



Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Katarzyna Łada

**Analogi cząsteczki Cystapep 1 jako nowa klasa związków
przeciwbakteryjnych wobec *Staphylococcus aureus* opornego na
metycylinę (MRSA): projektowanie, synteza i badania biologiczne**

Promotor:
prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło

Promotor pomocniczy:
dr Maria Dzierżyńska

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej

Gdańsk 2026

Chciałabym podziękować wszystkim osobom, których pomoc i wsparcie przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor **prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło** za życzliwość oraz wsparcie okazywane na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy. Dziękuję za możliwość rozwoju, zarażanie pasją do nauki i pozytywną energię, które dodawały mi motywacji i pomagały realizować kolejne etapy pracy.

Równie szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do Promotor pomocniczej – **dr Marii Dzierżyńskiej** za ogromną życzliwość, cierpliwość, wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy. Pani Marysiu – dziękuję przede wszystkim za wsparcie w trudnych momentach oraz, że podczas wszystkich prac laboratoryjnych mogłam liczyć na Pani cenne wskazówki i zaangażowanie – od pierwszych doświadczeń aż po końcowe etapy badań. Dziękuję **dr Łukaszowi Grabowskiemu** za wsparcie podczas realizacji badań mikrobiologicznych oraz zaangażowanie i pozytywne nastawienie, dzięki którym praca w laboratorium była znacznie łatwiejsza i przyjemniejsza.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do **dr hab. Agnieszki Gajewicz-Skrętniej** za zaangażowanie i nieocenioną pomoc podczas projektowania związków oraz opracowywania wizualizacji danych proteomicznych.

Dziękuję także **dr Monice Maciąg-Dorszyńskiej** za pomoc w prowadzeniu badań nad mechanizmami działania.

Serdecznie dziękuję wszystkim **Pracownikom oraz Doktorantom Katedry Chemii Biomedycznej** za życzliwą atmosferę oraz pomoc. Z całego serca dziękuję również koleżankom z pokoju A113 – **Darii, Karolinie i Agnieszce** – za merytoryczne dyskusje oraz liczne rozmowy w chwilach zwątpienia.

Wyjątkową wdzięczność pragnę wyrazić mojej **Mamie, Tacie oraz Bratu**. To dzięki Wam mogłam realizować swoje cele i dojść do miejsca, w którym jestem dzisiaj.

Największe podziękowania kieruję do mojego **męża Bartka**. Dziękuję, że mogłam liczyć na Ciebie każdego dnia, za nieustanne dodawanie mi siły i motywacji. Twoje wsparcie i wiara we mnie dawały mi poczucie, że dam sobie radę ze wszystkim.

Realizacja badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej była możliwa dzięki wsparciu finansowemu z następujących projektów badawczych oraz programów:

1. Projektu Preludium Bis 2 „Nowa klasa związków przeciwbakteryjnych. Projektowanie, synteza oraz badanie mechanizmu działania” umowa nr 2020/39/O/NZ7/00430, kierownik projektu prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki;



NARODOWE CENTRUM NAUKI

2. Programu stażowego NAWA Preludium Bis 2, finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej;



NARODOWA AGENCJA
WYMIANY AKADEMICKIEJ

3. Projektu Badania Młodych Naukowców „Badanie potencjału hemolitycznego oraz wpływu temperatury inkubacji na aktywność przeciwbakteryjną cząsteczki A-20 oraz jej analogów” nr 539-T070-B136-24, finansowanego przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego;
4. Projektu Badania Młodych Naukowców „Ocena wpływu działania A-20 oraz jego analogów na redukcję biofilmu tworzonego przez oporną na metycylinę bakterię *Staphylococcus aureus*” nr 539-T070-B210-25, finansowanego przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.



Uniwersytet
Gdański



Spis treści

Streszczenie.....	9
Summary.....	12
Wykaz stosowanych skrótów	15
I. Wstęp literaturowy	18
1. Wprowadzenie	18
2. Związki przeciwbakteryjne stosowane i rozwijane w terapii zakażeń MRSA	21
2.1. Antybiotyki	22
2.1.1. Wankomycyna.....	22
2.1.1. Daptomycyna	25
2.1.2. Linezolid	27
2.1.3. Dalbawancyna.....	28
2.1.4. Oritawancyna	29
2.2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs).....	30
2.2.1. Ludzka katelicydyna LL-37	33
2.2.2. Ludzkie β -defensyny.....	35
2.3. Peptydomimetyki	36
2.3.1. Brilacydyna (PMX30063).....	37
2.3.2. LTX-109.....	37
2.3.3. Cystapep 1.....	38
3. Główne mechanizmy działania związków przeciwbakteryjnych	41
3.1. Hamowanie syntezy ściany komórkowej	41
3.2. Zaburzenie integralności błony komórkowej	43
3.3. Inhibicja biosyntezy białek	44
3.4. Hamowanie syntezy kwasów nukleinowych	45
4. Metody badania mechanizmów działania związków przeciwbakteryjnych	46
4.1. Metody omiczne w badaniu mechanizmów działania związków przeciwbakteryjnych	47
4.1.1. Transkryptomika i sekwencjonowanie RNA	47
4.1.2. Genomika i sekwencjonowanie DNA.....	48
4.1.3. Funkcjonalna identyfikacja celu za pomocą proteomiki ekspresyjnej (FITE _{XP} , ang. <i>functional identification of target by expression proteomics</i>).....	49

4.1.4. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu (PISA, ang. <i>proteome integral solubility alteration</i>)	49
4.2. Metody obrazowania i znakowania komórek bakteryjnych.....	50
4.2.1. Obrazowanie mikroskopowe.....	50
4.2.2. Barwienie fluorescencyjne	51
4.2.3. Znakowanie radionuklidami.....	53
II. Hipoteza badawcza i cel pracy	54
III. Materiały i metody.....	57
1. Analizy chemometryczne.....	57
2. Synteza związków	57
2.1. Synteza Boc-Valinolu	58
2.2. Synteza Boc-ValΨ[CH ₂ -O-Ms], metanosulfonian 2-(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonyloamino)-3-metylobutanu).....	58
2.3. Synteza Boc-ValΨ[CH ₂ -N ₃], azydek 2-(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonylo-amino)-3-metylobutanu.....	59
2.4. Synteza Boc-ValΨ[CH ₂ -NH ₂] _x HCl, chlorowodorek 2-(<i>N</i> - <i>tert</i> -butoksykarbonylo-amino)-3-metylobutanu.....	59
2.5. Synteza związków	59
3. Oczyszczanie i charakterystyka peptydomimetyków	61
4. Badania mikrobiologiczne.....	62
4.1. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC).....	63
4.2. Oznaczanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC)	64
4.3. Oznaczanie MIC metodą pomiaru gęstości optycznej w czasie	65
4.4. Określanie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) w obecności peptydomimetyków	66
4.5. Wpływ temperatury inkubacji na aktywność przeciwbakteryjną zsyntezowanych peptydomimetyków	66
5. Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków w ludzkim osoczu oraz wodzie ..	67
6. Badania komórkowe.....	67
6.1. Badanie cytotoksyczności wybranych peptydomimetyków wobec linii komórkowej HaCaT	68
6.1.1. Hodowla komórek	68
6.1.2. Badanie wpływu wybranych związków na przeżywalność komórek linii HaCaT	68

6.2. Określanie aktywności hemolitycznej	69
6.2.1. Izolacja ludzkich erytrocytów z krwi.....	70
6.2.2. Badanie potencjału hemolitycznego wybranych peptydomimetyków	70
7. Ocena zdolności redukcji biofilmu MRSA.....	70
7.1. Pomiar liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) w biofilmie MRSA.....	71
7.2. Ocena biomasy biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym	71
7.3. Obrazowanie biofilmu metodą skaningowej mikroskopii elektronowej	72
8. Badanie mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków.....	72
8.1. Określanie wpływu wybranych peptydomimetyków na syntezę kwasów nukleinowych i białek w komórkach bakteryjnych	73
8.2. Ocena wpływu wybranych peptydomimetyków na integralność błony cytoplazmatycznej komórek bakteryjnych	74
8.2.1. Ocena integralności błony komórkowej w teście wychwyty jodku propidyny	74
8.2.2. Obrazowanie komórek bakteryjnych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.....	75
9. Analizy proteomiczne	76
9.1. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu (PISA) po inkubacji lizatu bakteryjnego MRSA 44 ze związkiem A-20 i jego pochodnymi	76
9.1.1. Przygotowanie materiału bakteryjnego do badań.....	76
9.1.2. Przygotowanie lizatu bakteryjnego oraz warunki analiz LC-MS/MS	77
9.2. Funkcjonalna identyfikacja zmian proteomu po inkubacji zawiesiny bakteryjnej MRSA 44 z A-20 i jego pochodnymi	82
IV. Wyniki badań i dyskusja	83
1. Projektowanie analogów Cystapep 1 (A-20) z wykorzystaniem metod chemometrycznych i analizy SAR.....	83
1.1. Analiza chemometryczna i założenia projektowania nowych analogów Cystapep 1 (A-20).....	83
1.2. Charakterystyka zaprojektowanych grup analogów Cystapep 1 (A-20) oraz model SAR.....	88
2. Synteza i charakterystyka otrzymanych peptydomimetyków	93
3. Badania mikrobiologiczne	103
3.1. Określenie wartości MIC oraz MBC otrzymanych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich	103

3.2. Określenie wartości MIC oraz MBC wybranych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych	108
3.3. Ocena aktywności wybranych peptydomimetyków wobec szczepów MRSA metodą monitorowania wzrostu bakterii w czasie	109
3.4. Ocena wpływu peptydomimetyków na przeżywalność szczepów MRSA metodą oznaczania CFU/ml	118
3.5. Ocena termostabilności wybranych peptydomimetyków na podstawie ich aktywności przeciwbakteryjnej	120
4. Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków w wodzie i ludzkim osoczu	121
5. Badania komórkowe	124
5.1. Wpływ wybranych peptydomimetyków na przeżywalność komórek linii HaCaT	124
5.2. Ocena aktywności hemolitycznej wybranych peptydomimetyków	126
6. Ocena zdolności wybranych peptydomimetyków do redukcji biofilmu MRSA	128
7. Analiza mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków w komórkach MRSA	132
8. Analizy proteomiczne	142
8.1. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu metodą PISA	142
8.2. Analiza zmian proteomu komórek MRSA metodą proteomiki ekspresyjnej FITE _{XP}	148
V. Podsumowanie	155
Dorobek naukowy	158
VI. Literatura cytowana	161
Załącznik 1	179
Załącznik 2	186
Załącznik 3	191

Streszczenie

Staphylococcus aureus jest jednym z najważniejszych patogenów bakteryjnych człowieka, odpowiedzialnym za zakażenia skóry, tkanek miękkich, kości, płuc oraz zakażenia ogólnoustrojowe. Szczególne zagrożenie stanowią szczepy metycylinooporne (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), które wykazują oporność na wiele stosowanych antybiotyków. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oporność drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe należy do najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego na świecie. Rosnąca częstość występowania szczepów wielolekoopornych ogranicza skuteczność dostępnych terapii i podkreśla potrzebę poszukiwania nowych chemioterapeutyków. Obiecującą grupą związków są peptydomimetyki, które mogą wykazywać wysoką aktywność wobec bakterii opornych na antybiotyki.

Jednym z peptydomimetyków aktywnych wobec bakterii Gram-dodatnich, w tym *S. aureus*, jest związek A-20 (Cystapep 1). Opracowano go na podstawie *N*-końcowego fragmentu ludzkiej cystatyny C (Arg⁸-Leu⁹-Val¹⁰-Gly¹¹), która jest białkiem o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Głównym celem mojej pracy było zaprojektowanie, synteza oraz kompleksowa charakterystyka nowych analogów cząsteczki Cystapep 1 (A-20) jako potencjalnej klasy peptydomimetycznych związków przeciwbakteryjnych aktywnych wobec szczepów MRSA.

Cel ten obejmował określenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną peptydomimetyków, właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością przeciwbakteryjną z wykorzystaniem metod chemometrycznych oraz SAR, ale także ocenę aktywności przeciwbakteryjnej, stabilności i cytotoksyczności otrzymanych związków. Istotnym elementem rozprawy doktorskiej było również wyjaśnienie możliwych mechanizmów działania wybranych peptydomimetyków wobec komórek MRSA, w tym ocena ich wpływu na integralność błony komórkowej oraz biosyntezę makrocząstek. Dodatkowo podjęłam próbę identyfikacji potencjalnych celów molekularnych badanych związków w komórkach MRSA poprzez analizę zmian proteomicznych.

Nowe analogi związku A-20 zaprojektowałam na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Chemii Biomedycznej oraz z wykorzystaniem metod

chemometrycznych i analizy SAR przeprowadzonej we współpracy z dr hab. Agnieszką Gajewicz-Skrętną z Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej. Wybrane związki otrzymałam metodą syntezy klasycznej w roztworze, a następnie oczyściłam i scharakteryzowałam. Ich aktywność przeciwbakteryjną oceniłam poprzez wyznaczenie wartości MIC i MBC wobec szczepów *S. aureus* oraz *S. pyogenes*. Prawie wszystkie otrzymane związki posiadały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów. Badania stabilności wykazały, że wybrane pochodne są stabilne zarówno w środowisku wodnym, jak i w ludzkim osoczu.

Następnie oceniłam skuteczność związku A-20 oraz jego wybranych pochodnych (A-75, A-76, A-238, A-241, A-243) wobec szerszego panelu szczepów MRSA, obejmującego izolaty szpitalne i laboratoryjne. Badania wzrostu bakterii w obecności peptydomimetyków prowadzone metodą pomiaru gęstości optycznej (OD₆₀₀) w czasie potwierdziły wysoką aktywność związków niezależnie od pochodzenia szczepów.

Dla związku A-20 oraz jego wybranych zsyntezowanych analogów (A-75, A-76, A-238, A-241, A-243) przeprowadziłam badania cytotoksyczności wobec ludzkich keratynocytów oraz ocenę aktywności hemolitycznej. Analizowane peptydomimetyki nie wykazywały działania cytotoksycznego ani hemolitycznego w zakresie stężeń odpowiadających ich aktywności przeciwbakteryjnej.

Mechanizm działania badanych peptydomimetyków (A-20, A-76 i A-241) w komórkach MRSA analizowałam poprzez ocenę wpływu na proces replikacji, transkrypcji, translacji oraz integralność wewnętrznej błony cytoplazmatycznej. Wykorzystując radioaktywnie znakowane prekursorsy wykazałam hamowanie syntezy DNA i RNA w komórkach MRSA. Test wychwytu jodku propidyny oraz obserwacje z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) wskazały na destabilizację błony cytoplazmatycznej. Otrzymane wyniki sugerują złożony mechanizm działania obejmujący zarówno oddziaływanie uzyskanych związków z błoną komórkową, jak i wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe.

Ze względu na istotną rolę biofilmów w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *S. aureus*, oceniłam również zdolność wybranych związków (A-20, A-76 oraz A-241) do redukcji biofilmu MRSA. Skuteczność działania potwierdziłam metodą oznaczania liczby jednostek tworzących kolonie, barwieniem fioletem krystalicznym oraz obserwacjami przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wszystkie przebadane związki wykazywały zdolność do redukcji biofilmu bakteryjnego.

W ostatnim etapie podjęłam próbę identyfikacji potencjalnych celów molekularnych badanych peptydomimetyków (A-20, A-220, A-235, A-76, A-241) z wykorzystaniem metod PISA oraz FITeXP. Pomimo zastosowania nowoczesnych narzędzi proteomicznych jednoznaczne wskazanie celu molekularnego okazało się utrudnione, co może wynikać ze złożonego i wielokierunkowego mechanizmu działania tej grupy związków.

Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat peptydomimetyków jako potencjalnych kandydatów na nowe leki przeciwbakteryjne. Otrzymane pochodne związku A-20 charakteryzują się wysoką aktywnością wobec szczepów MRSA, korzystnym profilem bezpieczeństwa oraz wysoką stabilnością w warunkach fizjologicznych. Uzyskane wyniki wskazują, że wybrane analogi związku A-20 (A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243) stanowią obiecującą grupę chemioterapeutyków do dalszych badań nad nowymi terapiami zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSA.

Summary

Staphylococcus aureus is one of the most important human bacterial pathogens, responsible for infections of the skin, soft tissues, bones, lungs, as well as systemic infections. Methicillin-resistant strains (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), which exhibit resistance to many commonly used antibiotics, pose a particular threat. According to the World Health Organization (WHO), antimicrobial resistance is among the most serious threats to global public health. The increasing prevalence of multidrug-resistant strains limits the effectiveness of available therapies and highlights the need to search for new chemotherapeutic agents. Peptidomimetics represent a promising group of compounds that may exhibit high activity against antibiotic-resistant bacteria.

One of the peptidomimetics active against Gram-positive bacteria, including *S. aureus*, is compound A-20 (Cystapep 1). It was developed based on the *N*-terminal fragment of human cystatin C (Arg⁸-Leu⁹-Val¹⁰-Gly¹¹), a protein with antimicrobial properties.

The main objective of my doctoral research was the design, synthesis, and comprehensive characterization of novel analogs of the Cystapep 1 (A-20) molecule as a potential class of peptidomimetic antibacterial compounds active against MRSA strains.

This objective included determining the relationships between the chemical structure of peptidomimetics, their physicochemical properties, and antibacterial activity using chemometric methods and structure-activity relationship (SAR) analysis, as well as evaluating the antibacterial activity, stability, and cytotoxicity of the obtained compounds. An important part of the dissertation was also investigation of the possible mechanisms of action of selected peptidomimetics against MRSA cells, including the assessment of their effects on cell membrane integrity and macromolecules biosynthesis. Furthermore, potential molecular targets of the investigated compounds in MRSA cells were explored using proteomics-based approaches.

The novel analogs of compound A-20 were designed based on previous studies conducted at the Department of Biomedical Chemistry and with the use of chemometric methods and SAR analysis performed in collaboration with Dr. Hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna from the Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdańsk University of Technology. Selected compounds were synthesized using classical solution-phase synthesis, followed by purification and characterization. Their

antibacterial activity was evaluated by determining minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values against *S. aureus* and *S. pyogenes* strains. Nearly all obtained compounds exhibited antimicrobial activity against the tested strains. Stability studies demonstrated that selected derivatives were stable both in aqueous environments and in human plasma.

The efficacy of compound A-20 and its selected derivatives (A-75, A-76, A-238, A-241, and A-243) was further evaluated against a broader panel of MRSA strains, including both clinical and laboratory isolates. Bacterial growth studies conducted by measuring optical density (OD₆₀₀) over time confirmed the high activity of these compounds regardless of the origin of the strains.

For compound A-20 and its selected synthesized analogs (A-75, A-76, A-238, A-241, and A-243), I performed cytotoxicity studies using human keratinocytes and assessed their hemolytic activity. The analyzed peptidomimetics did not exhibit cytotoxic or hemolytic effects within the concentration range corresponding to their antibacterial activity.

The mechanism of action of the investigated peptidomimetics (A-20, A-76, and A-241) in MRSA cells was analyzed by assessing their effects on replication, transcription, translation, and the integrity of the inner cytoplasmic membrane. Using radiolabeled precursors, I demonstrated the inhibition of DNA and RNA synthesis in MRSA cells. The propidium iodide uptake assay and observations performed using transmission electron microscopy (TEM) indicated destabilization of the cytoplasmic membrane. The obtained results suggest a complex mechanism of action involving both interactions of the compounds with the cell membrane and effects on intracellular processes.

Due to the significant role of biofilms in the pathogenesis of *S. aureus* infections, I also evaluated the ability of selected compounds (A-20, A-76, and A-241) to reduce MRSA biofilms. Their efficacy was confirmed by colony-forming unit (CFU) determination, crystal violet staining, and observations using scanning electron microscopy (SEM). All tested compounds demonstrated the ability to reduce bacterial biofilms.

Furthermore, potential molecular targets of the investigated peptidomimetics (A-20, A-220, A-235, A-76, and A-241) were explored using PISA and FITEp approaches. Despite the application of advanced proteomic tools, the identification of a

molecular target proved challenging, which may result from the complex and multifaceted mechanism of action of this group of compounds.

The conducted studies expand current knowledge on peptidomimetics as potential candidates for novel antibacterial drugs. The obtained derivatives of compound A-20 are characterized by high activity against MRSA strains, a promising safety profile, and high stability under physiological conditions. The results demonstrate that selected analogs of compound A-20 (A-75, A-76, A-238, A-241, and A-243) are promising candidates for further development as antibacterial agents against MRSA infections.

Wykaz stosowanych skrótów

4- <i>t</i> -Bu-Cin-OH	kwask 3-(4-(<i>tert</i> -butyl)fenylo)akrylowy
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ACN	acetonitryl
AcOEt	octan etylu
AcOH	kwask octowy
AGC	automatyczna kontrola wzmocnienia (ang. <i>Automatic Gain Control</i>)
AMPs	peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>Antimicrobial Peptides</i>)
AMR	oporność drobnoustrojów na antybiotyki (ang. <i>Antimicrobial Resistance</i>)
BHI	podłoże bulionowe mózgowo-sercowe (ang. <i>Brain Heart Infusion</i>)
Boc	<i>tert</i> -butyloksykarbonyl
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę związany z zakażeniami pozaszpitalnymi (ang. <i>Community-Associated MRSA</i>)
CDC	Centra Kontroli i Prewencji Chorób (ang. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CFU	jednostka tworząca kolonię (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
Cin	kwask <i>trans</i> -cynamonowy
CLSI	Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CPM	zliczenia na minutę (ang. <i>Counts Per Minute</i>)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCU	dicykloheksylomocznik
DMEM	ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DPBS	ang. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	ditioeterotiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPPS	kwask <i>N</i> -(2-hydroksyetylo)piperazyno- <i>N'</i> -(3-propanosulfonowy)
FBS	surowica płodowa bydłęca (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)

FITeXP	Funkcjonalna identyfikacja celu zmian proteomu za pomocą proteomiki ekspresyjnej (ang. <i>Functional Identification of Target by Expression Proteomics</i>)
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę związany z opieką zdrowotną (ang. <i>Healthcare-Associated MRSA</i>)
hBD-3	ludzka β -defensyna 3 (ang. <i>human β-defensin 3</i>)
HCD	wysokoenergetyczna dysocjacja zderzeniowa (ang. <i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>)
Hla	α -hemolizyna
HOBt	hydroksybenzotriazol
IAA	jodoacetamid
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę pochodzenia zwierzęcego (ang. <i>Livestock-Associated MRSA</i>)
MBC	minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. <i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
MeOH	metanol
MIC	minimalne stężenie hamujące (ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oporny na metycylinę (ang. <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> wrażliwy na metycylinę (ang. <i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i>)
NAA	kwasy 1-naftylooctowe
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAE	efekt poantybiotyczny (ang. <i>Post-Antibiotic Effect</i>)
PBP	białka wiążące penicylinę (ang. <i>Penicillin-Binding Proteins</i>)
PBS	buforowany roztwór soli fosforanowej
PI	jodek propidyny
PISA	Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu (ang. <i>Proteome Integral Solubility Alteration</i>)
PSM	fenolowo-rozpuszczalne moduliny (ang. <i>PhenolSoluble Modulins</i>)
PVL	toksyna Panton-Valentine
R _f	współczynnik retencji

RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych fazach
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SAR	zależność struktura aktywność (ang. <i>Structure-Activity Relationship</i>)
SEM	skaningowy mikroskop elektronowy (ang. <i>Scanning Electron Microscope</i>)
SPPS	synteza peptydów w fazie stałej, (ang. <i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>)
TCA	kwask trichlorooctowy
TEA	trietyloamina
TEAP	fosforan trietyloamoniowy
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. <i>Transmission Electron Microscope</i>)
TFA	kwask trifluorooctowy
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TSST-1	toksyna zespołu wstrząsu toksycznego
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> średniooporny na wankomycynę (ang. <i>Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i>)
VRE	szczepy <i>Enterococcus</i> odporne na wankomycynę (ang. <i>Vancomycin Resistant Enterococci</i>)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> odporny na wankomycynę (ang. <i>Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
WGS	sekwencjonowanie całogenomowe (ang. <i>Whole Genome Sequencing</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia, (ang. <i>World Health Organization</i>)
Z	benzyloksykarbonyl

I. Wstęp literaturowy

1. Wprowadzenie

Oporność drobnoustrojów na antybiotyki (AMR, ang. *Antimicrobial Resistance*) jest jednym z największych wyzwań zdrowia publicznego na świecie [1]. Na wzrost tego zjawiska wpływa wiele wzajemnie powiązanych czynników. Kluczową rolę odgrywa nadmierne stosowanie antybiotyków w medycynie, jak również niewłaściwe użycie w hodowli zwierząt. Istotne znaczenie mają ponadto czynniki społeczne i ekonomiczne, takie jak zbyt swobodny dostęp do chemioterapeutyków w niektórych krajach, niska higiena, czy niewystarczające działania profilaktyczne w zakresie kontroli zakażeń [2]. AMR jest często określana mianem „cichej pandemii” i wymaga natychmiastowej oraz skutecznej interwencji [3]. Szacuje się, że w 2019 roku liczba zgonów na świecie bezpośrednio związanych z tym zjawiskiem przekroczyła 1.2 miliona [4], [5]. Według WHO (Światowej Organizacji Zdrowia, ang. *World Health Organization*), jeśli nie zostaną podjęte skuteczne działania prewencyjne, liczba zgonów spowodowanych AMR może wzrosnąć do około 10 milionów rocznie, co uczyniłoby ją główną przyczyną śmierci na świecie, przewyższającą nawet choroby nowotworowe [6].

Jednym z najgroźniejszych patogenów związanych z opornością na antybiotyki jest *Staphylococcus aureus*, czyli gronkowiec złocisty, a szczególnie jego szczepy odporne na metycylinę, określane jako MRSA (ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) [7]. Obok *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* został sklasyfikowany przez WHO jako jeden z priorytetowych patogenów bakteryjnych o istotnym znaczeniu klinicznym w kontekście narastającej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz potrzeby opracowywania nowych strategii terapeutycznych. [8]. Bakteria ta jest istotnym czynnikiem etiologicznym w zakażeniach szpitalnych, ale występuje także w populacji ogólnej. MRSA wykazuje oporność na większość antybiotyków β -laktamowych, w tym penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, co znacząco ogranicza wybór dostępnych chemioterapeutyków [9], [10].

Pod względem epidemiologicznym szczepy MRSA są klasyfikowane jako: szczepy związane z opieką zdrowotną (HA-MRSA, ang. *Healthcare-Associated MRSA*),

zwykle wielolekooporne i częściej występujące u pacjentów hospitalizowanych, szczepy środowiskowe (CA-MRSA, ang. *Community-Associated MRSA*) oraz szczepy pochodzenia zwierzęcego (LA-MRSA, ang. *Livestock-Associated MRSA*). HA-MRSA są najczęściej związane z hospitalizacją lub niedawnym kontaktem z placówkami ochrony zdrowia, a izolowane szczepy zwykle wykazują fenotyp wielolekooporności. Szczepy CA-MRSA zakażają osoby wcześniej zdrowe w warunkach pozaszpitalnych, zwykle wykazując mniejszy zakres oporności na antybiotyki. Cechują się natomiast zwiększoną wirulencją, m.in. ze względu na obecność genów kodujących leukocydynę Pantone-Valentine (PVL). LA-MRSA są związane głównie z hodowlą zwierząt gospodarskich, zwłaszcza trzody chlewnej. Szczepy te są znaczącym źródłem oporności, który może prowadzić do kolonizacji oraz zakażeń u ludzi mających kontakt ze zwierzętami [11], [12].

Niezależnie od pochodzenia epidemiologicznego, wszystkie szczepy MRSA zachowują cechy gatunkowe *Staphylococcus aureus*, wynikające z określonej budowy komórki bakteryjnej. *S. aureus* jest Gram-dodatnią bakterią o kulistym kształcie komórki, niewytwarzającą przetrwalników. Jedną z charakterystycznych cech tego gatunku jest dodatnia reakcja koagulazowa, związana z wytwarzaniem koagulazy, czyli enzymu indukującego krzepnięcie fibrynogenu osocza, co sprzyja ochronie bakterii przed mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza [13], [14], [15].

Istotnym elementem wirulencji *S. aureus* jest zdolność tej bakterii do wytwarzania licznych czynników toksycznych. Należą do nich egzotoksyny, które można podzielić na cytotoksyny oraz toksyny o aktywności superantygenowej, odgrywające kluczową rolę w patogenezie zakażeń. Do najważniejszych cytotoksyn tej bakterii należą hemolizyny (α , β , γ oraz δ), które wykazują aktywność cytolityczną, m.in. wobec erytrocytów [16], [17]. Spośród cytotoksyn najlepiej scharakteryzowana jest α -hemolizyna (Hla). Jest ona zdolna do tworzenia porów w błonach komórkowych erytrocytów, komórek nabłonkowych i komórek układu odpornościowego, prowadząc do ich lizy oraz indukcji odpowiedzi zapalnej. α -Toksyna jest wydzielana przez *S. aureus* w postaci rozpuszczalnego w wodzie monomeru, który może wiązać się z błoną komórkową gospodarza i może oligomeryzować do struktury heptamerowej. Proces ten zachodzi na powierzchni komórek gospodarza i prowadzi do wytworzenia amfipatycznego poru o średnicy 1-3 nm, który perforuje eukariotyczną dwuwarstwę lipidową. Powstały por umożliwia przepływ jonów Ca^{2+} , K^{+} , ATP oraz niskocząsteczkowych związków o masie 1-4 kDa przez utworzony kanał [17], [18], [19].

Działanie β -hemolizyny (sfingomielinazy C) polega na enzymatycznym uszkodzaniu błon komórkowych bogatych w sfingomielinę [20]. Hemolizyna γ należy do grupy dwuskładnikowych toksyn wytwarzanych przez *S. aureus* i składa się z dwóch komponentów, określanych jako komponent S (białka: HlgA, HlgC, LukS-PV) oraz komponent F (białka: HlgB, LukF-PV). Ze względu na obecność trzech różnych podjednostek typu S oraz dwóch podjednostek typu F możliwe jest występowanie sześciu różnych wariantów toksyny γ . Działanie tej toksyny prowadzi do lizy neutrofili i makrofagów, a w konsekwencji do upośledzenia fagocytozy oraz wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [19], [21]. Podobną budowę posiada również leukotoksyna PVL, która jest obecna u prawie 50% szczepów *S. aureus* związanych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc [22].

Toksyna δ , w odróżnieniu do opisanych wyżej hemolizyn, jest krótkim, amfipatycznym peptydem, należącym do rodziny fenolowo-rozpuszczalnych modulin. Oddziałuje z lipidami błon komórkowych, destabilizując ich strukturę w sposób zbliżony do działania detergentów. δ -Hemolizyna przyczynia się do rozwoju atopowego zapalenia skóry poprzez indukowanie degranulacji komórek tucznych oraz nasilanie reakcji zapalnej [17], [19], [23]. Toksyny o aktywności superantygenowej (np. enterotoksyny A i B oraz toksyna zespołu wstrząsu toksycznego TSST-1) są również ważnym elementem wirulencji bakterii *S. aureus*. Toksyny te charakteryzują się zdolnością do jednoczesnego wiązania cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy II na komórkach prezentujących antygen oraz receptorów limfocytów T, z pominięciem klasycznego przetwarzania antygeny. Skutkuje to masywną, nieswoistą aktywacją limfocytów T oraz gwałtownym uwalnianiem cytokin prozapalnych, prowadzącym do objawów ogólnoustrojowych, takich jak gorączka, hipotensja i niewydolność wielonarządowa. Enterotoksyny gronkowcowe cechują się termostabilnością i odpornością na enzymy trawienne, co czyni je główną przyczyną zatruc pokarmowych [17], [24], [25].

Ważnym elementem biologii *S. aureus* jest jego zdolność do kolonizacji organizmu człowieka. Bakteria ta jest patogenem powszechnie występującym w środowisku oraz na powierzchni ciała człowieka, gdzie może bytować jako składnik naturalnej mikrobioty. Najczęstszym miejscem kolonizacji jest przedsionek nosa, który stanowi główne źródło rozprzestrzeniania się tego patogenu [26]. *S. aureus* wykazuje zdolność do adhezji do komórek nabłonka nosa, dzięki różnorodnym białkom powierzchniowym oraz innym komponentom komórkowym, co sprzyja przekształceniu

prześciowej kolonizacji w stan trwałego nosicielstwa [27], [28]. Szacuje się, że *S. aureus* występuje u 20%–80% populacji ludzkiej [29].

