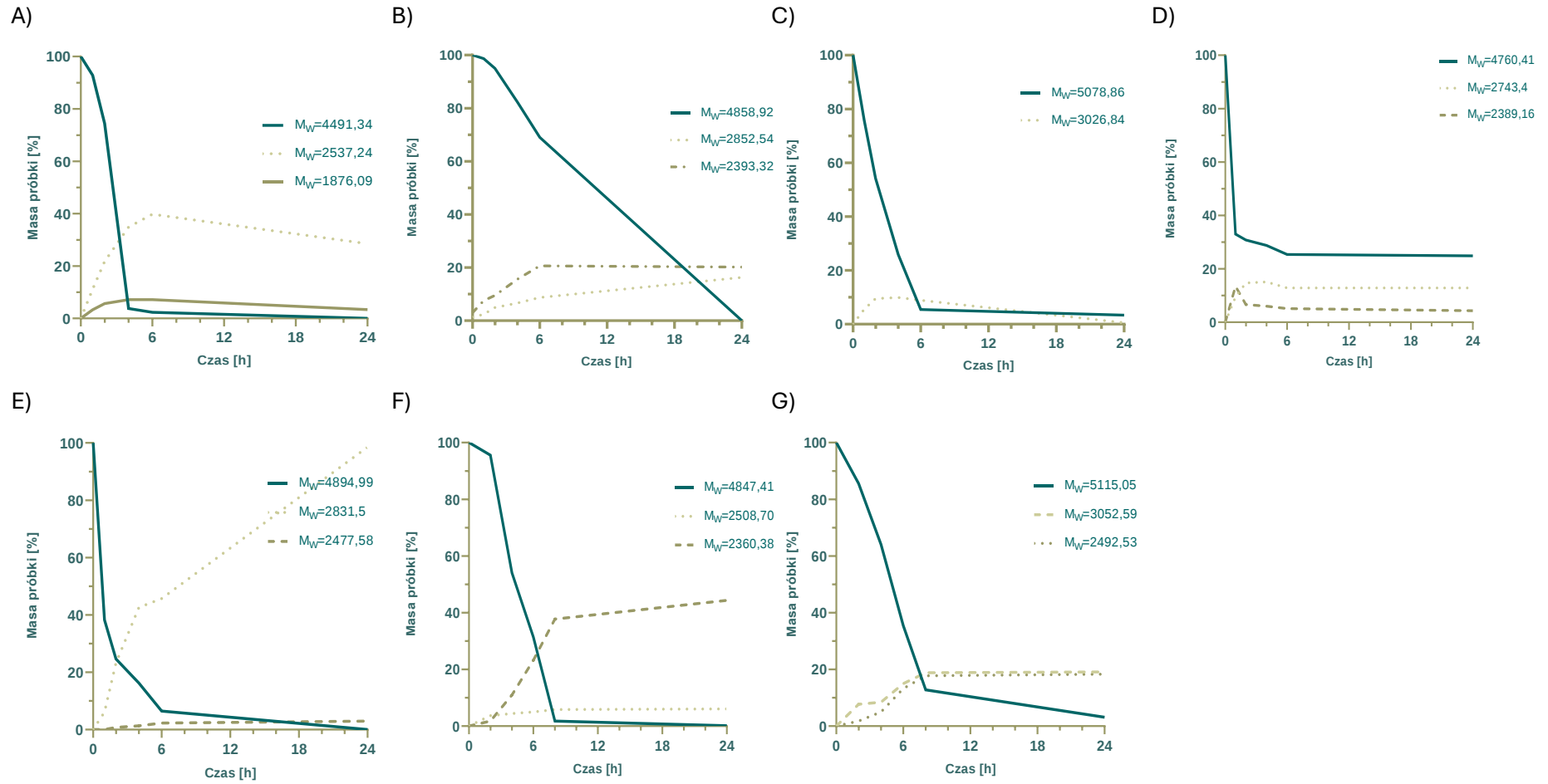
Analiza wpływu stężenia analogów [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 i [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 w kompleksie z dsDNA nie powiodła się, ponieważ próbki uległy agregacji na początkowym etapie badania.

3. Ocena podatności na proteolizę zsyntetyzowanych analogów z wykorzystaniem techniki LC-MS

Peptydomimetyki to syntetyczne związki chemiczne zaprojektowane tak, aby zachowywały strukturę i funkcję naturalnych peptydów. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę podatności na proteolizę otrzymanych związków oraz natywnego LL-37 w obecności ludzkiej neutrofilnej proteinazy 3 (PR3).

3.1. Krzywe zaniku

Krzywą zaniku natywnej cząsteczki ludzkiej katelicydyny w obecności PR3 przedstawiłam na Rys. 27A. Zależność obrazuje zawartość procentową natywnej ludzkiej katelicydyny LL-37 w buforze zawierającym PR3. Krzywa oznaczona jako $M_w = 4491,34$ g/mol obrazuje spadek stężenia LL-37 przez pierwsze 4 godziny inkubacji, co wskazuje na hydrolizę LL-37 przez PR3. W 4 godzinie hydrolizy w układzie pozostaje poniżej 5 % niehydrolizowanego LL-37 (Rys. 27A). Fragment LL-37 o $M_w = 2537,24$ g/mol początkowo o niskim stężeniu w analizowanej mieszaninie, po kilku godzinach wzrasta do około 40 %, co sugeruje akumulację produktu degradacji. Krzywa odpowiadająca fragmentowi LL-37 o $M_w = 2183,92$ g/mol stopniowo wzrasta w pierwszych godzinach i następnie ulega stabilizacji, co może wskazywać na trwały produkt hydrolizy.



Rysunek 27. Krzywe zaniku otrzymane w wyniku proteolizy PR3: A) LL-37, czas połowicznego rozpadu $T_{\frac{1}{2}}$ dla natywnej ludzkiej katelicydyny $T_{\frac{1}{2}} = 130,2$ min, B) $[Dap(GO1)]^{7,19,23,29,34}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 740,4$ min, C) $[Dap(GO2)]^{7,19,23,29,34}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 120,4$ min, D) $[Dap(MO1)]^{13,20,24}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 16,47$ min, E) $[Dap(MO2)]^{13,20,24}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 44,41$ min, F) $[Dap(O1)]^{8,10,12,15,18,25}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 242,31$ min, G) $[Dap(O2)]^{8,10,12,15,18,25}$ LL-37, $T_{\frac{1}{2}} = 306,21$ min.

Hydroliza enzymatyczna przez PR3 LL-37 zachodziła w pozycji Val²¹. Otrzymane fragmenty posiadały masy molowe: $M_w=2537,24$ g/mol oraz drugi $M_w= 1971,09$ g/mol. Dodatkowo PR3 hydrolizowała LL-37 w pozycjach Ile¹³ oraz Leu²⁸ tworząc fragment o sekwencji: GKEFKRIVQRIKDFL ($M_w= 1876,09$ g/mol) oraz dwa pozostałe o sekwencji: LLGDFFRKSKEKI ($M_w= 1580,89$ g/mol), RNLVPRTES ($M_w= 1071,20$ g/mol).



W przypadku procesu hydrolizy analogu [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 przez proteinazę 3 krzywa zaniku ($M_w = 4858,92$ g/mol) to stopniowy, liniowy spadek masy peptydomimetyku w czasie 24 godzin (Rys. 27B). W przeciwieństwie do LL-37, ta degradacja nie jest gwałtowna, lecz bardziej równomierna. Stężenie obu produktów hydrolizy rośnie w czasie do 6 godziny. Wprowadzone modyfikacje wpływają na podatność na hydrolizę przez PR3. Wolniejszy rozkład analogu może wydłużać jego czas działania w warunkach biologicznych, co może być korzystne w kontekście terapeutycznym. Analog [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 również uległ proteolizie w pozycjach: Val²¹ jednak masa się różni ze względu na wprowadzone modyfikacje $M_w= 2852,54$ g/mol oraz $M_w= 2393,32$ g/mol.

Hydroliza [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 w porównaniu do analogu [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 przebiega zdecydowanie szybciej to znaczy, że peptydomimetyk posiada mniejszą stabilność (Rys. 27C). Krzywa zaniku odpowiadająca $M_w = 5078,86$ g/mol, niehydrolizowanego analogu wykazuje gwałtowny spadek przez pierwsze 6 godzin a następnie się stabilizuje. Powstałe fragmenty ulegają dalszemu procesowaniu przez enzym. Peptydomimetyk [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 ulega proteolizie do fragmentu: $M_w= 3026,84$ g/mol jednak w roztworze nie występuje drugi fragment.

Peptydomimetyk [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37 jest częściowo odporny na hydrolizę przez PR3 (Rys. 27D). Krzywa zaniku odpowiadająca $M_w = 4760,41$ g/mol gwałtownie spada przez pierwszą godzinę a następnie ulega stabilizacji. Ponownie miejsce hydrolizy

analogu to Val²¹ a powstałe fragmenty posiadają następujące $M_w = 2743,4$ g/mol oraz $M_w = 2389,16$ g/mol.

Proteoliza [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 przebiega w pierwszych 2 godzinach od dodania enzymu - krzywa zaniku $M_w = 4894,99$ g/mol (Rys. 27E). Pod wpływem PR3 powstają dwa fragmenty o masach: $M_w = 2831,5$ g/mol i $M_w = 2477,58$ g/mol.

W przypadku krzywej odpowiadającej $M_w = 2831,5$ g/mol obserwujemy wzrost intensywności, co może oznaczać, że jest to końcowy, stabilny produkt degradacji. Stężenie drugiego fragmentu w analizowanej mieszaninie wzrasta do 6h, a następnie stabilizuje się, co może oznaczać, że jest to produkt pośredni, który ulega częściowej degradacji, ale w pewnym momencie jego ilość pozostaje stała.

Krzywa niehydrolizowanego analogu [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 o masie $M_w = 4847,41$ g/mol maleje w ciągu pierwszych 8 godzin inkubacji. W przypadku powstającego fragmentu o $M_w = 2508,70$ g/mol jego stężenie rośnie, a następnie stabilizuje się. Miejsce cięcia występuje w tym samym miejscu a fragmenty powstałe po hydrolizie enzymatycznej mają masy: $M_w = 2832,34$ g/mol oraz $M_w = 2360,38$ g/mol (Rys 27F). Stężenie [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, któremu odpowiada krzywa zaniku o masie $M_w = 5115,05$ g/mol maleje w ciągu pierwszych 8 godzin od dodania enzymu. W miarę postępującej hydrolizy powstają dwa nowe produkty o masach $M_w = 3052,59$ g/mol i $M_w = 2492,53$ g/mol (Rys. 27G) (tabela 9).

Tabela 9. Masy cząsteczkowe peptydomimetyków, ich fragmentów oraz ich czasy połowicznego rozpadu określone techniką LC-MS.

Masa analogu	Masa fragmentu 1	Masa fragmentu 2	Czas połowicznego rozpadu $T_{\frac{1}{2}}$ [min]
LL-37			
4491,34	2537,24	2183,32	130,2
[Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37			
4858,92	2852,54	2393,32	740,4
[Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37			
5078,86	3026,32	-	120,4
[Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37			
4760,41	2743,4	2389,16	16,47
[Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37			
4894,99	2831,5	2477,58	44,41
[Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37			
4847,41	2832,24	2360,38	242,31
[Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37			
5115,05	3052,59	2492,53	306,21

3.2. Podatność analogów na reakcje deiminacji z wykorzystaniem enzymów PAD2 i PAD4

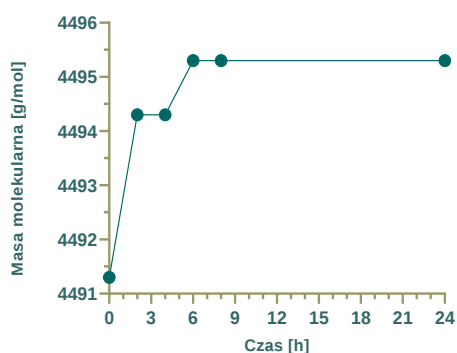
Deiminazy peptydyloargininowe (PAD) są enzymami należącymi do rodziny hydrolaz, które katalizują proces deiminacji reszt argininy w białkach. Proces ten polega na przekształceniu argininy w cytrulinę w wyniku eliminacji grupy guanidynowej i wprowadzenia grupy karbonylowej. Analiza LC-MS analogów [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 i [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 wykonana po inkubacji z enzymami PAD2 lub PAD4 umożliwiła mi określenie podatności na reakcję deiminacji (tabela 10 i 11).

Tabela 10. Wyniki uzyskane podczas deiminacji z wykorzystaniem PAD2 natywnej katelicydyny oraz peptydomimetyków.

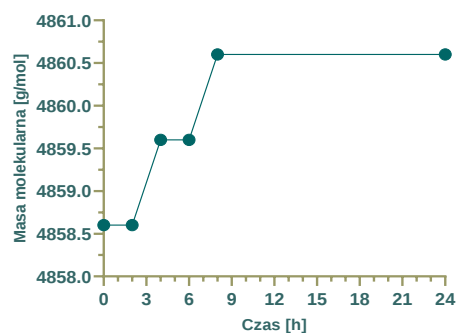
Czas inkubacji [h]	Masa molowa związku po inkubacji z PAD2		
	LL-37 [g/mol]	[Dap(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 [g/mol]	[Dap(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 [g/mol]
0	4491,3	4858,60	5078,60
2	4494,3	4858,60	5078,60
4	4494,3	4859,60	5078,60
6	4495,3	4859,60	5079,60
8	4495,3	4860,60	5079,60
24	4495,3	4860,60	5079,60

Uzyskane wyniki dowodzą, że wprowadzone modyfikacje w obrębie ludzkiej katelicydyny LL-37 zwiększyły odporność otrzymanych analogów na reakcję deiminacji w obecności enzymów PAD2 i PAD4. Grupy guanidynowe w analogu [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 zostają przekształcone w ugrupowanie karbamoilowe dopiero po 4h. [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37, wykazuje jeszcze wyższą odporność i omawiane przekształcenie obserwujemy dopiero po 6 h (Rys. 28 i 29 A-C).

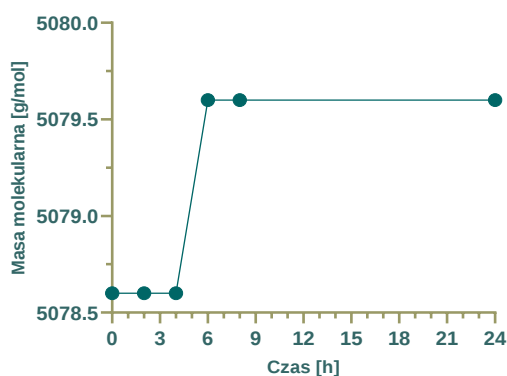
A)



B)



C)

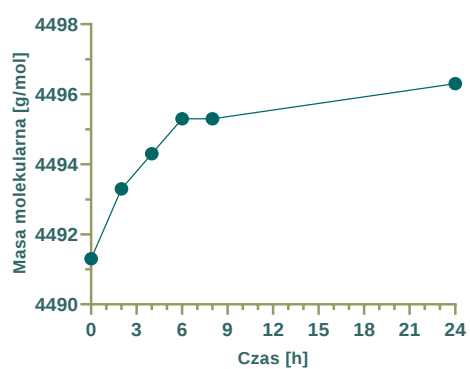


Rysunek 28. Podatność A) natywnego LL-37, B) $[Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37$, C) $[Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37$ na reakcję deiminacji w obecności enzymu PAD2.

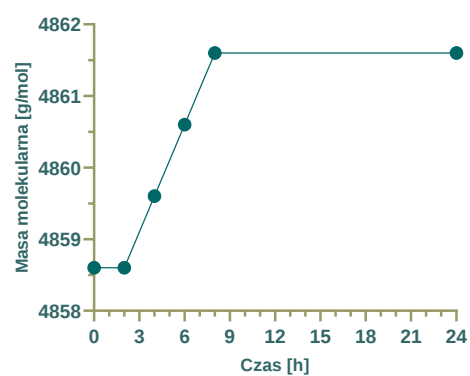
Tabela 11. Wyniki uzyskane podczas deiminacji z wykorzystaniem PAD4 natywnej katelicydyny oraz peptydomimetyków.

Czas inkubacji [h]	Masa molowa związku po inkubacji z PAD4		
	LL-37 [g/mol]	$[Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37$ [g/mol]	$[Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37$ [g/mol]
0	4491,3	4858,60	5078,60
2	4494,3	4858,60	5078,60
4	4494,3	4859,60	5078,60
6	4495,3	4859,60	5079,60
8	4495,3	4860,60	5079,60
24	4495,3	4860,60	5079,60

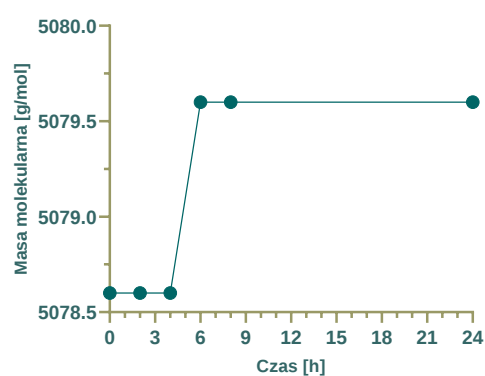
A)



B)



C)



Rysunek 29. Podatność A) natywnego LL-37, B) $[Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37$, C) $[Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37$ na reakcję deiminacji w obecności enzymu PAD4.

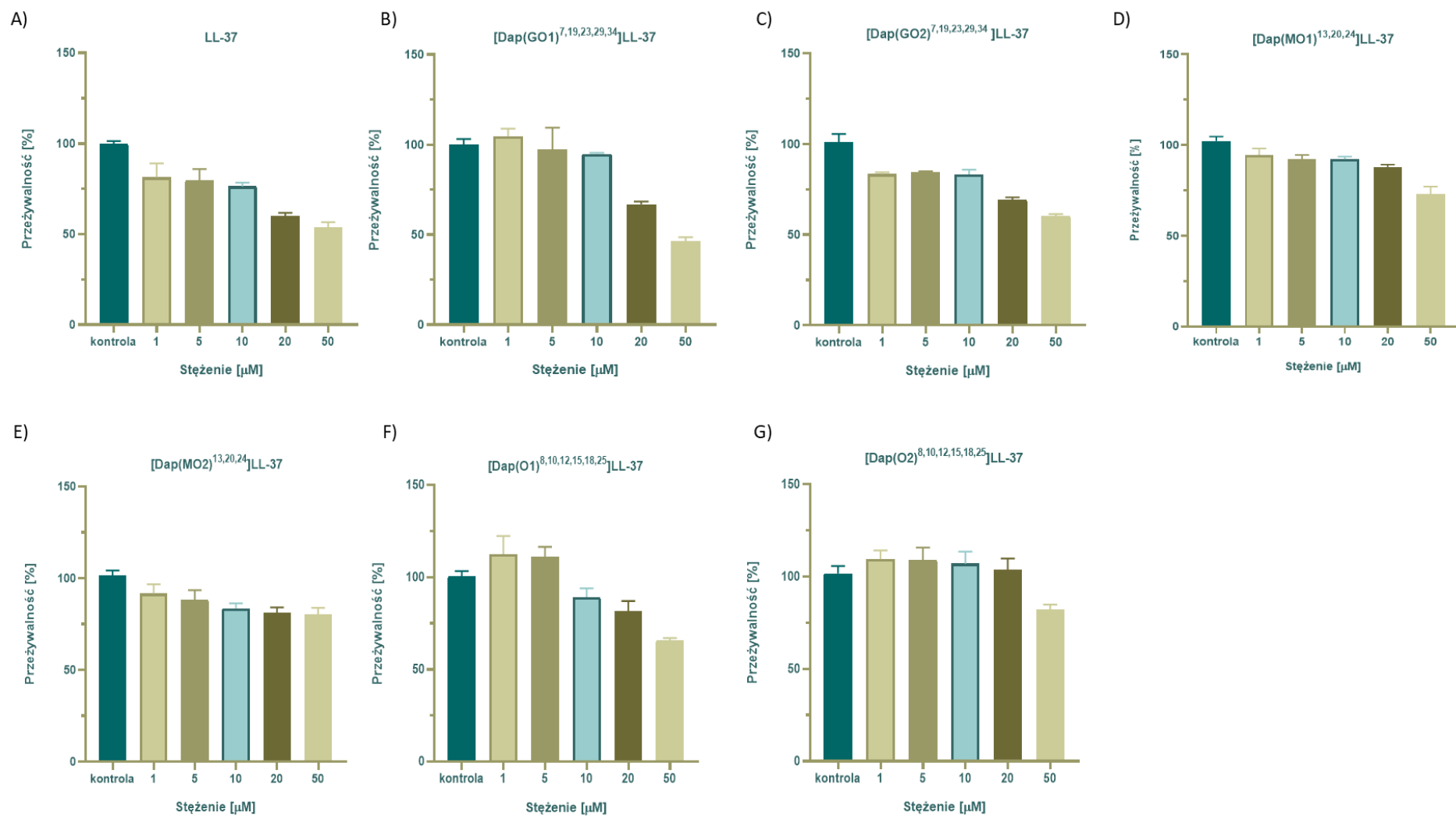
4. Cytotoksyczność peptydomimetyków względem linii komórkowych

Wszystkie uzyskane wyniki dowodzą, że zarówno natywna ludzka katelicydyna LL-37 oraz jej analogi nie wykazują cytotoksyczności wobec komórek linii HDFa w zakresie stężeń 1-10 μM (Rys. 30A-D). W przypadku [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 nie obserwujemy toksyczności w pełnym zakresie analizowanych stężeń 1- 50 μM .

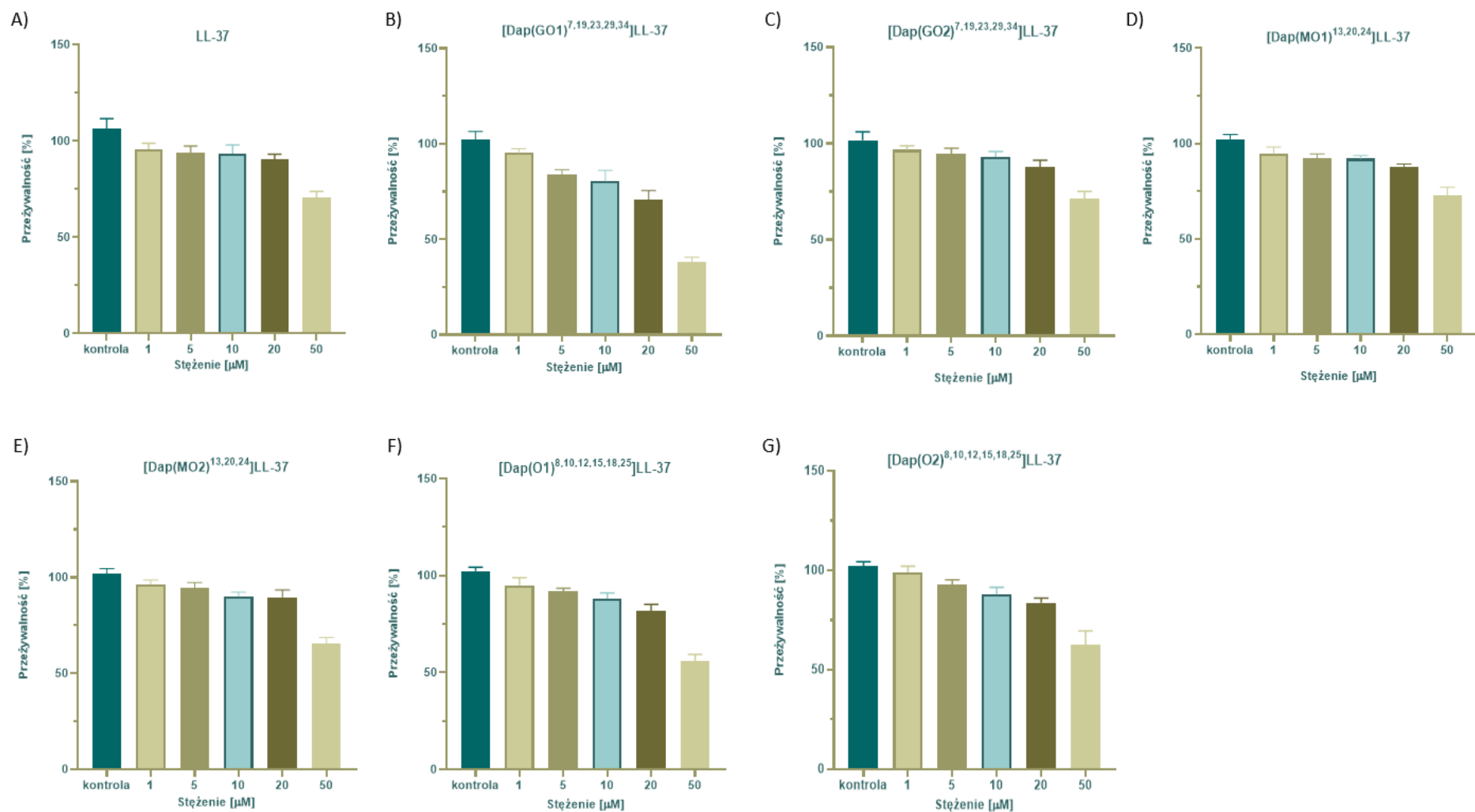
Dla linii komórkowej CRL-1472, ludzkich komórek nowotworowych nabłonka pęcherza moczowego, III stadium nowotwora, wyniki testu MTT wskazują na brak właściwości toksycznych w zakresie od 1 do 20 μM (Rys. 31D-G). W przypadku LL-37, [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 oraz [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 są one nietoksyczne w zakresie 1-10 μM (Rys. 31A-C), natomiast przy stężeniu 50 μM badane peptydomimetyki wykazują cytotoksyczne działanie na komórki nabłonkowe (Rys. 31A-G).