Zakażenia wywołane przez ten patogen obejmują głównie infekcje skóry i tkanek miękkich. *S. aureus* powoduje czyraki, liszajce, ropnie, zapalenie mieszków włosowych oraz zakażenia ran pooperacyjnych. Zmiany te mają zwykle charakter ropny, mogą być bolesne i nawracające, co jest bardzo uciążliwe dla chorego. Oprócz zakażeń powierzchownych szczepy MRSA mogą również powodować ciężkie infekcje układu oddechowego (w tym zapalenie płuc) [30], a także liczne zakażenia układu kostno-stawowego, w tym zapalenie kości i szpiku, zapalenie stawów oraz zakażenia protez ortopedycznych. Patogen ten jest również częstą przyczyną sepsy, która prowadzi do rozsiewu zakażenia do narządów oraz do zapalenia wsierdza [31], [32]. Tak szerokie spektrum kliniczne wynika z wysokiej zdolności *S. aureus* do kolonizacji różnych tkanek, wytwarzania toksyn oraz nabywania genów oporności, które utrudniają skuteczne leczenie i mogą wydłużać czas hospitalizacji. W 2019 roku *S. aureus* był powiązany z blisko 3 milionami zgonów na świecie, z czego szczepy MRSA odpowiadały bezpośrednio za ponad 100 tysięcy przypadków śmierci [4]. Pomimo wielu działań profilaktycznych, MRSA pozostaje jednym z najpoważniejszych patogenów współczesnej medycyny i stanowi istotne wyzwanie terapeutyczne.

2. Związki przeciwbakteryjne stosowane i rozwijane w terapii zakażeń MRSA

Odkrycie antybiotyków zapoczątkowało nową erę w historii medycyny, całkowicie zmieniając sposób leczenia chorób zakaźnych. Przed ich wynalezieniem i wprowadzeniem do praktyki klinicznej, śmiertelność spowodowana zakażeniami bakteryjnymi była niezwykle wysoka [33], [34]. W 1928 roku Alexander Fleming zaobserwował zjawisko hamowania wzrostu bakterii *S. aureus* przez pleśń *Penicillium notatum*, co doprowadziło do odkrycia pierwszego antybiotyku – penicyliny [35]. Przełom ten, wraz z rozwojem farmakoterapii przeciwbakteryjnej, stał się impulsem do poszukiwania i wdrażania kolejnych leków przeciwdrobnoustrojowych, obejmujących zarówno antybiotyki, takie jak aminoglikozydy i lipopeptydy, jak również syntetyczne chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, w tym sulfonamidy [33], [34], [36].

Wprowadzenie penicyliny do praktyki klinicznej w latach 40. XX wieku zrewolucjonizowało terapię zakażeń bakteryjnych, drastycznie obniżając śmiertelność z

powodu sepsy i zapaleń płuc podczas II wojny światowej [37]. Antybiotyki stały się jednym z największych osiągnięć medycyny XX wieku, przyczyniając się do wydłużenia średniej długości życia i znaczącej poprawy zdrowia publicznego.

Zastosowanie antybiotyków umożliwiło również rozwój współczesnych technologii medycznych, pozwalając na skuteczne zapobieganie zakażeniom u pacjentów poddawanych chemioterapii oraz zabiegom chirurgicznym. Pomimo ogromnych korzyści płynących z terapii antybiotykowej, już sam Fleming przestrzegał przed niekontrolowanym stosowaniem tych leków, ponieważ może prowadzić do rozwoju oporności [38].

W kolejnych dekadach coraz więcej bakterii nabywało oporność na różne klasy antybiotyków, co doprowadziło do intensyfikacji badań nad alternatywnymi metodami leczenia. Obecnie istnieje kilka obiecujących metod terapeutycznych, do których należą: terapia fagowa [39], immunoterapia [40] oraz szczepionki przeciwbakteryjne [41]. Pomimo rozwinięcia nowych strategii, antybiotyki pozostają podstawowym i najczęściej stosowanym narzędziem w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

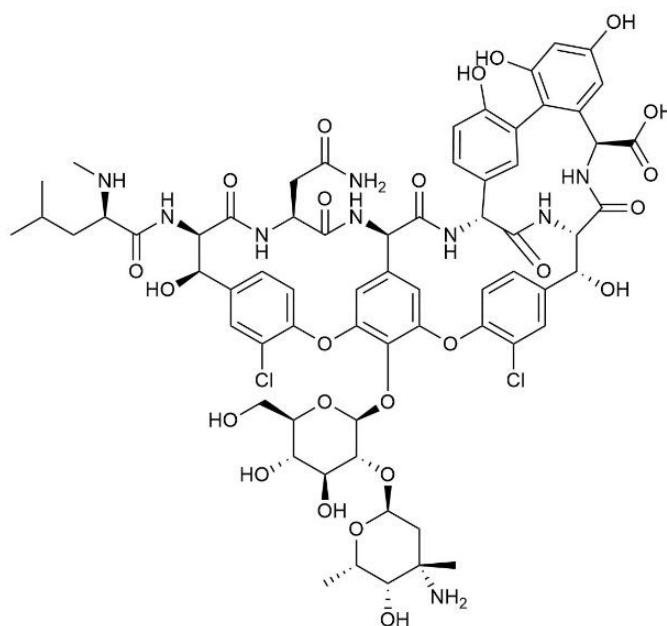
2.1. Antybiotyki

W ujęciu klasycznym antybiotyki definiuje się jako substancje pochodzenia biologicznego, wytwarzane przez mikroorganizmy i zdolne do hamowania wzrostu lub niszczenia innych mikroorganizmów. Należy jednak zaznaczyć, że w praktyce klinicznej termin „antybiotyk” bywa stosowany szerzej i często odnosi się do leków przeciwbakteryjnych niezależnie od ich pochodzenia, obejmując zarówno związki naturalne, półsyntetyczne, jak i syntetyczne. W celu uniknięcia niejednoznaczności terminologicznej w niniejszej pracy zastosowałam szersze określenie „leki przeciwbakteryjne” lub „leki przeciwdrobnoustrojowe”.

2.1.1. Wankomycyna

Wankomycyna jest jednym z najważniejszych antybiotyków stosowanych w terapii zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie, szczególnie przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz *Enterococcus*, w tym szczepy wielolekooporne, takie jak MRSA. Stężenie wankomycyny wymagane do zahamowania wzrostu większości szczepów *S. aureus* zazwyczaj mieści się w zakresie od 0,5 do 2 µg/ml [42]. Związek ten jest glikopeptydem (Rysunek 1) i został wyizolowany z bakterii *Amycolatopsis orientalis* [43].

Mechanizm działania wankomycyny polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej bakterii poprzez wiązanie się z kluczowym substratem dla tego procesu – końcowym fragmentem D–alanylo–D–alaniny nieusieciowanego lipidu II, który jest prekursorem w procesie biosyntezy peptydoglikanu [44]. Wiązanie to blokuje aktywność enzymów odpowiedzialnych za transglikozylację, co uniemożliwia polimeryzację peptydoglikanu i prowadzi do destabilizacji struktury ściany komórkowej. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia biosyntezy ściany komórkowej, osłabienia jej integralności oraz zwiększenia podatności komórki na działanie ciśnienia osmotycznego, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej.[44].

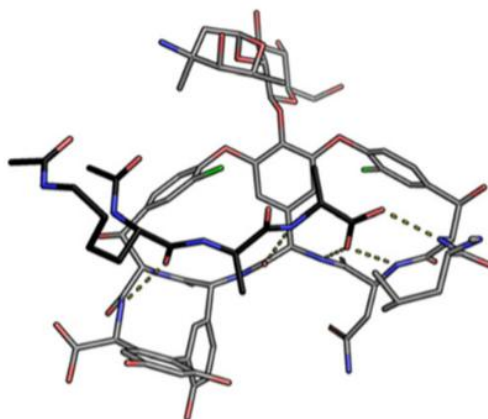


Rysunek 1. Struktura wankomycyny (opracowano na podstawie [43]).

W przeciwieństwie do antybiotyków β -laktamowych, których mechanizm polega na oddziaływaniu bezpośrednio z enzymami biorącymi udział w biosyntezie ściany komórkowej [45], wankomycyna tworzy kompleksy z prekursorami peptydoglikanu. Jej aktywność nie zależy od powinowactwa do enzymu docelowego, ale od specyficzności substratowej enzymów, które determinują strukturę tych prekursorów [46]. Dlatego początkowo przewidywano, że oporność na glikopeptydy nigdy się nie pojawi ze względu na ich specyficzny mechanizm działania. Jednak pomimo swojej skuteczności, w ostatnich dekadach odnotowano pojawienie się szczepów opornych na wankomycynę. Wyróżnia się szczepy określane jako VISA (ang. *Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*), wykazujące podwyższone wartości MIC wankomycyny wobec

MRSA oraz VRSA (ang. *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*) dla których wartości MIC wynoszą $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ [47].

Jak do tej pory, oporność na ten antybiotyk została opisana najlepiej u enterokoków. Mechanizm ten polega na modyfikacji końcowego fragmentu prekursora peptydoglikanu, który w warunkach prawidłowych ma postać wyżej wspomnianego dipeptydu D-Ala-D-Ala, do którego wiąże się wankomycyna. W szczepach opornych dochodzi jednak do zmiany tego fragmentu. Reakcję tę katalizuje ligaza kodowana przez geny należące do operonów oporności typu Van [46], [48]. Zmiana ta znacząco zmniejsza powinowactwo antybiotyku do miejsca wiązania, przez co lek nie jest w stanie skutecznie zahamować syntezy peptydoglikanu. Do najlepiej opisanych typów oporności należą układy: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM oraz VanN, które odpowiadają operonom zawierającym geny kodujące enzymy uczestniczące w syntezie zmodyfikowanego prekursora ściany komórkowej oraz eliminacji prawidłowego dipeptydu D-Ala-D-Ala. W przypadku *S. aureus* oporność na wysokie stężenia glikopeptydów występuje bardzo rzadko i jest wówczas uwarunkowana obecnością operonu *vanA*, przenoszonego na ruchomym elemencie genetycznym Tn1546, pochodzącego od szczepów *Enterococcus* opornych na wankomycynę – VRE (ang. *Vancomycin Resistant Enterococci*) [49]. W warunkach fizjologicznych wankomycyna wykazuje wysokie powinowactwo do peptydu o sekwencji D-Ala-D-Ala. Sekwencja ta jest stabilizowana przez sieć pięciu wiązań wodorowych pomiędzy grupami amidowymi dipeptydu a resztami aminokwasowymi antybiotyku (Rysunek 2). Zastąpienie końcowej reszty D-alaniny przez D-mleczan, katalizowane przez ligazę VanA, prowadzi do powstania dipeptydu D-Ala-D-Lac, w którym jedno z wiązań amidowych zostaje zastąpione wiązaniem estrowym. Ta pozornie niewielka modyfikacja powoduje utratę kluczowego wiązania wodorowego, ponieważ zastąpienie wiązania amidowego wiązaniem estrowym powoduje utratę donora protonu, niezbędnego do utworzenia jednego z wiązań wodorowych oraz wprowadza niekorzystne oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy atomami tlenu. Skutkuje to obniżeniem powinowactwa wankomycyny do miejsca wiązania nawet 1000-krotnie [46], [50], [51], [52]. Większość szczepów VRSA posiada plazmidowe kopie Tn1546 przejęte od VRE, więc kluczowym czynnikiem sprzyjającym pojawianiu się VRSA jest występowanie zakażeń mieszanych MRSA i VRE w środowisku szpitalnym [47].



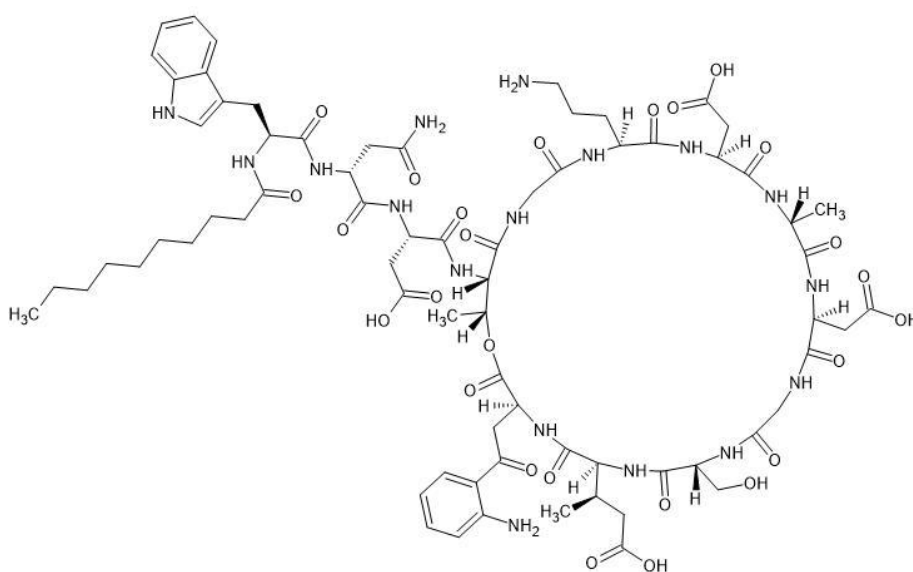
Rysunek 2. Struktura krystaliczna kompleksu wankomycyny z peptydem o sekwencji Ac-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala, będącym fragmentem peptydoglikanu [49].

Leczenie zakażeń wywołanych przez VISA oraz VRSA wymaga stosowania alternatywnych antybiotyków, takich jak daptomycyna czy linezolid [53]. Z tego względu rozwój i rozprzestrzenianie się oporności na wankomycynę jest monitorowany globalnie przez organizacje zdrowia publicznego, w tym WHO i CDC (Centra Kontroli i Prewencji Chorób, ang. *Centers for Disease Control and Prevention*). Wankomycyna pozostaje przy tym jednym z kluczowych leków „ostatniej szansy” w terapii zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie. Wynika to nie tylko z jej istotnej roli terapeutycznej w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych przez wielolekooporne bakterie Gram-dodatnie, ale również z konieczności racjonalnego ograniczania jej stosowania. Nadużywanie wankomycyny sprzyja selekcji szczepów opornych, w tym VISA i VRSA, a sam lek wiąże się z ryzykiem wystąpienia istotnych działań niepożądanych, takich jak nefrotoksyczność. Z tych względów wankomycyna jest obecnie zarezerwowana głównie do leczenia zakażeń ciężkich lub opornych na inne antybiotyki, a jej stosowanie podlega ścisłym zasadom antybiotykoterapii celowanej [54], [55].

2.1.1. Daptomycyna

Daptomycyna jest cyklicznym antybiotykiem lipopeptydowym (Rysunek 3), produkowanym przez bakterię *Streptomyces roseosporus* [56]. Związek ten został zatwierdzony przez FDA (Agencja Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*) w 2003 roku do leczenia zakażeń skóry i tkanek miękkich, infekcyjnego zapalenia wsierdza oraz bakteriemii związanej z tymi zakażeniami [57], [58], [59]. Daptomycyna wykazuje bakteriobójczą aktywność wobec szerokiego spektrum bakterii Gram-dodatnich, w tym szczepów wielolekoopornych, dla których istnieją ograniczone

możliwości terapeutyczne, w tym MRSA oraz VRE [56], [60]. Wartość MIC daptomycyny dla szczepów wrażliwych na antybiotyki jest zazwyczaj czterokrotnie niższa w porównaniu do wankomycyny. Warto podkreślić, że daptomycyna wykazuje efekt poantybiotykowy (PAE, ang. *post-antibiotic effect*), w którym bakterie wykazują zwiększoną wrażliwość na antybiotyk po wcześniejszej ekspozycji na niższe niż terapeutyczne stężenia tego leku. Dodatkowo, daptomycyna wydłuża czas potrzebny bakteriom do ponownego rozpoczęcia wzrostu po zakończeniu ekspozycji na lek, przy czym efekt ten jest silniejszy przy wyższych stężeniach tego antybiotyku. Efekty PAE trwające od 1 do 6 godzin obserwowano wobec *E. faecalis* i *S. aureus* po ekspozycji na stężenia daptomycyny w zakresie od 0,25 do 16 µg/ml [60].

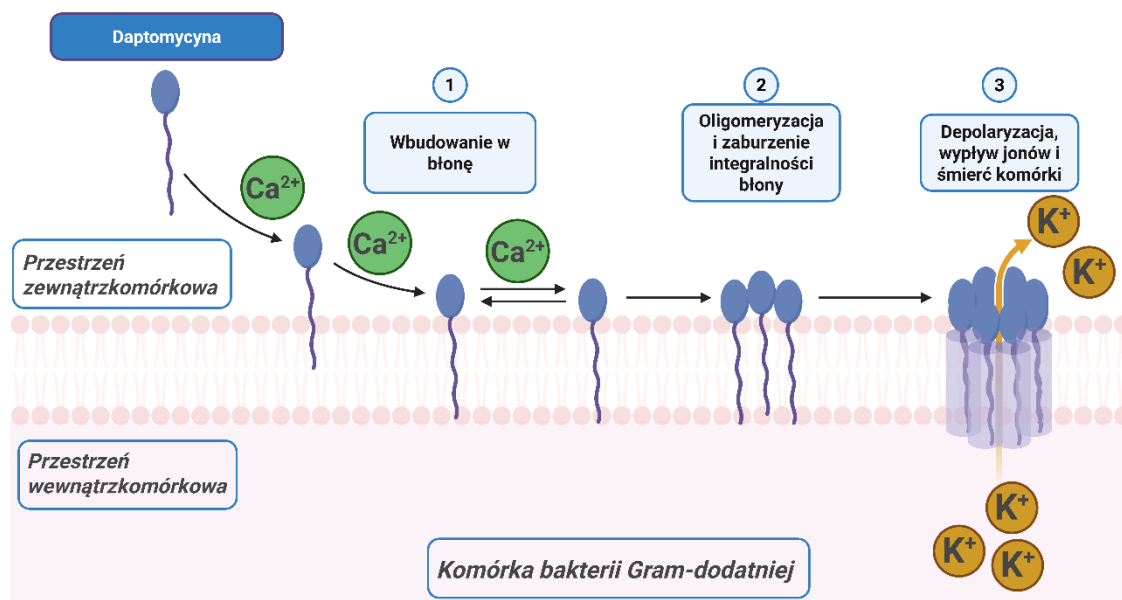


Rysunek 3. Struktura daptomycyny (opracowano na podstawie [59]).

Mechanizm działania daptomycyny nie został jeszcze w pełni poznany. Wiadomo jednak, że antybiotyk ten wbudowuje się w błonę cytoplazmatyczną w sposób zależny od jonów wapnia (Ca^{2+}), prowadząc do jej depolaryzacji. Efekt ten nie jest związany z lizą komórki ani tworzeniem dużych porów w błonie, lecz wynika z powstawania oligomerów i kompleksów zaburzających jej integralność oraz przepuszczalność. Proces ten powoduje utratę składników wewnątrzkomórkowych, np. takich jak K^+ (Rysunek 4). Ponadto sugeruje się, że daptomycyna może również hamować syntezę peptydoglikanu i/lub kwasu lipoteichojuowego [59], [61].

Ze względu na ten unikalny mechanizm działania daptomycyny, nie obserwuje się typowej lub szerokiej krzyżowej oporności z większością klasycznych antybiotyków, co czyni ją ważną opcją w terapii ciężkich zakażeń wywołanych przez MRSA lub VRE. W

ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad terapiami skojarzonymi z udziałem tego antybiotyku, których wyniki mogą poszerzyć spektrum działania i ograniczyć ryzyko rozwoju oporności [59], [62].

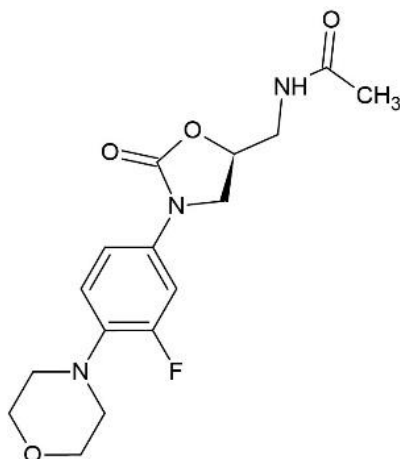


Rysunek 4. Schemat mechanizmu działania daptomycyny (opracowano w BioRender na podstawie [63]).

2.1.2. Linezolid

Linezolid jest syntetycznym antybiotykiem należącym do klasy oksazolidynonów (Rysunek 5), wprowadzonym do leczenia po zatwierdzeniu przez FDA w 2000 roku [64] jako odpowiedź na narastającą oporność patogenów Gram-dodatnich na tradycyjne antybiotyki. Wykazuje aktywność wobec tlenowych bakterii Gram-dodatnich, w tym szczepów MRSA, VRSA, VRE [65].

Mechanizm działania linezolidu wyróżnia się spośród innych antybiotyków. W przypadku *S. aureus* linezolid wiąże się z podjednostką 50S rybosomu i blokuje tworzenie kompleksu inicjacyjnego 70S, co prowadzi do zahamowania procesu inicjacji translacji. W konsekwencji zahamowaniu ulega pierwszy etap syntezy białka, jeszcze przed elongacją łańcucha polipeptydowego [66].



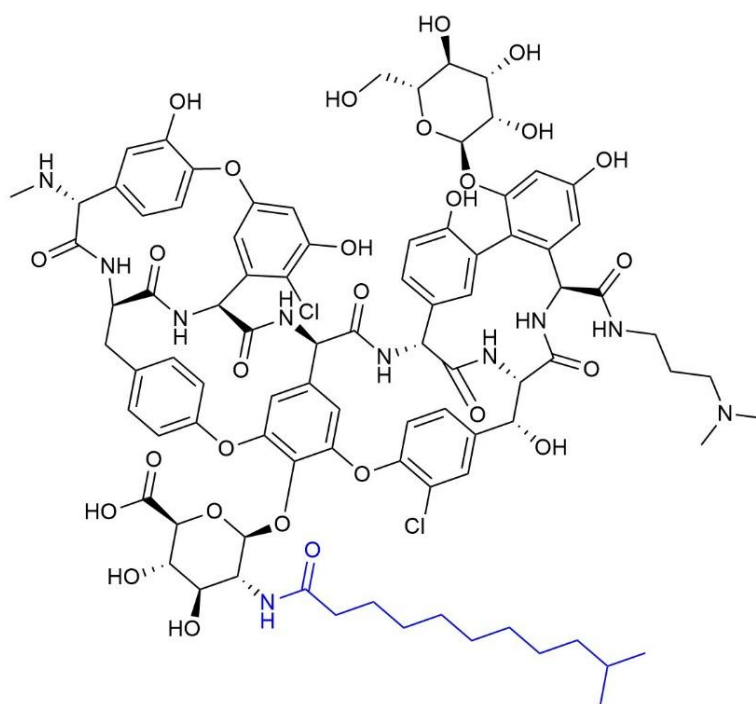
Rysunek 5. Struktura linezolidu (opracowano na podstawie [66]).

Działanie linezolidu ma charakter głównie bakteriostatyczny wobec gronkowców i enterokoków, choć w przypadku niektórych paciorkowców może wykazywać aktywność bakteriobójczą. Kliniczna skuteczność linezolidu, w połączeniu z dobrą biodostępnością po podaniu doustnym, czyni go ważnym elementem terapii ciężkich zakażeń wywołanych przez wielolekooporne bakterie Gram-dodatnie. Jego stosowanie powinno jednak być ograniczone do uzasadnionych przypadków ze względu na ryzyko działań niepożądanych, takich jak mielosupresja czy neuropatie [67], [68], [69].

2.1.3. Dalbawancyna

Pojawienie się szczepów opornych na wankomycynę przyczyniło się do intensyfikacji poszukiwań alternatywnych antybiotyków. Przykładem takiej substancji jest dalbawancyna, która została zatwierdzona do użytku przez FDA w 2014 roku i jest stosowana do leczenia ciężkich infekcji wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie, głównie tych związanych z powikłanymi zakażeniami skóry i tkanek miękkich [70].

Mechanizm działania dalbawancyny jest podobny do mechanizmu działania wankomycyny, jednak jej struktura obejmuje dodatkową lipofilową resztę boczną, umożliwiającą zakotwiczenie cząsteczki w błonie bakterii (Rysunek 6). Obecność tej grupy zwiększa powinowactwo do miejsca docelowego i wzmacnia efekt bakteriobójczy. W konsekwencji antybiotyk ten wykazuje wyższą aktywność wobec MRSA niż wankomycyna [71].



Rysunek 6. Struktura dalbawancyny z zaznaczoną kolorem niebieskim lipofilową resztą (opracowano na podstawie [72]).

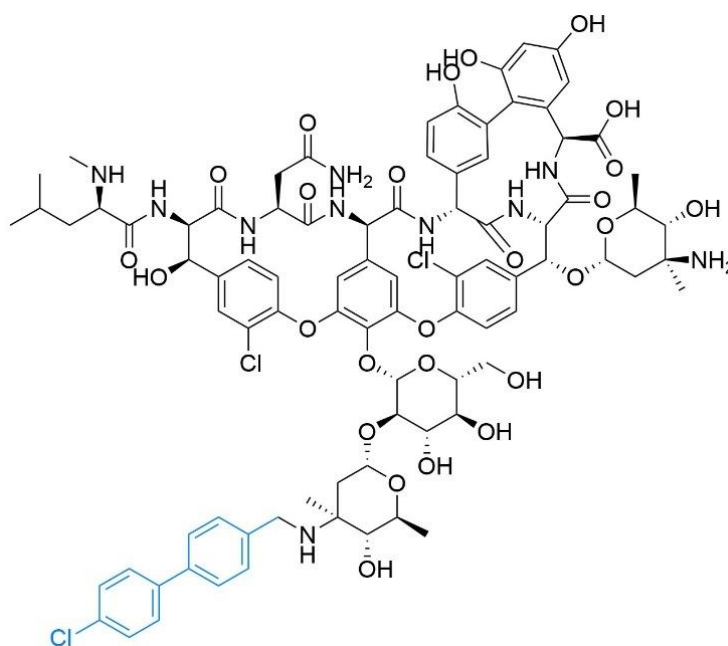
Kolejnym ważnym atutem jest bardzo długi okres półtrwania, wynoszący około dwóch tygodni. Dzięki temu stężenia terapeutyczne mogą być utrzymywane w organizmie nawet przez tydzień. Umożliwia to rzadsze dawkowanie, co jest istotną zaletą kliniczną, szczególnie w terapii pacjentów z przewlekłymi lub nawrotowymi zakażeniami skóry [73].

W porównaniu z wankomycyną, dalbawancyna wykazuje korzystny profil bezpieczeństwa. W badaniach klinicznych częstość ciężkich skutków ubocznych była podobna lub niższa niż w grupach leczonych standardową terapią opartą na wankomycynie, przy jednocześnie istotnie mniejszym ryzyku nefrotoksyczności, która stanowi jedno z głównych ograniczeń stosowania wankomycyny [74], [75].

2.1.4. Oritawancyna

Kolejnym antybiotykiem glikopeptydowym jest oritawancyna. Jej mechanizm działania jest wielokierunkowy i polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej. W przeciwieństwie do wielu innych glikopeptydów, wykazuje zdolność wiązania się nie tylko z fragmentem D-Ala-D-Ala, lecz także z fragmentem D-Ala-D-Lac, co umożliwia jej hamowanie syntezy peptydoglikanu drobnoustrojów wykazujących oporność typu VanA (szczepy VRSA) [76], [77]. Oritawancyna w swojej strukturze posiada podstawnik

p-chlorofenylo-benzylowy (Rysunek 7), który oddziałuje z błoną komórkową bakterii, wywołując dwa efekty. Po pierwsze, umożliwia utrzymywanie cząsteczki antybiotyku w optymalnym położeniu dla oddziaływania z peptydoglikanem, zwiększając skuteczność blokady transglikozylacji i transpeptydacji. Po drugie, nadaje oritawancynie zdolność do zaburzania potencjału błony komórkowej. Potwierdzono również dodatkową aktywność tego antybiotyku, polegającą na hamowaniu syntezy RNA [77], [78].



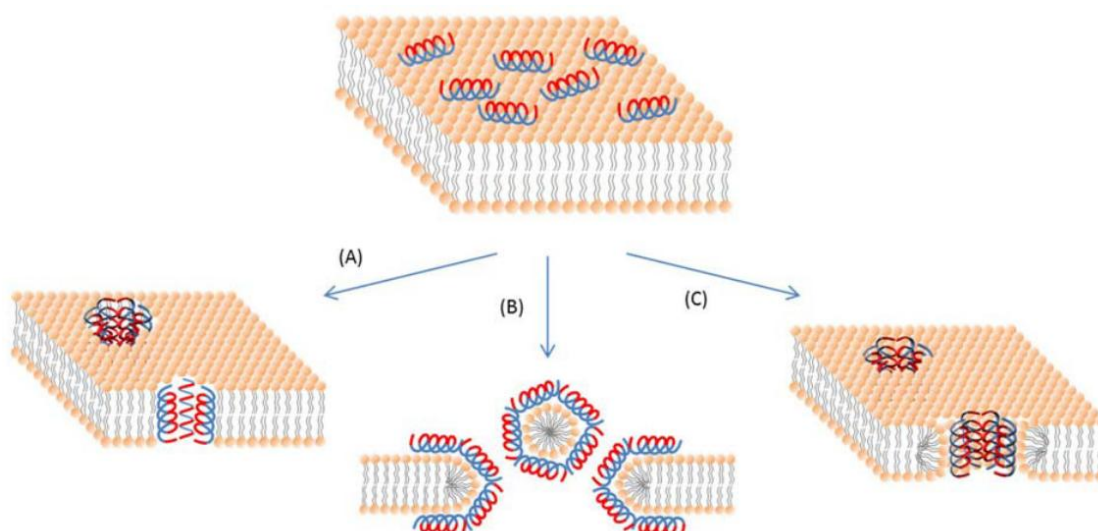
Rysunek 7. Struktura oritawancyny z zaznaczonym na niebiesko podstawnikiem *p*-chlorofenylo-benzylowym (opracowano na podstawie [76]).

2.2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs)

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, ang. *Antimicrobial Peptides*) odgrywają kluczową rolę we wrodzonej odporności immunologicznej gospodarza wobec szerokiego spektrum mikroorganizmów, obejmującego bakterie, grzyby, pasożyty i wirusy [79]. W niniejszej pracy, termin AMPs będzie stosowany w odniesieniu do peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej.

Leczenie infekcji bakteryjnych przez długi czas opierało się głównie na stosowaniu antybiotyków. Ze względu na rosnącą oporność mikroorganizmów na te związki, zaczęto zwracać większą uwagę na peptydy przeciwdrobnoustrojowe AMPs, które w przeciwieństwie do klasycznych antybiotyków, często działają na wiele celów molekularnych zlokalizowanych zarówno w błonie komórkowej patogenów, jak i wewnątrz komórek, a ponadto cechują się silną aktywnością wobec szczepów lekoopornych [80], [81]. Mechanizmy działania oraz cele molekularne AMPs są

zróżnicowane, jednak najczęściej opisywanym mechanizmem jest zaburzenie integralności błony komórkowej. Wynika ono z różnic ładunku pomiędzy ujemnie naładowanymi składnikami powierzchni komórek bakteryjnych a dodatnio naładowanymi strukturami AMPs [82]. W modelu „*barrel-stave*” (Rysunek 8 – A) peptydy oligomeryzują w błonie, tworząc stabilne, transbłonowe pory wyścielane cząsteczkami peptydu, natomiast w mechanizmie porów toroidalnych (ang. *toroidal-pore*, Rysunek 8 – C) dochodzi do jednoczesnego wbudowania się peptydów i lipidów w strukturę poru. Z kolei w modelu „*carpet*” (Rysunek 8 – B) AMPs pokrywają powierzchnię błony, powodując jej destabilizację i rozpad w sposób przypominający działanie detergentów. Skutkiem tych procesów jest depolaryzacja błony, utrata jonów i metabolitów oraz zaburzenie homeostazy komórkowej, co powoduje śmierć komórki bakteryjnej [82], [83].