W przypadku linii komórkowej HB2 (ludzkie komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego) analizowane związki (Rys. 32A-G) nie wykazywały cytotoksyczności w zakresie stężeń 1-20 μM .

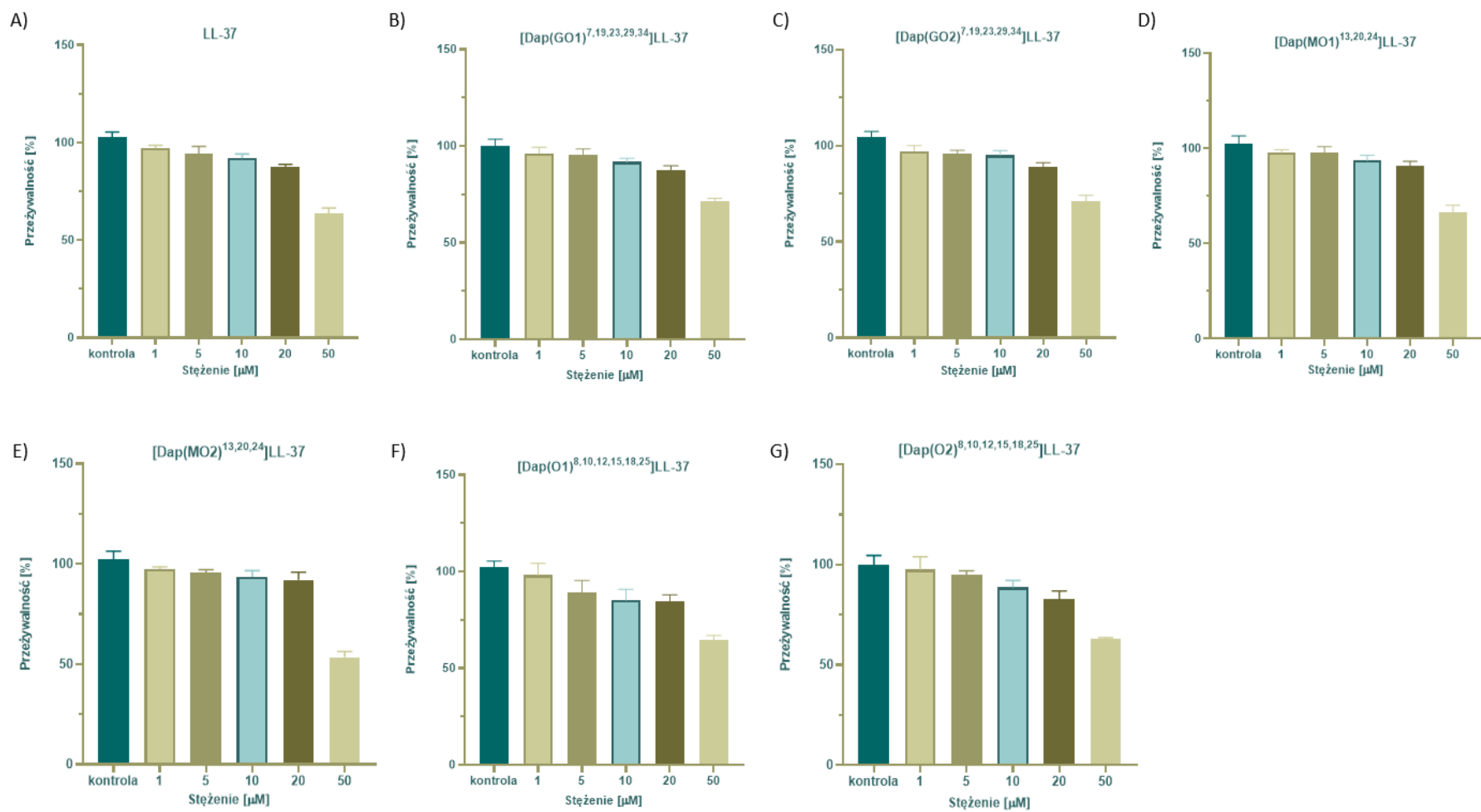
Test MTT wykonany z wykorzystaniem linii HL-60 i HL-60 zróżnicowanej do komórek wykazujących cechy neutrofili wykazał, że zastosowane analogi oraz LL-37 nie są cytotoksyczne w zastosowanym zakresie stężeń (Rys. 33 i 34). W przypadku innych badanych linii komórkowych (HDFa, CRL-1472, HB2), gdzie LL-37 nie wykazywał istotnego efektu cytotoksycznego, w przypadku różnicowanych neutrofili HL-60 ludzka katelicydyna oraz jej analogi zwiększały przeżywalność komórek. Może to sugerować ich istotną rolę w regulacji funkcji odpornościowych neutrofili i ich ochronie przed czynnikami stresowymi.



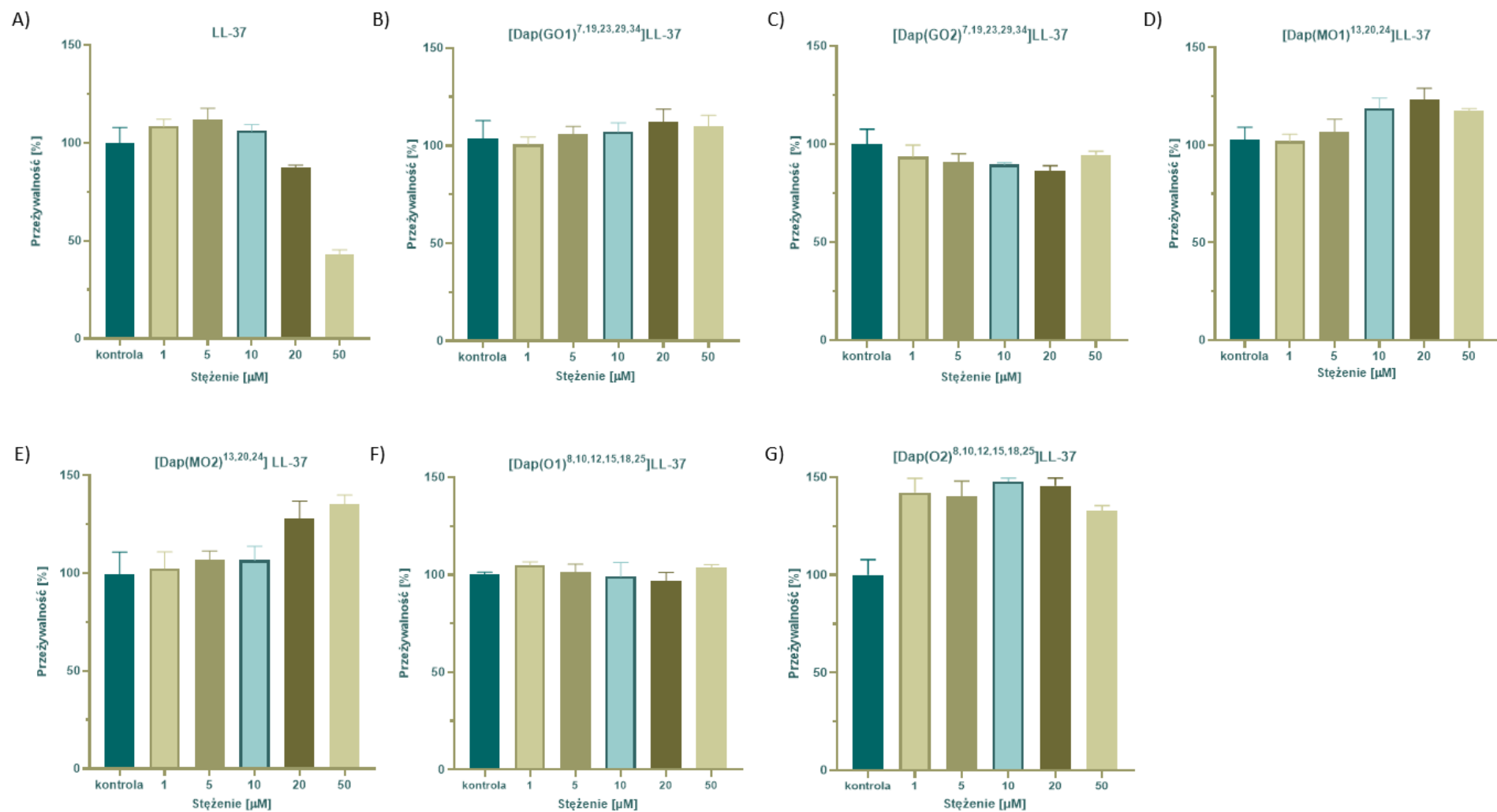
Rysunek 30. Cytotoksyczność związków wobec linii komórkowej HDFa podczas 24 h inkubacji



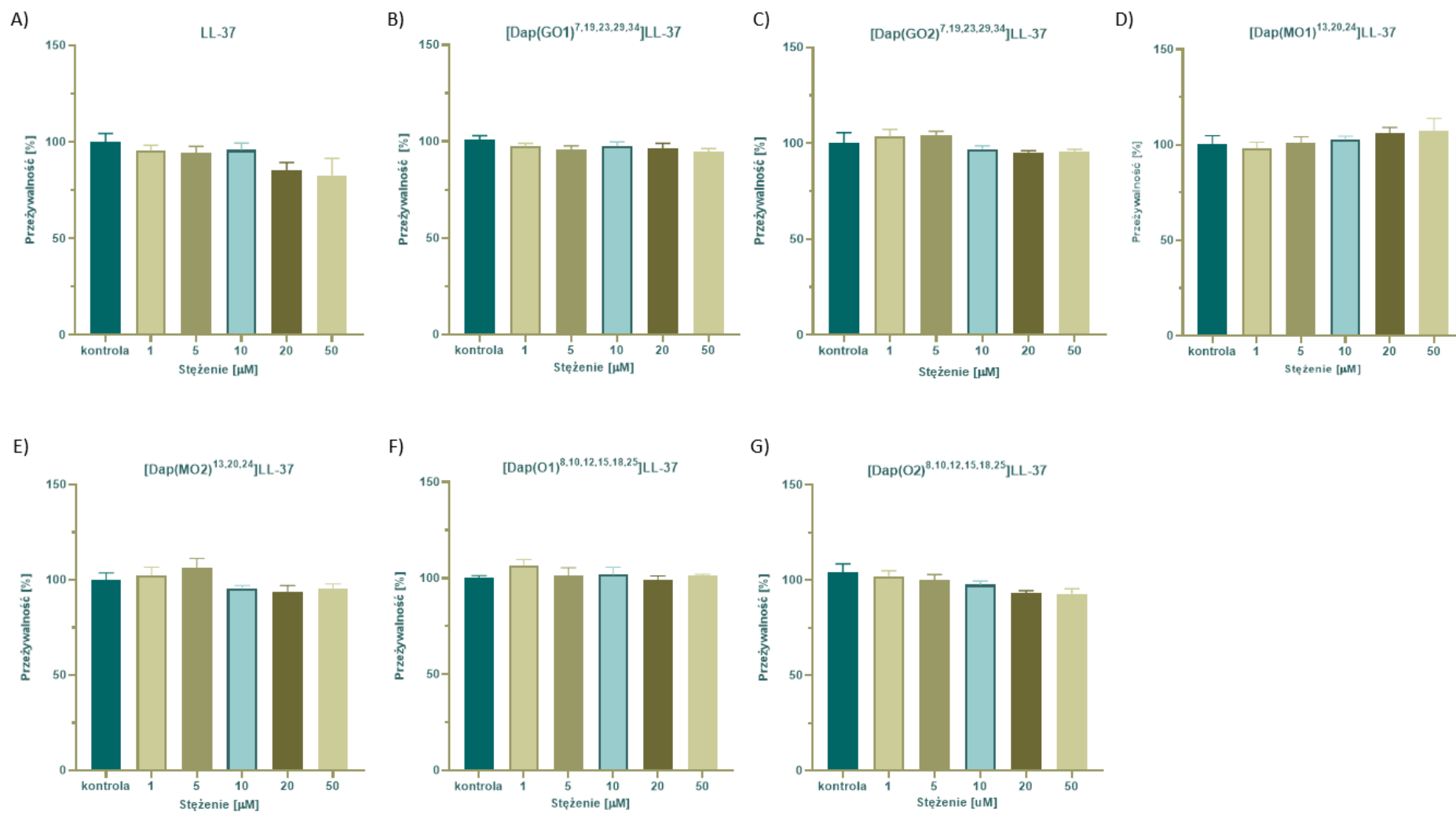
Rysunek 31. Cytotoksyczność związków wobec linii komórkowej CRL-1472 podczas 24 h inkubacji.