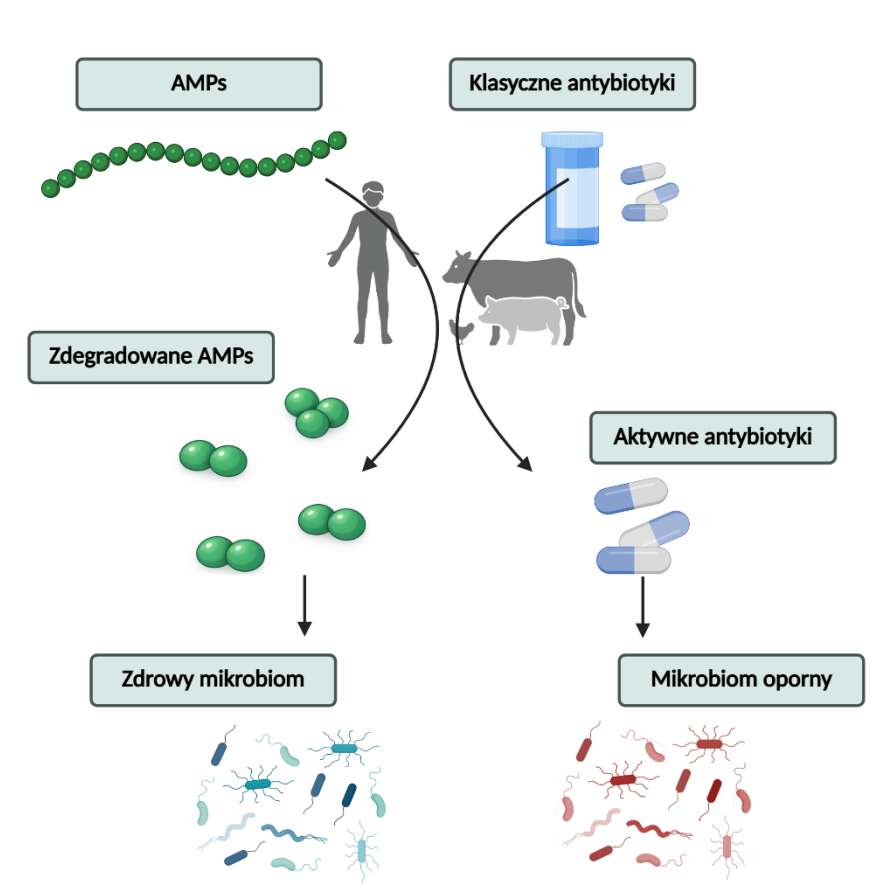


Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie wybranych mechanizmów działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) oddziałujących z błoną komórkową; (A) przedstawia model „*barrel-stave*”, (B) model porów toroidalnych, (C) model „*carpet*” [82].

Na uwagę zasługuje również ekologiczny aspekt AMPs, który daje im przewagę nad tradycyjnymi związkami przeciwbakteryjnymi, ze względu na ich biodegradowalność (Rysunek 9). Cecha ta wiąże się z ograniczeniem zanieczyszczania środowiska, ponieważ peptydy te ulegają rozkładowi do nietoksycznych produktów [79], [84], [85]. W związku z tym AMPs są bardziej zgodne z założeniami „zielonych technologii oraz strategii minimalizacji odpadów”. Ma to szczególne znaczenie w kontekście narastającego problemu oporności bakteryjnej, ponieważ pozostałości tradycyjnych antybiotyków obecne w środowisku mogą sprzyjać rozprzestrzenianiu się szczepów lekoopornych, zwłaszcza w rolnictwie oraz hodowli zwierząt.

Pomimo licznych zalet, AMPs wykazują również ograniczenia i posiadają wady, typowe dla większości związków o działaniu farmakologicznym. Aktywność tych związków często ulega osłabieniu w warunkach *in vivo* (w porównaniu do właściwości *in vitro*), m.in. ze względu na fizjologiczne stężenia jonów, podatności na degradację przez proteazy oraz wiązania z białkami surowicy [86]. Ponadto AMPs mogą być cytotoksyczne lub powodować hemolizę w stężeniach terapeutycznych, co jest związane z ich dodatnim ładunkiem i zdolnością do tworzenia porów w błonach erytrocytów [79], [82].

Kolejnym ograniczeniem związanym z praktycznym wykorzystaniem AMPs jest ich produkcja, która może stanowić wyzwanie z punktu widzenia zasad zielonej chemii. Konwencjonalna synteza peptydów, zwłaszcza synteza w fazie stałej (SPPS, ang. *Solid-Phase Peptide Synthesis*), często wymaga użycia dużych ilości toksycznych rozpuszczalników oraz odczynników, co obecnie jest niepożądane w kontekście ochrony środowiska. W przeciwieństwie do wielu klasycznych antybiotyków, takich jak niektóre β -laktamy czy makrolidy, które mogą być otrzymywane w procesach biotechnologicznych z wykorzystaniem odpowiednio dobranych lub zmodyfikowanych szczepów mikroorganizmów, AMPs są często otrzymywane metodami chemicznymi, głównie na etapie badań laboratoryjnych i optymalizacji struktury. Alternatywę dla syntezy chemicznej stanowią jednak systemy ekspresji rekombinowanej [87], które są rozwijane w celu zwiększenia wydajności i obniżenia kosztów produkcji tych peptydów. Postępy w syntezie peptydów doprowadziły również do opracowania nowych strategii minimalizujących negatywny wpływ na środowisko, takich jak stosowanie bardziej przyjaznych rozpuszczalników, ograniczanie etapów płukania oraz optymalizacja warunków syntezy [79].



Rysunek 9. Porównanie degradacji AMPs w środowisku do klasycznych antybiotyków (opracowano na podstawie [79] w BioRender).

Pomimo istniejących ograniczeń, część AMPs oraz inne związki peptydowe o aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostały zatwierdzone przez FDA (np. Polimyksyna B [88]), a kolejne znajdują się na różnych etapach badań klinicznych. AMPs uznawane są obecnie za obiecującą alternatywę lub uzupełnienie klasycznych antybiotyków oraz jeden z kluczowych kierunków poszukiwań nowych terapii przeciwbakteryjnych.

2.2.1. Ludzka katelicydyna LL-37

Jednym z najlepiej poznanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest ludzka katelicydyna LL-37, która w ostatnich latach stała się jednym z głównych przedmiotów badań nad związkami o potencjale terapeutycznym przeciwko MRSA [89], [90]. Katelicydyny to peptydy przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez ludzi i zwierzęta w odpowiedzi na różne drobnoustroje patogenne [91]. Nazwa LL-37 odnosi się do dwóch *N*-końcowych reszt leucyny oraz długości peptydu, który składa się z 37 reszt aminokwasowych i posiada następującą sekwencję LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES. Wykazuje zarówno

bezpośrednią aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak i silne właściwości przeciwbiofilmowe [92].

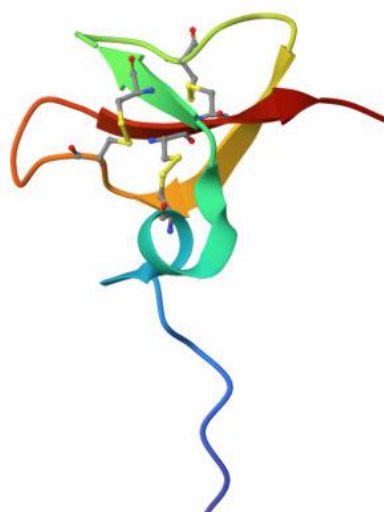
Głównym mechanizmem działania tego peptydu jest destabilizacja błony komórkowej bakterii poprzez elektrostatyczne wiązanie z ujemnie naładowanymi składnikami powierzchni komórek bakteryjnych, takimi jak kwasy tejchojowe i lipotejchojowe u bakterii Gram-dodatnich oraz lipopolisacharydami u bakterii Gram-ujemnych. Po związaniu z powierzchnią komórki bakteryjnej LL-37 może przechodzić z konformacji nieuporządkowanej do amfipatycznej struktury α -helikalnej, co sprzyja jego wbudowywaniu w dwuwarstwę lipidową i destabilizacji błony cytoplazmatycznej [91], [92].

LL-37 reguluje odpowiedź zapalną gospodarza poprzez hamowanie nadmiernej produkcji cytokin, a także stymuluje proliferację komórek nabłonkowych [92], [93], [94]. W ten sposób wspomaga procesy gojenia ran, co czyni ten peptyd atrakcyjnym kandydatem do terapii miejscowych zakażeń oraz ran przewlekłych. Co istotne, wykazano również, że peptyd ten posiada zdolność do redukcji biofilmu MRSA [95] oraz wykazuje działanie synergistyczne wraz z innymi antybiotykami w redukcji biofilmu [96].

Z uwagi na ograniczenia natywnej cząsteczki LL-37, obejmujące przede wszystkim niską stabilność w warunkach fizjologicznych oraz potencjalną cytotoksyczność [91], [94] opracowano wiele modyfikacji tego związku [90], np. skrócenie lub cyklizacja sekwencji peptydowej (m.in. peptyd KR-12 i jego formy cykliczne [97], [98] oraz 18-mer LLKKK [99]). Mimo, że LL-37 ani jego pochodne nie są obecnie zarejestrowane jako leki stosowane w leczeniu zakażeń bakteryjnych, peptyd ten wykazuje szeroki potencjał terapeutyczny, obejmujący nie tylko działanie przeciwdrobnoustrojowe, lecz także właściwości immunomodulujące i wspomagające procesy gojenia tkanek. Kliniczne wdrożenie LL-37 i jego pochodnych pozostaje jednak długotrwałym oraz złożonym procesem. W rejestrach badań klinicznych odnotowano wybrane projekty dotyczące zastosowania LL-37 lub preparatów opartych na tym peptydzie, m.in. w kontekście gojenia ran, owrzodzeń stopy cukrzycowej, zapalenia przyzębia, czerniaka oraz chorób przebiegających z zaburzoną odpowiedzią zapalną. Świadczy to o rosnącym zainteresowaniu wykorzystaniem tego peptydu w medycynie klinicznej, wykraczającym poza jego właściwości przeciwbakteryjne [100], [101], [102].

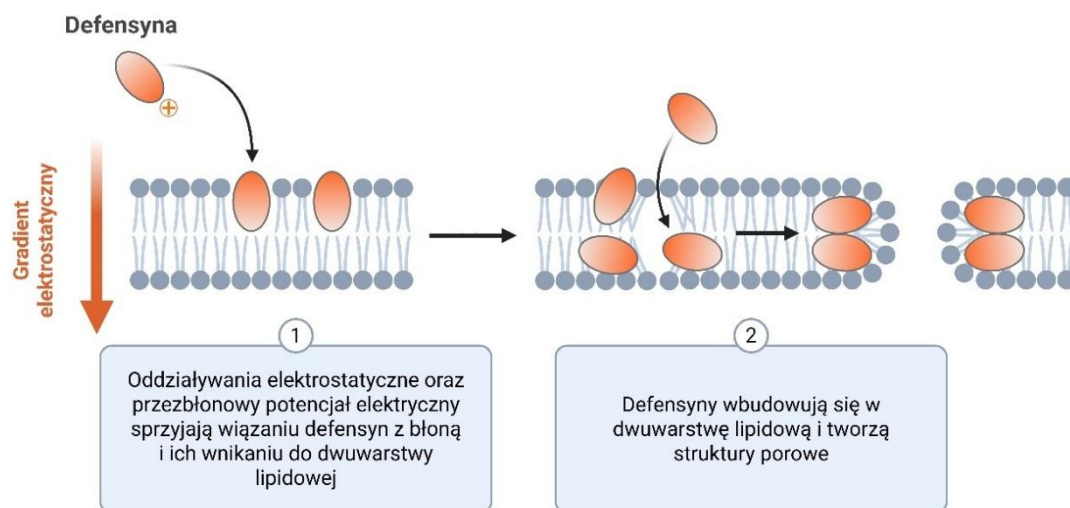
2.2.2. Ludzkie β -defensyny

Do kluczowych AMPs występujących w organizmie człowieka należą defensyny. Charakteryzują się one kationowym charakterem, amfipatycznością oraz obecnością struktury β -kartki. Związki te zazwyczaj zawierają sześć reszt cysteinowych tworzących sieć trzech mostków disiarczkowych (Rysunek 10), które stabilizują strukturę przestrzenną defensyn [103]. Peptydy te charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, obejmującym bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie [104], grzyby [105] oraz niektóre wirusy [106]. Jedną z defensyn wykazujących szczególnie wysoką aktywność wobec MRSA jest ludzka β -defensyna 3 (hBD-3, ang. *human β -defensin 3*) [103], [107].



Rysunek 10. Struktura przestrzenna ludzkiej defensyny 3, wyznaczona metodą spektroskopii NMR w roztworze (kod PDB: 1KJ6).

Te dodatnio naładowane peptydy oddziałują z ujemnie naładowanymi składnikami powierzchni komórek bakteryjnych. W przypadku bakterii Gram-ujemnych mogą wypierać dwuwartościowe kationy (Ca^{2+} , Mg^{2+}), stabilizujące strukturę błony zewnętrznej, zwłaszcza poprzez oddziaływanie z lipopolisacharydami. Prowadzi to do zaburzenia funkcji barierowej błony oraz ułatwia penetrację peptydów do wnętrza komórki. U bakterii Gram-dodatnich, takich jak *S. aureus*, defensyny oddziałują natomiast głównie z ujemnie naładowanymi składnikami ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej, m.in. z kwasami tejchojowymi i lipotejchojowymi. Następnie defensyny wbudowują się w błonę cytoplazmatyczną, gdzie tworzą multimeryczne pory (Rysunek 11), powodując wzrost przepuszczalności błony, utratę jonów potasu oraz jej depolaryzację [103], [108], [109].



Rysunek 11. Schemat zaburzania integralności błony komórkowej bakterii przez defensyny (opracowano na podstawie [110] w BioRender). Dodatnio naładowane defensyny są przyciągane do ujemnie naładowanych składników powierzchni błony bakteryjnej wskutek oddziaływań elektrostatycznych, co ułatwia ich wiązanie, insercję do dwuwarstwy lipidowej oraz tworzenie struktur porowych.

Poza bezpośrednim działaniem przeciwdrobnoustrojowym defensyny pełnią również istotne funkcje immunomodulujące. Wykazano, że mogą indukować chemotaksję komórek układu odpornościowego, a także modulować produkcję cytokin, wpływając tym samym na przebieg odpowiedzi zapalnej [111], [112].

Ważnym aspektem biologii defensyn jest zdolność niektórych patogenów do osłabiania ich działania poprzez modyfikację ładunku powierzchniowego komórki, co zmniejsza siłę oddziaływania z dodatnio naładowanymi peptydami. Zjawisko to pokazuje dynamiczny charakter interakcji pomiędzy mechanizmami obronnymi gospodarza a strategiami adaptacyjnymi patogenów [113].

Ze względu na szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, defensyny, podobnie jak katelicydyny, pozostają obiektem intensywnych badań, które skupiają się na projektowaniu nowych analogów tych peptydów o silniejszej aktywności wobec patogenów wielolekoopornych [107], [114].

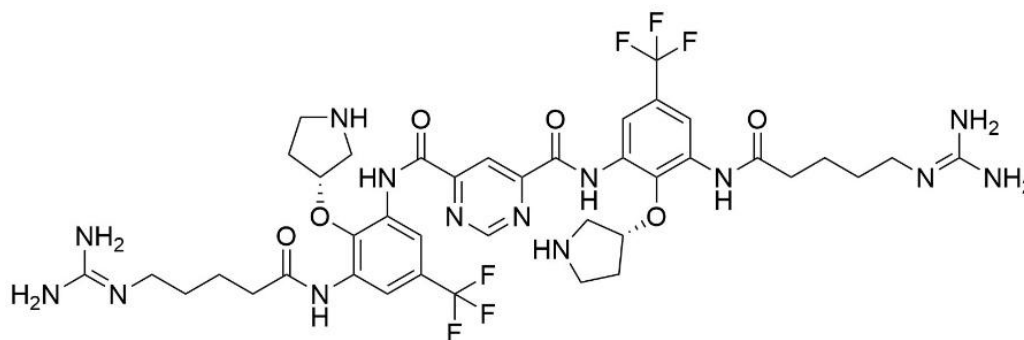
2.3. Peptydomimetyki

Peptydomimetyki są obiecującą grupą związków przeciwdrobnoustrojowych, często projektowanych w celu naśladowania funkcji AMPs, przy jednoczesnym wyeliminowaniu ich kluczowych wad. Dzięki modyfikacjom szkieletu cząsteczki cechują się zwiększoną odpornością na degradację proteolityczną, wyższą biodostępnością oraz

aktywnością wobec szerszego zakresu patogenów, co sprawia, że są one, tak jak AMPs, ważnym kierunkiem współczesnych badań nad nowymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi [115], [116], [117].

2.3.1. Brilacydyna (PMX30063)

Brilacydyna (ang. *brilacidin*) jest syntetycznym mimetykiem naturalnie występujących defensyn. Związek ten został zaprojektowany tak, aby zachować zasadnicze cechy strukturalne defensyn takie jak kationowość i amfipatyczność, przy jednoczesnym zwiększeniu stabilności proteolitycznej oraz obniżeniu wartości MIC wobec bakterii w porównaniu z defensynami. W strukturze brilacydyny obecne są grupy kationowe (m. in. guanidynowe) oraz pierścienie aromatyczne (Rysunek 12), które tworzą stabilny szkielet odpowiedzialny za silne oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowaną powierzchnią komórek bakteryjnych oraz efektywne zakotwiczenie cząsteczki w dwuwarstwie lipidowej. Związek ten jest aktywny głównie wobec bakterii Gram-dodatnich, w tym wielolekoopornych, a jego mechanizm działania polega na zaburzaniu integralności i depolaryzacji błony komórkowej [118], [119].



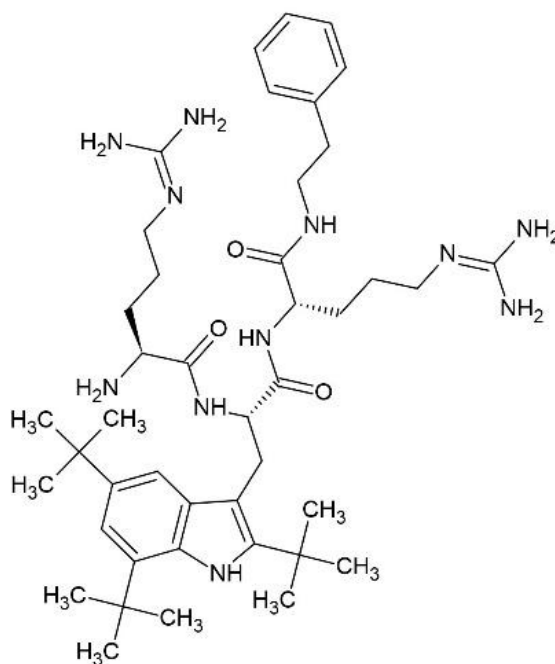
Rysunek 12. Struktura brilacydyny (opracowano na podstawie [120]).

W kontekście rozwoju farmaceutycznego, brilacydyna wykazała dużą skuteczność w badaniu klinicznym (numer rejestracyjny badania: NCT02052388) w leczeniu ostrych zakażeń skóry i tkanek miękkich wywołanych przez gronkowca złocistego, porównywalną do skuteczności daptomycyny [121].

2.3.2. LTX-109

Do peptydomimetyków posiadających działanie bakteriobójcze wobec MRSA należy również LTX-109 (Voxvoganan) (Rysunek 13), który opracowała firma Lytix Biopharma AS [122]. Mechanizm działania tego związku opiera się głównie na uszkodzeniu błony komórkowej bakterii. LTX-109 oddziałuje elektrostatycznie z ujemnie

naładowanymi komponentami błony, co prowadzi do szybkiej depolaryzacji oraz zwiększenia jej przepuszczalności. Niewielki rozmiar cząsteczki oraz zastosowane modyfikacje strukturalne sprawiają, że LTX-109 jest mniej podatny na degradację proteolityczną, co stanowi istotną zaletę tego związku. Potencjalne mechanizmy adaptacyjne bakterii wobec związków błonowo-aktywnych mogą natomiast obejmować modyfikację składu lipidowego błony komórkowej lub chemiczną neutralizację ujemnie naładowanych składników powierzchniowych [123].



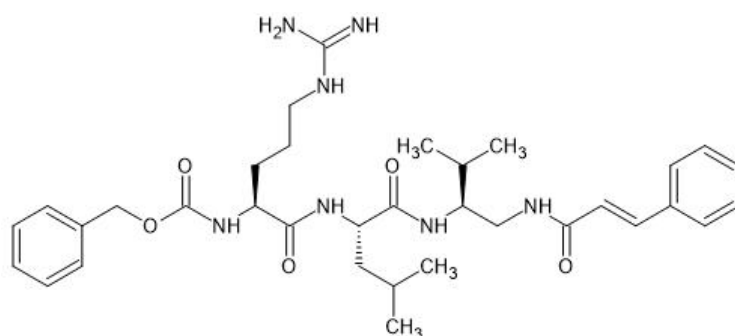
Rysunek 13. Struktura LTX-109 (opracowano na podstawie [120]).

Badania *in vitro* wykazały, że LTX-109 wykazuje wysoką aktywność hamującą wobec wielu szczepów *S. aureus* przy wartościach MIC wynoszących 2-4 µg/ml [124]. Dodatkowo w badaniu klinicznym fazy I/IIa (numer rejestracyjny badania: NCT01158235) wykazano skuteczność miejscowego zastosowania LTX-109 w redukcji kolonizacji bakterii *S. aureus* w tym MRSA oraz MSSA u nosicieli tego patogenu w przednich odcinkach jamy nosowej [122].

2.3.3. Cystapep 1

Ludzka Cystatyna C jest białkiem należącym do grupy inhibitorów proteaz cysteinowych. Posiada również aktywność przeciwdrobnoustrojową, hamuje wzrost bakterii oraz replikację wirusa opryszczki [125], [126]. W mechanizmie hamowania proteaz cysteinowych istotną rolę odgrywa m.in. *N*-końcowy fragment Cystatyny C obejmujący sekwencję Arg⁸-Leu⁹-Val¹⁰-Gly¹¹, który stanowi jeden z elementów regionu

odpowiedzialnego za oddziaływanie z enzymem. W oparciu o ten fragment zsyntezowano szereg pochodnych peptydomimetycznych oraz przebadano pod względem hamowania niektórych szczepów bakterii Gram-dodatnich *in vitro* oraz *in vivo* na modelu mysim. Badania te wykazały, że kilka związków hamuje wzrost *S. aureus* oraz *S. pyogenes*. Pierwotnie zakładano, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa tych związków jest związana ze zdolnością do hamowania proteaz cysteinowych. Jednak, co ciekawe, późniejsze badania wykazały, że oba te efekty nie są bezpośrednio powiązane [127]. Uzyskane dotychczas obiecujące wyniki stały się podstawą do projektowania kolejnych analogów, spośród których najbardziej efektywnym pod względem aktywności przeciwdrobnoustrojowej okazał się Cystapep 1 (A-20) (Rysunek 14). Co istotne związek ten wykazywał aktywność również wobec szczepów MRSA [128].



Rysunek 14. Struktura cząsteczki Cystapep 1 o sekwencji Z-Arg-Leu-ValΨ[CH₂-NH]-Cin (opracowano na podstawie [129]).

W kolejnych pracach nad związkiem Cystapep 1 oraz jego analogami wykazano, że możliwa jest optymalizacja jego struktury w celu zwiększenia aktywności przeciwbakteryjnej, poprawy rozpuszczalności i zmniejszenia cytotoksyczności, przy jednoczesnym zachowaniu względnej stabilności w środowisku fizjologicznym [129], [130]. Zestawienie wybranych, najważniejszych modyfikacji związku A-20 przedstawiłam w Tabeli 1.

Jednym z kluczowych elementów struktury cząsteczki Cystapep 1 jest reszta argininy. Jej obecność zapewnia dodatnio naładowane ugrupowanie guanidynowe, które uczestniczy w oddziaływaniach elektrostatycznych z ujemnie naładowaną powierzchnią komórek bakteryjnych. Wykazano, że zamiana reszty argininy na leucynę osłabia aktywność związku [131]. Kolejnym kluczowym obszarem modyfikacji struktury cząsteczki Cystapep 1 jest fragment ValΨ[CH₂-NH]. Korzystny wpływ na aktywność obserwowano po zamianie go fragmentem Thr(OBzl)Ψ[CH₂-NH], analog ten cechował

się czterokrotnie niższą wartością MIC wobec *S. aureus* w porównaniu ze związkiem wyjściowym. Jednocześnie samo wprowadzenie treoniny bez podstawnika benzyłowego okazało się niewystarczające do zachowania aktywności. Sugeruje to, że kluczowe znaczenie dla poprawy właściwości przeciwbakteryjnych ma hydrofobowy charakter grupy benzyłowej [132].

Cystapep 1 posiada również dwa istotne fragmenty aromatyczne: grupę Z od strony *N*-końca oraz fragment kwasu cynamonowego od strony *C*-końca cząsteczki. Wykazano, że brak obecności pierścieni fenyłowych po obu stronach cząsteczki wpływało niekorzystnie na aktywność przeciwbakteryjną [127]. Ponadto analogi, w których fragment kwasu cynamonowego zastępowano innymi aromatycznymi fragmentami często prowadzi do polepszenia aktywności [129], [133]. Wyniki te wskazują, że końcowy fragment aromatyczny może być modyfikowany bez utraty właściwości biologicznych, pod warunkiem zachowania odpowiedniego charakteru aromatycznego i przestrzennego ułożenia cząsteczki. Wieloletnie badania nad modyfikacjami cząsteczki Cystapep 1 w celu poprawy aktywności przeciwbakteryjnej wskazują, że aktywność analogów zależy od równowagi pomiędzy kationowością, hydrofobowością oraz przestrzennym umiejscowieniem fragmentów aromatycznych.

Mechanizm działania cząsteczki Cystapep 1 nie został dotychczas jednoznacznie poznany. Podjęte badania z wykorzystaniem modeli błon bakteryjnych potwierdziły zdolność tego peptydomimetyku do oddziaływania z ich strukturami, jednak siła tego oddziaływania wydaje się niewspółmierna do efektów obserwowanych w analizach kalorymetrycznych. Wskazuje to, że destabilizacja błony komórkowej może być jedynie jednym z elementów szerszego, wieloetapowego mechanizmu działania związku Cystapep 1 oraz jego analogów [131].

Tabela 1. Zestawienie najważniejszych modyfikacji strukturalnych analogów Cystapep 1 (A-20) oraz ich wpływ na aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus*.

Analog	Główna modyfikacja względem A-20	Aktywność przeciwbakteryjna (MIC) wobec <i>S. aureus</i>	Znaczenie modyfikacji strukturalnej w odniesieniu do A-20	Źródło
A-20	związek wyjściowy: Z-Arg-Leu-ValΨ[CH ₂ -NH]-Cin	16–32 µg/ml	struktura wyjściowa	[127], [128], [130], [131], [132], [133]
A-134	Arg → Har	16 µg/ml	Korzystne wydłużenie bocznego łańcucha węglowodorowego z ugrupowaniem guanidynowym	[131], [132]
Analog II w [131]	Leu → Pro	>512 µg/ml	niekorzystne ograniczenie konformacyjne	[131], [132]

Analog III w [131]	Leu → Gly	>512 µg/ml	utrata hydrofobowego łańcucha bocznego	[131], [132]
A-90	Leu → Phe	16 µg/ml	aktywność pozostaje na zbliżonym poziomie	[132], [133]
Analog IV w [131]	Leu → Nle	24 µg/ml	aktywność pozostaje na zbliżonym poziomie	[131], [132]
Analog V w [131]	ValΨ[CH ₂ -NH] → Thr(OBzl) Ψ[CH ₂ -NH]	8 µg/ml	korzystna modyfikacja	[131], [132]
A-143	Zmiana izosterycznego łącznika; [CH ₂ -NH] → [CH ₂ -CH ₂ -NH]	512 µg/ml	silne osłabienie aktywności	[133]
A-165	Cin → NAA	16 µg/ml	korzystna modyfikacja C-końca	[133]
A-171	wydłużenie łańcucha peptydowego – dodatkowa reszta Arg	128 µg/ml	niekorzystne zwiększenie kationowości	[133]
A-164	Cin → PCA	8 µg/ml	korzystna modyfikacja C-końca, zwiększenie hydrofobowości	[129], [133]
A-192	Arg → Har; Leu → Arg; Cin → PCA	8 µg/ml	wprowadzenie dodatkowego ładunku dodatniego oraz hydrofobowości C-końca	[133]

3. Główne mechanizmy działania związków przeciwbakteryjnych

3.1. Hamowanie syntezy ściany komórkowej

Ściana komórkowa otaczająca komórki bakteryjne jest głównym celem dla wielu antybiotyków. Jej podstawowym składnikiem jest peptydoglikan, zbudowany z łańcuchów glikanowych utworzonych przez naprzemiennie ułożone reszty *N*-acetyloglukozaminy i kwasu *N*-acetylmuraminowego. Do reszt kwasu *N*-acetylmuraminowego przyłączone są krótkie łańcuchy peptydowe, które mogą ulegać sieciowaniu, nadając ścianie komórkowej odpowiednią sztywność i wytrzymałość mechaniczną [134]. Synteza peptydoglikanu jest procesem wieloetapowym zachodzącym zarówno w cytoplazmie, jak i w obrębie błony cytoplazmatycznej. Obejmuje wytwarzanie prekursora – lipidu II. Następnie prekursor ten jest transportowany na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej przy udziale flipaz, gdzie uczestniczy w dalszej polimeryzacji i sieciowaniu peptydoglikanu z udziałem enzymów biosyntezy ściany komórkowej, w tym białek wiążących penicylinę. Wszystkie antybiotyki β-laktamowe, w tym penicyliny i ich pochodne, a także glikopeptydy ingerują w procesy biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej, choć działają na różne etapy tego procesu. β-laktamy hamują przede wszystkim aktywność białek wiążących penicylinę,

natomiast glikopeptydy, takie jak wankomycyna, wiążą się z prekursorami peptydoglikanu. Skutkuje to osłabieniem jej struktury, co prowadzi do zmiany ciśnienia osmotycznego w komórce, a w konsekwencji do autolizy [135].

Skuteczność związków przeciwdrobnoustrojowych ukierunkowanych na biosyntezę ściany komórkowej została znacząco ograniczona przez pojawienie się i szybkie rozprzestrzenianie mechanizmów oporności, które pozwalają bakteriom neutralizować lub omijać działanie antybiotyków. W przypadku oporności na β -laktamy jednym z najważniejszych mechanizmów jest wytwarzanie β -laktamaz, czyli enzymów inaktywujących antybiotyki β -laktamowe poprzez hydrolizę pierścienia β -laktamowego, kluczowego dla ich aktywności biologicznej [136]. U bakterii Gram-dodatnich mechanizm ten jest bardziej złożony, wynikający z lokalizacji β -laktamaz w przestrzeni periplazmatycznej oraz ograniczonej przepuszczalności błony zewnętrznej. W przypadku MRSA oporność na metycylinę wynika z obecności genu *mecA* zintegrowanego z chromosomem, kodującego białko warunkujące oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe. Gen *mecA* koduje białko PBP2a, będące zmodyfikowaną transpeptydazą uczestniczącą w końcowym etapie biosyntezy peptydoglikanu. U szczepów wrażliwych antybiotyki β -laktamowe, w tym metycylina, wiążą się z natywnymi białkami wiążącymi penicylinę (PBP, ang. *Penicillin-Binding Proteins*), hamując ich aktywność transpeptydazową i w konsekwencji zaburzając sieciowanie łańcuchów peptydoglikanu. PBP2a charakteryzuje się jednak istotnie obniżonym powinowactwem do antybiotyków β -laktamowych, co uniemożliwia ich skuteczne wiązanie. W rezultacie, nawet w obecności metycyliny, PBP2a zachowuje aktywność enzymatyczną i umożliwia prawidłowe sieciowanie peptydoglikanu, zapewniając ciągłość syntezy ściany komórkowej i przeżycie bakterii. Szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę wykazują oporność na większość antybiotyków β -laktamowych, a ponadto często obserwuje się u nich współoporność na inne klasy antybiotyków, m.in. streptomycynę, tetracyklinę, a niekiedy także erytromycynę [137], [138], [139].

Oporność na glikopeptydy, w tym wankomycynę, w klasycznym mechanizmie typu Van polega na modyfikacji końcowego fragmentu prekursora peptydoglikanu, tj. zastąpieniu sekwencji D-alanylo-D-alaniny (D-Ala-D-Ala) sekwencją D-alanylo-D-mleczanu (D-Ala-D-Lac). Zmiana ta znacząco zmniejsza powinowactwo antybiotyku do miejsca wiązania, co ogranicza jego skuteczność [137], [139]. Mechanizm ten został szczegółowo omówiony w podrozdziale 2.1.1.

3.2. Zaburzenie integralności błony komórkowej

Zdolność do oddziaływania z błonami komórek bakteryjnych posiadają przede wszystkim dodatnio naładowane peptydy AMPs. Związki te mogą oddziaływać z błoną zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, jak i z błoną cytoplazmatyczną bakterii Gram-dodatnich [135], [140].