Rysunek 32. Cytotoksyczność związków wobec linii komórkowej HB2 podczas 24 h inkubacji.



Rysunek 33. Cytotoksyczność związków wobec linii komórkowej HL-60 podczas 24 h inkubacji.



Rysunek 34. Cytotoksyczność związków wobec linii komórkowej zróżnicowanych HL-60 podczas 24 h inkubacji.

Przedstawione wyniki uzyskane podczas testów MTT, wykazują, że badane związki nie wykazują istotnej cytotoksyczności wobec testowanych linii komórkowych, co potwierdza ich potencjalne bezpieczeństwo biologiczne. Wyniki te sugerują, że peptydomimetyki prezentują selektywne działanie wobec komórek eukariotycznych.

4.1. Stopień aktywacji komórek linii HL-60

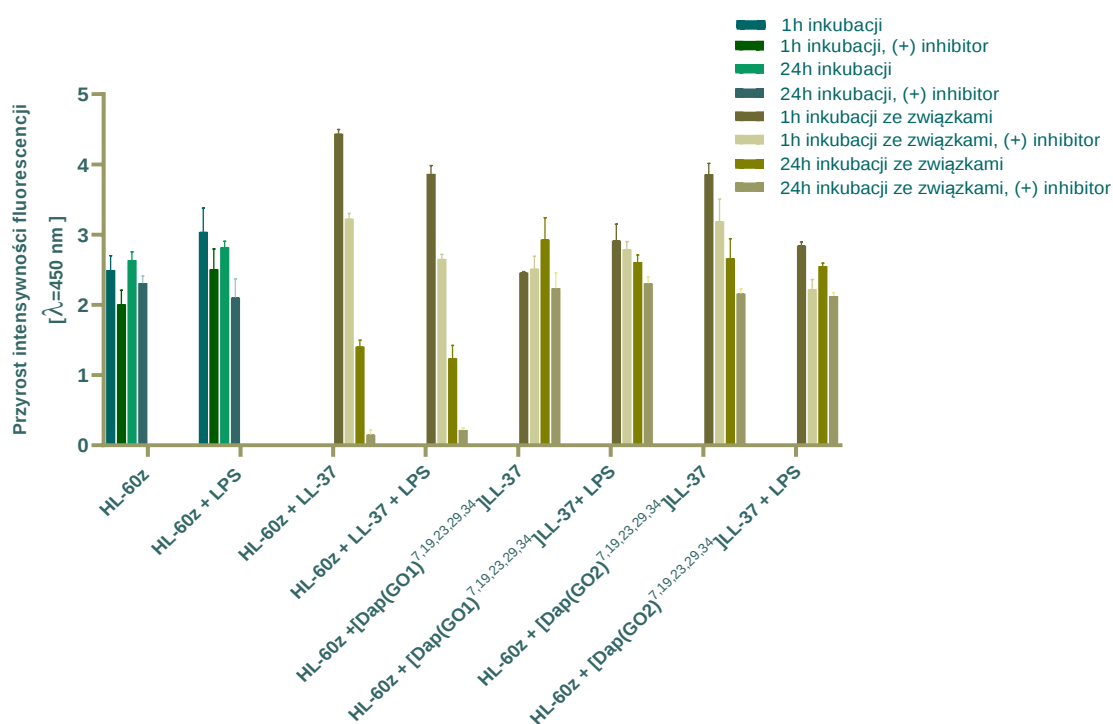
Linia komórkowa HL-60 jest często wykorzystywana jako model do badań różnicowania neutrofili oraz ich funkcji immunologicznych. Różnicowanie HL-60 do cech neutrofili pozwala na ocenę wpływu różnych czynników na ich aktywację i przeżywalność. W badaniu oceniłam, w jaki sposób ludzka katelicydyna LL-37 oraz jej syntetyczne analogi wpływają na metabolizm i funkcjonalność komórek HL-60 posiadających cechy neutrofili.

4.1.1. Proteinaza 3

Aktywność PR3 w nadsączach komórkowych i lizatach zróżnicowanych komórek HL-60 określiłam wykorzystując substrat: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Dap(DNP)-NH₂ ($c_{\text{końcowe}} = 4,57 \times 10^{-6}$ M) oraz specyficzny inhibitor ($c_{\text{końcowe}} = 4,71 \times 10^{-6}$ M) o sekwencji Bt-Pro-Tyr-Asp-AbuP (O-C₆H₄-4-Cl)₂.

Aktywność PR3 w medium zewnątrzkomórkowym zróżnicowanych komórek HL-60, wskazuje na obecność aktywnej formy enzymu. Po inkubacji z lipopolisacharydem LPS, stężenie PR3 ulega wzrostowi co sugeruje aktywację tego enzymu w odpowiedzi na bodziec zapalny. Co może wskazywać na fakt, że to właśnie PR3 uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej. W przypadku systemu HL-60 eksponowanych na LPS widoczny jest znaczny wzrost stężenia PR3 po 1 h, który spada po 24 h, co sugeruje krótkotrwałą aktywację komórek HL-60 przez LPS. Zastosowanie inhibitora w obu systemach (1 h i 24 h) powoduje zahamowanie aktywności enzymatycznej, co potwierdza, że enzym wydzielany w wyniku aktywacji HL-60 to proteinaza 3. W obu systemach HL-60 + LL-37 poziom fluorescencji wynikający z efektywnej hydrolizy substratu PR3 nie jest tak wysoki jak w próbach z dodatkiem LPS, ale wykazuje umiarkowany wzrost. Efekt zmniejsza się po 24 h, a inhibitor hamuje aktywność PR3. Dodatkowo HL-60 + LL-37 + LPS wykazuje najwyższy poziom aktywności proteinazy

3 po 1 h, co sugeruje, że LL-37 wzmacnia efekt LPS. Po 24 godzinach inkubacji zaobserwowano spadek aktywności badanej proteazy, jednak jej stężenie jest wyższe niż w próbkach traktowanych wyłącznie LPS lub samym LL-37, co może wskazywać na utrzymującą się aktywność PR3 mimo częściowego obniżenia sygnału. Ludzka katelicydyna i jej analogi aktywują komórki HL-60, ale w różnym stopniu. LL-37 + LPS wykazuje synergistyczny efekt, prowadzący do najsilniejszej aktywacji komórek. [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 jest najbardziej zbliżony do LL-37, natomiast [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 wykazuje najslabsze działanie. Zastosowany inhibitor skutecznie obniża aktywność PR3. W każdym przypadku po 24 h efekt aktywacji jest znacznie mniejszy, co może wskazywać na mechanizmy regulacyjne lub degradację peptydów (Rys. 35).

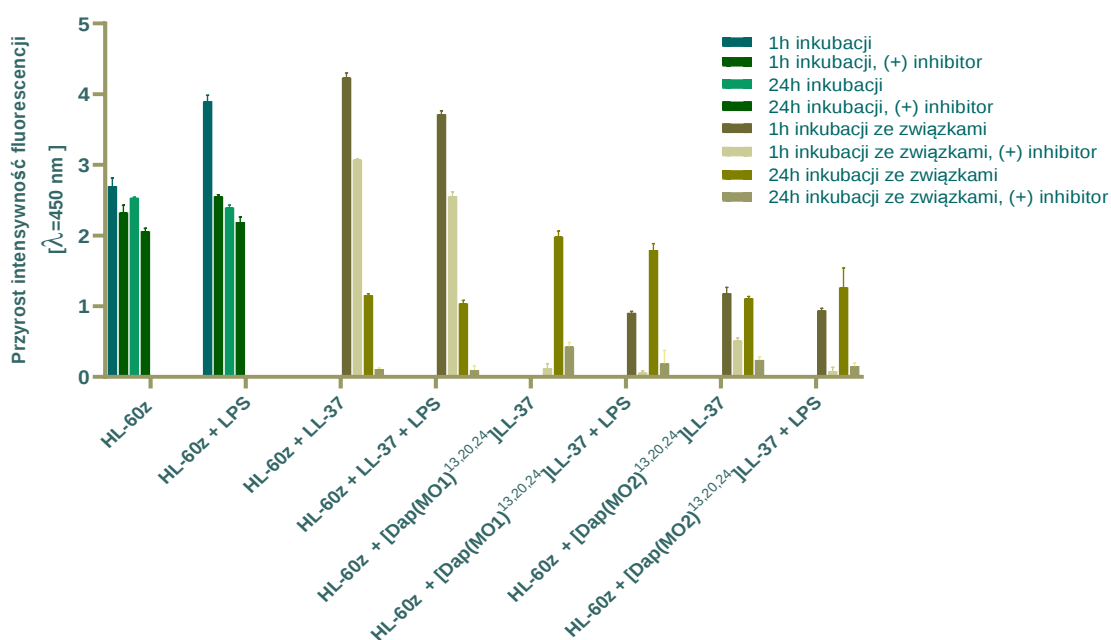


Rysunek 35. Stopień aktywacji komórek HL-60 inkubowanych z: LL-37, [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37 i [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37.

Ludzka proteinaza neutrofilowa (PR3) odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności peptydu przeciwdrobnoustrojowego LL-37 poprzez jego proteolizę. Badania wykazały, że PR3 efektywnie degraduje LL-37, prowadząc do powstania fragmentów o zmienionej aktywności biologicznej. Zwiększenie odporności proteolitycznej LL-37 na PR3 polegało na wprowadzeniu modyfikacji w sekwencji peptydowej. Zastąpienie

reszt argininy homoargininą w LL-37 (hArg^{7,19,23,29,34}-LL-37) skutkowało peptydem odpornym na cytrulinację, zachowującym swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe nawet w obecności wysokiej aktywności deiminazy argininy [144].

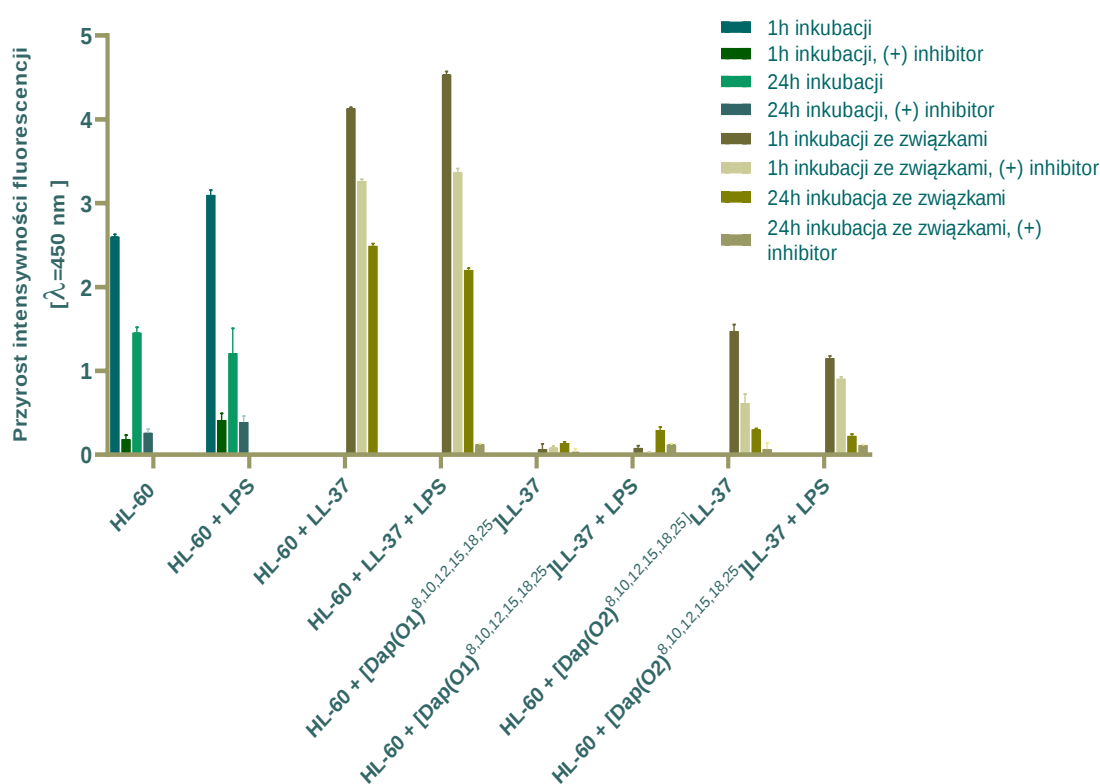
Próbie aktywacji zróżnicowanych komórek HL-60 w obecności analogów [Dap(MO1)^{13,20,24}]-LL-37 oraz [Dap(MO2)^{13,20,24}]-LL-37 przedstawiłam na rysunku 36. Przeprowadzone analizy wykazują istotnie niższy poziom aktywacji komórek (mierzonej jako pomiar aktywności PR3) w przypadku zróżnicowanych komórek HL-60 w porównaniu z natywnym LL-37. Po 1 godzinie inkubacji obserwuje jedynie umiarkowany wzrost aktywności, który po 24 godzinach ulega niemal całkowitemu zanikowi. Dodatek LPS do próbek z analogami zwiększa ich efekt stymulujący, jednak aktywność ta pozostaje niższa niż w przypadku LL-37 w połączeniu z LPS (Rys. 36). Obserwowany umiarkowany efekt supresji aktywacji komórek HL-60 w wyniku stymulacji LPS poprzez badane analogii może znaleźć zastosowanie podczas badań nad czynnikami przeciwzapalnymi.



Rysunek 36. Stopień aktywacji komórek HL-60 inkubowanych z: [Dap(MO1)^{13,20,24}]-LL-37 i [Dap(MO2)^{13,20,24}]-LL-37.

Rysunek 37 przedstawia wyniki analizy aktywności PR3 w medium zewnątrzkomórkowym znad zróżnicowanych HL-60. Analogi [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]-LL-37 i [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]-LL-37 nie wykazują zdolność do aktywacji komórek HL-60 co uwidacznia się brakiem hydrolizy substratu PR3 w badanych systemach. Wynik ten

odbiega od uzyskanych wcześniej dla badanych analogów i jest na tyle istotny, że badane związki w których reszty Lys zostały podstawione resztami zawierającymi PEGyłowane bloki budulcowe o różnych długościach łańcucha bocznego są w stanie zahamować aktywację komórek HL-60 w wysokim stopniu: $[\text{Dap}(\text{O1})^{8,10,12,15,18,25}]\text{LL-37}$ lub umiarkowanym: $[\text{Dap}(\text{O2})^{8,10,12,15,18,25}]\text{LL-37}$, w stosunku do systemów kontrolnych. Należy podkreślić, że ta obserwacja w przypadku jej potwierdzenia w innych systemach aktywacji neutrofilii może prowadzić do otrzymania związku o dużym potencjale przeciwzapalnym, co w kontekście braku efektu toksycznego wydaje się być niezwykle interesujące.



Rysunek 37. Stopień aktywacji komórek HL-60 inkubowanych z: $[\text{Dap}(\text{O1})^{8,10,12,15,18,25}]\text{LL-37}$ i $[\text{Dap}(\text{O2})^{8,10,12,15,18,25}]\text{LL-37}$.

Dodatkowo przeprowadziłam pomiary aktywności enzymatycznej w lizatach uzyskanych ze zróżnicowanych komórek linii HL-60, jednak nie zaobserwowałam tam aktywności badanego enzymu.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki uzyskane w ramach badań przeprowadzonych do mojej rozprawy doktorskiej mogę podsumować następująco:

1. Otrzymałam 6 peptydomimetyków o określonych masach cząsteczkowych potwierdzonych techniką spektrometrii mas (MS) oraz czystości potwierdzonej za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (UPLC).
2. Wprowadzane modyfikacje łańcucha natywnej katelicydyny LL-37 nie wpłynęły na α -helikalną strukturę drugorzędową peptydomimetyków.
3. Zsyntetyzowane związki wykazywały zdolność oddziaływania z kwasami nukleinowymi (plazmidem pUC19 oraz dsDNA (76pz)), co potwierdziłam za pomocą odpowiednich technik analitycznych (elektroforeza, DLS, AFM). Dowiodłam, że wzrost ilości peptydu powoduje zmniejszenie stopnia migracji w żelu agarozowym oraz poliakrylamidowym. Natomiast metodą dynamicznego rozproszenia światła określiłam wielkości tworzonych kompleksów. Technika mikroskopii sił atomowych (AFM) umożliwiła analizę powstałych kompleksów, obrazując że tworzące się struktury są złożone i mają punkty przecięcia.
4. Ustaliłam stężenia peptydomimetyków, przy których obserwujemy najwyższy poziom kondensacji DNA.
5. Pomimo licznych prób nie udało mi się wyznaczyć stałych wiązania peptydomimetyków z dsDNA za pomocą techniki termoforezy w mikroskali. Otrzymane dane eksperymentalne uniemożliwiały określenie parametrów oddziaływań, co mogło wynikać ze słabego powinowactwa pomiędzy białkiem a ligandem lub zbyt niskim stężeniem użytych związków. W konsekwencji nie wyznaczyłam wartości stałej dysocjacji, ze względu na fakt, że nie osiągnięto punktu wysycenia związku przez DNA.

6. Oceeniłam podatność zsyntetyzowanych związków na proteolizę względem natywnej cząsteczki LL-37 w obecności proteinazy 3. Zaobserwowałam zwiększoną odporność proteolityczną w przypadku analogów [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37.
7. Modyfikacje wprowadzone w analogach [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37 w pozycjach reszt argininy podwyższyły ich odporność na reakcję deiminacji w obecności enzymów PAD2 oraz PAD4.
8. Zsyntetyzowane peptydomimetyki nie wykazywały cytotoksyczności wobec następujących linii komórkowych: HDFa, CRL-1472, HB2, HL-60, HL-60 zróżnicowane do neutrofili w badanym zakresie stężeń 1-50 µM.
9. Neutrofile pod wpływem czynnika LPS ulegają aktywacji i wydzielają enzymy proteolityczne, których obecność w medium zewnątrzkomórkowych oraz lizatach komórkowych wykorzystałam do badań. Na ich podstawie ustaliłam stopień aktywacji zróżnicowanych komórek HL-60, prowadziłam pomiary aktywności przykładowego enzymu proteolitycznego jakim była PR3 w obecności inhibitora, jako kontroli. Otrzymane wyniki potwierdziły, że peptydomimetyki w różnym stopniu modulują neutrofilopodobne komórki HL-60. Funkcje aktywujące wykazują: [Dap(GO1)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(GO2)^{7,19,23,29,34}]LL-37, [Dap(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, [Dap(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37. Analogi zawierające reszty MO1 i MO2 czyli [Dap(MO1)^{13,20,24}]LL-37, [Dap(MO2)^{13,20,24}]LL-37 redukują proces wydzielania PR3 co może wskazywać na hamowanie aktywacji tych komórek. W celu określenia potencjału obniżającego aktywację wymagane są dalsze badania lecz związki te stanowią strukturę wyjściową potencjalnego terapeutyku o właściwościach przeciwzapalnych.

Dorobek naukowy

Publikacje naukowe:

- 1) Wiktoria Rejmak, Katarzyna Bury, Magdalena Wysocka, Adam Lesner, „*Novel analogs of LL-37 modified by functionalized oxaacids modulates the level of immune cells activation*”. Manuscript in preparation
- 2) Natalia Gruba, Honorata Sikora, Justyna Ciesielska, Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „*Caspase-like activity is associated with bacterial infection of the urine in urinary tract diseases*”, *Analytical Biochemistry*, vol. 688, 2024
- 3) Natalia Gruba, Wiktoria Rejmak, Anita Romanowska, Adam Lesner, „Kropki kwantowe jako narzędzia diagnostyczne”, *Wiadomości chemiczne*, vol. 68, 2024
- 4) Dżesika Jankowska, Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, Natalia Gruba, „Peptydy z węzłem cysteinowym jako inhibitory kallikreiny 13”, *Wiadomości chemiczne*, vol.78, 2024
- 5) Natalia Gruba, Monika Musielak, Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „Detection of ADAM15 in urine from patients with bladder cancer”, *Analytical Biochemistry*, vol. 654, 2022
- 6) Natalia Gruba, Anita Romanowska, Wiktoria Rejmak, Honorata Sikora, Magdalena Wysocka, Adam Lesner, „Monitorowanie aktywności proteolitycznej jako element diagnostyki chorób cywilizacyjnych”, *Wiadomości chemiczne*, vol. 76, 2022

Komunikaty ustne:

- 1) Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „Oddziaływania analogów ludzkiej katelicydyny LL-37 z DNA”, XX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji”, 26-29.05.2024, Jarnołtówek, Polska
- 2) Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „Strategies for boosting proteolytic resistance in proteins”, Natural Science Baltic Conference (NSBC), 20-21.04.2024, Online
- 3) Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „Analogi ludzkiej katelicydyny o zwiększonej odporności na degradację proteolityczną”, XIX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów "Na pograniczu chemii i biologii" (XIX NPCIB), 4-7.06.2023, Trzebieszowice, Polska
- 4) Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, „Characterization of antimicrobial peptides, especially cathelicidin LL-37”, Baltic Chemistry Conference, 2023, Online

Postery:

- 1) Wiktoria Rejmak, Katarzyna Bury, Magdalena Wysocka, Adam Lesner, „Human cathelicidin analogs with increased stability towards the enzymes”, European Peptide Synthesis Conference (EPSC 2024), 29.04-01.05.2024, Praga, Czechy
- 2) Wiktoria Rejmak, „Katelicydyna jako wzór - badania i rozwój analogów antybakteryjnych”, III Kongres Młodej Nauki, 6-8.07.2023, Gdańsk, Polska
- 3) Wiktoria Rejmak, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, „Katelicydyna LL-37 peptyd antymikrobiotyczny o działaniu terapeutycznym”, III Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne (III PSSCh), 18-19.09.2021, Online

Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w takich projektach:

- 1) „Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne.”, nr 2019/35/O/ST4/01142 (NCN), PRELUDIUM BIS 1, 2020-2024, doktorant stypendysta
- 2) „Synteza sondy do oznaczania aktywności PR3”, nr 539-T020-B061-23 Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), projekt badawczy w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich, 2023, kierownik projektu
- 3) „Synteza substratów fluorogenicznych dla proteinazy 3 oraz ludzkiej elastazy”, nr 539-T020-B149-24, projekt badawczy w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich, 2024, kierownik projektu

Wykaz rysunków

RYSUNEK 1. MECHANIZM DZIAŁANIA KATELICYDYN.	19
RYSUNEK 2. PODZIAŁ PEPTYDÓW ANTYMIKROBIOTYCZNYCH, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [33].	21
RYSUNEK 3. MODELE ODZIAŁYWANIA PEPTYDÓW ANTYMIKROBIOTYCZNYCH Z BŁONĄ KOMÓRKOWĄ, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [33].	22
RYSUNEK 4. LOKALIZACJA GENU KATELICYDYN W GENOMIE CZŁOWIEKA I JEGO STRUKTURA, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [41].	23
RYSUNEK 5. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA SYNTEZĘ KATELICYDYN.	27
RYSUNEK 6. STRUKTURY: DEIMINAZY PEPTYDYLOARGINIONOWEJ 2 I DEIMINAZY PEPTYDYLOARGININOWEJ 4, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [70].	36
RYSUNEK 7. MECHANIZMY OBRONNE NEUTROFILI, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [73].	44
RYSUNEK 8. PROCES FORMOWANIA NETs, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [71], MPO-MIELOPEROKSYDAZA, HCAP18- NIEAKTYWNA FORMA LUDZKIEJ KATELICYDYN.	45
RYSUNEK 9. FORMOWANIE NEUTROFILI NA DRODZE PROCESU GRANULOCYTOPOEZY, RYSUNEK WYKONANY W OPARCIU O ŹRÓDŁO [112].	48
RYSUNEK 10. SCHEMAT PROCESU SYNTETY CHEMICZNEJ.	57
RYSUNEK 11. SCHEMAT WPROWADZANYCH MODYFIKACJI	61
RYSUNEK 12. SCHEMAT PRZEBIEGU TESTÓW CYTOTOKSYCZNOŚCI.	72
RYSUNEK 13. ETAPY LIZY KOMÓRKOWEJ.	73
RYSUNEK 14. WIDMA MAS: A) [DAP(MO1)^{13,20,24}]LL-37, B) [DAP(MO2)^{13,20,24}]LL-37. 76	
RYSUNEK 15. WIDMA MAS: A) [DAP(O1)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, B) [DAP(O2)^{8,10,12,15,18,25}]LL-37.	77
RYSUNEK 16. CHROMATOGRAMY UPLC PEPTYDOMIMETYKÓW A) [DAP(MO1)^{13,20,24}]LL-37, B) [DAP(MO2)^{13,20,24}]LL-37.	77
RYSUNEK 17. WIDMA CD PEPTYDOMIMETYKÓW.	79
RYSUNEK 18. ELEKTROFOREGRAM KOMPLEKSÓW PEPTYDOMIMETYKÓW Z pUC19.	82
RYSUNEK 19. ELEKTROFOREGRAM KOMPLEKSÓW PEPTYDOMIMETYKÓW Z pUC19.	83
RYSUNEK 20. ELEKTROFOREGRAM KOMPLEKSÓW PEPTYDOMIMETYKÓW Z DSDNA (76PZ).	84