Sposób interakcji związków oddziałujących z błoną komórek bakteryjnych jest zależny od ich struktury, stosunku liczby cząsteczek związku przeciwdrobnoustrojowego do cząsteczek lipidu oraz właściwości fizykochemicznych samej dwuwarstwy lipidowej. Modele opisujące te oddziaływania opisałam w podrozdziale 2.2. Wiele związków lokalizuje się głównie w obrębie powierzchni błony, prowadząc do jej odkształcenia. W niższych stężeniach związku przeciwdrobnoustrojowego błona może wyrównać te zaburzenia, natomiast przy większej liczbie związanych cząsteczek związku może dojść do przerwania ciągłości błony lub jej nieodwracalnego uszkodzenia [140], [141]. Obserwacje te pozwoliły stwierdzić, że kluczowy etap działania związków przeciwbakteryjnych o charakterze kationowym zachodzi na powierzchni błony, bez konieczności trwałego wbudowania w dwuwarstwę lipidową. Zrozumienie tego mechanizmu stało się podstawą do projektowania małych peptydów i peptydomimetyków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [120], [140], [142].

Oprócz adaptacyjnych zmian właściwości fizykochemicznych dwuwarstwy lipidowej w odpowiedzi na antybiotyk są białka błonowe (ang. *efflux pumps*), które działają jak kanały i wypychają szkodliwe dla komórki substancje. Jest to jeden z istotnych mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki. Transport ten jest procesem aktywnym, wymagającym dostarczenia energii. W zależności od rodziny białek błonowych, energia ta pochodzi albo z hydrolizy ATP (transportery typu ABC), albo znacznie częściej u bakterii z gradientu elektrochemicznego protonów, charakterystycznego m.in. dla transporterów należących do rodziny MFS (ang. *Major Facilitator Superfamily*) oraz RND (ang. *Resistance-Nodulation-Division*) [143], [144]. Przykładowo gronkowce posiadają geny oporności *qacA* oraz *qacB*, które kodują transportery QacA i QacB należące do rodziny MFS. Transportery te warunkują zmniejszoną wrażliwość lub oporność na wybrane środki antyseptyczne, w tym czwartorzędowe związki amoniowe [145], [146], [147].

3.3. Inhibicja biosyntezy białek

Synteza białek jest złożonym procesem biologicznym, w którym komórki wytwarzają określone białka na podstawie informacji genetycznej. Ekspresja genów prowadząca do powstania białka obejmuje transkrypcję oraz translację, natomiast właściwa synteza łańcucha polipeptydowego zachodzi podczas translacji. Proces translacji przebiega w trzech głównych etapach: inicjacji, elongacji i terminacji. Uczestniczą w nim rybosomy, cząsteczki mRNA i tRNA oraz liczne cytoplazmatyczne czynniki pomocnicze niezbędne do prawidłowego przebiegu poszczególnych etapów translacji [148], [149].

Rybosom bakteryjny jest kompleksem rybonukleoproteinowym, złożonym z dwóch podjednostek: dużej 50S i małej 30S, które podczas inicjacji translacji łączą się z udziałem mRNA, tworząc razem rybosom 70S. Wiele antybiotyków oddziałuje selektywnie na podjednostkę 30S lub 50S, zaburzając prawidłowy przebieg translacji poprzez blokowanie inicjacji, elongacji łańcucha polipeptydowego lub powodowanie błędnego odczytu mRNA. Hamowanie syntezy białek skutkuje zatrzymaniem wzrostu komórek bakteryjnych bądź prowadzi do ich śmierci, w zależności od mechanizmu działania danego związku [149].

Inhibitory podjednostki 50S oddziałują z rybosomem bakteryjnym poprzez wiązanie się z 23S rRNA lub białkami rybosomalnymi tej podjednostki, prowadząc do zaburzenia kluczowych etapów translacji. W zależności od klasy antybiotyku, hamowanie może dotyczyć różnych procesów molekularnych, w tym blokowania centrum peptydylotransferazy odpowiedzialnego za tworzenie wiązań peptydowych, uniemożliwienia prawidłowego wiązania peptydylo-tRNA w miejscu A lub P rybosomu, blokowania kanału wyjścia nowo syntetyzowanego peptydu lub zahamowania translokacji tRNA i mRNA w obrębie rybosomu. W rezultacie działania inhibitorów 50S dochodzi do zahamowania wydłużania łańcucha polipeptydowego, destabilizacji kompleksów translacyjnych oraz zatrzymania syntezy białek [149], [150].

Związki hamujące aktywność podjednostki 30S mogą zaburzać wiązanie aminoacylo-tRNA z miejscem A rybosomu lub wpływać na prawidłowe odczytywanie kodonu mRNA przez tRNA. Przykładowo, tetracykliny blokują dostęp aminoacylo-tRNA do miejsca A rybosomu. Niektóre aminocyklitole, takie jak spektynomycyna, hamują translokację katalizowaną przez czynnik elongacyjny EF-G, nie powodując przy tym błędnego odczytu mRNA [149], [151]. Natomiast aminoglikozydy działają w odmienny

sposób. Wiążą się z 16S rRNA w obrębie centrum dekodującego podjednostki 30S, powodując zmianę konformacji kompleksu utworzonego między kodonem mRNA a odpowiadającym mu aminoacylo-tRNA. Prowadzi to do błędnego dopasowania tRNA, a w konsekwencji do wbudowywania nieprawidłowych aminokwasów i powstawania wadliwych białek [139], [149], [151].

Jednym z mechanizmów oporności na antybiotyki hamujące syntezę białek jest enzymatyczna modyfikacja cząsteczki leku. Mechanizm ten jest szczególnie dobrze poznany w przypadku aminoglikozydów, które mogą być modyfikowane przez bakteryjne acetylotransferazy, nukleotydylotransferazy lub fosfotransferazy. Enzymatyczna modyfikacja struktury antybiotyku prowadzi do zmiany ładunku, geometrii lub tworzenia oddziaływań z miejscem docelowym, co zaburza oddziaływania z 16S rRNA podjednostki 30S i uniemożliwia skuteczne wiązanie z rybosomem [148], [149], [152]. Do innych mechanizmów oporności należą m.in. metylacja rRNA, mutacje w obrębie miejsca docelowego, aktywne usuwanie antybiotyku z komórki oraz zmniejszenie jego przenikania do wnętrza bakterii [153].

3.4. Hamowanie syntezy kwasów nukleinowych

Syntezę kwasów nukleinowych można podzielić na dwie fazy: syntezę prekursorów (nukleotydów i deoksyrybonukleotydów) z cząsteczek pośrednich metabolizmu komórkowego oraz enzymatyczną polimeryzację nukleotydów w celu utworzenia makrocząsteczki, której sekwencja jest określona przez komplementarność zasad w matrycy DNA [134].

Synteza DNA w komórce bakteryjnej wymaga udziału kluczowych enzymów, w tym topoizomeraż. Enzymy te dzielą się na typ IA, w którego skład wchodzi topoizomeraza I i III, oraz typ IIA, który dzieli się na gyrazę DNA i topoizomerażę IV. Zaburzenie aktywności tych enzymów powoduje nieprawidłowości w skręceniu struktury DNA i prowadzi do jego nieprawidłowego tworzenia. Przykładem antybiotyków działających w taki sposób są fluorochinolony, które inhibują gyrazę DNA u bakterii Gram-ujemnych i topoizomerażę IV u bakterii Gram-dodatnich. Fluorochinolony oddziałują selektywnie z topoizomerażami typu IIA, jednak nie działają jako klasyczne inhibitory kompetycyjne ani allosteryczne. Ich mechanizm polega na stabilizacji przejściowego kompleksu enzym-DNA powstającego podczas katalizy [154], [155].

Mechanizm działania antybiotyków z grupy ryfamycyn polega na zakłócaniu syntezy RNA poprzez hamowanie aktywności polimerazy RNA. Polimeraza RNA

odpowiada za proces transkrypcji, buduje sekwencję RNA łącząc ze sobą rybonukleotydy i jest zależna od matrycy DNA. Ryfamycyny wiążą się z polimerazą RNA, a dokładniej z jej podjednostką β . Miejscem wiązania ryfamycyn jest hydrofobowa kieszeń zlokalizowana w kanale wyjścia nowo syntetyzowanego RNA, w pobliżu centrum aktywnego enzymu. Częsteczka ryfamycyny oddziałuje z aminokwasami podjednostki β poprzez kombinację oddziaływań hydrofobowych i wiązań wodorowych, stabilizując konformację enzymu, która umożliwia inicjację transkrypcji, lecz uniemożliwia dalszą elongację. W efekcie ryfamycyna nie blokuje przyłączenia pierwszego rybonukleotydu ale hamuje wydłużanie łańcucha RNA po syntezie około 2-3 nukleotydów, blokując w ten sposób proces transkrypcji [135], [156].

Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki hamujące syntezę kwasów nukleinowych polegają głównie na modyfikacjach w genach kodujących polimerazę RNA, gyrazy DNA oraz topoizomeraż [135]. Gyraza DNA jest kodowana przez geny *gyrA* i *gyrB*, natomiast topoizomeraza IV przez geny *parC* i *parE*. Mutacje w tych genach mogą prowadzić do zmian w strukturze miejsca docelowego fluorochinolonów, zmniejszając powinowactwo antybiotyku do kompleksu enzym–DNA i ograniczając jego zdolność do stabilizacji kompleksu [157].

4. Metody badania mechanizmów działania związków przeciwbakteryjnych

Komórka bakteryjna stanowi złożony układ biologiczny, którego funkcjonowanie zależy zarówno od integralności struktur komórkowych, takich jak błony i ściana komórkowa, jak i od prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, ekspresji genów oraz mechanizmów regulacyjnych [158]. W odpowiedzi na działanie związków przeciwbakteryjnych elementy te mogą ulegać istotnym zmianom, dlatego identyfikacja mechanizmów działania takich związków wymaga zastosowania różnych, wzajemnie uzupełniających się metod badawczych. Współczesne podejścia obejmują przede wszystkim analizy genomowe, transkryptomiczne i proteomiczne, a także techniki obrazowania, barwienia fluorescencyjnego oraz znakowania radionuklidami. Metody te umożliwiają ocenę odpowiedzi bakterii na poziomie molekularnym, komórkowym i fenotypowym, dostarczając informacji istotnych dla projektowania nowych terapii oraz przewidywania rozwoju oporności.

4.1. Metody omiczne w badaniu mechanizmów działania związków przeciwbakteryjnych

4.1.1. Transkryptomika i sekwencjonowanie RNA

Sekwencjonowanie RNA (RNA-seq, ang. *RNA sequencing*) jest obecnie jedną z kluczowych metod analizy odpowiedzi komórek bakteryjnych na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych. Technika ta umożliwia globalne profilowanie transkryptomu genów (ilościową i jakościową analizę transkryptomu), co pozwala na identyfikację zmian regulacyjnych związanych z określonym mechanizmem działania antybiotyku lub innego związku przeciwdrobnoustrojowego [159], [160].

RNA-seq jest techniką sekwencjonowania nowej generacji, która zazwyczaj obejmuje przekształcenie RNA w cDNA (ang. *complementary DNA*) z udziałem odwrotnej transkryptazy, a następnie sekwencjonowanie przygotowanej biblioteki cDNA. Pierwszym etapem tej metody jest izolacja wysokiej jakości RNA z komórek oraz jego oczyszczenie. Następnie przeprowadza się trawienie zanieczyszczeń DNA, ocenę jakości RNA oraz, w przypadku analiz bakteryjnych, najczęściej usunięcie rybosomalnego RNA. Kolejnymi etapami są synteza cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy, fragmentacja materiału, przygotowanie biblioteki sekwencyjnej oraz przyłączenie adapterów umożliwiających sekwencjonowanie. Uzyskane odczyty sekwencyjne są następnie mapowane do genomu referencyjnego lub analizowane metodami składania *de novo*, a dalsza analiza bioinformatyczna pozwala określić poziomy ekspresji genów, zidentyfikować nowe transkrypty, małe RNA regulatorowe, regiony niekodujące oraz potencjalne miejsca startu transkrypcji [161], [162].

Przykładem wykorzystania RNA-seq do badania mechanizmu działania związków przeciwdrobnoustrojowych jest praca O'Rourke i in. [163], w której na podstawie globalnych zmian w profilu ekspresji genów *E. coli* sklasyfikowano 37 antybiotyków według ich mechanizmu działania oraz opracowano model umożliwiający przewidywanie prawdopodobnego mechanizmu działania nowych związków przeciwbakteryjnych na podstawie ich profilu transkryptomicznego. W badaniach nad *S. aureus* Jones i in. [164] wykazali, że analiza transkryptomiczna może wspierać rozróżnianie odpowiedzi komórkowej na związki bakteriostatyczne i bakteriobójcze. Autorzy wskazali również możliwy mechanizm działania nowego związku przeciwdrobnoustrojowego poprzez porównanie jego profilu transkryptomicznego z

profilami indukowanymi przez antybiotyki o znanych mechanizmach działania [164]. W związku z tym warto podkreślić, że RNA-seq może być szczególnie przydatne w przypadku nowych klas związków przeciwdrobnoustrojowych o nieznanym mechanizmie, ponieważ możliwe jest porównywanie profili ekspresji z wzorcami transkryptomycznymi generowanymi przez antybiotyki o już opisanych mechanizmach działania.

Jak każda technika badawcza, RNA-seq ma również swoje ograniczenia. Metoda ta wymaga wysokiej jakości RNA, odpowiedniej ilości próbki, dobór czasu ekspozycji komórek na badany związek, właściwie zaplanowanego eksperymentu, odpowiedniej liczby powtórzeń biologicznych oraz zaawansowanej analizy bioinformatycznej i statystycznej [165], [166].

4.1.2. Genomika i sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie pełnego genomu, określane jako sekwencjonowanie całogenomowe (WGS, ang. *Whole Genome Sequencing*) stało się jedną z najważniejszych technik umożliwiających poznanie kompletnej sekwencji DNA organizmów, w tym bakterii chorobotwórczych. W przypadku patogenów, za pomocą tej metody można zbadać geny kodujące białka np. z obszarów regulatorowych, czy genów oporności [167]. Analiza całego genomu bakterii pozwala zidentyfikować geny odpowiedzialne za oporność, co może przybliżyć do wyjaśnienia sposobu, w jaki antybiotyki działają na poziomie molekularnym [168].

Metoda ta rozwijała się przez lata zaczynając od sekwencjonowania Sangera, przez sekwencjonowanie drugiej generacji, aż po technologie sekwencjonowania trzeciej generacji, umożliwiające odczytywanie informacji genetycznej z pojedynczych cząsteczek DNA, często w czasie rzeczywistym [169].

Ogólna procedura WGS polega na izolacji DNA z komórek, ocenie jego jakości i ilości, a następnie przygotowaniu biblioteki sekwencyjnej, które może obejmować fragmentację DNA oraz przyłączenie adapterów niezbędnych do przeprowadzenia sekwencjonowania i identyfikacji poszczególnych fragmentów. Po uzyskaniu odczytów sekwencyjnych przeprowadza się analizę bioinformatyczną, obejmującą m.in. kontrolę jakości danych, składanie genomu lub mapowanie odczytów do genomu referencyjnego, anotację genów oraz identyfikację potencjalnych determinant oporności [169], [170].

4.1.3. Funkcjonalna identyfikacja celu za pomocą proteomiki ekspresyjnej (FITeXP, ang. *functional identification of target by expression proteomics*)

Technika ta umożliwia identyfikację potencjalnych celów molekularnych leków lub związków przeciwdrobnoustrojowych na podstawie zmian w ekspresji białek w komórkach traktowanych danym związkiem w porównaniu z komórkami nietraktowanymi. W FITeXP przyjmuje się, że białka, których poziom ekspresji ulega istotnej i specyficznej zmianie w odpowiedzi na związek, mogą być powiązane z jego mechanizmem działania leku lub wskazywać jego bezpośredni cel molekularny [171].

Metoda FITeXP polega na analizie zmian profilu ekspresji białek w komórkach poddanych działaniu badanego związku. Na podstawie istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji identyfikuje się białka potencjalnie zaangażowane w mechanizm działania związku, w tym kandydatów na bezpośrednie cele molekularne lub elementy powiązanych szlaków biologicznych [171], [172].

4.1.4. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu (PISA, ang. *proteome integral solubility alteration*)

PISA jest nowoczesną metodą proteomiczną wykorzystywaną do identyfikacji potencjalnych celów molekularnych leków i związków przeciwdrobnoustrojowych na podstawie zmian rozpuszczalności białek w komórkach traktowanych danym związkiem. Metoda opiera się na założeniu, że interakcja małocząsteczkowego związku z białkiem może powodować zmianę jego termodynamicznych właściwości, w tym stabilności i rozpuszczalności. W praktyce PISA polega na porównawczej analizie rozpuszczalności białek w próbkach traktowanych badanym związkiem oraz w próbkach kontrolnych po zastosowaniu stresu termicznego. Zmiany integralnej rozpuszczalności proteomu, wyznaczone na podstawie ilości białek pozostających we frakcji rozpuszczalnej, pozwalają na identyfikację białek bezpośrednio wiążących związek lub pośrednio zaangażowanych w jego mechanizm działania [173], [174].

W pracy Maity i in. [175] zastosowano metodę PISA-Express w połączeniu z danymi pochodzącymi z innych technik omicznych, w tym transkryptomiki, w celu odróżnienia potencjalnych bezpośrednich interakcji pięciu badanych związków z proteomem bakterii *Helicobacter pylori* od efektów wtórnych. Analiza zmian rozpuszczalności białek wykazała, że wszystkie testowane związki wpływały na rozpuszczalność białka AtpD, stanowiącym element kompleksu syntazy ATP. Dla

jednego ze związków zidentyfikowano ponadto cztery dodatkowe potencjalne cele w obrębie tego kompleksu: AtpB, AtpC, AtpF oraz AtpG, co wskazuje na jego możliwy potencjał jako inhibitora syntazy ATP, czyli kluczowego elementu metabolizmu energetycznego komórki bakteryjnej.

Podsumowując, obie metody pozwalają na uzyskanie komplementarnych informacji przydatnych w identyfikacji potencjalnych celów molekularnych leków oraz w poznawaniu mechanizmów działania związków terapeutycznych. FITExP dostarcza informacji o zmianach poziomu ekspresji białek, natomiast PISA umożliwia analizę zmian ich rozpuszczalności i stabilności. Łączne wykorzystanie tych podejść może ułatwić odróżnienie bezpośrednich efektów działania związku od wtórnych zmian w metabolizmie komórki [171], [173].

4.2. Metody obrazowania i znakowania komórek bakteryjnych

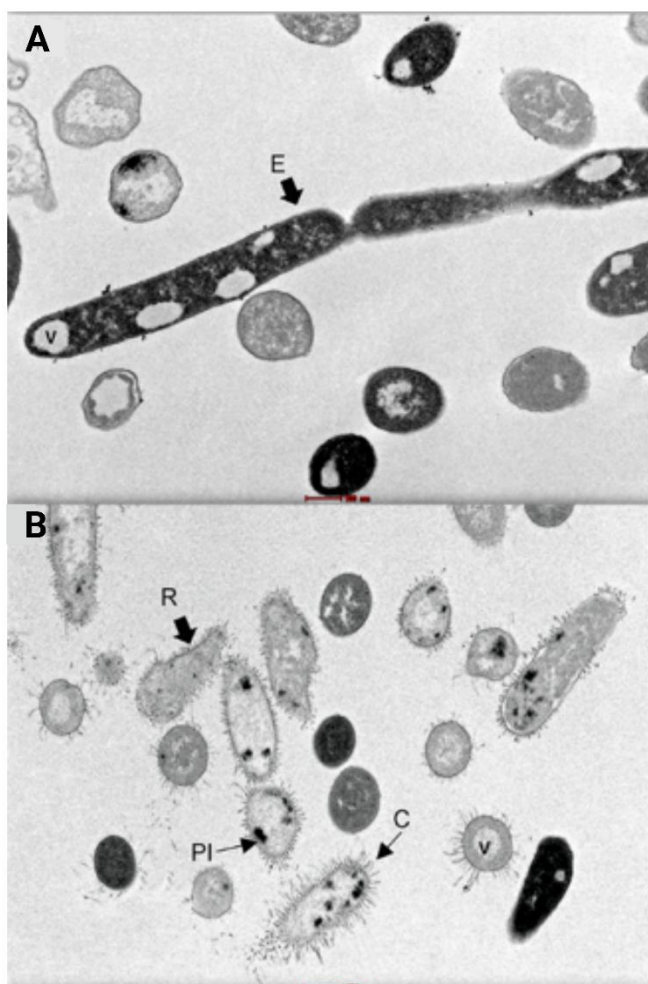
4.2.1. Obrazowanie mikroskopowe

Mikroskopia elektronowa, w tym transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, ang. *transmission electron microscopy*) i skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, ang. *scanning electron microscopy*), jest niezwykle cennym narzędziem w badaniach mechanizmów działania związków przeciwbakteryjnych. Pozwalają one bowiem obserwować zmiany morfologiczne i strukturalne komórek bakteryjnych z rozdzielczością rzędu nanometrów, niedostępną metodom klasycznej mikroskopii świetlnej.

W przypadku TEM wiązka elektronów przechodzi przez ultracienki preparat, co umożliwia wizualizację ultrastruktury komórki bakteryjnej, w tym takich struktur jak błony cytoplazmatycznej, struktur wewnątrzkomórkowych, a także ewentualnych uszkodzeń powstałych po podaniu związku przeciwbakteryjnego [176], [177].

W SEM próbka jest skanowana skupioną wiązką elektronów, która w kontakcie z materiałem powoduje emisję elektronów wtórnych oraz elektronów wstecznie rozproszonych. Detekcja tych elektronów pozwala uzyskać obrazy topografii powierzchni próbki. Ten rodzaj mikroskopii elektronowej dostarcza trójwymiarowych obrazów powierzchni bakterii o dużej głębi ostrości, umożliwiając ocenę zmian w obrębie powierzchni ściany komórkowej, membrany komórkowej, czy deformacji strukturalnych komórki [176], [177], [178].

Badanie przeprowadzone na szczepie *E. coli* potraktowanym różnymi klasami antybiotyków wykazało, że po ekspozycji na β -laktamy bakterie ulegały wydłużeniu, co oznaczało zakłócenie syntezy ściany komórkowej, natomiast po działaniu polimyksyn obserwowano uszkodzenia błony zewnętrznej (Rysunek 15) [179].

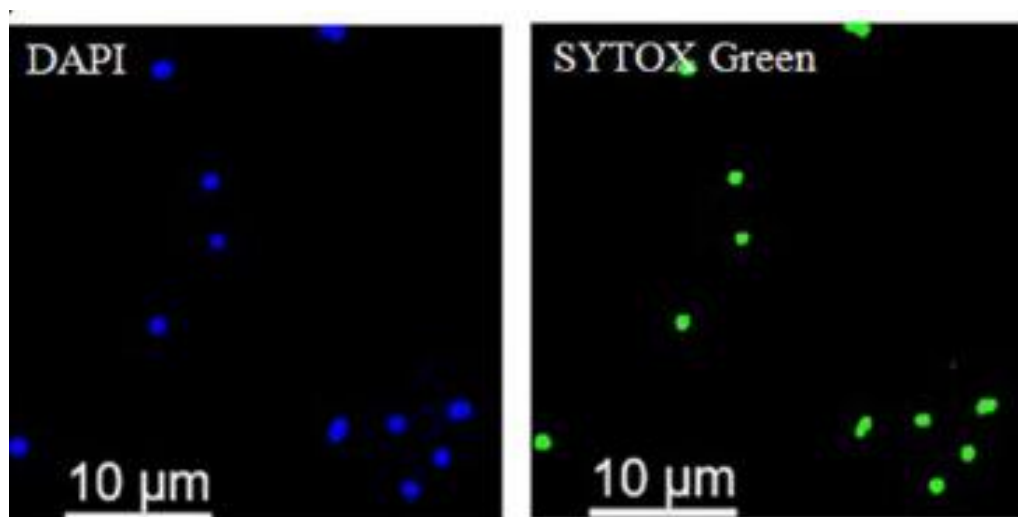


Rysunek 15. Zdjęcia TEM szczepu *E. coli* ATCC 25922 po traktowaniu: A) amoksycyliną z kwasem klawulanowym, B) polimyksyną B. Czarna strzałka wskazuje wewnątrzkomórkowe zmiany strukturalne: E – wydłużenie komórki, R – przerwanie struktury, V – wakuola, C – fimbrie typu curli oraz PI – plazmid. Powiększenie 4400x [179].

4.2.2. Barwienie fluorescencyjne

Barwienie komórek bakteryjnych barwnikami fluorescencyjnymi jest jedną z najczęściej stosowanych metod oceny integralności błony cytoplazmatycznej, jej przepuszczalności oraz żywotności komórek po ekspozycji na związki przeciwdrobnoustrojowe. Zwykle wykorzystuje się barwniki, które nie przenikają przez

nienaruszoną błonę cytoplazmatyczną, dlatego wybarwieniu ulegają tylko komórki z uszkodzoną błoną, co sugeruje zaburzenie jej integralności lub śmierć komórki [180], [181], [182]. Do przykładów takich barwników należą SYTOX Green (Rysunek 16) oraz jodek propidyny (PI), które po wnikięciu do komórki z uszkodzoną błoną wiążą się z kwasami nukleinowymi, głównie DNA. Odmienny charakter wykazuje natomiast DAPI, który może przenikać do komórek w ograniczonym stopniu i jest powszechnie stosowany do barwienia DNA [180], [183], [184].



Rysunek 16. Komórki MRSA ATCC 43300 wybarwione barwnikami DAPI oraz SYTOX Green po 30-minutowej inkubacji ze związkiem L007-0069 w stężeniu równym $1 \times \text{MIC}$ [183].

Barwienie fluorescencyjne często prowadzi się z wykorzystaniem układów wielobarwnych, w których stosuje się jednocześnie barwniki penetrujące wszystkie komórki (np. SYTO 9) oraz barwniki wnikające wyłącznie do komórek o uszkodzonej błonie. Podejście to umożliwia równoczesną ocenę populacji żywych i uszkodzonych komórek (ang. *live/dead staining*) [185], [186]. Interpretacja uzyskanych obrazów wymaga jednak ostrożności, ponieważ zwiększona przepuszczalność błony nie zawsze jednoznacznie oznacza śmierć komórki. Może również odzwierciedlać stan subletalnego uszkodzenia lub przejściową destabilizację błony indukowaną działaniem związku przeciwdrobnoustrojowego. Dodatkowo intensywność fluorescencji zależy od stopnia kondensacji DNA, czasu inkubacji oraz warunków środowiskowych, takich jak pH czy obecność jonów, co może wpływać na porównywalność wyników [187], [188]. Z tego względu barwienie fluorescencyjne wykorzystywane do oceny integralności błony jest najczęściej stosowane jako metoda jakościowa i powinno być interpretowane w

połączeniu z innymi technikami, takimi jak testy żywotności komórek lub obrazowanie z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej.

4.2.3. Znakowanie radionuklidami

Znakowanie antybiotyków lub innych związków przeciwdrobnoustrojowych radionuklidami stanowi ważne podejście umożliwiające śledzenie ich dystrybucji, akumulacji oraz oddziaływania z komórkami bakteryjnymi. Dzięki temu można monitorować, czy dany związek przenika do komórek bakteryjnych, czy ulega akumulacji w określonych frakcjach komórkowych lub, czy wiąże się z określonymi strukturami takimi jak ściana komórkowa, błona, DNA. Metoda ta może również służyć do badania losów znakowanego związku oraz jego metabolitów [189].

Całkowicie odmiennym podejściem jest wykorzystanie radioaktywnych prekursorów, np. [^3H]tymidyny do oceny syntezy DNA w komórce, [^3H]urydyny do oceny syntezy RNA, [^3H]leucyny albo [^3H]histydyny do oceny syntezy białek. Podczas inkubacji związków przeciwdrobnoustrojowych z zawiesiną bakteryjną i zastosowanym prekursorem możliwe jest sprawdzenie, czy dany prekursor jest włączany do procesu. Na tej podstawie można określić wpływ badanego związku na procesy biosyntetyczne, bez konieczności znakowania samego chemioterapeutyku [190], [191].

Zastosowanie radioaktywnych prekursorów biosyntezy makrocząsteczek umożliwia funkcjonalną ocenę wpływu badanego związku na kluczowe szlaki metaboliczne. Metoda ta opiera się na pomiarze stopnia inkorporacji znakowanego prekursora do nowo syntetyzowanych makrocząsteczek, co pozwala wskazać prawdopodobny mechanizm działania badanego związku lub zawęzić zakres jego potencjalnych celów komórkowych. Przykładowo, w pracy Patrzykata i in. [192] mechanizm działania peptydu przeciwdrobnoustrojowego P-Der, będącego pochodną pleurocydyny i dermaseptyny, oceniono na podstawie analizy hamowania inkorporacji radioaktywnych prekursorów ([^3H]tymidyny, [^3H]urydyny oraz [^3H]histydyny) do nowo syntetyzowanych makromolekuł w komórkach *E. coli*. Uzyskane wyniki wykazały istotne zahamowanie syntezy makromolekuł, przy czym szczególnie wyraźny efekt obserwowano w przypadku syntezy RNA.

II. Hipoteza badawcza i cel pracy

W swojej pracy założyłam, że racjonalne modyfikacje strukturalne cząsteczki Cystapep 1 (A-20), zaprojektowane na podstawie wcześniejszych badań zależności struktura-aktywność oraz wspomagane analizą deskryptorów molekularnych i metodami chemometrycznymi, pozwolą otrzymać nowe peptydomimetyki o wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *S. aureus*, korzystnym profilem bezpieczeństwa biologicznego oraz odpowiedniej stabilności w warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

Przyjęłam, że aktywność biologiczna analogów Cystapep 1 zależy od równowagi między właściwościami strukturalnymi i fizykochemicznymi cząsteczki, takimi jak obecność dodatnio naładowanych ugrupowań, hydrofobowość, wielkość cząsteczki, rozgałęzienie struktury, pole powierzchni polarnej, rozpuszczalność oraz charakter końcowych fragmentów aromatycznych. Założyłam również, że analiza chemometryczna umożliwi identyfikację cech molekularnych istotnych dla aktywności przeciwbakteryjnej, cytotoksyczności, hemolityczności, stabilności oraz potencjalnej przydatności aplikacyjnej otrzymanych związków.

Dodatkowo postawiłam hipotezę, że mechanizm działania wybranych analogów Cystapep 1 wobec komórek MRSA ma charakter złożony i nie ogranicza się wyłącznie do destabilizacji błony komórkowej, lecz może obejmować także zaburzenie procesów wewnątrzkomórkowych, w tym biosyntezy kwasów nukleinowych i białek, oraz oddziaływanie z wybranymi składnikami proteomu bakteryjnego.

Głównym celem mojej pracy było zaprojektowanie, synteza oraz kompleksowa charakterystyka nowych analogów cząsteczki Cystapep 1 (A-20) jako potencjalnej klasy peptydomimetycznych związków przeciwbakteryjnych aktywnych wobec szczepów *S. aureus*, również opornych na metycylinę (MRSA).

Cel ten obejmował określenie zależności pomiędzy ich strukturą chemiczną, właściwościami fizykochemicznymi, deskryptorami molekularnymi i aktywnością biologiczną z wykorzystaniem metod SAR oraz analizy chemometrycznej, jak również ocenę aktywności przeciwbakteryjnej, stabilności i bezpieczeństwa biologicznego otrzymanych związków. Istotnym elementem pracy było również wyjaśnienie możliwych mechanizmów działania wybranych peptydomimetyków wobec komórek MRSA, w tym ocena ich wpływu na integralność błony komórkowej, biosyntezę makrocząsteczek, biofilm bakteryjny oraz profil zmian proteomicznych.

Do osiągnięcia głównego celu rozprawy, wyszczególniłam następujące zadania szczegółowe:

1. Analiza dostępnych danych dotyczących aktywności biologicznej wcześniej otrzymanych analogów A-20. Przygotowanie na tej podstawie modeli strukturalnych wybranych związków, obliczenie deskryptorów molekularnych oraz przeprowadzenie analizy zależności struktura–aktywność (SAR) i analizy chemometrycznej. Następnie wykorzystanie uzyskanych wyników do racjonalnego zaprojektowania nowych peptydomimetyków o potencjalnie korzystniejszych właściwościach przeciwbakteryjnych.
2. Synteza wybranych zaprojektowanych peptydomimetyków metodą klasycznej syntezy w roztworze oraz ich oczyszczenie i charakterystyka z wykorzystaniem metod chromatograficznych i spektrometrycznych.
3. Zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich oraz wybranych związków wobec bakterii Gram-ujemnych poprzez oznaczenie wartości MIC i MBC.
4. Wytypowanie najbardziej aktywnych analogów i przeprowadzenie badań na rozszerzonym panelu szczepów MRSA, w tym szczepów laboratoryjnych i izolatów klinicznych poprzez analizę dynamiki wzrostu i przeżywalności komórek bakteryjnych. Dodatkowo określenie wpływu temperatury na aktywność przeciwbakteryjną wybranych analogów.
5. Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków w środowisku wodnym oraz w ludzkim osoczu jako jednego z kluczowych parametrów ich potencjalnej przydatności biologicznej.
6. Zbadanie bezpieczeństwa biologicznego otrzymanych związków poprzez określenie ich cytotoksyczności wobec ludzkich keratynocytów oraz aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów.
7. Określenie zdolności wybranych peptydomimetyków do redukcji biofilmu MRSA z wykorzystaniem metod mikrobiologicznych, barwienia fioletem krystalicznym oraz obrazowania skaningową mikroskopią elektronową.
8. Analiza mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków w komórkach MRSA poprzez ocenę ich wpływu na biosyntezę DNA, RNA i białek oraz na integralność błony cytoplazmatycznej. Dodatkowo ocena zmian

morfologicznych komórek MRSA indukowanych przez wybrane analogi z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

9. Podjęcie próby identyfikacji potencjalnych celów molekularnych działania wybranych peptydomimetyków z zastosowaniem metod proteomicznych opartych na spektrometrii mas, w tym PISA oraz FITE_xP.

III. Materiały i metody

1. Analizy chemometryczne

Analizy chemometryczne wykorzystane w niniejszej pracy zostały przeprowadzone w ramach współpracy naukowej i były istotnym narzędziem wspomagającym projektowanie nowych analogów oraz interpretację zależności struktura-aktywność. Nie stanowiły one jednak samodzielnej części eksperymentalnej realizowanej przeze mnie, lecz zostały wykorzystane jako wsparcie procesu projektowania badanych peptydomimetyków.

Z tego względu w rozprawie przedstawiam ich zakres, cel oraz sposób wykorzystania, natomiast szczegółowe aspekty obliczeniowe pozostają częścią opracowania wykonanego przez dr hab. Agnieszkę Gajewicz-Skrętną z Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (do października 2025 r. zatrudnioną w Katedrze Chemii i Radiochemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego).

Mój udział obejmował przygotowanie i przekazanie struktur analizowanych analogów oraz danych eksperymentalnych dotyczących ich aktywności biologicznej. Modele 3D ukazujące geometrię cząsteczek i układ atomów wygenerowałam i poddałam minimalizacji energii w programie Avogadro. Następnie przeprowadziłam pełną optymalizację geometrii cząsteczek przy użyciu półempirycznej metody PM7 zaimplementowanej w programie MOPAC2016.

Otrzymane dane przekazałam dr hab. Agnieszce Gajewicz-Skrętniej, która na podstawie zoptymalizowanych geometrii struktur obliczyła deskryptory molekularne, w tym deskryptory jedno-, dwu- oraz trójwymiarowe (1D-3D). Następnie przeprowadziła eksploracyjną analizę danych, jakościowe modelowanie SAR. Uzyskane wyniki zostały następnie poddane wspólnej analizie i interpretacji.

2. Synteza związków

Opisane niżej procedury zastosowałam jako ogólny schemat otrzymywania odpowiednich *N*-Boc-chronionych aminoalkoholi, ich pochodnych mesylowych oraz kolejnych prekursorów wykorzystywanych w syntezie peptydomimetyków (podrozdział

2.1). W pierwszym etapie, w zależności od syntezowanego peptydomimetyku, wychodziłam z odpowiedniego *N*-Boc-chronionego aminokwasu: Boc-Val-OH, Boc-Tic-OH oraz Boc-Phg-OH.

Z-Har-OH, wykorzystany jako substrat do syntezy wybranych analogów, zsyntezowała dr Maria Dzierżyńska z Katedry Chemii Biomedycznej, Wydziału Chemii UG.

Pozostałe substraty: kwasy, Boc-aminokwasy oraz Z-aminokwasy zostały zakupione jako związki o czystości co najmniej 90%.

2.1. Synteza Boc-Valinolu

Do roztworu Boc-Val-OH (23 mmol) w DCM (9,5 ml) dodałam TEA (22 mmol) i ochłodziłam mieszaninę do -18 °C. Następnie dodałam w jednej porcji chloromrówczan izobutyli (23 mmol) i mieszałam przez 20 min. Po dodaniu NaBH₄ (70 mmol) temperaturę podniosłam do -5 °C i powoli wkraplałam MeOH (115 ml). Po zakończeniu wkraplania mieszaninę mieszałam jeszcze przez 15 min, a następnie dodałam stężony AcOH (3,45 ml) i kontynuowałam mieszanie przez 30 min. Rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuściłam w Et₂O. Fazę organiczną przemywałam kolejno 1 M HCl, 5% NaHCO₃ oraz nasyconym roztworem NaCl, suszyłam nad MgSO₄, odsączyłam i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem.

TLC (żel krzemionkowy, CHCl₃/MeOH/AcOH 90:8:2, v/v/v) R_f = 0,41 (UV, 254 nm); wydajność 98% (22,6 mmol).

2.2. Synteza Boc-ValΨ[CH₂-O-Ms], metanosulfonian 2-(*N*-*tert*-butoksykarbonyloamino)-3-metylobutanu)

Do roztworu Boc-ValΨ[CH₂-OH] (22,6 mmol) w DCM (40 ml) w temperaturze 0 °C dodałam TEA (25 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszałam przez 10 min. Następnie wkropiłam MsCl (25 mmol) w ciągu 5 min i kontynuowałam mieszanie przez 1 h. Mieszaninę reakcyjną przemyłam buforem fosforanowym o pH 6,6, a warstwę organiczną suszyłam nad MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego odparowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem.

TLC (żel krzemionkowy, cykloheksan/AcOEt 1:1, v/v) R_f = 0,33 (UV, 254 nm); wydajność 95% (21,4 mmol).

2.3. Synteza Boc-ValΨ[CH₂-N₃], azydek 2-(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-amino)-3-metylobutanu

Do roztworu Boc-ValΨ[CH₂-O-Ms] (21 mmol) w suchym DMF (53 ml) dodałam porcjami bromek tetrabutylamonowy (21 mmol) i NaN₃ (110 mmol), mieszaninę mieszałam osłoniętą od dostępu do światła. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą analizy IR, do momentu uzyskania intensywnego pasma azydkowego na widmie przy liczbie falowej równej około 2100 cm⁻¹. Po zakończeniu reakcji mieszaninę odparowałam, otrzymany osad rozpuściłam w wodzie i przeprowadziłam ekstrakcję do Et₂O. Warstwę organiczną ekstrahowałam z wody, nasyconego NaCl, suszyłam nad bezwodnym MgSO₄, odsączyłam i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem.

IR (cm⁻¹): 3303 (N-H), 2101 (N₃), 1694 (C=O), 1173 (C-O); 69% (14,5 mmol).

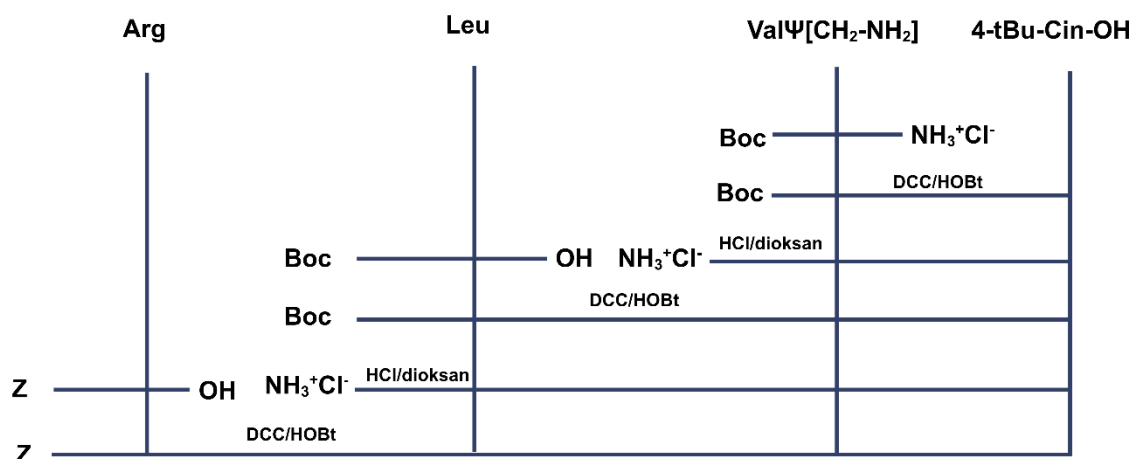
2.4. Synteza Boc-ValΨ[CH₂-NH₂]_xHCl, chlorowodorek 2-(*N*-*tert*-butoksykarbonylo-amino)-3-metylobutanu

Boc-ValΨ[CH₂-N₃] (14,5 mmol) rozpuściłam w mieszaninie MeOH (45 ml) i CHCl₃ (1,5 ml), a następnie poddałam uwodornieniu katalitycznemu w obecności Pd/C_{aktywny} w atmosferze H₂. Reakcję prowadziłam do całkowitego zaniku substratu na płytce TLC, nie dłużej niż 6 h. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowałam z Et₂O.

TLC (żel krzemionkowy, CHCl₃/MeOH/AcOH 90:8:2, v/v/v) R_f = 0,05 (UV, 254 nm); wydajność 74% (10,8 mmol).

2.5. Synteza związków

Peptydomimetyki zsyntezowałam metodą klasyczną w roztworze z zastosowaniem strategii Boc. Wszystkie związki otrzymałam według analogicznej procedury i przy zachowaniu jednakowych stosunków molowych reagentów. Przykładowy przebieg syntezy, przedstawiony dla związku A-241 pokazałam na Rysunku 17.



Rysunek 17. Schemat syntezy związku A-241 jako przykład zastosowanej strategii przy syntezie peptydomimetyków, gdzie 4-tBu-Cin-OH oznacza kwas 3-(4-(*tert*-butyl)fenylo)akrylowy.

Postęp reakcji sprzęgania oraz deprotekcji monitorowałam metodą RP-HPLC z wykorzystaniem systemu Nexera X2 (Shimadzu) wyposażonego w kolumnę analityczną Kinetex C8, 2,6 µm, 100 Å, 2,1 x 100 mm, detekcja UV przy długości fali 223 nm. Jako fazę ruchomą stosowałam eluent A: H₂O z 0,1% TFA, B: 80% ACN z 0,08% TFA. Rozdział chromatograficzny prowadziłam przy przepływie 0,5 ml/min stosując gradient 5% B do 100% B w czasie 15 min.

Deprotekcję osłony Boc aminokwasów prowadziłam za pomocą 4 M HCl w dioksanie. Po zakończeniu reakcji odparowywałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość wytrącałam przez dodatek Et₂O.

W pierwszym etapie rozpuściłam Boc-ValΨ[CH₂-NH₂]_xHCl (1,7 mmol) w bezwodnym THF (4 ml, świeżo destylowanym), a następnie przy mieszaniu wkraplałam TEA do uzyskania pH ok. 8,5. Do roztworu wprowadziłam kwas 3-(4-(*tert*-butyl)fenylo)akrylowy (4-*t*-Bu-Cin-OH, 1,4 mmol) oraz HOBt (1,4 mmol). Mieszaninę reakcyjną schłodziłam do temperatury 0 °C, po czym porcjami dodawałam DCC (2,2 mmol) w czasie około 20 minut, kontrolując przy tym pH. Mieszanie prowadziłam przez około 60 minut i ponownie sprawdziłam pH. Reakcję prowadziłam przez 18 h, monitorując jej przebieg metodą HPLC. Po zakończeniu reakcji wytrącony osad w mieszaninie reakcyjnej – dicykloheksylomocznik (DCU) – odsączyłam, przesącz odparowałam, a pozostałość rozpuściłam w AcOEt. Otrzymaną mieszaninę poddałam trzykrotnej ekstrakcji, kolejno: wodą, zimnym 0,5 N HCl, nasyconym NaHCO₃ oraz

nasyconym roztworem NaCl. Warstwę organiczną suszyłam nad MgSO₄, a następnie odparowałam rozpuszczalnik.

W etapie drugim otrzymany produkt Boc-ValΨ[CH₂-NH]-4-*t*-Bu-Cin (1 mmol) poddałam deprotekcji. Uzyskany HCl×ValΨ[CH₂-NH]-4-*t*-Bu-Cin (0,95 mmol) rozpuściłam w bezwodnym THF (4 ml), po czym dodałam TEA do uzyskania pH ok. 8,5. Następnie dodałam Boc-Leu-OH (1,1 mmol) oraz HOBt (1,1 mmol). Mieszaninę schłodziłam do temperatury 0 °C i porcjami dodawałam DCC (1,4 mmol) przez około 20 minut, kontrolując przy tym pH. Dalszą procedurę przeprowadziłam analogicznie jak w etapie pierwszym.

W trzecim etapie Boc-Leu-ValΨ[CH₂-NH]-4-*t*-Bu-Cin (0,7 mmol) poddałam deprotekcji, a następnie uzyskany HCl×Leu-ValΨ[CH₂-NH]-4-*t*-Bu-Cin (0,62 mmol) rozpuściłam w bezwodnym DMF (3 ml) i dodałam TEA do uzyskania pH ok. 8,5. W kolejnym kroku do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłam Z-Arg-OH (0,7 mmol) oraz HOBt (0,7 mmol). Mieszaninę schłodziłam do temp. 0 °C, a następnie w ciągu ok. 20 min porcjami dodawałam DCC (0,9 mmol), kontrolując przy tym pH. Mieszanie prowadziłam przez ok. 60 min i ponownie sprawdziłam pH. Reakcję prowadziłam przez 20 h, monitorując jej postęp. Następnie odsączyłam powstały DCU, przesącz odparowałam, a surowy produkt poddałam oczyszczaniu.

3. Oczyszczanie i charakterystyka peptydomimetyków

Dla każdego surowego produktu peptydomimetyku dobrałam indywidualne warunki oczyszczania metodą RP-HPLC. Wstępną optymalizację warunków rozdzielania prowadziłam w układzie izokratycznym wykorzystując chromatograf HPLC (Shimadzu) wyposażony w detektor PDA (Shimadzu) oraz kolumnę analityczną Kromasil C8, 90 Å, 4,6 x 250 mm. Analizy prowadziłam przez 60 min z detekcją UV przy długości fali 223 nm. Skład fazy ruchomej dobrałam indywidualnie dla każdego peptydomimetyku, stosując odpowiednie układy eluentów:

- a. eluent A: H₂O z 0,1% TFA, eluent B: 80% ACN z 0,08% TFA,
- b. eluent A: 10% roztwór 0,2 M TEAP (fosforanu trietyloamoniowego) w H₂O, eluent B: 10% roztwór 0,2 M TEAP, 65% ACN w H₂O,
- c. eluent A: 0,1 M roztwór octanu amonu w H₂O, eluent B: 0,1 M roztwór octanu amonu w 65% ACN i H₂O.

Następnie proces oczyszczania zsyntezowanych peptydomimetyków prowadziłam stosując RP-HPLC z wykorzystaniem półpreparatywnego zestawu chromatograficznego złożonego z dwóch pomp (Knauer Azura P 4.1S), detektora UV (Knauer Azura UVD 2.1S) oraz kolumny Kromasil C8, 90 Å, 21,2 x 250 mm. Rozdział chromatograficzny prowadziłam w warunkach izokratycznych, dobranych wcześniej na podstawie analiz wykonanych w skali analitycznej.

Do sprawdzenia czystości oczyszczonych peptydomimetyków wykorzystałam system RP-HPLC Nexera X2 (Shimadzu), kolumnę analityczną Kinetex C8, 2,6 µm, 100 Å, 2,1 x 100 mm, detekcja UV przy długości fali 223 nm, układ faz A: H₂O z 0,1% TFA, B: 80% ACN z 0,08% TFA, przepływ 0,5 ml/min, stosując gradient 5% B do 100% B w 15 minut.

W celu weryfikacji masy cząsteczkowej czystych związków korzystałam ze spektrometru mas MALDI TOF (Bruker) lub LCMS-ESI-IT-TOF (Shimadzu) z kolumną analityczną Phenomenex Jupiter Proteo, 90 Å, 4 µm, 2 x 150 mm, w trybie pozytywnej jonizacji.

4. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne przeprowadziłam na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej oraz Katedrą Genetyki Molekularnej Bakterii. Oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej wykonywałam pod opieką dr. Łukasza Grabowskiego, a interpretację uzyskanych wyników konsultowałam z prof. dr hab. Alicją Węgrzyn. Badania mechanizmów działania z wykorzystaniem prekursorów znakowanych radionuklidami prowadziłam pod kierunkiem dr hab. Moniki Maciąg-Dorszyńskiej.

Długoterminowe przechowywanie szczepów bakteryjnych odbywało się w temperaturze -80 °C w podłożu BHI lub LB z 15% dodatkiem glicerolu jako krioprotektanta. Przed użyciem szczepy namnażałam zgodnie z wymaganiami danej procedury eksperymentalnej.

Wszystkie doświadczenia mikrobiologiczne prowadziłam w warunkach aseptycznych, z użyciem jałowego szkła laboratoryjnego, sterylnych materiałów plastikowych oraz jałowych roztworów i podłoży hodowlanych. Wartość gęstości optycznej (OD₆₀₀) zawiesiny bakteryjnej doбираłam indywidualnie do rodzaju przeprowadzanego doświadczenia, uwzględniając konieczność uzyskania komórek znajdujących się w określonej fazie wzrostu.

4.1. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC)

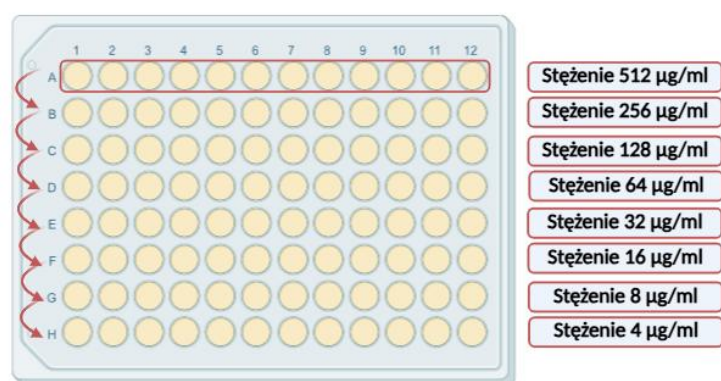
W celu oceny aktywności przeciwbakteryjnej wszystkich zsyntezowanych związków oznaczyłam wartości MIC metodą seryjnych mikrorozcieńczeń w płynnym podłożu BHI (bulion z wyciągiem sercowo-mózgowym, ang. *brain heart infusion broth*). Pomimo że głównym obiektem zainteresowania w niniejszej pracy były szczepy MRSA, początkowy etap badań przeprowadziłam z wykorzystaniem referencyjnych szczepów Gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 oraz *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Projektowanie nowych analogów Cystapep 1 opierało się na danych eksperymentalnych, które w większości uzyskano dla szczepu *S. aureus* ATCC 29213. Zastosowanie tego samego modelu badawczego miało na celu późniejsze porównanie aktywności nowo otrzymanych peptydomimetyków z wcześniej zsyntetyzowanymi analogami oraz ocenę wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych. Dodatkowo do badań użyłam *S. pyogenes* ATCC 19615 jako przedstawiciela innego gatunku bakterii Gram-dodatnich, aby zweryfikować, czy aktywność badanych peptydomimetyków nie jest ograniczona wyłącznie do *S. aureus*. Takie podejście umożliwiło wstępną ocenę aktywności przeciwbakteryjnej zsyntezowanych analogów wobec reprezentatywnych bakterii Gram-dodatnich oraz identyfikację najbardziej obiecujących związków.

W dniu poprzedzającym test, komórki bakteryjne wysiałam metodą posiewu reducyjnego na agarowe podłoże BHI i inkubowałam przez 24 h w 37 °C. Następnego dnia eżę pobierałam kilka pojedynczych kolonii bakteryjnych i zawieszałam w próbówce hodowlanej zawierającej 10 ml jałowego podłoża płynnego BHI. Następnie określałam mętność zawiesiny bakteryjnej za pomocą densytometru i standaryzowałam ją do wartości około 0,5 w skali McFarlanda. W kolejnym kroku wykonałam odpowiednie rozcieńczenia w celu uzyskania inokulum o wartości CFU (jednostka tworząca kolonię, ang. *colony forming unit*) 10^5 CFU/ml. Tak przygotowaną zawiesinę przenieśliśmy do dołków płytek 96-dołkowych w objętości 100 μ l na dołek.

Roztwory peptydomimetyków o stężeniu początkowym 1024 μ g/ml sporządziłam w trzech układach rozpuszczalników: wodzie, 2% roztworze etanolu (EtOH) w wodzie oraz 2% dimetylosulfotlenku (DMSO) w wodzie. Jako kontrolę zastosowałam kontrolę wzrostu, tj. zawiesinę bakteryjną bez dodatku związku oraz odpowiednie kontrole rozpuszczalników, przy czym końcowe stężenia rozpuszczalników odpowiadały

stężeniom zastosowanych w badanych próbkach. Następnie do dołków w pierwszym rzędzie płytki (rząd A – Rysunek 18), zawierających zawiesinę bakteryjną, dodawałam po 100 μl każdego roztworu peptydomimetyku, uzyskując końcowe stężenie peptydomimetyku wynoszące 512 $\mu\text{g/ml}$. Za pomocą pipety wielokanałowej wykonałam serię dwukrotnych rozcieńczeń, otrzymując zakres stężeń peptydomimetyków od 4 do 512 $\mu\text{g/ml}$ (Rysunek 18). Tak przygotowane płytki inkubowałam przez 24 h w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji określałam MIC na podstawie wizualnej oceny wzrostu bakterii, ocenianego jako zmętnienie zawartości dołków. Za wartość MIC przyjmowałam najniższe stężenie związku, przy którym nie obserwowałam wzrostu bakteryjnego. Doświadczenie wykonałam dla każdego układu rozpuszczalnika w trzech powtórzeniach technicznych.



Rysunek 18. Schemat przygotowania płytki 96-dołkowej do oznaczania wartości MIC metodą seryjnych mikrorozcieńczeń w zakresie stężeń badanego związku od 4 do 512 $\mu\text{g/ml}$ (opracowane w BioRender).

4.2. Oznaczanie minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC)

Oznaczenie MBC przeprowadziłam poprzez pobranie po 10 μl zawiesiny z dołka, w którym nie obserwowałam zmętnienia podczas oznaczania MIC, oraz z dołków zawierających wyższe stężenie badanego związku. Następnie pobrany materiał wysiewałam na płytki Petriego z agarowym podłożem BHI. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C oceniałam obecność kolonii bakteryjnych. Wartość MBC określałam jako najniższe stężenie peptydomimetyku, dla którego nie obserwowałam wzrostu bakterii na podłożu stałym.

Dodatkowo przeprowadziłam badania MIC oraz MBC wobec wybranych szczepów Gram-ujemnych w celu określenia selektywności oraz spektrum działania zsyntezowanych związków. Do dalszych badań wobec bakterii Gram-ujemnych wybrałam peptydomimetyki wykazujące najwyższą aktywność wobec badanych

szczepów Gram-dodatnich. Aktywność tych związków oceniałam wobec następujących szczepów: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145 oraz *A. baumannii* CRAB 24133571.

4.3. Oznaczanie MIC metodą pomiaru gęstości optycznej w czasie

W celu wyznaczenia wartości MIC wybranych peptydomimetyków wobec szczepów MRSA przeprowadziłam monitorowanie wzrostu bakterii na podstawie pomiarów gęstości optycznej (OD) w czasie. Badania wykonałam na izolatach udostępnionych dzięki uprzejmości mgr Krystyny Boguckiej z Wydziału Biologii UG, obejmujących szczepy:

- kliniczne: MRSA 44, MRSA 342, MRSA 124, MRSA 115, MRSA 343, MRSA 352;
- laboratoryjne: MRSA RA636, MRSA RA604, MRSA RA532, MRSA O2449, MRSA O2229;
- szczep referencyjny MSSA ATCC 29213.

W przeddzień eksperymentu przygotowałam bakteryjną hodowlę nocną, poprzez zawieszenie pojedynczej kolonii bakteryjnej w 20 ml podłoża BHI, a następnie inkubację przez 20 h w 37 °C z wytrząsaniem 200 rpm. Następnego dnia rozcieńczałam hodowlę nocną w świeżym podłożu BHI, tak aby uzyskać $OD_{600} = 0,1$. Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną nanosiłam w ilości 100 µl na dołek.

Roztwory badanych peptydomimetyków przygotowałam w roztworze 2% DMSO w wodzie. Po zmieszaniu 100 µl zawiesiny bakteryjnej ze 100 µl roztworu peptydomimetyku uzyskiwałam następujące końcowe stężenia badanych związków:

- A-20 w stężeniach 32, 64, 128 µg/ml;
- A-75, A-76 i A-241 w stężeniach 4, 8, 16, 32 µg/ml;
- A-238 w stężeniach 16, 32, 64 µg/ml;
- A-243 w stężeniach 8, 16, 32 µg/ml.

Do dołków zawierających zawiesinę bakteryjną dodawałam peptydomimetyki w ilości 100 µl. Kontrolę rozpuszczalnika stanowiła hodowla bakteryjna z dodatkiem rozpuszczalnika, tj. DMSO w wodzie w stężeniu końcowym 1%, bez dodatku peptydomimetyku. Wzrost bakterii monitorowałam poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 600 nm przy użyciu czytnika mikropłytek EnSpire (PerkinElmer).

Odczyty prowadziłam przez 20 h w 37 °C, z jednoczesnym wytrząsaniem płytki oraz rejestracją wyników co 30 minut. Eksperyment wykonałam w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych.

4.4. Określanie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) w obecności peptydomimetyków

Badanie przeprowadziłam na dwóch szczepach klinicznych MRSA 44 oraz MRSA 343. W celu oznaczenia liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) peptydomimetyki rozpuszczone w DMSO dodawałam do kolb stożkowych zawierających zawiesinę bakteryjną przygotowaną w podłożu BHI i doprowadzoną do $OD_{600} = 0,1$ (końcowe stężenie DMSO w zawieszynie wynosiło 1%). Związki stosowałam w końcowych stężeniach: A-20 w stężeniu 128 µg/ml, A-75 – 16 µg/ml, A-76 – 8 µg/ml, A-238 – 128 µg/ml, A-241 – 8 µg/ml oraz A-243 – 16 µg/ml. Kontrolę stanowiła zawiesina bakteryjna z dodatkiem DMSO w stężeniu końcowym 1%, bez dodatku peptydomimetyków. Tak przygotowane hodowle inkubowałam w temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem o szybkości 300 rpm przez 5 h.

W wyznaczonych punktach czasowych, począwszy od 0,5 h inkubacji, co 30 min pobierałam 100 µl zawiesiny do probówek wirówkowych 1,5 ml. Następnie wykonywałam serię sześciu dziesięciokrotnych rozcieńczeń, każdorazowo przenosząc 100 µl zawiesiny do probówki zawierającej 900 µl podłoża BHI. Z uzyskanych rozcieńczeń wysiewałam po 100 µl na powierzchnię podłoża stałego BHI metodą na murawę, po czym płytki inkubowałam przez 24 h w 37 °C. Następnego dnia zliczałam kolonie bakteryjne na płytkach umożliwiającymi wiarygodne oznaczenie liczby kolonii, i wyznaczałam wartości CFU zgodnie z Równaniem 1.

$$CFU = \frac{\text{Liczba kolonii}}{\text{Objętość naniesiona}} \times \text{Współczynnik rozcieńczenia}$$

Równanie 1. Wzór na obliczanie CFU/ml.

Badanie przeprowadziłam w trzech powtórzeniach technicznych.

4.5. Wpływ temperatury inkubacji na aktywność przeciwbakteryjną zsyntezowanych peptydomimetyków

Stabilność aktywności przeciwbakteryjnej po ogrzewaniu związku A-20 oraz jego pięciu analogów: A-75, A-76, A-238, A-241 i A-243, po ogrzewaniu oceniłam poprzez

poddanie ich roztworów działaniu podwyższonej temperatury tj. 70 °C i 90 °C, przez 30 min. Roztwory peptydomimetyków przygotowałam poprzez rozpuszczenie ich w 2% DMSO w wodzie. Następnie, w celu sprawdzenia, czy ogrzewane roztwory zachowały aktywność przeciwbakteryjną, wykonałam test seryjnych mikrorozcieńczeń w płynnej pożywce BHI na płytkach 96-dołkowych, wyznaczając wartości MIC, a następnie wartości MBC. Eksperyment wykonałam w trzech powtórzeniach. Opis dalszego postępowania w doświadczeniu by zgodny z procedurami opisanymi w podrozdziałach 4.1 i 4.2.

5. Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków w ludzkim osoczu oraz wodzie

Badane związki: A-75, A-76, A-238, A-241 i A-243 rozpuściłam w 5% roztworze DMSO w wodzie. W celu oceny ich stabilności prowadziłam inkubację próbek w punktach czasowych 0, 1, 2, 6 i 24 h w ludzkim osoczu (lub wodzie) w 37 °C z wytrząsaniem (300 rpm). Końcowe stężenie związków podczas inkubacji wynosiło 350 µg/ml.

Po upływie określonego czasu inkubacji reakcję zatrzymywałam przez dodanie ACN w stosunku objętościowym 1:1 (v/v). Następnie próbki inkubowałam w 4 °C przez 20 min, po czym wszystkie próbki poddawałam wirowaniu w 4 °C przez 10 min przy 14000 rpm. Otrzymany supernatant poddawałam analizie HPLC. Eksperymenty przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach.

Stabilność związków analizowałam za pomocą systemu HPLC (Shimadzu) wyposażony w detektor PDA (Shimadzu) oraz kolumnę analityczną Phenomenex Luna C18, 5 µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm. Rozdział prowadziłam w 60-minutowym gradiencie od 5% do 100% fazy B (eluent A: H₂O z 0,1% TFA, eluent B: 80% ACN z 0,08% TFA), z detekcją UV przy długości fali 223 nm. Stabilność związków określałam na podstawie zmian pola powierzchni pików chromatograficznych odpowiadających badanym związkom w kolejnych punktach czasowych, odnosząc je do pola powierzchni piku próbki w czasie 0 h przygotowanej w wodzie.

6. Badania komórkowe

Wszystkie eksperymenty komórkowe prowadziłam w warunkach aseptycznych, z użyciem jałowego szkła laboratoryjnego, sterylnych materiałów jednorazowych oraz

jałowych roztworów i podłoży hodowlanych. Badania komórkowe wykonałam w celu oceny bezpieczeństwa biologicznego wybranych peptydomimetyków wobec komórek eukariotycznych. Jako model komórkowy zastosowałam linię HaCaT, czyli unieśmiertelnione ludzkie keratynocyty, ponieważ komórki te stanowią użyteczny model nabłonka skóry w badaniach cytotoksyczności związków potencjalnie przeznaczonych do zastosowań miejscowych. Przeżywalność komórek oceniałam metodą wychwytu czerwieni obojętnej, która pozwala określić aktywność żywych komórek na podstawie zdolności do akumulacji barwnika w lizosomach.

6.1. Badanie cytotoksyczności wybranych peptydomimetyków wobec linii komórkowej HaCaT

6.1.1. Hodowla komórek

Linię unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytów HaCaT (DKFZ, Heidelberg, Niemcy) hodowałam w warunkach standardowych w inkubatorze z kontrolowaną atmosferą (37 °C, 5% CO₂, atmosfera wysycona parą wodną). Komórki utrzymywałam w podłożu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) o wysokiej zawartości glukozy, suplementowanym 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 100 jednostek/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny.

Hodowlę komórek prowadziłam w kolbach hodowlanych o powierzchni 25 cm² i pasażowałam po osiągnięciu ~80% konfluencji, stosując 0,25% roztwór trypsyny-EDTA. Komórki przemywałam buforem Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), wolnym od czerwieni fenolowej oraz jonów wapnia i magnezu. Stan komórek monitorowałam za pomocą mikroskopu świetlnego.

Po odwirowaniu zawiesiny komórkowej komórki ponownie zawiesiłam w świeżym podłożu hodowlanym i wysiewałam w odpowiedniej gęstości do dalszych eksperymentów.