RYSUNEK 21. ELEKTROFOREGRAM KOMPLEKSÓW PEPTYDOMIMETYKÓW Z dsDNA (76PZ).....	85
RYSUNEK 22. WIĄZANIE LUDZKIEJ KATELICYDYN Y LL-37 (C= 200 μ M) ZE ZNAKOWANĄ FLUORESCENCYJNIE (CY5) NICIĄ dsDNA (C= 100 nM) UZYSKANE ZA POMOCĄ TECHNIKI TERMOFOREZY W MIKROSKALI. ZIELONA LINIA: $K_D=33,8 \mu$ M, CZERWONA LINIA: $K_D= 96,9 \mu$ M, NIEBIESKA LINIA: $K_D=62 \mu$ M.	86
RYSUNEK 23. ZDJĘCIA Z MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH AFM: A) 5 nM DNA - 2 μ M, B) 875 nM LL-37 - 1 μ M, C) 5 nM DNA + 875 nM LL-37 - 1 μ M, D) 5 nM DNA + 4.375 μ M PEPTYD [DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 - 1 μ M, E) 5 nM DNA + 4.375 μ M [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 - 1 μ M, F) 5 nM DNA - 875 nM [DAP(MO1) ^{13,20,24}]LL-37 - 1 μ M, G) 5 nM DNA - 875 nM [DAP(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 - 1 μ M, H) 5 nM DNA - 875 nM [DAP(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 - 1 μ M.	88
RYSUNEK 24. WYNIKI DLS PEPTYDOMIMETYKÓW I ICH KOMPLEKSÓW A) Z PLAZMIDEM pUC19, B) Z dsDNA (76PZ).....	90
RYSUNEK 25. POTENCJAŁ ZETA PEPTYDOMIMETYKÓW I ICH KOMPLEKSÓW A) Z pUC19, B) Z dsDNA.	91
RYSUNEK 26. ZALEŻNOŚĆ WIELKOŚCI KOMPLEKSU OD STĘŻENIA PEPTYDOMIMETYKÓW A) LL-37: dsDNA, B) [DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA, C) [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37: dsDNA, D) [DAP(MO1) ^{13,20,24}]LL-37: dsDNA [μ M].....	95
RYSUNEK 27. KRZYWE ZANIKU OTRZYMANE W WYNIKU PROTEOLIZY PR3: A) LL-37, CZAS POŁOWICZNEGO ROZPADU T_{12} DLA NATYWNEJ LUDZKIEJ KATELICYDYN Y $T_{12} = 130,2 \text{ min}$, B) [DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37, $T_{12} = 740,4 \text{ min}$, C) [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37, $T_{12} = 120,4 \text{ min}$, D) [DAP(MO1) ^{13,20,24}]LL-37, $T_{12} = 16,47 \text{ min}$, E) [DAP(MO2) ^{13,20,24}]LL-37, $T_{12} = 44,41 \text{ min}$, F) [DAP(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, $T_{12} = 242,31 \text{ min}$, G) [DAP(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37, $T_{12} = 306,21 \text{ min}$	97
RYSUNEK 28. PODATNOŚĆ A) NATYWNEGO LL-37, B) [DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37, C) [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 NA REAKCJĘ DEIMINACJI W OBECNOŚCI ENZYMU PAD2.	102
RYSUNEK 29. PODATNOŚĆ A) NATYWNEGO LL-37, B) [DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37, C) [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 NA REAKCJĘ DEIMINACJI W OBECNOŚCI ENZYMU PAD4.	103
RYSUNEK 30. CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ HDFA PODCZAS 24 H INKUBACJI	105

RYSUNEK 31. CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ CRL-1472	
PODCZAS 24 H INKUBACJI.	106
RYSUNEK 32. CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ HB2	
PODCZAS 24 H INKUBACJI.....	107
RYSUNEK 33. CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ HL-60	
PODCZAS 24 H INKUBACJI.	108
RYSUNEK 34. CYTOTOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ	
ZRÓŻNICOWANYCH HL-60 PODCZAS 24 H INKUBACJI.	109
RYSUNEK 35. STOPIEŃ AKTYWACJI KOMÓREK HL-60 INKUBOWANYCH Z: LL-37,	
[DAP(GO1) ^{7,19,23,29,34}]LL-37 I [DAP(GO2) ^{7,19,23,29,34}]LL-37.....	111
RYSUNEK 36. STOPIEŃ AKTYWACJI KOMÓREK HL-60 INKUBOWANYCH Z:	
[DAP(MO1) ^{13,20,24}]LL-37 I [DAP(MO2) ^{13,20,24}]LL-37.....	112
RYSUNEK 37. STOPIEŃ AKTYWACJI KOMÓREK HL-60 INKUBOWANYCH Z:	
[DAP(O1) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37 I [DAP(O2) ^{8,10,12,15,18,25}]LL-37.....	113

Wykaz tabel

TABELA 1. PRZEDSTAWICIELE KATELICYDYN.	17
TABELA 2. REAGENTY ORAZ ICH OBJĘTOŚCI STOSOWANE PODCZAS AUTOMATYCZNEJ SYNTEZY MIKROFALOWEJ.	55
TABELA 3. SKŁAD TESTÓW MONITORUJĄCYCH PROCES SYNTEZY.	58
TABELA 4. WARUNKI PRZYŁĄCZANIA POCHODNYCH.	62
TABELA 5. SKŁAD ŻELI ZAGĘSZCZAJĄCEGO I ROZDZIELAJĄCEGO.	65
TABELA 6. IŁOŚĆ PASAŻOWANYCH KOMÓREK.	71
TABELA 7. CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA OTRZYMANYCH PEPTYDOMIMETYKÓW.	78
TABELA 8. ŚREDNICE HYDRODYNAMICZNE I WSKAŹNIKI POLIDYSPERSYJNOŚCI (PDI) ANALOGÓW LUDZKIEJ KATELICYDYNY I ICH KOMPLEKSÓW Z PLAZMIDEM pUC19 LUB dsDNA. 76 PZ.	92
TABELA 9. MASY CZĄSTECZKOWE PEPTYDOMIMETYKÓW, ICH FRAGMENTÓW ORAZ ICH CZASY POŁOWICZNEGO ROZPADU OKREŚLONE TECHNIKĄ LC-MS.	100
TABELA 10. WYNIKI UZYSKANE PODCZAS DEIMINACJI Z WYKORZYSTANIEM PAD2 NATYWNEJ KATELICYDYNY ORAZ PEPTYDOMIMETYKÓW.	101
TABELA 11. WYNIKI UZYSKANE PODCZAS DEIMINACJI Z WYKORZYSTANIEM PAD4 NATYWNEJ KATELICYDYNY ORAZ PEPTYDOMIMETYKÓW.	102

Literatura cytowana

- [1] Koczulla R., Krötz F., Zahler S., Gloe T., Issbrücker K., Unterberger P., Zaiou M., Leberherz C., „*An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18*”, Journal of Clinical Investigation, vol. 111, pp. 1665–1672, 2003
- [2] Zanettisq M., Del G., Li S., Storicis P., Schneiderli C., Romeo D., „*The cDNA of the Neutrophil Antibiotic Bac5 Predicts a Pro-sequence Homologous to a Cysteine Proteinase Inhibitor That Is Common to Other Neutrophil Antibiotics*”, The Journal of biological chemistry, vol. 268, pp. 522-526, 1993
- [3] Robinson M., Hutchinson A., Donnelly S., „Antimicrobial peptides: utility players in innate immunity”, Frontiers in Immunology, vol.3, pp. 325-326, 2012
- [4] Zaiou M., Nizet V., Gallo R., „*Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence*”, Journal of Investigative Dermatology, vol. 120, pp. 810-816, 2003
- [5] Harwig S., Ganz T., Lehrer R., „*Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing*”, Academic Press, vol. 236, pp. 160-172, 1991
- [6] Lehrer R., Lichtenstein A., Ganz T., „*Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells*”, Annual Reviews, vol. 11, pp. 105-128, 1993
- [7] Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R., „*Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 263, pp. 9573–9575, 1988
- [8] Boman H., Agerberth B., Boman A., „*Mechanisms of Action on Escherichia coli of Cecropin P1 and PR-39, Two Antibacterial Peptides from Pig Intestine*”, Infection and Immunity, vol. 61, pp. 2978-2984, 1993
- [9] Gennaro R., Zanetti M., „*Structural Features and Biological Activities of the Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides*”, Peptide Science, vol. 55, pp. 31-49, 2000
- [10] Johansson J., Gudmundsson G., Rottenberg M., Berndt K., Agerberth B., „*Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 273, pp. 3718–3724, 1998

- [11] Bals R., Lang C., Weiner D., Vogelmeier C., Welsch U., Wilson J., „*Rhesus monkey (Macaca mulatta) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules*”, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 8, pp. 370–375, 2001
- [12] Chen C., Brock R., Luh F., Chou P., Larrick J., Huang R., Huang T., „*The solution structure of the active domain of CAP18-a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes*”, FEBS Letters, vol. 370, pp. 46-52, 1995
- [13] Das H., Sharma B., Kumar A., „*Cloning and characterization of novel cathelicidin cDNA sequence of Bubalus bubalis homologous to Bos taurus cathelicidin-4*”, DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping, vol. 17, pp. 407–414, 2006
- [14] Wang Y., Hong J., Liu H., Yang H., Liu R., Wu J., Wang A., Lin D., Lai R., „*Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics*”, PLoS One, vol. 3, pp. 165-172, 2008
- [15] Storici P., Tossi A., Lenarčič B., Romeo D., „*Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides*”, European Journal of Biochemistry, vol. 238, pp. 769–776, 1996
- [16] Nagaoka I., Tsutsumi-Ishii Y., Yomogida S., Yamashita T., „*Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 272, pp. 22742–22750, 1997
- [17] Scocchi M., Bontempo D., Boscolo S., Tomasinsig L., Giulotto E., Zanetti M., „*Novel cathelicidins in horse leukocytes*”, FEBS Letters, vol. 457, pp. 459–464, 1999
- [18] Xiao Y., Cai Y., Bommineni Y., Fernando S., Prakash O., Gilliland S., Zhang G., „*Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 281, pp. 2858–2867, 2006
- [19] Uzzell T., Stolzenberg E., Shinnar A., Zasloff M., „*Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins*”, Peptides, vol. 24, pp. 1655–1667, 2003
- [20] Huttner K., Lambeth M., Burkin H., Burkin D., Broad T., „*Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes*”, Gene, vol. 206, pp. 85-91, 1998

- [21] Chang C., Zhang, Zou Y., Nie P., Secombes C., „*Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*)*” Antimicrob Agents Chemother, vol. 50, pp. 185–195, 2006
- [22] Termén S., Tollin M., Olsson B., Svenberg T., Agerberth B., Gudmundsson G., „*Phylogeny, processing and expression of the rat Cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides*”, Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 60, pp. 536-549, 2003
- [23] Tossi A., Scocchi M., Zanetti M., Storici P., Gennaro R., „PMAP-37, a Novel Antibacterial Peptide from Pig Myeloid Cells. cDNA Cloning, Chemical Synthesis and Activity”, European Journal of Biochemistry, vol. 228, pp. 941–946, 1995
- [24] Nilsson M., Sandstedt B., Sørensen O., Weber G., Borregaard N., Ståhle-Bäckdahl M., „*The Human Cationic Antimicrobial Protein (hCAP18), a Peptide Antibiotic, Is Widely Expressed in Human Squamous Epithelia and Colocalizes with Interleukin-6*”, Infection and Immunity, vol. 67, pp. 2561-2566, 1999
- [25] Oren Z., Lerman J., Gudmundsson G., Agerberth B., Shai Y., „*Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes : relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity*”, Biochemical Juurnal, vol. 341, pp. 501-513, 1999
- [26] Peric M., Koglin S., Kim S., Morizane S., Besch R., Prinz J., Ruzicka T., Gallo R., Schaubert J., „*IL-17A Enhances Vitamin D 3-Induced Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide in Human Keratinocytes 1*”, The Journal of Immunology, vol. 181, pp. 8504-8512, 2008
- [27] Ramanathan B., Davis E., Ross C., Blecha F., „*Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity*”, Microbes and Infection, vol. 4, pp. 361-372, 2002
- [28] Brown K., Poon G., Birkenhead D., Pena O., Falsafi R., Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J., Hancock R., Johnson P., „*Host Defense Peptide LL-37 Selectively Reduces Proinflammatory Macrophage Responses*”, The Journal of Immunology, vol. 186, pp. 5497–5505, 2011
- [29] Kim S., Kim Y., Jang Y., „*Cutting Edge: LL-37–Mediated Formyl Peptide Receptor-2 Signaling in Follicular Dendritic Cells Contributes to B Cell Activation in Peyer’s Patch Germinal Centers*”, The Journal of Immunology, vol. 198, pp. 629–633, 2017

- [30] Shaykhiev R., Beisswenger Ch., Kändler K., Senske J., Püchner A., Damm T., Behr J., Bals R., „Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure”, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 289, pp. 842–848, 2005
- [31] Vandamme D., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L., „*A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin human cathelicidin peptide*”, *Cellular Immunology*, vol. 280, pp. 22-35, 2012
- [32] Zasloff M., „*Antimicrobial peptides of multicellular organisms*”, *Nature*, vol. 415, pp. 389-395, 2002
- [33] Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H., „*Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields*”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, pp. 579-582, 2020
- [34] Kumar P., Kizhakkedathu J., Straus S., „*Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo*”, *Biomolecules*, vol. 8, pp. 1-24, 2018
- [35] Gudmundsson G., Agerberth B., Odeberg J., Bergman T., Olsson B., Salcedo R., „*The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes*”, *European Journal of Biochemistry*, vol. 238, pp. 325–332, 1996
- [36] Schaubert J., Gallo R., „*Antimicrobial peptides and the skin immune defense system*”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 122, pp. 261-266, 2008
- [37] Bardan A., Nizet V., Gallo R., „*Antimicrobial peptides and the skin*”, *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 4, pp. 543-549, 2005
- [38] Nardo A., Vitiello A., Gallo R., „*Cutting Edge: Mast Cell Antimicrobial Activity Is Mediated by Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide*”, *The Journal of Immunology*, vol. 170, pp. 2274-2278, 2003
- [39] Dombrowski Y., Schaubert J., „*Cathelicidin LL-37: A defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis*”, *Experimental Dermatology*, vol. 21, pp. 327-330, 2012
- [40] Scott M., Davidson D., Gold M., Bowdish D., Hancock R., „*The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses*”, *The Journal of Immunology*, vol. 169, pp. 3883–3891, 2002

- [41] Pazgier M., Ericksen B., Ling M., Toth E., Shi J., Li X., Galliher-Beckley A., Lan L., Zou G., Zhan C., Yuan W., Pozharski E., Lu W., „*Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37*” *Biochemistry*, vol. 52, pp. 1547–1558, 2013
- [42] Termén S., Tollin M., Rodriguez E., Sveinsdóttir S., Jóhannesson B., Cederlund A., Sjövall J., Agerberth B., Gudmundsson G., „*PU.1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells*”, *Molecular Immunology*, vol. 45, pp. 3947–3955, 2008
- [43] Storici P., Tossi A., Lenarcic B., Romeo D., „*Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides*”, *European Journal of Biochemistry*, vol. 238, pp. 769-776, 1996
- [44] Ouellette A., „*Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity*”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, pp. 2215-2229, 2011
- [45] van Harten R., van Woudenberg E., van Dijk A., Haagsman H., „*Cathelicidins: Immunomodulatory antimicrobials*”, *Journal Vaccines (Basel)*, vol. 6, pp. 1-23, 2018
- [46] Wong J., Ng T., Legowska A., Rolka K., Hui M., Cho C., „*Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on Candida albicans*”, *Peptides*, vol. 32, pp. 1996-2002, 2011
- [47] Wang G., „*Human antimicrobial peptides and proteins*”, *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 7, pp. 549-594, 2014
- [48] Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E., Rehm B., Hancock R., „*Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation*” *Infection and Immunity*, vol. 76, pp. 4176–4182, 2008
- [49] Tsai P., Cheng Y., Hsieh W., Lan C., „*Responses of Candida albicans to the human antimicrobial peptide LL-37*”, *Journal of Microbiology*, vol. 52, pp. 581–589, 2014
- [50] Gordon Y., Huang L., Romanowski E., Yates K., Proske R., Mcdermott A., „*Human Cathelicidin (LL-37), a Multifunctional Peptide, is Expressed by Ocular Surface Epithelia and has Potent Antibacterial and Antiviral Activity*”, *Current Eye Research*, vol. 30, pp. 385-394, 2005

- [51] Barlow P., Svoboda P., Mackellar A., Nash A., York I., Pohl J., Davidson D., Donis R., „*Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37*”, PLoS One, vol. 6, pp. 1-9, 2011
- [52] Wang G., Mishra B., Epand R., Epand R., „*High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments*”, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1838, pp. 2160-2172, 2014
- [53] Schaubert J., Dorschner R., Coda A., Büchau A., Liu P., Kiken D., Helfrich Y., Kang S., Elalieh H., Steinmeyer A., Zügel U., Bikle D., Modlin R., Gallo R., „*Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism*”, Journal of Clinical Investigation, vol. 117, pp. 803–811, 2007
- [54] Grönberg A., Mahlapuu M., Ståhle M., Whately-Smith C., Rollman O., „*Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial*”, Wound Repair and Regeneration, vol. 22, pp. 613–621, 2014
- [55] Talukder P., Satho T., Irie K., Sharmin T., Hamady D., Nakashima Y., Kashige N., Miake F., „*Trace metal zinc stimulates secretion of antimicrobial peptide LL-37 from Caco-2 cells through ERK and p38 MAP kinase*”, International Immunopharmacology, vol. 11, pp. 141–144, 2011
- [56] Schaubert J., Iffland K., Frisch S., Kudlich T., Schmausser B., Eck M., Menzel T., Gostner A., Lühns H., Scheppach W., „*Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells*”, Molecular Immunology, vol. 41, pp. 847–854, 2004
- [57] Zeng X., Sunkara L., Jiang W., Bible M., Carter S., Ma X., Qiao S., Zhang G., „*Induction of Porcine Host Defense Peptide Gene Expression by Short-Chain Fatty Acids and Their Analogs*” PLoS One, vol. 8, pp. 1-8, 2013
- [58] Kuroda K., Okumura K., Isogai H., Isogai E., „*The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs*”, Frontiers in Oncology, vol. 5, pp. 1-10, 2015
- [59] Grant W., „*Hypothesis - Ultraviolet-B irradiance and vitamin D reduce the risk of viral infections and thus their sequelae, including autoimmune diseases and some cancers*”, Photochemistry and Photobiology, vol. 84, pp. 356-365, 2008

- [60] Roby K., Nardo A., „*Innate immunity and the role of the antimicrobial peptide cathelicidin in inflammatory skin disease*”, *Drug Discovery Today Disease Mechanisms*, vol. 10, pp. 3-4, 2013
- [61] Wang C., Wang S., Li D., Chen P., Han S., Zhao G., Chen K., Zhao J., Xiong J., Qiu J., Wei D., 4 5, Zhao J., Wang J., „*Human Cathelicidin Inhibits SARS-CoV-2 Infection: Killing Two Birds with One Stone*”, *ACS Infectious Diseases*, vol. 7, pp. 1545–1554, 2021
- [62] Aloul K., Nielsen J., Defensor E., Lin J., Fortkort J., Shamloo M., Cirillo J., Gombart A., Barron A., „*Upregulating Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 Expression May Prevent Severe COVID-19 Inflammatory Responses and Reduce Microthrombosis*”, *Frontiers in Immunology*, vol. 13, pp. 1-16, 2022
- [63] Scheenstra M., van Harten R., Veldhuizen E., Haagsman H., Coorens M., „*Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation*”, *Frontiers in Immunology*, vol 11, pp. 1-16, 2020
- [64] Kang J., Dietz M., Li B., „*Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against Staphylococcus aureus biofilms*”, *PLoS One*, vol. 14, pp. 1-13, 2013
- [65] Piktel E., Niemirowicz K., Wnorowska U., Wątek M., Wollny T., Głuszek K., Gózdź S., Levental I., Bucki R., „*The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development*”, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 64, pp. 33-46, 2016
- [66] Zhang H., Yuan X., Yang Y., Wanyan Y., Tao L., Chen Y., „*Cathelicidin LL-37 promotes EMT, migration and metastasis of hepatocellular carcinoma cells in vitro and mouse model*”, *Cell Adhesion Migration*, vol. 17, pp. 20–34, 2023
- [67] Seil M., Nagant C., Dehaye J., Vandenbranden M., Lensink M., „*Spotlight on human LL-37, an immunomodulatory peptide with promising cell-penetrating properties*”, *Pharmaceuticals*, vol. 3, pp. 3435-3460, 2010
- [68] Nagaoka I., Tamura H., Reich J., „*Therapeutic potential of cathelicidin peptide ll-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model*”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, pp. 1-16, 2020

- [69] De Lorenzi E., Chiari M., Colombo R., Cretich M., Sola L., Vanna R., Gagni P., Bisceglia F. Morasso C., Lin J., Lee M., McGeer P., Barron A., „*Evidence that the human innate immune peptide LL-37 may be a binding partner of amyloid- β and inhibitor of fibril assembly*”, *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 59, pp. 1213–1226, 2017
- [70] Armiento V., Hille K., Naltsas D., Lin J., Barron A., Kapurniotu A., „*The Human Host-Defense Peptide Cathelicidin LL-37 is a Nanomolar Inhibitor of Amyloid Self-Assembly of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)*”, *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 59, pp. 12837–12841, 2020
- [71] Neurath H., Woodbury R. Everitt M., „*Mast cell proteases*”, *Method Enzymology*, vol. 80, pp. 588-609, 1981.
- [72] Page M., Di Cera E., „*Serine peptidases: Classification, structure and function*”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, pp. 1220-1233, 2008
- [73] Heutinck K., Berge I., Hack C., Hamann J., Rowshani A., „*Serine proteases of the human immune system in health and disease*”, *Molecular Immunology*, vol. 47, pp. 1943-1955, 2010
- [74] Schechter I. , Berger A., „*On the size of the active site in proteases. I. Papain*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 27, pp. 157-162, 1967
- [75] Fujinaga M., Chernaia M., Halenbeck R., Koths K., James M., „*The Crystal Structure of PR3, a Neutrophil Serine Proteinase Antigen of Wegener’s Granulomatosis Antibodies*”, *Journal of Molecular Biology*, vol. 261, pp. 267-278, 1996
- [76] Voynow J., Shinbashi M., „*Neutrophil elastase and chronic lung disease*”, *Biomolecules*, vol. 11, pp. 1-15, 2021
- [77] Segal A., „*How neutrophils kill microbes*”, *Annual Review of Immunology*, vol. 23, pp. 197-223, 2005
- [78] Papayannopoulos V., Zychlinsky A., „*NETs: a new strategy for using old weapons*”, *Trends Immunology*, vol. 30, pp. 511-556, 2009
- [79] von der Geld Y., Limburg P., Kallenberg C., „*Proteinase 3, Wegener’s autoantigen: from gene to antygen*”, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 69, pp. 177,190, 2001

- [80] Korkmaz B., Hajjar E., Kalupov T., Reuter N., Brillard-Bourdet M., Moreau T., Juliano L., Gauthier F., „*Influence of charge distribution at the active site surface on the substrate specificity of human neutrophil protease 3 and elastase: A kinetic and molecular modeling analysis*” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 1989–199, 2007
- [81] Bank U., Ansorge S., „*More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control*”, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 69, pp. 197–206, 2001
- [82] Wiedow O., Meyer-Hoffert U., „*Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation*”, *Journal of Internal Medicine*, vol. 257, pp. 319–28, 2005
- [83] Owen C., Campbell E., „*The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis*”, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 65, pp. 137–50, 1999
- [84] Witalison E., Thompson P., Hofseth L., „*Protein Arginine Deiminases and Associated Citrullination: Physiological Functions and Diseases Associated with Dysregulation*”, *Curr Drug Targets*, vol. 16, pp. 700–710, 2015
- [85] Inagaki M., Takahara H., Nishi Y., Sugawara K., Sato C., „*Ca²⁺-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain*” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, pp. 18119–18127, 1989
- [86] György B., Tóth E., Tarcsa E., Falus A., Buzás E., „*Citrullination: A posttranslational modification in health and disease*”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, pp. 1662–1677, 2006
- [87] Vossenaar E., Zendman A., van Venrooij W., Pruijn G., „*PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease*”, *Bioessays*, vol. 25, pp. 1106–1118, 2003
- [88] Wiersma V., Clarke A., Pouwels S., Perry E., Abdullah T., Kelly C., De Soyza A., Hutchinson D., Eggleton P., Bremer E., „*Galectin-9 is a possible promoter of immunopathology in rheumatoid arthritis by activation of peptidyl arginine deiminase 4 (PAD-4) in Granulocytes*” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, pp. 1–20, 2019