6.1.2. Badanie wpływu wybranych związków na przeżywalność komórek linii HaCaT

Ocenę przeżywalności ludzkich keratynocytów w obecności wybranych peptydomimetyków wykonałam za pomocą testu wychwytu czerwieni obojętnej (NRU, ang. *Neutral Red Uptake*). Komórki HaCaT wysiewałam w ilości 10 000 komórek na

dołek hodowlanej płytki 96-dołkowej przeznaczonej do hodowli komórkowej. Po jednym dniu inkubacji w warunkach opisanych w podrozdziale 6.1.1 całą objętość pożywki wymieniałam na świeże podłoże hodowlane zawierające peptydomimetyki A-20, A-75, A-76, A-241, A-243 w stężeniach 4, 8, 16, 32, 64, 128 $\mu\text{g/ml}$ oraz 1% DMSO, dla zachowania rozpuszczalności badanych związków. Jako kontrolę pozytywną zastosowałam komórki traktowane 1% roztworem Triton X-100. Kontrolę negatywną stanowiły komórki nietraktowane w standardowym podłożu hodowlanym, natomiast kontrolę rozpuszczalnika stanowiły komórki nietraktowane inkubowane w podłożu zawierającym 1% DMSO. Tak przygotowane płytki inkubowałam przez 24 h.

Po zakończeniu inkubacji usunęłam pożywkę ze wszystkich dołków, przemyłam buforem DPBS i naniosłam po 100 μl roztworu czerwieni obojętnej (o końcowym stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$) w podłożu hodowlanym, po czym inkubowałam w inkubatorze przez 3 h. Następnie usunęłam roztwór barwnika i komórki przemyłam buforem DPBS w celu usunięcia niezwiązanego barwnika.

W kolejnym etapie dodałam 100 μl na dołek roztworu odbarwiającego składającego się z 50% EtOH, 49% wody, 1% lodowatego kwasu octowego, który umożliwił uwolnienie czerwieni obojętnej zaabsorbowanej przez żywe komórki. Zawartość dołków delikatnie mieszałam, po czym zmierzyłam absorbancję przy długości fali 540 nm wykorzystując czytnik mikropłytek Varioskan (Thermo Scientific). Przeżywalność komórek obliczałam względem odpowiednich kontroli. Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

6.2. Określanie aktywności hemolitycznej

Krew ludzka została pozyskana od zdrowych, anonimowych dawców. Badania przeprowadziłam w ramach współpracy z dr hab. Anną Wardowską z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, na podstawie zgody Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, Uchwała nr KB/343/2024 na prowadzenie badań z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego.

Ocena aktywności hemolitycznej pozwala określić, czy badane peptydomimetyki uszkadzają błonę erytrocytów, prowadząc do uwolnienia hemoglobiny do supernatantu. Badanie to jest jednym z podstawowych elementów oceny bezpieczeństwa biologicznego związków, zwłaszcza w kontekście ich potencjalnego kontaktu z komórkami krwi.

6.2.1. Izolacja ludzkich erytrocytów z krwi

Do 4 ml świeżo pobranej krwi obwodowej umieszczonej w probówce wirówkowej o pojemności 15 ml dodałam 8 ml buforu PBS. Erytrocyty wyizolowałam poprzez ich trzykrotne zwirowanie ($1500 \times g$, temperatura pokojowa, 10 min) i przemywanie w PBS. Po odwirowaniu usuwałam supernatant oraz warstwę leukocytno-płytkową wykorzystując strzykawkę wyposażoną w długą igłę, a osad erytrocytny ponownie zawieszałam w PBS. Po ostatnim przemyciu otrzymany osad erytrocytów przenosiłam do nowej, sterylnej probówki wirówkowej o pojemności 15 ml.

6.2.2. Badanie potencjału hemolitycznego wybranych peptydomimetyków

Wyizolowane erytrocyty w objętości 40 μl dodałam do 960 μl roztworu peptydomimetyku w stężeniach: 4, 8, 16, 32, 64, 128 $\mu g/ml$ w probówkach wirówkowych o objętości 1,5 ml. Roztwory peptydomimetyków A-20, A-75, A-238, A-241, A-243 przygotowałam w 1% roztworze EtOH w PBS. Jako kontrolę pozytywną zastosowałam erytrocyty traktowane 1% roztworem Triton X-100, a kontrolę negatywną erytrocyty w roztworze PBS oraz erytrocyty w roztworze 1% EtOH w PBS. Próbkę inkubowałam przez 2 h w temperaturze 37 °C.

Po inkubacji próbki wirowałam przez 5 minut w temperaturze pokojowej ($10000 \times g$). Następnie 100 μl supernatantu przeniosłam na płytkę 96-dołkową i zmierzyłam absorbancję za pomocą czytnika mikropłytek CLARIOstar Plus (BMG Labtech) przy długości fali 540 nm. Absorbancja przy 540 nm odpowiadała ilości hemoglobiny uwolnionej z erytrocytów do supernatantu. Eksperyment wykonałam w trzech powtórzeniach. Procent hemolizy obliczyłam zgodnie ze wzorem:

$$\%H = [(A - A_0)/(A_1 - A_0)] \times 100,$$

gdzie A oznacza wartość OD₅₄₀ próbki peptydomimetyku w danym stężeniu, A₀ wartość OD₅₄₀ próbki zawierającej erytrocyty w 1% roztworze EtOH w PBS oraz A₁ pznacza wartość OD₅₄₀ próbki zawierającej erytrocyty traktowane 1% roztworem Triton X-100.

7. Ocena zdolności redukcji biofilmu MRSA

W celu utworzenia biofilmu zawiesinę bakteryjną szczepu MRSA 44 naniosłam do dołków 12-dołkowej płytki w ilości 1 ml na dołek. Biofilm tworzyłam poprzez statyczną inkubację przez 24 h w temperaturze 37 °C. Następnego dnia z dołków usunęłam podłoże

hodowlane, a biofilmy utworzone na dnie dołków dwukrotnie przemyłam buforem PBS, zachowując ostrożność, aby nie naruszyć ich struktury.

W dalszej części procedury przygotowałam roztwory peptydomimetyków w podłożu BHI z dodatkiem 1% DMSO, otrzymując końcowe stężenia w dołku 128 µg/ml dla związku A-20 oraz 16 µg/ml dla A-76 i A-241. Jako kontrolę zastosowałam biofilm traktowany podłożem BHI z dodatkiem 1% DMSO bez badanego związku.

W kolejnym kroku każdy z dołków z biofilmem wypełniłam 1 ml roztworu peptydomimetyku lub roztworu kontrolnego i tak przygotowane płytki ponownie inkubowałam statycznie przez 24 h w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji usunęłam roztwory z dołków, a następnie biofilmy dwukrotnie przemyłam buforem PBS.

7.1. Pomiar liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) w biofilmie MRSA

Po inkubacji biofilmów z roztworami peptydomimetyków lub roztworem kontrolnym oraz po przemyciu biofilmów buforem PBS do każdego dołka dodałam po 1 ml płynnego podłoża BHI. Po mechanicznym oderwaniu biofilmu od dna dołków przeniosłam zawartość każdego dołka, obejmującą podłoże i biofilm, do probówek wirówkowych o pojemności 1,5 ml. Następnie wykonałam serię sześciu rozcieńczeń przenosząc każdorazowo 100 µl zawiesiny do kolejnej probówki zawierającej 900 µl podłoża BHI. W kolejnym kroku z otrzymanych probówek pobrałam po 100 µl zawiesiny i wykonałam posiew na murawę na płytkach z podłożem stałym BHI, które następnie inkubowałam przez 24 h w 37 °C. Następnego dnia zliczałam kolonie bakteryjne na płytkach umożliwiającym wiarygodne oznaczenie liczby kolonii, a następnie wyznaczyłam CFU zgodnie z Równaniem 1.

7.2. Ocena biomasy biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym

W celu porównania wyników uzyskanych różnymi metodami oceny biofilmu, równoległe z oznaczaniem liczby żywych komórek metodą CFU/ml wykonano barwienie fioletem krystalicznym. Procedurę przeprowadzono w tych samych warunkach eksperymentalnych, a badanie wykonał dr Łukasz Grabowski z Katedry Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Do przygotowanych dołków płytek z uformowanym biofilmem, dodano 0,1% roztwór fioletem krystalicznego w wodzie w celu wybarwienia całkowitej biomasy

biofilmu. Płytki inkubowano statycznie w 37 °C przez 20 min. Po tym czasie usunięto roztwór fioletu krystalicznego, a dołki przepłukano dwukrotnie buforem PBS w celu usunięcia niezwiązanego barwnika. Następnie płytki pozostawiono do wyschnięcia przez 15 min.

W kolejnym etapie do każdego dołka dodano po 1 ml EtOH w celu rozpuszczenia i odzyskania fioletu krystalicznego związanego z biomasą biofilmu. Roztwór kilkakrotnie zasysano i wypuszczano przy użyciu pipety, aby ułatwić odzyskanie związanego barwnika z powierzchni dołka. Absorbancję otrzymanych roztworów zmierzono za pomocą czytnika mikropłytek Varioskan (Thermo Scientific) przy długości fali 570 nm.

7.3. Obrazowanie biofilmu metodą skaningowej mikroskopii elektronowej

Obrazowanie SEM zostało wykonane w Laboratorium Bioobrazowania Wydziału Biologii UG. Po inkubacji z peptydomimetykami lub roztworem kontrolnym oraz dwukrotnym przemyciu buforem PBS, próbki utrwalono 2,5% roztworem aldehydu glutarowego w buforze. Następnie biofilmy odwadniano w szeregu wodnych roztworów etanolu o rosnącym stężeniu i utrwalano wtórnie z użyciem tlenku osmu (VIII).

Po zakończeniu przygotowywania próbek za pomocą skalpela wycinałam dołki płytek z utrwalonymi biofilmami. Ostatnim krokiem w przygotowywaniu biofilmów do obrazowania było napylenie ich cienką warstwą złota. Obrazowanie zostało wykonane z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego Philips XL-30.

8. Badanie mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków

W celu wstępnego określenia mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków oceniłam ich wpływ na podstawowe procesy biosyntetyczne zachodzące w komórkach bakteryjnych oraz na integralność błony cytoplazmatycznej. Analizy te pozwoliły określić, czy badane związki oddziałują wyłącznie na osłony komórkowe bakterii, czy mogą również zaburzać procesy wewnątrzkomórkowe. Do dalszych badań wybrałam związki (A-76, A-241 oraz strukturę wiodącą A-20) wykazujące wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów MRSA oraz korzystny profil w badaniach mikrobiologicznych.

8.1. Określanie wpływu wybranych peptydomimetyków na syntezę kwasów nukleinowych i białek w komórkach bakteryjnych

Wpływ wybranych peptydomimetyków na biosyntezę DNA, RNA oraz białek oceniałam za pomocą radioaktywnie znakowanych prekursorów, wykorzystując odpowiednio [^3H]tymidynę, [^3H]urydynę oraz [^3H]leucynę. Hodowle bakteryjne prowadziłam zgodnie z opisem przedstawionym w podrozdziale 4.3, z tą modyfikacją, że inkubację zawiesiny bakteryjnej kontynuowałam do osiągnięcia wartości gęstości optycznej $\text{OD}_{600} = 0,2$.

Analizę wcielenia znakowanych prekursorów do frakcji nierozpuszczalnej w TCA przez bakterie szczepu MRSA 44 przeprowadziłam w 24-dołkowych płytkach hodowlanych. Do każdego dołka przenosiłam 500 μl zawiesiny bakteryjnej, po czym dodawałam odpowiedni prekursor znakowany trytem do końcowej aktywności 5 μCi na dołek. Następnie dodawałam peptydomimetyki rozpuszczone w DMSO do końcowego stężenia odpowiadającego $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$ (A-20 – 32 $\mu\text{g/ml}$, A-76 oraz A-241 – 4 $\mu\text{g/ml}$). Moment dodania peptydomimetyków definiowałam jako punkt czasowy 0 min. Próbę kontrolną stanowiła zawiesina bakteryjna z dodatkiem odpowiedniego stężenia DMSO w stężeniu odpowiadającym jego końcowemu stężeniu w próbach badanych, bez dodatku peptydomimetyku.

Inkubację z peptydomimetykami prowadziłam w temperaturze 37 °C z jednoczesnym wytrząsaniem (300 rpm). W punktach czasowych 0, 15, 30 oraz 60 min pobierałam próbki o objętości 50 μl , nanosiłam je na bibułę filtracyjną Whatman 3MM i wytrącałam frakcję nierozpuszczalną inkubując próbki w 10% TCA przez 10 min. Następnie bibułę przemywałam 5% TCA, a na końcu 96% EtOH. Po wysuszeniu bibuły filtracyjnej z naniesionymi próbkami mierzyłam radioaktywność za pomocą licznika scyntylacyjnego MicroBeta (PerkinElmer).

Wyniki wyraziłam jako liczbę zliczeń na minutę (CPM, ang. *Counts Per Minute*). Dane przedstawiłam jako względną inkorporację (wcielenie) [^3H]tymidyny, [^3H]urydyny lub [^3H]leucyny do frakcji nierozpuszczalnej w TCA, odzwierciedlającą odpowiednio syntezę DNA, RNA lub białek. Doświadczenie przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach.

8.2. Ocena wpływu wybranych peptydomimetyków na integralność błony cytoplazmatycznej komórek bakteryjnych

Wpływ wybranych peptydomimetyków na integralność błony cytoplazmatycznej komórek bakteryjnych indukowaną przez wybrane peptydomimetyki oceniałam z wykorzystaniem barwienia komórek jodkiem propidyny (PI) oraz obrazowania TEM.

Doświadczenia przeprowadziłam na szczepie MRSA 44. Jodek propidyny jest barwnikiem fluorescencyjnym, który nie przenika przez nieuszkodzoną błonę cytoplazmatyczną, natomiast wnika do komórek z uszkodzoną lub zwiększoną przepuszczalnością błony. Po związaniu z kwasami nukleinowymi, PI wykazuje wzrost intensywności fluorescencji. Z tego względu wzrost sygnału fluorescencyjnego PI traktowałam jako wskaźnik zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej indukowanej działaniem badanych peptydomimetyków.

8.2.1. Ocena integralności błony komórkowej w teście wychwyty jodku propidyny

Do dołków czarnej 96-dołkowej płytki naniosłam badane peptydomimetyki: A-20, A-76, A-241, tak aby uzyskać odpowiednie stężenia końcowe. Dla A-20 zastosowałam stężenia 16, 32, 64, 128, 256, 512 $\mu\text{g/ml}$, natomiast w przypadku A-76 oraz A-241 było to 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g/ml}$. Zakresy te wynosiły odpowiednio $\frac{1}{4} \times \text{MIC}$, $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$, MIC, $2 \times \text{MIC}$ oraz $4 \times \text{MIC}$ dla każdego badanego związku.

Bakterie hodowałam w podłożu BHI do momentu osiągnięcia wartości $\text{OD}_{600} = 0,3$. Następnie zawiesinę bakteryjną zwirowałam, przemyłam buforem PBS i ponownie zawiesiłam w PBS. Do zawiesiny bakteryjnej dodałam PI, a następnie inkubowałam próbki przez 30 min w ciemności. Po inkubacji przeniosłam po 50 μl zawiesiny bakteryjnej z PI do każdego dołka zawierającego badany peptydomimetyk; końcowe stężenie końcowe PI w dołku wynosiło 20 μM .

Jako kontrolę negatywną zastosowałam zawiesinę bakteryjną z PI bez dodatku peptydomimetyku, natomiast kontrolę pozytywną stanowiła zawiesina bakteryjna traktowana 1% roztworem Triton X-100. Emisję fluorescencji mierzyłam przy długościach fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 538 nm i 617 nm, w temperaturze 37 °C przez 2 godziny, z użyciem czytnika mikropłytek CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Odczyty rejestrowałam co 2 minuty.

Stopień permeabilizacji błony cytoplazmatycznej obliczyłam na podstawie intensywności fluorescencji PI, odnosząc sygnał uzyskany dla próbek traktowanych

peptydomimetykami do kontroli negatywnej oraz pozytywnej. Wyniki wyrażałam jako procent permeabilizacji błony według wzoru:

$$\%Permeabilizacji\ błony = [(F - F_0)/(F_1 - F_0)] \times 100,$$

gdzie F oznacza wartość zmierzonej fluorescencji próbki peptydomimetyku w danym stężeniu, F_0 wartość kontroli negatywnej oraz F_1 oznacza wartość zmierzonej fluorescencji próbki zawierającej erytrocyty traktowane 1% roztworem Triton X-100.

Doświadczenie wykonałam w trzech powtórzeniach.

8.2.2. Obrazowanie komórek bakteryjnych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Hodowlę bakteryjną szczepu MRSA 44 prowadziłam do osiągnięcia wartości OD₆₀₀ równej 0,1, a następnie traktowałam peptydomimetykami: A-20 w stężeniu 64 µg/ml, A-76 i A-241 w stężeniu 8 µg/ml (stężenia odpowiadały wyznaczonym wcześniej wartościom MIC). Badane związki dodawałam w roztworze DMSO, przy czym końcowe stężenie rozpuszczalnika w hodowli wynosiło 1%. Inkubację prowadziłam w temperaturze 37 °C z jednoczesnym wytrząsaniem 160 rpm przez 30 min, po czym zawiesiny bakteryjne zwirowałam, a otrzymany osad przemyłam dwukrotnie PBS. Jako kontrolę zastosowałam komórki bakteryjne inkubowane w obecności 1% DMSO, bez dodatku peptydomimetyków.

Otrzymany osad bakteryjny przekazałam do Laboratorium Bioobrazowania Wydziału Biologii UG. Dalsze przygotowanie próbek do analizy TEM obejmowało utrwalenie materiału biologicznego w 2,5% aldehydzie glutarowym, a następnie wtórne utrwalenie w 1% tlenku osmu (VIII) w PBS. Po odwodnieniu w szeregu wodnych roztworów EtOH o rosnącym stężeniu, próbki zatapiano w żywicy Epon (Merck). Ultracienkie skrawki przygotowywano przy użyciu ultramikrotomu Leica UC7 (Leica Microsystems), a następnie kontrastowano preparatem UranylLess (Delta Microscopies) oraz cytrynianem ołowiu Reynoldsa (Delta Microscopies), a następnie analizowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company) przy napięciu przyspieszającym 120 kV.

9. Analizy proteomiczne

Badania mające na celu wstępną identyfikację potencjalnych celów molekularnych związku A-20 i jego pochodnych, z wykorzystaniem metod proteomicznych sprzężonych ze spektrometrią mas, wykonałam podczas stażu doktorskiego w grupie prof. Romana Zubareva w Instytucie Biochemii Medycznej i Biofizyki Karolinska Institutet w Sztokholmie (Szwecja).

Peptydomimetyk A-220, nieaktywny wobec *S. aureus*, wykorzystany w badaniach jako związek odniesienia o braku aktywności przeciwbakteryjnej otrzymałam od dr Marii Dzierżyńskiej.

Zobrazowanie uzyskanych wyników w postaci wykresów PCA oraz analizę rozkładu danych wykonała dr hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna z Katedry Chemii Fizycznej, Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej.

W badaniach wykorzystałam związki:

A-20;

A-76 oraz A-241 (o aktywności lepszej od A-20 wobec MRSA);

A-235 (o aktywności słabszej od A-20);

A-220 (brak aktywności wobec MRSA).

Dobór związków o zróżnicowanej aktywności miało na celu ustalenie potencjalnej korelacji pomiędzy uzyskanymi wynikami a aktywnością biologiczną.

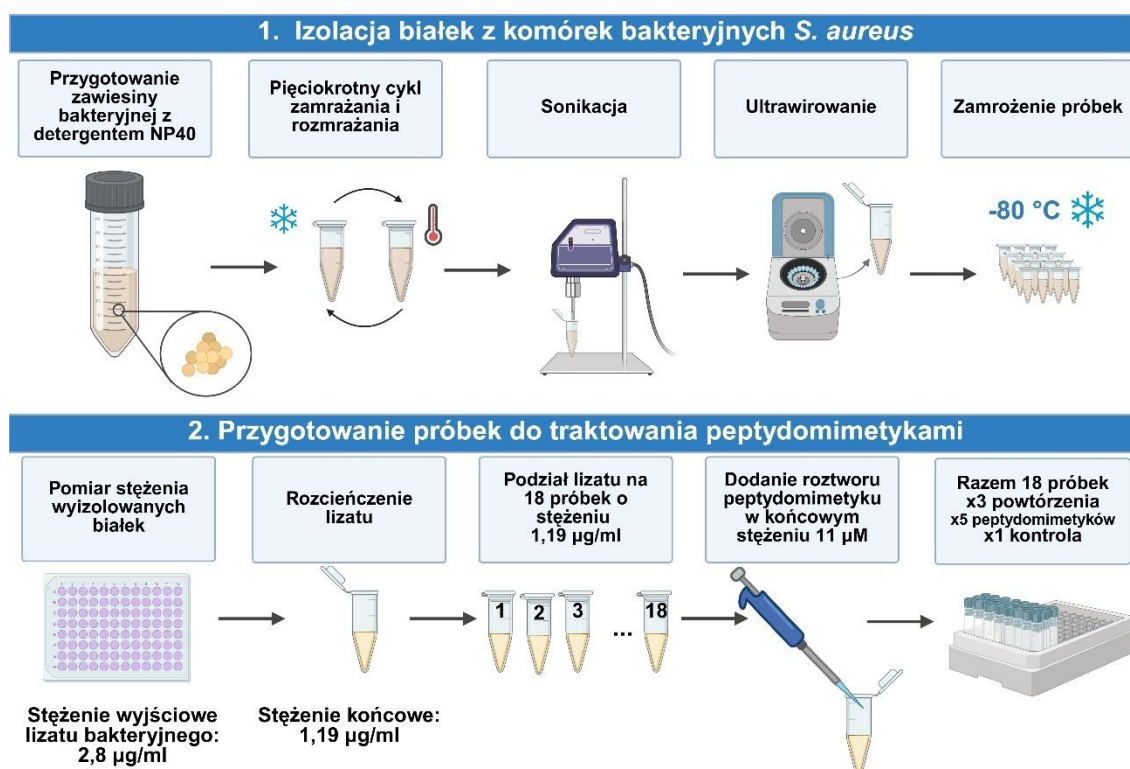
9.1. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu (PISA) po inkubacji lizatu bakteryjnego MRSA 44 ze związkiem A-20 i jego pochodnymi

9.1.1. Przygotowanie materiału bakteryjnego do badań

Nocną hodowlę szczepu MRSA 44 rozcieńczyłam w stosunku 1:100 (v/v) i prowadziłam hodowlę do osiągnięcia $OD_{600} = 0,6$, odpowiadającego fazie stacjonarnej hodowli bakterii. Pobrałam 18 próbek po 15 ml tak przygotowanej hodowli, które zwirowałam (4 °C, $2773 \times g$, 15 min). Następnie supernatant usunęłam, osad bakteryjny przemyłam buforem PBS. Próbkę ponownie odwirowałam i usunęłam supernatant, otrzymany osad bakteryjny zawiesiłam w 400 µl buforu PBS zawierającego inhibitory proteaz w rozcieńczeniu 1:100 (v/v). Tak przygotowane próbki zamroziłam w -80 °C do czasu ich lizy.

9.1.2. Przygotowanie lizatu bakteryjnego oraz warunki analiz LC-MS/MS

W celu otrzymania frakcji białkowej lizatu bakteryjnego szczepu MRSA 44 przeprowadziłam pięciokrotny cykl zamrażania i rozmrażania w obecności 0,4% detergentu NP40, a następnie wykonałam sonikację w cyklu 3 s impulsu i 3 s przerwy, przez łączny czas 1 min. Próbkę zwirowałam w ultrawirówce (4 °C, 33000 rpm, 30 min) po czym zebrałam supernatant zawierający rozpuszczoną frakcję białkową i zamroziłam go w -80 °C. W następnym kroku połączyłam supernatanty i zmierzyłam stężenie wyizolowanych białek z użyciem Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Stężenie białka w lizacie wyniosło 2,8 µg/µl. Następnie pobrałam odpowiednią ilość z roztworu wyjściowego lizatu bakteryjnego i rozcieńczyłam buforem PBS, tak aby stężenie końcowe wyniosło 1,19 µg/µl. Tak przygotowany lizat podzieliłam na 18 próbek, po 990 µl zawierających białko o stężeniu 1,19 µg/µl. Do każdej z próbek dodałam 10 µl roztworu odpowiedniego peptydomimetyku w DMSO, tak aby końcowe stężenie związku wynosiło 11 µM. Badanie wykonałam w trzech powtórzeniach technicznych. Jako kontrolę zastosowałam próbki lizatu nietraktowane peptydomimetykami, do których dodałam równoważną objętość DMSO. Schemat przygotowywania lizatu bakteryjnego przedstawiłam na Rysunek 19.



Rysunek 19. Schemat przygotowania frakcji białkowej lizatu komórek szczepu MRSA 44 oraz próbek do inkubacji z peptydomimetykami w analizie PISA. Przedstawiono kolejne etapy lizy komórek bakteryjnych, izolacji frakcji białkowej, oznaczenia stężenia białka, rozcieńczenia lizatu oraz przygotowania próbek zawierających badane peptydomimetyki w końcowym stężeniu 11 µM (opracowano z wykorzystaniem BioRender).

W kolejnym kroku przeprowadziłam inkubację frakcji białkowej lizatu bakteryjnego z A-20 i jego analogami: A-76, A-241, A-235 i A-220 przez 15 min w temperaturze 25 °C. W tym celu próbkę podzieliłam na 16 porcji, po 60 µl, i umieściłam w probówkach PCR. Następnie próbki poddałam działaniu gradientu temperaturowego w termocyklerze PCR w zakresie 44,1 °C –71,7 °C. W kolejnym etapie próbki zamroziłam w ciekłym azocie, po czym połączyłam porcje należące do tej samej próbki, uzyskując 18 próbek końcowych. Następnie oznaczyłam stężenie białka w każdej z próbek i pobrałam ilości odpowiadające 50 µg białek.

Następnie przeprowadziłam etapy niezbędne do przeprowadzenia analizy proteomicznej zgodnie z procedurą opisaną przez X. Zhang et al. [174] (z niewielkimi modyfikacjami):

1. Przeprowadziłam redukcję z użyciem DTT (ditiioeterotiolu, końcowe stężenie 8 mM) przez 45 min, w 55 °C, z wytrząsaniem 300 rpm.
2. Probki zalkalizowałam wykorzystując w tym celu IAA (jodoacetamid, końcowe

- stężenie 25 mM) przez 30 min, w ciemności, w temperaturze pokojowej.
3. Strąciłam białka przy użyciu zimnego acetonu w stosunku objętościowym 1:6 (próbka:aceton). Próbkę pozostawiłam na noc w temperaturze -20 °C.
 4. Następnego dnia próbkę zwirowałam (1400 × g, 10 min) i usunęłam supernatant. Pozostały osad zawiesiłam w 15 µl 8 M moczniku w 20 mM buforze EPPS o pH 8,2. Rozpuściłam 20 µg enzymu LysC w 480 µl 20 mM buforze EPPS o pH 8,2 i dodałam do każdej z prób po 16 µl w celu przeprowadzenia procesu trawienia białek. Trawienie prowadziłam przez 7 h, w temperaturze 30 °C, z wytrząsaniem 300 rpm.
 5. Wykonałam trypsynizację próbek. W tym celu rozpuściłam 20 µg trypsyny modyfikowanej o czystości odpowiedniej do sekwencjonowania białek w 40 µl buforu dedykowanego dla trypsyny. Następnie dodałam 1800 µl 20 mM buforu EPPS o pH 8,2. Do każdej z próbek dodałam po 92 µl uprzednio przygotowanego roztworu trypsyny. Trypsynizację prowadziłam przez noc w 37 °C z wytrząsaniem 300 rpm.
 6. Następnego dnia wykonałam znakowanie znacznikami TMT: TMTpro 16-plex oraz TMT TM -134C & TMT TM -135N (Thermo Fisher Scientific). Do 133 µg każdego znacznika dodałam 25 µl ACN. Każdą z próbek przypisałam do konkretnego znacznika a następnie przeniosłam 60 µl każdej próbki do przygotowanych znaczników. Reakcję znakowania prowadziłam przez 2 h w temperaturze pokojowej, w ciemności, z wytrząsaniem 300 rpm.
 7. Zatrzymałam reakcję znakowania poprzez dodanie 0,85 µl hydroksyloaminy (końcowe stężenie hydroksyloaminy ~0,5%). Próbkę inkubowałam przez 15 min.
 8. Próbkę połączyłam w jedną mieszaninę i zateżyłam w koncentratorze próżniowym do momentu, aż ACN całkowicie odparował.
 9. Następnie wykonałam odsalanie z wykorzystaniem kolumny tC18 SepPak (Waters) i kolektora próżniowego. Próbkę zakwasiłam TFA do pH < 3. Sekwencja odsalania próbki i zbierania kolejnych frakcji była następująca:
 - przemyłam kolumnę 450 µl 100% MeOH;
 - przemyłam kolumnę 450 µl 50% roztworem ACN z dodatkiem 0,1% TFA;
 - zrównowagowałam kolumnę 900 µl 0,1% wodnym roztworem TFA;
 - naniosłam próbkę na kolumnę;

- przemyłam kolumnę 450 μ l roztworem 2% ACN z dodatkiem 0,1% TFA;
- przemyłam kolumnę 200 μ l roztworem 2% ACN z dodatkiem 0,1% FA;
- eluowałam peptydy 450 μ l wodnym roztworem 50% ACN z dodatkiem 0,1% FA, a następnie 300 μ l wodnego roztworu 80% ACN z dodatkiem 0,1% FA i kolekcjonowałam uzyskane frakcje.

10. Próbkę odparowałam do sucha z wykorzystaniem koncentratora próżniowego.

11. Pozostały osad rozpuściłam w 150 μ l buforu zawierającego 20 mM NH_4OH w H_2O .

12. Przeprowadziłam frakcjonowanie z użyciem systemu HPLC z kolektorem frakcji i detektorem UV (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific).

Warunki frakcjonowania były następujące:

- kolumna C18, 5 μ m, 300 Å, 2,1 mm x 250 mm (Waters);
- przepływ 200 μ l/min;
- bufor A (20 mM NH_4OH w H_2O) oraz bufor B (20 mM NH_4OH w ACN);
- elucja gradientowa: od 1% do 6% buforu B w czasie od 2 do 6 min, następnie do 26% B w ciągu 36 min, do 53% B w ciągu kolejnych 4 min, do 63% B w ciągu 3 min, a następnie 63% B przez 5 min;
- elucję monitorowałam przy długości fali 214 nm.

Zebrałam 96 frakcji po 100 μ l każda na 96-dołkowej płytce, które następnie zredukowałam do 48 poprzez połączenie ze sobą kolejno roztworów z dołków o numerach 1 z 49, 2 z 50 ... 48 z 96. Połączone frakcje przeniosłam do probówek o pojemności 0,5 ml i odparowałam do sucha.

13. Odparowane frakcje rozpuściłam w 16 μ l buforu A (2% ACN, 0,1% FA, H_2O). Przeprowadziłam analizę LC-MS/MS z wykorzystaniem spektrometru masowego wyposażonego w źródło jonizacji EASY ElectroSpray (Orbitrap Q Exactive HF, Thermo Fisher Scientific) oraz system nanoUPLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific).

Warunki rozdziału peptydów były następujące:

- kolumna PepMap C18, 2 μ m, 100 Å, 75 μ m x 50 cm;
- przepływ 300 nl/min;

- bufor A (2% ACN, 0,1% FA, H₂O), bufor B (98% ACN, 0,1% FA, H₂O);
- elucja gradientowa: od 4% do 26% buforu B w czasie od 5 do 91 min, następnie od 26% do 95% buforu B w ciągu 9 min, po czym 5 min w 95% buforu B.

14. Widma MS rejestrowałam w zakresie stosunku masy do ładunku m/z 375–1500, z rozdzielczością 120 000 przy m/z 200. Docelowa wartość automatycznej kontroli wzmocnienia (AGC, ang. *automatic gain control*) ustawiłam na 3×10^6 , a maksymalny czas iniekcji wynosił 100 ms. Do fragmentacji metodą wysokoenergetycznej dysocjacji zderzeniowej (HCD, ang. *higher-energy collisional dissociation*) wybrałam 17 najbardziej intensywnych jonów peptydowych, przy ustawionej znormalizowanej energii zderzenia na poziomie 33. Próg intensywności jonów ustawiłam na 0,1%, z wykluczeniem jonów jednokrotnie naładowanych ($z = 1$).

15. Widma MS/MS rejestrowałam z rozdzielczością 60 000, przy docelowej liczbie 2×10^5 jonów i maksymalnym czasie iniekcji wynoszącym 120 ms. Stała wartość początkowa m/z wynosiła 100, a okno izolacji – 1,6 m/z . Instrument pracował w trybie dodatnich jonów, z czasem dynamicznego wykluczenia uprzednio wybranych prekursorowych wynoszącym 45 s.