- [89] Antosova Z., Mackova M., Kral V., Macek T., „*Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?*”, Trends in Biotechnology, vol.27, pp. 628-635, 2009
- [90] Murray J., Brown L., Langer R., „*Controlled Release of Microquantities of Macromolecules*”, Cancer Drug Deliv, vol. 1, pp. 119-123, 1984
- [91] Ladner R., Sato A., Gorzelany J., Souza M., „*Phage display- derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies*”, Drug Discovery Today, vol. 9, pp. 525-529, 2004
- [92] Melchionna M., Styan K., Marchesan S., „*The Unexpected Advantages of Using D- Amino Acids for Peptide Self- Assembly into Nanostructured Hydrogels for Medicine*”, Current Topics in Medicinal Chemistry, vol. 16, pp. 2009-2016, 2016
- [93] Milroy L., Grossmann T., Hennig S., Brunsvelde L., Ottmann C., „*Modulators of protein-protein interactions*”, Chemical Reviews, vol. 114, pp. 4695–748, 2014
- [94] Wang L., Wang N., Zhang W., Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R., Fu C., „*Therapeutic peptides: current applications and future directions*”, Signal Transduct Targeted Therapy, vol. 7, pp. 1-27, 2022
- [95] Veronese F., „*Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions*”, Biomaterials, vol. 22, pp. 405-417, 2001
- [96] Gupta V., Bhavanasi S., Quadir M., Singh K., Ghosh G., Vasamreddy K., Ghosh A., Siahaan T., Banerjee S., Banerjee S., „*Protein PEGylation for cancer therapy: bench to bedside*”, Journal of Cell Communication and Signaling, vol. 13, pp. 319-330, 2019
- [97] Pelay-Gimeno M., Glas A., Koch O., Grossmann T., „*Strukturbasierte Entwicklung von Protein-Protein-Interaktions inhibitoren: Stabilisierung und Nachahmung von Peptidliganden*” Angewandte Chemie, vol. 127, pp. 9022–9054, 2015
- [98] Witt K., Davis T., „*CNS Drug Delivery: Opioid Peptides and the Blood-Brain Barrier*”, The An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, vol. 8, pp. 81-88, 2006
- [99] Hruby V., Cai M., „*Design of peptide and peptidomimetic ligands with novel pharmacological activity profiles*”, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 53, pp. 557-580, 2013

- [100] Tsai P., Volkin D., Dabora J., Thompson K., Bruner M., Gress J., Matuszewska B., Keogan M., Bondi J., Middaugh C., „*Formulation Design of Acidic Fibroblast Growth Factor*” *Pharmaceutical Research*, vol. 10, pp. 649–659, 1993
- [101] Johnson O., Cleland J., Lee H., Charnis M., Duenas E., Jaworowicz W., Shepard D., Shahzamani A., Jones A., Putney S., „*A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone*” *Nature Medicine*, vol. 2, pp. 795–797, 1996
- [102] Semalty A., Semalty M., Singh R., Saraf S. Saraf S., „*Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides*”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, pp. 741-747, 2007
- [103] Burnham N., „*Polymers for delivering peptides and proteins*”, *American Journal of Hospital Pharmacy*, vol. 51, pp. 210–218, 1994
- [104] Semalty A., Semalty M., Singh R., Saraf S. Saraf S., „*Properties and formulation of oral drug delivery systems of protein and peptides*” *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 69, pp. 741-763, 2007
- [105] Sanvicens N., Marco M., „*Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine*” *Trends in Biotechnology*, vol. 26, pp. 425–433, 2008
- [106] Antosova Z., Mackova M., Kral V., Macek T., „*Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?*” *Trends Biotechnology*, vol. 27, pp. 628–635, 2009
- [107] Wysocka M., Gruba N., Grzywa R., Giełdoń A., Bąchor R., Brzozowski K., Sieńczyk M., Dieter J., Szewczuk Z., Rolka K., Lesner A., „*PEGylated substrates of NSP4 protease: A tool to study protease specificity*”, *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1-11, 2016
- [108] Ashton N., Bolderson E., Cubeddu L., O’byrne K., Richard D., „*Human single-stranded DNA binding proteins are essential for maintaining genomic stability*”, *BMC Molecular Biology*, vol. 14, pp. 1-20, 2013
- [109] Peterson C., Orth K., Calamel K., „*Binding In Vitro of Multiple Cellular Proteins to Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer DNA*”, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 6, pp. 4168-4178, 1986

- [110] Alendar A., Berns A., „*Sentinels of chromatin: chromodomain helicase DNA-binding proteins in development and disease*”, Genes & Development, vol. 35, pp. 1403-1430, 2021
- [111] Countryman P., Countryman P., Fan Y., Gorthi A., Pan H., Strickland E., Kaur P., Wang X., Lei X., White C., You C., Wirth N., Tessmer I., Piehler J., Riehn R., Bishop A., Tao Y., Wang H., „*Cohesin SA2 is a sequence-independent DNA-binding protein that recognizes DNA replication and repair intermediates*” Journal of Biological Chemistry, vol. 293, pp. 1054–1069, 2018
- [112] Weickert P., Stingle J., „*Annual Review of Biochemistry DNA-Protein Crosslinks and Their Resolution A basic site: a position in DNA that lacks a DNA base; an abundant DNA lesion caused by spontaneous hydrolysis or upon enzymatic base excision*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 293, pp. 1054-1069, 2022
- [113] Hudson W., Ortlund E., „*The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA*”, Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 15, pp. 749–760, 2014
- [114] Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D., Weinrauch Y., Zychlinsky A., „*Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria*”, Nature Reviews Immunology, vol. 4, pp. 1532-1535, 2004
- [115] Sørensen O., Borregaard N., „*Neutrophil extracellular traps - The dark side of neutrophils*”, Nature Reviews Immunology, vol. 11, pp. 519-531, 2011
- [116] Mantovani A., Cassatella M., Costantini C., Jaillon S., „*Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*”, Nature Reviews Immunology, vol. 11, pp. 519- 531, 2011
- [117] Blanter M., Gouwy M., Struyf S., „*Studying neutrophil function in vitro: Cell models and environmental factors*”, Journal of Inflammation Research, vol. 14, pp. 141-162, 2021
- [118] Zhu S.Yu Y., Ren Y., Xu L., Wang H., Ling X., Jin L., Hu Y., Zhang H., Miao C., Guo K., „*The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing*”, Cell Death and Disease, vol. 12, pp. 1-9, 2021
- [119] Guimarães-Costa A., Nascimento M., Wardini A., Pinto-Da-Silva L., Saraiva E., „*ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death*”, Journal of Parasitology Research, vol. 2012, pp. 1-11, 2012

- [120] T. A. Fuchs T., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A., „*Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*” *Journal of Cell Biology*, vol. 176, pp. 231–241, 2007
- [121] Borregaard N., Theilgaard-Mönch K., Cowland J., Ståhle M., Sørensen O., „*Neutrophils and keratinocytes in innate immunity--cooperative actions to provide antimicrobial defense at the right time and place*” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 77, pp. 439–443, 2005
- [122] Borregaard N., Cowland J., „*Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*” *Blood*, vol. 89, pp. 3503–3521, 1997
- [123] Blanter M., Gouwy M., Struyf S., „*Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors*”, *Journal of Inflammation Research*, vol. 14, pp. 141–162, 2021
- [124] Connelly A., Huijbregts R., Pal H., Kuznetsova V., Davis M., Ong K., Fay C., Greene M., Overton E., Hel Z., „*Optimization of methods for the accurate characterization of whole blood neutrophils*” *Scientific Reports*, vol. 12, pp. 1-15, 2022
- [125] Y. GuoY., Gao F., Wang Q., Wang K., Pan S., Pan Z., Xu S., Li L., Zhao D., „*Differentiation of HL-60 cells in serum-free hematopoietic cell media enhances the production of neutrophil extracellular traps*”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 21, pp. 353-357, 2021
- [126] Rafiq M., Riveccio F., Zimmermann A., Visser C., Bruch A., Krüger T., Rojas K., Kniemeyer O., Blango M., Brakhage A., „*PLB-985 Neutrophil-Like Cells as a Model To Study Aspergillus fumigatus Pathogenesis*”, *mSphere*, vol. 7, pp. 940-1021, 2022
- [127] Tucker K., Lilly M., Heck L., Rado T., „*Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity*” *Blood*, vol. 70, pp. 372–8, 1987
- [128] Drexler H., Dirks W., Matsuo Y., MacLeod R., „*False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines*” *Leukemia*, vol. 17, pp. 416–26, 2003
- [129] Rincón E., Rocha-Gregg B., Collins S., „*A map of gene expression in neutrophil-like cell lines*”, *BMC Genomics*, vol. 19, pp. 573, 2018

- [130] Handzlik A., Bystrzycka W., Wachowska M., Sieczkowska S., Stelmaszczyk-Emmel A., Demkow U., Ciepiela O., „*The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps*” Immunology Cell Biology, vol. 96, pp. 413–425, 2018
- [131] Magnez R., Bailly C., Thuru X., „*Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases*”, International Journal of Molecular Sciences, vol. 23, pp. 1-15, 2022
- [132] N. Sewald N., Wilking S., Eckel R., Albu S., Wollschläger K., Gaus K., Becker A., Bartels F., Ros R., Anselmetti D., „*Probing DNA-peptide interaction forces at the single-molecule level*”, Journal of Peptide Science, vol. 12, pp. 536-542, 2006
- [133] Ahmad A., Ranjan S., Zhang W., Zou J., Pykkö I., Kinnunen P., „*Novel endosomolytic peptides for enhancing gene delivery in nanoparticles*”, Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, vol. 1848, pp. 544–553, 2015
- [134] Birnie G., „*The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation*”, British Journal of Cancer, vol. 9, pp. 41-45, 1988
- [135] Moghanloo E., Ghorbani E., Beikverdi M., Badameh P., Rezaei S., Piroozmand A., Teimourian S., Shahidi M., Khorshidi A., „*The Netosis Formation of HL-50 Cell Differentiated to Neutrophil- Like Cells by LPS*”, Journal of Human, Environment and Health Promotion, vol. 4, pp. 138-143, 2018
- [136] Martin S., Bradley J., Cotter T., „*HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis*”, Clinical & Experimental Immunology, vol. 79, pp. 448-453, 1990
- [137] Berridge M., Tan A., „*Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction*”, Archives of Biochemistry Biophysics, vol. 303, pp. 474–482, 1993
- [138] Islam M., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P., „*A review on macroscale and microscale cell lysis methods*”, Micromachines (Basel), vol. 8, pp. 83-86, 2017
- [139] Forster Th., „*Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*”, Annalen der Physik, vol. 437, pp. 55-75, 1948

- [140] Johansson J., Gudmundsson G. H., Rottenberg M., Berndt K., Agerberth B., „*Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*”, Journal of Biological Chemistry, vol. 273, pp. 3718–3724, 1998
- [141] Badal D., Dayal D., Singh G., Sachdeva N., „*Role of DNA-LL37 complexes in the activation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes in subjects with type 1 diabetes*”, Scientific Reports, vol. 10, pp. 1-19, 2020
- [142] Craig M., Radford M., Nguyen T., Avelsgard I., „*Thermodynamic characterization of the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and DNA oligonucleotides (978.3)*”, The FASEB Journal, vol. 28, pp. 24-30, 2014
- [143] Shahmiri M., Enciso M., Adda C., Smith B., Perugini M., Mechler A., „*Membrane Core-Specific Antimicrobial Action of Cathelicidin LL-37 Peptide Switches between Pore and Nanofibre Formation*”, Scientific Reports, vol. 6, pp. 1-11, 2016
- [144] Bryzek D., Golda A., Budziaszek J., Kowalczyk D., Wong A., Bieliecka E., Shakamuri P., Svoboda P., Pohl J., Potempa J., Koziel J., „*Citrullination-resistant ll-37 is a potent antimicrobial agent in the inflammatory environment high in arginine deiminase activity*” International Journalist of Molecular Sciences, vol. 21, pp. 1–15, 2020

OŚWIADCZENIE

Ja niżej podpisana oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. „Nowe analogi ludzkiej katelicydyny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną. Projektowanie, synteza chemiczna i badania biologiczne”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Lesnera, w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej w Katedrze Technologii Środowiska, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych osób w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. 2000 r. Nr 80, poz 904, z późn.zm.)

.....

data

.....

podpis