16. Identyfikację i ilościową analizę peptydów/białek wykonałam przy użyciu oprogramowania Proteome Discoverer. Wyszukiwanie przeprowadziłam względem kompletnej bazy danych UniProt dla gatunku *S. aureus*.

Z dalszej analizy usunęłam wszystkie białka oznaczone jako potencjalne zanieczyszczenia. W analizie ilościowej uwzględniłam jedynie białka, dla których wykryto co najmniej dwa unikalne peptydy. Otrzymane intensywności białek znormalizowałam względem kontroli. Istotność statystyczną różnic względem kontroli oceniłam z użyciem testu t-Studenta, przyjmując za istotne statystycznie wyniki o wartości $p < 0,05$. Wyznaczyłam wartości $\log_2$ ze średniej z trzech powtórzeń intensywności dla danego badanego związku oraz $-\log_{10}(\text{wartość } p)$, na podstawie których ustaliłam ranking białek, jako potencjalnych celów molekularnych.

9.2. Funkcjonalna identyfikacja zmian proteomu po inkubacji zawiesiny bakteryjnej MRSA 44 z A-20 i jego pochodnymi

Przygotowanie materiału bakteryjnego do badań

Nocną hodowlę szczepu MRSA 44 rozcieńczyłam w stosunku 1:100 i rozchodowałam do OD₆₀₀ = 0,2. Z przygotowanej zawiesiny bakteryjnej pobrałam 18 próbek po 15 ml każda, a następnie do każdej dodałam roztwór odpowiedniego peptydomimetyku rozpuszczonego w DMSO (lub kontroli) w stężeniu $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$ każdy i inkubowałam przez 1 h w temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem 160 rpm.

Po zakończeniu inkubacji próbki zwirowałam (4 °C, 15 min), a otrzymany osad przemyłam 500 µl buforu PBS. Następnie próbki ponownie zwirowałam i usunęłam supernatant. Tak otrzymane próbki zamroziłam w temperaturze –80 °C do czasu przygotowania do analizy.

W kolejnym kroku wykonałam lizę komórek bakteryjnych zgodnie z opisem w podrozdziale 9.1.2 a następnie przeprowadziłam kolejne etapy przygotowania próbek oraz analizę LC-MS/MS zgodnie z procedurą opisaną również w podrozdziale 9.1.2.

IV. Wyniki badań i dyskusja

1. Projektowanie analogów Cystapep 1 (A-20) z wykorzystaniem metod chemometrycznych i analizy SAR

1.1. Analiza chemometryczna i założenia projektowania nowych analogów Cystapep 1 (A-20)

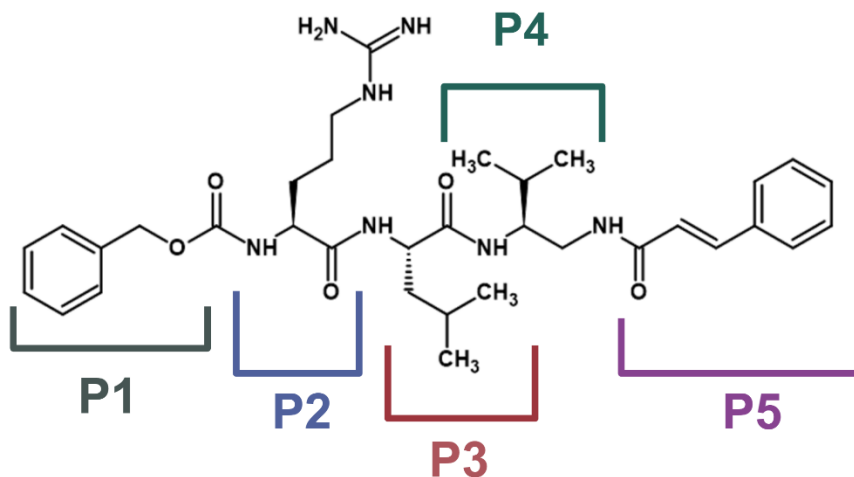
Punktem wyjścia do projektowania nowych analogów Cystapep 1 (A-20) były wcześniejsze wyniki wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze Chemii Biomedycznej nad zależnościami pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną tej grupy peptydomimetyków. Na podstawie analizy dostępnych danych [125], [127], [129], [130], [131], [132], [133], [193], [194], [195], [196], [197]) wytypowałam elementy strukturalne, mające największy wpływ na aktywność przeciwbakteryjną. Zestawienie tych zależności przedstawiłam w Tabeli 1 w rozdziale I.2.3.3.

Przed przystąpieniem do projektowania nowych analogów Cystapep 1 (A-20) przygotowałam zestaw danych obejmujący struktury A-20 oraz jego wcześniej otrzymanych analogów, dla których wyznaczono aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepu *S. aureus* na podstawie wartości MIC. Zakres prac wykonanych przeze mnie w ramach analizy chemometrycznej obejmował czynności opisane w rozdziale dotyczącym metodologii, w podrozdziale III.1.

Zebrane dane zawierały związek wyjściowy A-20 (Rysunek 20) oraz jego analogi różniące się m.in. charakterem reszty zasadowej w pozycji P2, rodzajem reszty aminokwasowej w pozycji P3, budową fragmentu peptydomimetycznego zawierającego zredukowany izoster wiązania amidowego w pozycji P4 oraz charakterem końcowego ugrupowania hydrofobowego lub aromatycznego w pozycji P5. Zestawienie to wskazywało, że aktywność przeciwbakteryjna analogów A-20 nie zależy od pojedynczej cechy strukturalnej, lecz wynika ze współdziałania kilku parametrów w tym od kationowości, hydrofobowości, rozgałęzieniem podstawników, obecnością fragmentów aromatycznych oraz ich przestrzennym rozmieszczeniem.

Dane te stanowiły punkt wyjścia do racjonalnego zaprojektowania nowej serii peptydomimetyków oraz do przeprowadzenia analiz chemometrycznych, a na koniec stworzenie modelu SAR (ang. *structure-activity relationship*).

Duża część zebranych danych miała charakter wewnętrzny i nie została dotychczas opublikowana, dlatego w rozprawie nie przedstawiam pełnego zestawu struktur wszystkich związków referencyjnych wykorzystanych na etapie modelowania.



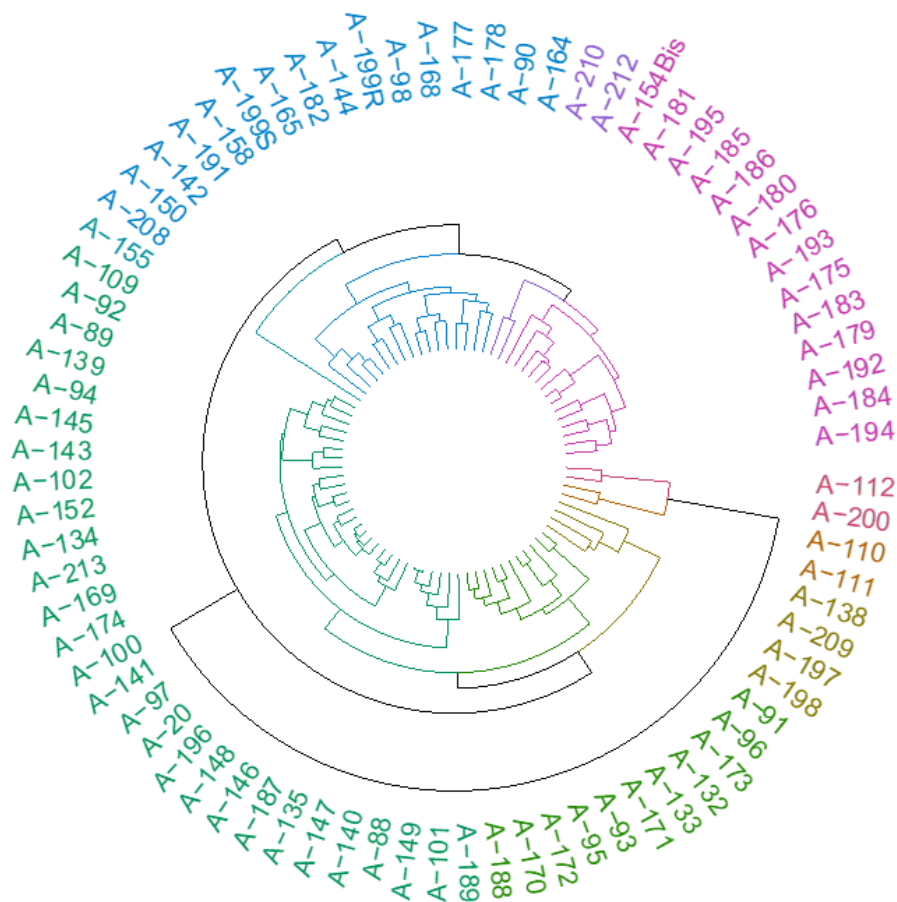
Rysunek 20. Struktura chemiczna cząsteczki Cystapep 1 (A-20) z oznaczeniem pięciu obszarów strukturalnych P1–P5 uwzględnianych w analizie zależności struktura–aktywność oraz w projektowaniu nowych analogów.

Analiza chemometryczna została przeprowadzona w celu określenia, które właściwości molekularne analogów A-20 są najściślej związane z ich aktywnością przeciwbakteryjną. W ramach tych badań uwzględniłam zarówno dane eksperymentalne, w tym wartości MIC wobec *S. aureus*, jak i deskryptory molekularne opisujące wielkość, kształt, lipofilowość, polarność, rozpuszczalność oraz właściwości elektronowe cząsteczek.

Wyznaczenie deskryptorów molekularnych oraz przeprowadzenie analiz statystycznych wykonała dr hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna z Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Politechniki Gdańskiej. W analizie uwzględniono deskryptory opisujące właściwości konstytucyjne, topologiczne, elektronowe i fizykochemiczne badanych cząsteczek, w tym parametry związane m.in. z masą cząsteczkową, wielkością, kształtem, lipofilowością, polarnością oraz rozpuszczalnością.

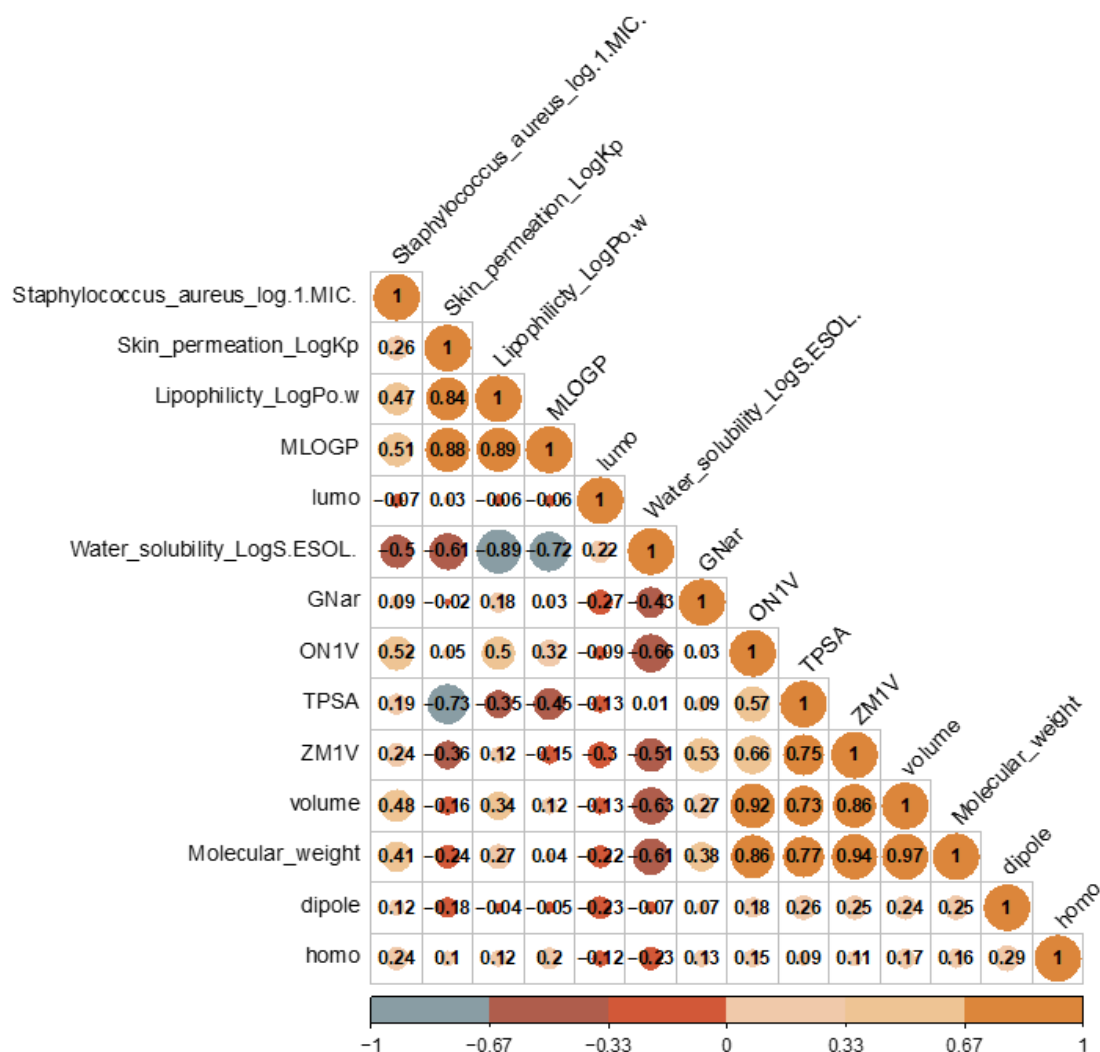
Uzyskane wyniki wykorzystałam następnie do interpretacji zależności struktura-aktywność oraz do racjonalnego wyboru kierunków dalszych modyfikacji cząsteczki A-20. Na podstawie wyznaczonych deskryptorów przeprowadziłam analizę podobieństwa (Rysunek 21) analizę korelacji pomiędzy wybranymi zmiennymi (Rysunek 22) oraz analizę głównych składowych (PCA) badanych analogów (Rysunek 23). Analiza podobieństwa umożliwiła pogrupowanie analogów A-20 według ich profilu strukturalno-

fizykochemicznego, natomiast analiza korelacji pozwoliła wskazać deskryptory powiązane z aktywnością przeciwbakteryjną.



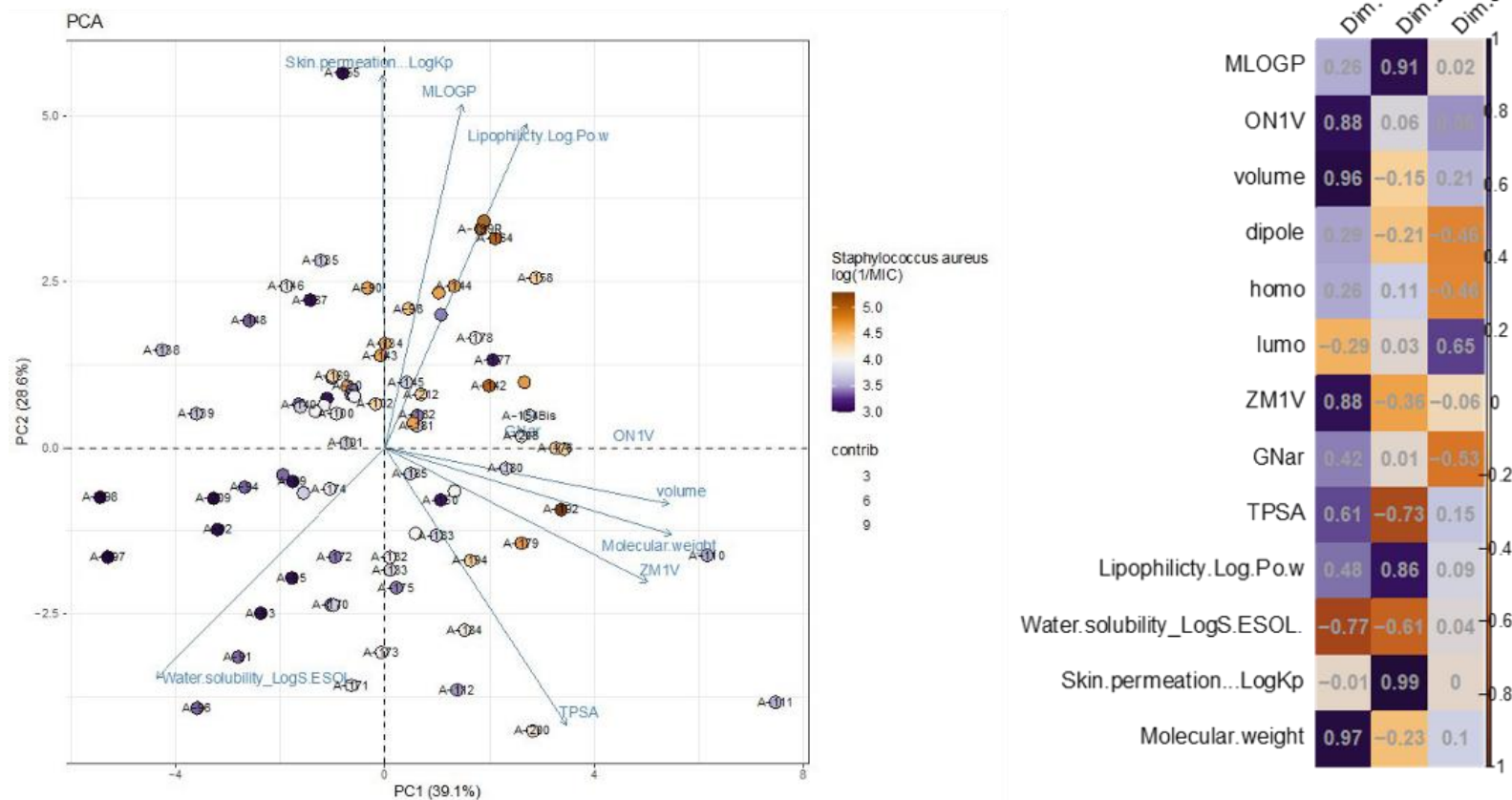
Rysunek 21. Analiza podobieństwa cząsteczki Cystapep 1 (A-20) oraz jej analogów na podstawie deskryptorów molekularnych. Kolorami zaznaczono klastry związków o podobnym profilu strukturalno-fizykochemicznym.

Przedstawiona analiza korelacji wskazuje, że wartość MIC wobec *S. aureus* była powiązana z deskryptorami opisującymi lipofilowość, rozpuszczalność w wodzie, objętość cząsteczki oraz przewidywaną zdolność przenikania przez barierę skórną. Deskryptory topologiczne, takie jak ON1V i ZM1V, wykazywały natomiast związek z parametrami opisującymi rozpuszczalność oraz właściwości transportowe. Wyniki te sugerują, że aktywność przeciwbakteryjna analogów A-20 zależy od równowagi pomiędzy rozmiarem cząsteczki, hydrofobowością, polarnością i rozpuszczalnością.



Rysunek 22. Macierz korelacji pomiędzy wybranymi deskryptorami molekularnymi wykorzystanymi w analizie chemometrycznej analogów Cystapep 1 (A-20).

Na podstawie analizy PCA można stwierdzić, że pierwsza składowa główna (PC1) była związana głównie z deskryptorami opisującymi wielkość, kształt i masę cząsteczek, takimi jak ON1V, objętość, ZM1V, LogS oraz masa cząsteczkowa. Druga składowa główna (PC2) była natomiast powiązana przede wszystkim z parametrami opisującymi lipofilowość, polarność i właściwości transportowe cząsteczek, w tym MLOGP, TPSA, LogP oraz LogKp. Wyniki te ponownie wskazują, że zróżnicowanie badanej serii analogów A-20 jest związane przede wszystkim z parametrami opisującymi rozmiar cząsteczki, hydrofobowość, polarność oraz rozpuszczalność. W zestawieniu z wartościami MIC sugeruje to, że aktywność przeciwbakteryjna tej grupy peptydomimetyków zależy od zachowania równowagi pomiędzy tymi właściwościami.



Rysunek 23. Mapa korelacji przedstawiająca zależności pomiędzy logarytmiczną wartością MIC wobec *S. aureus* a wybranymi deskryptorami molekularnymi wykorzystanymi w analizie SAR analogów Cystapep 1 (A-20). Kolor oraz wielkość symboli odzwierciedlają kierunek i siłę korelacji: wartości dodatnie oznaczają korelację dodatnią, natomiast wartości ujemne korelację ujemną.

Podsumowując, wnioski z analizy chemometrycznej dla wyjściowej grupy analogów A-20 zestawiałam z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi wpływu wybranych elementów strukturalnych na aktywność przeciwbakteryjną tej grupy peptydomimetyków. Szczególne znaczenie miały obserwacje wskazujące na korzystny wpływ obecności reszt Arg lub Har, odpowiedniego rozmieszczenia fragmentów hydrofobowych oraz zachowania końcowych ugrupowań aromatycznych. Połączenie danych eksperymentalnych z wynikami analizy chemometrycznej umożliwiło mi bardziej ukierunkowane zaprojektowanie nowej serii analogów.

1.2. Charakterystyka zaprojektowanych grup analogów Cystapep 1 (A-20) oraz model SAR

Na podstawie wyników z analiz chemometrycznych zaprojektowałam bibliotekę nowych analogów Cystapep 1 (A-20). Przeprowadzona analiza zależności umożliwiła określenie elementów strukturalnych kluczowych dla aktywności przeciwbakteryjnej peptydomimetyków wobec *S. aureus*. W strukturze cząsteczki A-20 wyróżniłam pięć pozycji modyfikacji (P1-P5) przedstawionych na Rysunek 20. Podczas projektowania przyjąłam, że istotne znaczenie dla zachowania wysokiej aktywności wobec *S. aureus* miała obecność reszty argininy w pozycji P2 oraz leucyny (ewentualnie argininy) w pozycji P3. Niezbędnym elementem strukturalnym wpływającym korzystnie na aktywność była obecność zredukowanego aminokwasu w pozycji P4, szczególnie fragmentu ValΨ[CH₂-NH]. Dodatkowo wykazałam, że obecność hydrofobowych fragmentów aromatycznych, głównie podstawników fenylowych w pozycjach P1 oraz P5, sprzyjała zwiększeniu aktywności biologicznej związków.

Na podstawie uzyskanych zależności zaprojektowałam 102 nowe analogi związku A-20, wprowadzając modyfikacje głównie w pozycjach P2, P3, P4 oraz P5. Biblioteka została zaprojektowana w oparciu o racjonalne, systematyczne modyfikacje wybranych obszarów cząsteczki A-20, przy jednoczesnym zachowaniu elementów uznanych wcześniej za korzystne dla aktywności przeciwbakteryjnej.

Nowe analogi podzielałam na kilka głównych grup, różniących się zakresem i charakterem wprowadzanych modyfikacji. W Załączniku 1 przedstawiłam wzory nowo zaprojektowanych analogów w formacie SMILES.

Grupa I – analogi z zachowanym rdzeniem A-20 i modyfikowanym końcowym fragmentem hydrofobowym w pozycji P5

Do tej grupy należą związki, w których zachowałam zasadniczy układ Z-Arg-Leu-ValΨ[CH₂-NH], natomiast zmieniałam charakter końcowego fragmentu hydrofobowego. Wprowadziłam podstawniki alifatyczno-aromatyczne, wydłużone łańcuchy hydrofobowe lub bardziej rozbudowane układy aromatyczne. Celem tych modyfikacji było określenie, czy zwiększenie hydrofobowości oraz zmiana długości i sztywności fragmentu P5 może poprawić oddziaływanie z zewnętrznymi strukturami komórkowymi bakterii, bez nadmiernego pogorszenia rozpuszczalności.

Część struktur uwzględnionych na etapie projektowania w tej grupie (w tym wszystkie związki zsyntezowane w tej grupie) pochodziła z propozycji projektowych prof. dr. hab. Franciszka Kasprzykowskiego z Katedry Chemii Biomedycznej.

Do tej grupy należą zsyntetyzowane peptydomimetyki: A-71, A-73, A-75, A-76.

Grupa II – analogi z końcowymi fragmentami naftyłowymi w pozycji P5

Drugą grupę stanowiły związki, w których fragment trans-cynamoilowy A-20 zastępowałam bardziej rozbudowanymi ugrupowaniami aromatycznymi (układami naftyłowymi). Przesłanką do ich zaprojektowania była obserwacja, że obecność fragmentów aromatycznych po obu stronach cząsteczki jest korzystna dla aktywności. Jednocześnie związki te pozwalały ocenić, czy zbyt duże zwiększenie objętości fragmentu P5 nie prowadzi do pogorszenia aktywności wskutek niekorzystnej geometrii lub ograniczenia rozpuszczalności. Zsyntezowane związki z tej grupy: A-229, A-230, A-231, A-232, A-233.

Grupa III – analogi z podstawionymi fragmentami aromatycznymi w pozycji P5

W tej grupie znajdują się związki, w których został zachowany aromatyczny charakter końcowego fragmentu P5, ale modyfikowałam właściwości pierścienia aromatycznego poprzez wprowadzenie podstawników zmieniających lipofilowość, rozkład elektronowy, co mogło powodować potencjalne oddziaływania z elementami powierzchni komórki bakteryjnej. Projektując tę grupę założyłam, że umiarkowane zmiany elektronowe i steryczne w obrębie fragmentu aromatycznego mogą wpływać na aktywność przeciwbakteryjną, a jednocześnie pozwolą uniknąć zbyt dużego wzrostu hydrofobowości. Zsyntezowane peptydomimetyki z tej grupy: A-235, A-236, A-237, A-238, A-243.

Grupa IV – analogi z modyfikacjami długości i charakteru łącznika hydrofobowego w pozycji P5

W czwartej grupie znalazły się związki, w których modyfikowałam długość, elastyczność i stopień nasycenia końcowego fragmentu hydrofobowego. Celem było sprawdzenie, czy aktywność wymaga obecności sztywnego układu aromatycznego, czy też może zostać zachowana po wprowadzeniu bardziej elastycznego łańcucha alifatycznego lub alifatyczno-aromatycznego. Ta grupa miała znaczenie dla oceny wpływu geometrii P5 na aktywność oraz dla określenia, czy końcowy fragment hydrofobowy wymaga specyficznego układu aromatycznego dla zachowania aktywności. Zsyntezowane pochodne z tej grupy: A-239, A-240, A-241.

Grupa V – analogi z bardziej rozbudowanymi fragmentami aromatycznymi w pozycjach P4/P5

Do piątej grupy należały analogi, w których wprowadzałam bardziej złożone, przestrzennie rozbudowane lub elektronowo zmodyfikowane fragmenty aromatyczne. Celem tej grupy było sprawdzenie, czy rozszerzenie układu aromatycznego lub zmiana jego charakteru może zwiększyć aktywność biologiczną poprzez zwiększenie oddziaływań hydrofobowych. Jednocześnie związki te pozwalały określić zakres dopuszczalnych modyfikacji strukturalnych cząsteczki A-20 obejmujących rozbudowane i sztywne ugrupowania aromatyczne. Zsyntezowane peptydomimetyki z tej grupy: A-234, A-242, A-244, A-245, A-246, A-247, A-248.

Grupa VI – analogi łączące kilka potencjalnie korzystnych modyfikacji w jednej strukturze

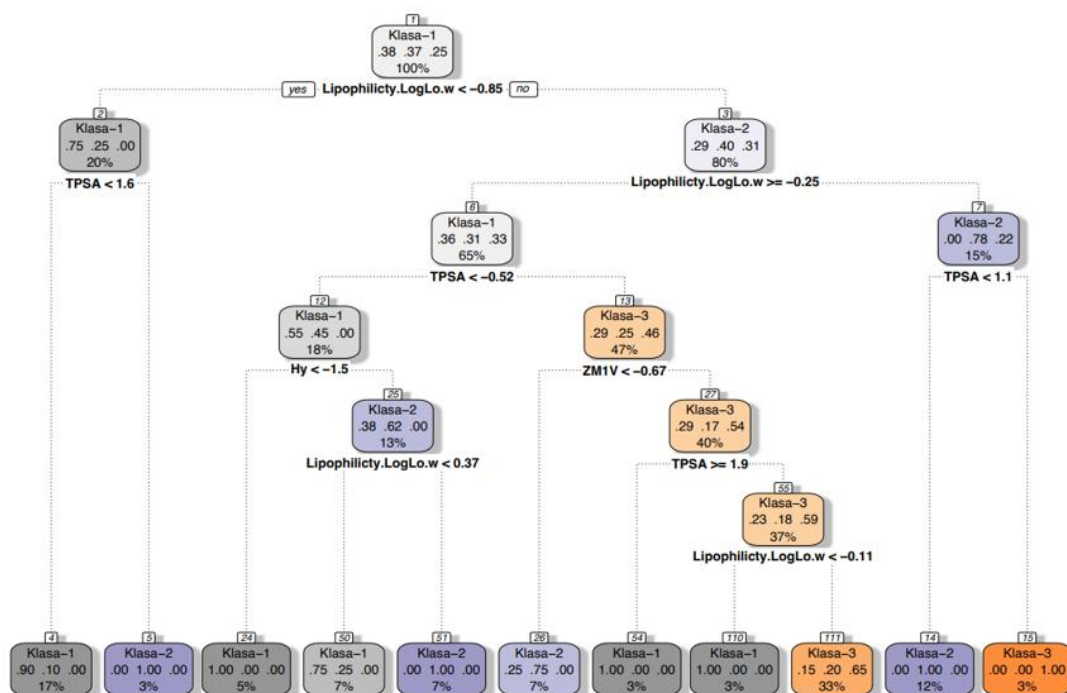
Do grupy VI należały związki zaprojektowane jako analogi modyfikowane w pozycji P3 i P5. Łączyłam w nich elementy uznane za potencjalnie korzystne, takie jak obecność zasadowego ugrupowania guanidynowego oraz odpowiednio dobrany końcowy fragment aromatyczny lub alifatyczno-aromatyczny w pozycji P5. Celem tej grupy było sprawdzenie, czy połączenie pojedynczych cech strukturalnych może prowadzić do efektu addytywnego lub synergistycznego. Jednocześnie celem projektowania tej grupy było określenie wpływu dodatkowych ugrupowań guanidynowych na aktywność biologiczną, hydrofilowość oraz rozpuszczalność badanych związków. Zsyntezowane analogi z tej grupy: A-249, A-250, A-251, A-252.

Grupa VII – analogi o zróżnicowanych modyfikacjach strukturalnych

Do ostatniej grupy należały analogi, których modyfikacje nie wpisywały się jednoznacznie w schematy projektowe, które opisałam dla grup I–VI. Związki te zaprojektowałam jako analogi eksploracyjne, mające na celu poszerzenie analizowanej

przestrzeni chemicznej wokół cząsteczki wyjściowej A-20 oraz ocenę tolerancji jej rdzenia strukturalnego na mniej typowe zmiany budowy. Chciałam sprawdzić, czy wprowadzenie bardziej nietypowych elementów strukturalnych może wskazać dodatkowe kierunki optymalizacji aktywności przeciwbakteryjnej. Analogi te pozwalały ocenić, w jakim stopniu aktywność biologiczna badanej klasy związków zależy od zachowania klasycznego układu P1–P5 opisanego dla A-20, a w jakim może być modulowana przez zmiany wykraczające poza wcześniejsze założenia projektowe. W tej grupie uwzględniłam pochodne zawierające modyfikacje inspirowane zarówno wcześniejszymi analogami Cystapep 1, jak i wybranymi motywami strukturalnymi obecnymi w innych związkach przeciwdrobnoustrojowych lub peptydomimetykach. Pomimo rozważenia szeregu dodatkowych modyfikacji strukturalnych, żaden z analogów należących do tej grupy nie został skierowany do syntezy. Analiza SAR sugerowała niskie prawdopodobieństwo uzyskania związków o korzystnej aktywności przeciwbakteryjnej.

Dla wszystkich zaprojektowanych struktur dr hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna przeprowadziła obliczenia deskryptorów molekularnych oraz analizę porównawczą względem grupy referencyjnej pochodnych A-20, dla której dostępne były dane biologiczne. Przeprowadzone zostały analiza podobieństwa, PCA oraz modelowanie klasyfikacyjne. Uzyskane wyniki wykorzystałam do wyboru najbardziej obiecujących struktur do syntezy i dalszych badań biologicznych. Na podstawie deskryptorów molekularnych nowo zaprojektowanych związków oraz przeprowadzanych analiz chemometrycznych dr hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna opracowała model klasyfikacyjny SAR z wykorzystaniem metody CART (drzewa klasyfikacyjno-regresyjnego, ang. *Classification and Regression Tree*). Model ten pozwolił na przyporządkowanie zaprojektowanych peptydomimetyków do jednej z założonych trzech klas przewidywanej aktywności przeciwbakteryjnej: związków o wysokim przewidywanym potencjale przeciwbakteryjnym, związków o potencjale pośrednim oraz analogów o niskim przewidywanym potencjale przeciwbakteryjnym lub przewidywanych jako nieaktywne (Rysunek 24).



Rysunek 24. Model klasyfikacyjny CART dla nowo zaprojektowanych analogów Cystapep 1 (A-20), przedstawiający podział zaprojektowanych peptydomimetyków na trzy klasy przewidywanej aktywności przeciwbakteryjnej na podstawie wybranych deskryptorów molekularnych.

Wyniki tego modelowania miały charakter predykcyjny i służyły jako niezwykle przydatne narzędzie wspomagające selekcję struktur do syntezy. Ostateczny wybór związków wymagał jednak uwzględnienia również kryteriów praktycznych, takich jak dostępność substratów, zgodność proponowanych modyfikacji z opracowaną ścieżką syntetyczną oraz możliwość oczyszczenia produktów do stopnia umożliwiającego ich dalszą charakterystykę i badania biologiczne. Do syntezy wytypowałam przede wszystkim analogi zaklasyfikowane jako związki o wysokim lub pośrednim potencjale przeciwbakteryjnym wobec *S. aureus*.

Powszechną strategią racjonalnego projektowania nowych związków jest wykorzystanie metod opartych na strukturze celu molekularnego tj. dokowanie molekularne. Jednak podejście to wymaga znajomości białka docelowego i sposobu jego oddziaływania z ligandem [198]. W przypadku A-20 i jego pochodnych bezpośredni cel molekularny nie został dotychczas jednoznacznie określony, dlatego projektowanie nowych analogów oparłam na analizie danych eksperymentalnych, analizie chemometrycznej oraz metodach SAR. Metody te umożliwiają identyfikację cech strukturalnych istotnych dla aktywności biologicznej oraz wspomagają przewidywanie

właściwości nowych analogów jeszcze przed ich syntezą, co pozwala ograniczyć liczbę otrzymywanych związków i zwiększyć efektywność procesu projektowania [199].

2. Synteza i charakterystyka otrzymanych peptydomimetyków

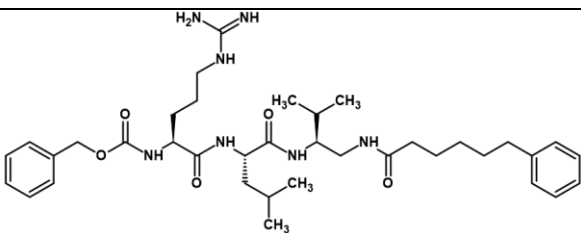
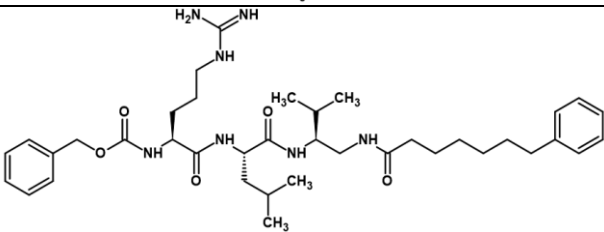
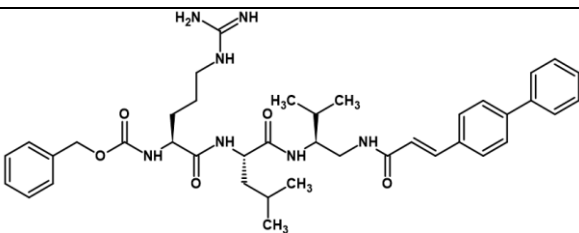
W wyniku wieloetapowych syntez prowadzonych klasyczną metodą w roztworze, z zastosowaniem strategii Boc, otrzymałam 28 peptydomimetyków, których nazwy i struktury przedstawiłam w Tabeli 2. Podczas syntez wykonywałam reakcje sprzęgania prowadzące do utworzenia wiązań amidowych, aktywowane z zastosowaniem układu DCC/HOBt. Zastosowanie HOBt pozwalało ograniczyć racemizację aktywowanych pochodnych aminokwasowych oraz zmniejszyć udział reakcji ubocznych związanych z tworzeniem nietrwałych pochodnych *O*-acyloizomocznikowych, co zwiększało efektywność tworzenia wiązania amidowego. Postęp reakcji sprzęgania monitorowałam metodą HPLC, co umożliwiało kontrolę stopnia przereagowania reagentów oraz optymalizację czasu prowadzenia reakcji. W przypadku niepełnego przekształcenia reagentów dodawałam do mieszaniny reakcyjnej dodatkową porcję czynnika sprzęgającego (DCC) i kontynuowałam reakcję sprzęgania, co pozwalało zwiększyć wydajność poszczególnych etapów syntezy.

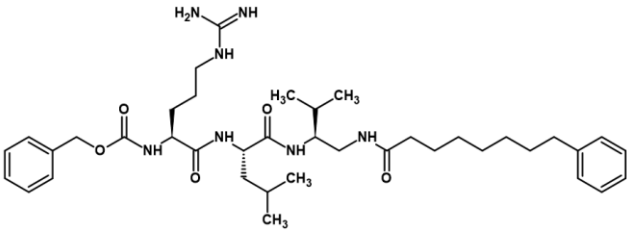
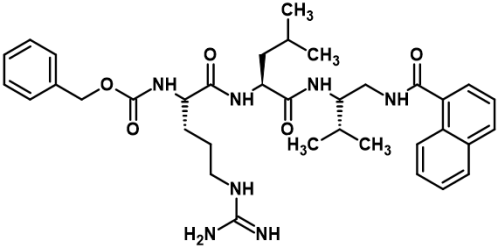
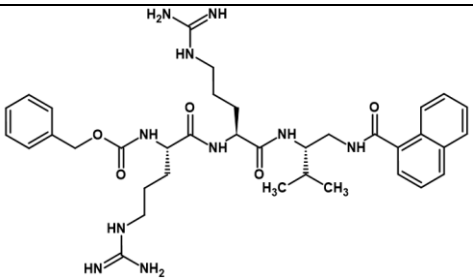
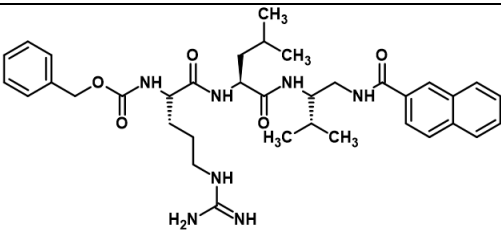
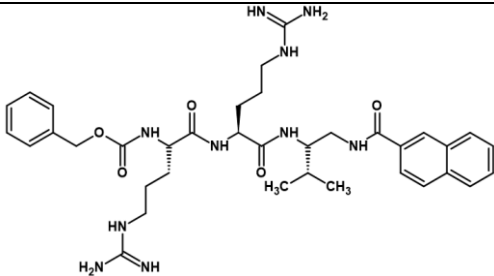
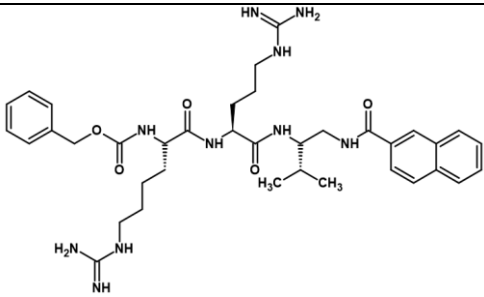
Syntezę zaprojektowanych peptydomimetyków rozpocząłam od wieloetapowych modyfikacji odpowiednich Boc-aminokwasów, prowadzących do otrzymania kluczowego fragmentu strukturalnego ValΨ[CH₂-NH] lub jego zmodyfikowanego odpowiednika, zależnie od zaprojektowanej struktury danego analogu. Fragment ten jest niezbędnym elementem strukturalnym cząsteczki A-20 i jej pochodnych, ponieważ wprowadza peptydomimetyczny izoster wiązania peptydowego oraz wpływa na właściwości konformacyjne i biologiczne tej klasy związków. Po otrzymaniu odpowiednich fragmentów strukturalnych prowadziłam dalszą syntezę metodą klasycznej syntezy w roztworze. W toku syntez zaobserwowałam narastające trudności związane z rozpuszczalnością kolejnych produktów pośrednich, szczególnie w przypadku bardziej rozbudowanych struktur. Z tego względu dużą część reakcji sprzęgania prowadziłam w bezwodnym DMF, pomimo utrudnionego usuwania tego rozpuszczalnika po zakończeniu procesu. Wybór DMF wynikał z jego wysokiej polarności oraz zdolności do rozpuszczania zarówno aminokwasowych substratów, jak i coraz bardziej hydrofobowych produktów pośrednich. Dzięki temu możliwe było prowadzenie reakcji w jednorodnym środowisku, co sprzyjało efektywnemu przebiegowi sprzęgania. Jednocześnie wysoka temperatura wrzenia DMF utrudniała jego usunięcie po

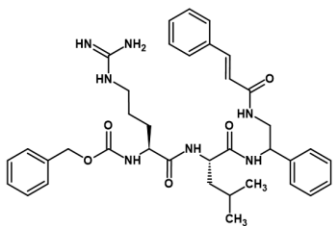
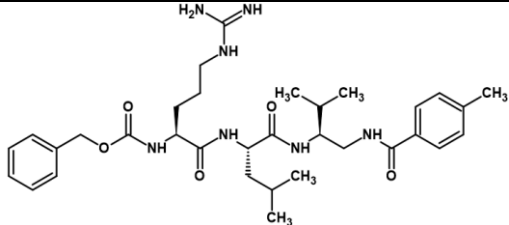
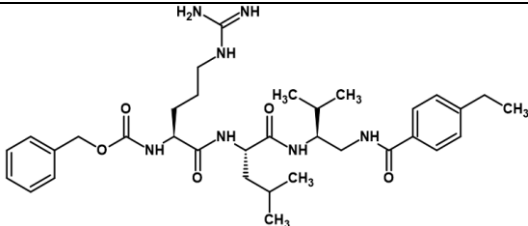
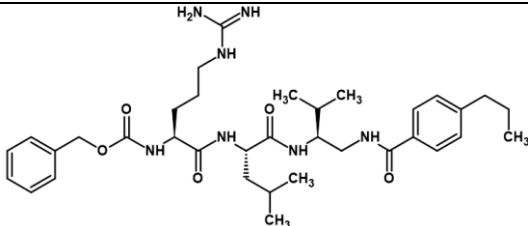
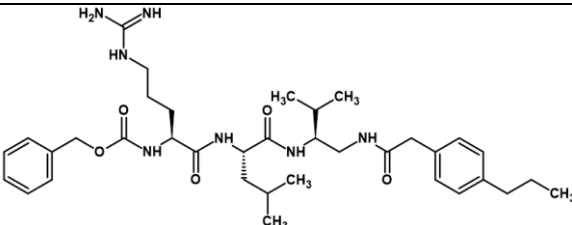
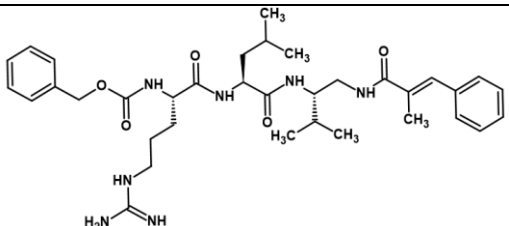
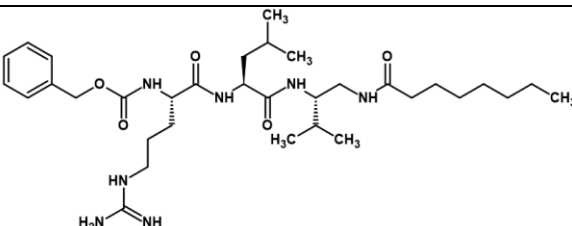
zakończeniu reakcji. DMF zapewniał jednak odpowiednią rozpuszczalność zarówno substratów, jak i produktów pośrednich, dlatego w wielu przypadkach był najkorzystniejszym rozpuszczalnikiem do prowadzenia kolejnych etapów syntezy.

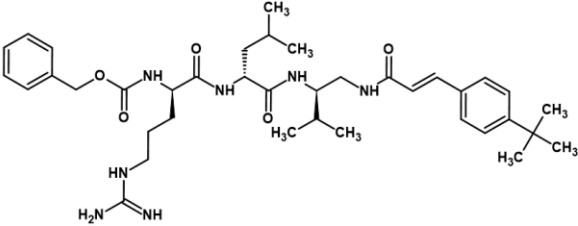
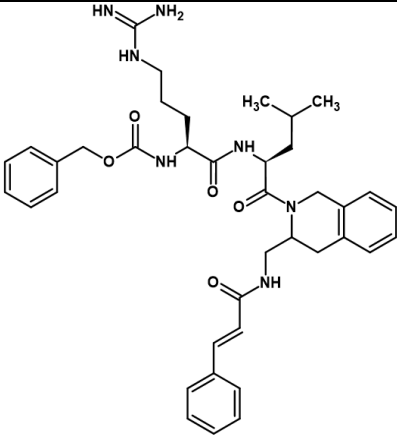
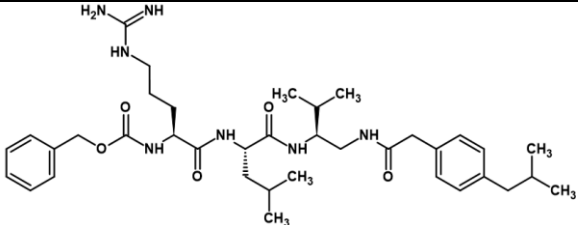
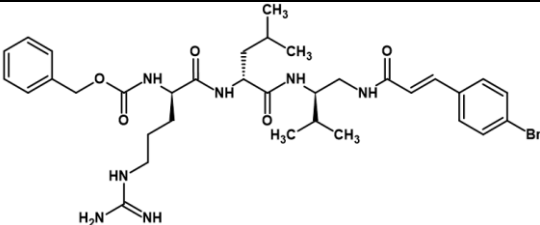
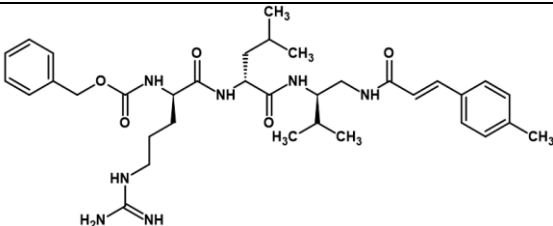
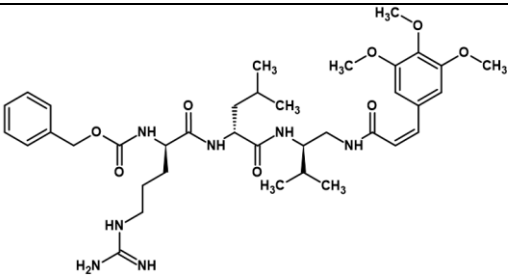
Deprotekcję grup Boc prowadziłam z zastosowaniem 4M HCl w dioksanie, uzyskując odpowiednie chlorowodorki wykorzystywane bezpośrednio w kolejnych etapach syntezy. Powstający podczas reakcji sprzęgania nierozpuszczalny DCU usuwałam poprzez filtrację, natomiast produkty pośrednie izolowałam głównie za pomocą ekstrakcji. Ze względu na długotrwały i mało efektywny proces krystalizacji w przypadku części otrzymanych peptydomimetyków zrezygnowałam z izolacji produktów tą metodą po każdym etapie sprzęgania. Takie podejście pozwoliło uprościć procedurę syntezy oraz skrócić czas otrzymywania docelowych peptydomimetyków, jednak wiązało się z otrzymywaniem produktów pośrednich o niższym stopniu czystości. W konsekwencji końcowy etap oczyszczania metodą preparatywnej RP-HPLC często był bardziej wymagający, ponieważ konieczne było oddzielenie produktu docelowego od pozostałości reagentów, produktów ubocznych sprzęgania oraz zanieczyszczeń pochodzących z wcześniejszych etapów syntezy.

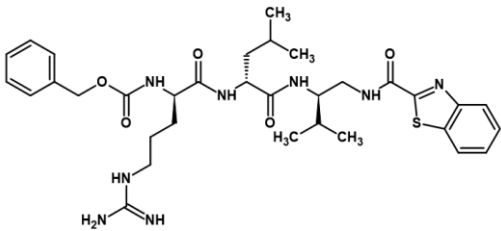
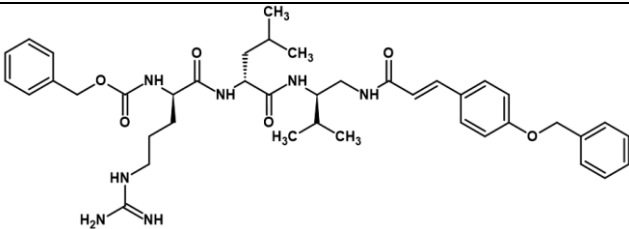
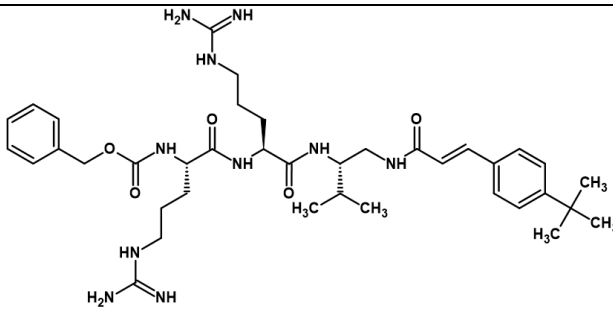
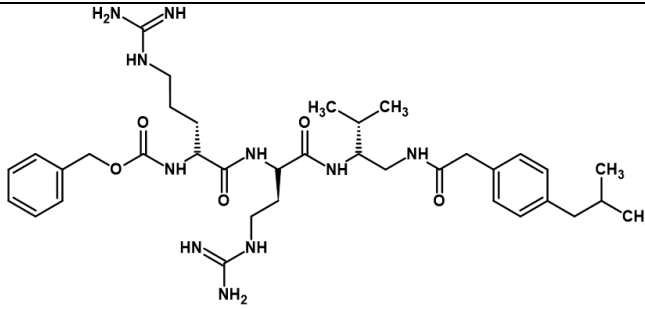
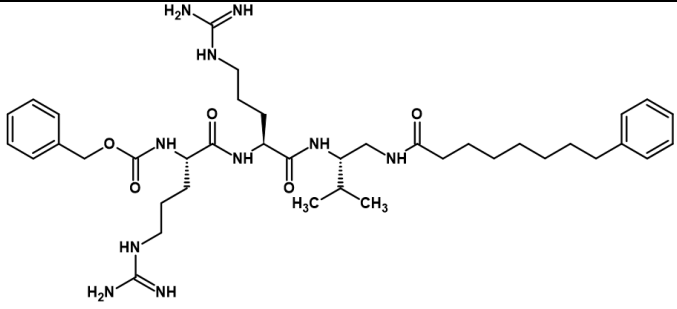
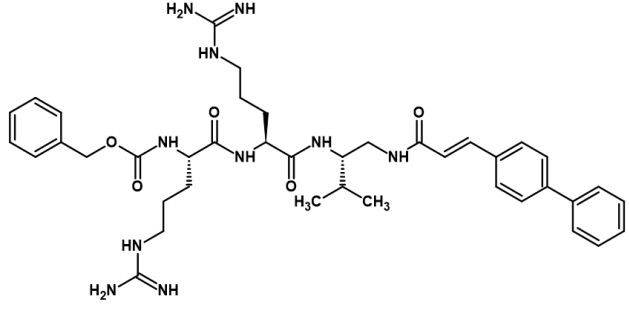
Tabela 2. Symbole oraz struktury chemiczne zsyntezowanych i oczyszczonych peptydomimetyków.

Symbol związku	Struktura
A-71	
A-73	
A-75	

A-76	
A-229	
A-230	
A-231	
A-232	
A-233	

A-234	
A-235	
A-236	
A-237	
A-238	
A-239	
A-240	

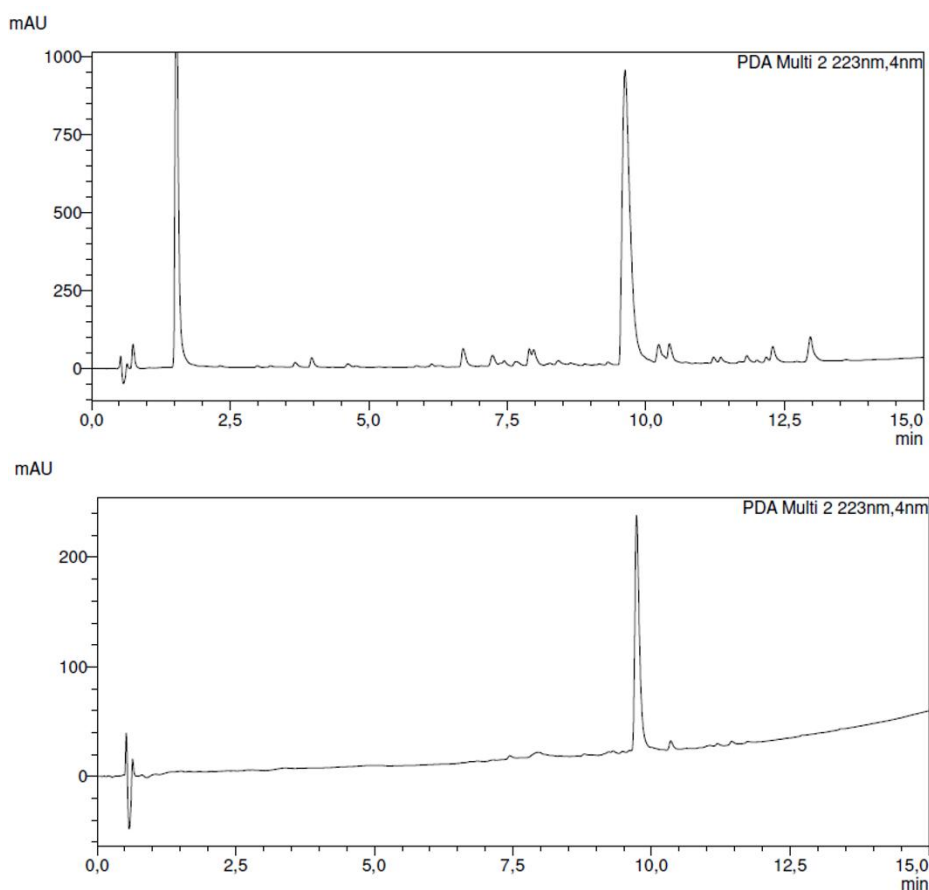
A-241	
A-242	
A-243	
A-244	
A-245	
A-246	

A-247	
A-248	
A-249	
A-250	
A-251	
A-252	

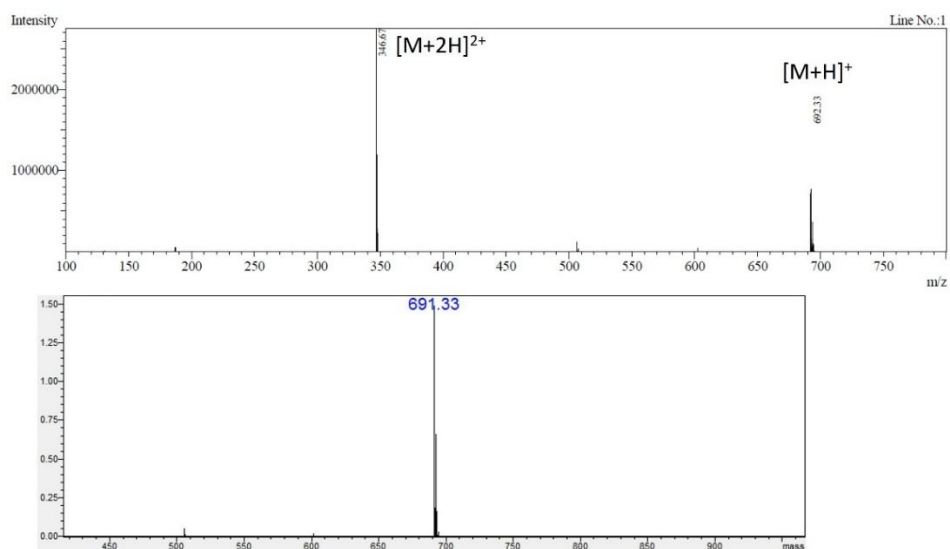
Oczyszczanie zsyntezowanych peptydomimetyków prowadziłam z użyciem preparatywnego RP-HPLC z zastosowaniem elucji izokratycznej. Dla każdego związku konieczny był indywidualny dobór udziału eluentu B w układzie faz ruchomych, umożliwiający uzyskanie możliwie najlepszego rozdziału chromatograficznego produktu głównego. Szczególną trudność stanowiło ustalenie odpowiedniego udziału fazy B, co wynikało z licznych zanieczyszczeń o czasach retencji zbliżonych do oczyszczanego peptydomimetyku. Parametry oczyszczania oraz masy teoretyczne otrzymanych związków przedstawiłam w Tabeli 3.

W przypadku niektórych peptydomimetyków przed właściwym oczyszczaniem w warunkach elucji izokratycznej przeprowadziłam wstępne oczyszczanie z wykorzystaniem elucji gradientowej, mające na celu ułatwienie dobierania odpowiednich warunków izokratycznych do głównego oczyszczania. Pomimo zastosowania tego podejścia, dla związków A-232, A-249, A-250, A-251 i A-252 nie uzyskałam odpowiedniego rozdziału chromatograficznego umożliwiającego izolację produktu o wymaganej czystości, ani nie dobrałam odpowiednich warunków elucji izokratycznej. W konsekwencji nie udało mi się oczyścić wymienionych peptydomimetyków do stopnia umożliwiającego ich dalszą charakterystykę i wykorzystanie w badaniach biologicznych. Z tego względu związków tych nie uwzględniłam w Tabeli 3.

Czystość oraz tożsamość otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą analitycznej RP-HPLC oraz spektrometrii mas MALDI-TOF lub LC-MS-ESI-IT-TOF. Przykładowe chromatogramy oraz widma mas przedstawiłam na Rysunek 25 i Rysunek 26.



Rysunek 25. Chromatogramy RP-HPLC związku A-241 przed oczyszczaniem preparatywnym (u góry) i po oczyszczaniu (na dole), zarejestrowane przy długości fali 223 nm.



Rysunek 26. Widmo mas ESI-TOF związku A-241 po oczyszczeniu metodą preparatywnego RP-HPLC. Panel górny przedstawia pełne widmo mas, natomiast panel dolny przedstawia sygnał po dekonwolucji. Obserwowany sygnał przy m/z 692,33 odpowiada jonowi $[M+H]^+$ oraz sygnał 346,67 odpowiada jonowi $[M+2H]^{2+}$ związku A-241 i potwierdza jego tożsamość.

Tabela 3. Parametry oczyszczania preparatywnego RP-HPLC oraz charakterystyka masowa otrzymanych peptydomimetyków.

Nazwa związku	Masa surowego produktu poddanego oczyszczaniu [mg]	Układ faz ruchomych	Udział fazy B w elucji izokratycznej [%]	Masa oczyszczonego produktu [mg]	Wydajność oczyszczania [%]	Masa teoretyczna monoizotopowa [g/mol]	Obserwowany jon pseudomolekularny m/z
A-71	190	a	47	22,05	11,61	678,442	$[M+H]^+=680,358$
A-73	175	a	49	4,35	2,49	693,458	$[M+H]^+=694,358$
A-75	185	a	48	19,05	10,30	711,411	$[M+H]^+=712,253$
A-76	173	b	53	14,00	8,09	707,473	$[M+H]^+=708,285$
A-229	162	a	42	8,10	5,00	659,379	$[M+H]^+=660,311$
A-230	180	a	29	6,94	3,89	702,397	$[M+2H]^{2+}=352,183$
A-231	180	a	44	10,37	5,76	659,380	$[M+H]^+=660,300$
A-233	168	c	37	8,25	4,91	716,412	$[M+2H]^{2+}=359,172$
A-234	170	a	43	7,54	4,44	669,364	$[M+H]^+=670,265$
A-235	182	a	39	16,86	9,26	623,380	$[M+H]^+=624,292$
A-236	170	b	46	18,08	10,64	637,395	$[M+H]^+=638,297$
A-237	180	a	45	12,47	6,93	651,411	$[M+H]^+=652,320$
A-238	188	a	47	34,91	18,57	665,426	$[M+H]^+=666,279$
A-239	166	a	42	16,86	10,16	649,395	$[M+H]^+=650,286$
A-240	160	a	46	4,25	2,66	631,442	$[M+H]^+=632,340$

A-241	175	a	50	35,40	20,23	691,442	$[M+H]^+=692,330$
A-242	197	a	43	3,56	1,81	695,380	$[M+2H]^{2+}=348,631$
A-243	160	a	51	12,80	8,00	679,442	$[M+H]^+=680,318$
A-244	160	a	46	15,24	9,53	713,290	$[M+2H]^{2+}=357,584$
A-245	174	a	44	10,46	6,01	649,395	$[M+H]^+=650,278$
A-246	158	a	40	22,49	14,23	725,411	$[M+H]^+=726,278$
A-247	170	a	43	26,67	15,69	666,331	$[M+H]^+=667,200$
A-248	185	a	37	6,88	3,72	741,421	$[M+H]^+=742,257$

W przypadku projektowanych peptydomimetyków, które zawierały niewielką liczbę reszt aminokwasowych oraz specyficzne fragmenty niebiałkowe, klasyczna synteza w roztworze była podejściem efektywnym i zgodnym z wcześniejszymi procedurami stosowanymi dla A-20 i jego analogów [127], [130]. Alternatywną metodą otrzymywania peptydów jest synteza na nośniku stałym, zapoczątkowana przez Merrifielda, szczególnie użyteczna w przypadku dłuższych sekwencji peptydowych i szybkiego otrzymywania bibliotek związków [200], [201]. W niniejszej pracy zastosowanie syntezy w roztworze było jednak uzasadnione charakterem otrzymywanych krótkich peptydomimetyków oraz koniecznością wprowadzania niestandardowych fragmentów strukturalnych.

3. Badania mikrobiologiczne

3.1. Określenie wartości MIC oraz MBC otrzymanych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich

Pierwszym etapem oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych wszystkich otrzymanych peptydomimetyków było określenie ich aktywności wobec wybranych referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich, tj. *S. aureus* ATCC 29213 oraz *S. pyogenes* ATCC 19615. Celem przeprowadzonych doświadczeń była wstępna charakterystyka ich potencjału przeciwbakteryjnego oraz identyfikacja związków wykazujących najwyższą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich. W tym celu wyznaczyłam wartości MIC metodą seryjnych mikrorozcieńczeń, a następnie wartości MBC, które wyznaczyłam zgodnie z procedurami opisanymi w podrozdziałach 4.1 oraz 4.2. Otrzymane wyniki pozwoliły na ocenę zarówno zdolności badanych peptydomimetyków do hamowania wzrostu bakterii, jak i ich działania bakteriobójczego.

Wykorzystana metoda seryjnych mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym jest uznawana za standard w ocenie aktywności przeciwbakteryjnej nowych związków i została znormalizowana przez CLSI (Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*). Dodatkową zaletą tej metody była możliwość przeprowadzenia oznaczeń z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych. Zastosowanie płytek 96-dołkowych umożliwiło przeprowadzenie oznaczeń w układzie mikroskalowym, co pozwoliło ograniczyć zużycie badanych peptydomimetyków przy zachowaniu powtarzalnych warunków eksperymentalnych.

Pomimo że standardy CLSI rekomendują stosowanie podłoża Mueller-Hinton Broth do oznaczania wartości MIC [202], w niniejszej pracy wykorzystałam podłoże BHI, analogicznie do wcześniejszych badań prowadzonych dla tej grupy peptydomimetyków. Takie podejście umożliwiło zachowanie porównywalności wyników oraz bardziej wiarygodną ocenę wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na aktywność przeciwbakteryjną.

Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność zsyntezowanych peptydomimetyków w środowisku wodnym, badania wykonałam z wykorzystaniem trzech rozpuszczalników: wody, wodnego roztworu EtOH oraz DMSO. Roztwory wyjściowe przygotowałam w układach zawierających 2% EtOH lub 2% DMSO, natomiast po zmieszaniu z zawiesiną bakteryjną końcowe stężenie rozpuszczalnika organicznego w dołku wynosiło 1%. Zastosowane stężenia rozpuszczalników organicznych nie wpływały na wzrost komórek bakteryjnych, co potwierdziłam na podstawie odpowiednich kontroli rozpuszczalnikowych, dzięki czemu mogły zostać wykorzystane w dalszych badaniach mikrobiologicznych.

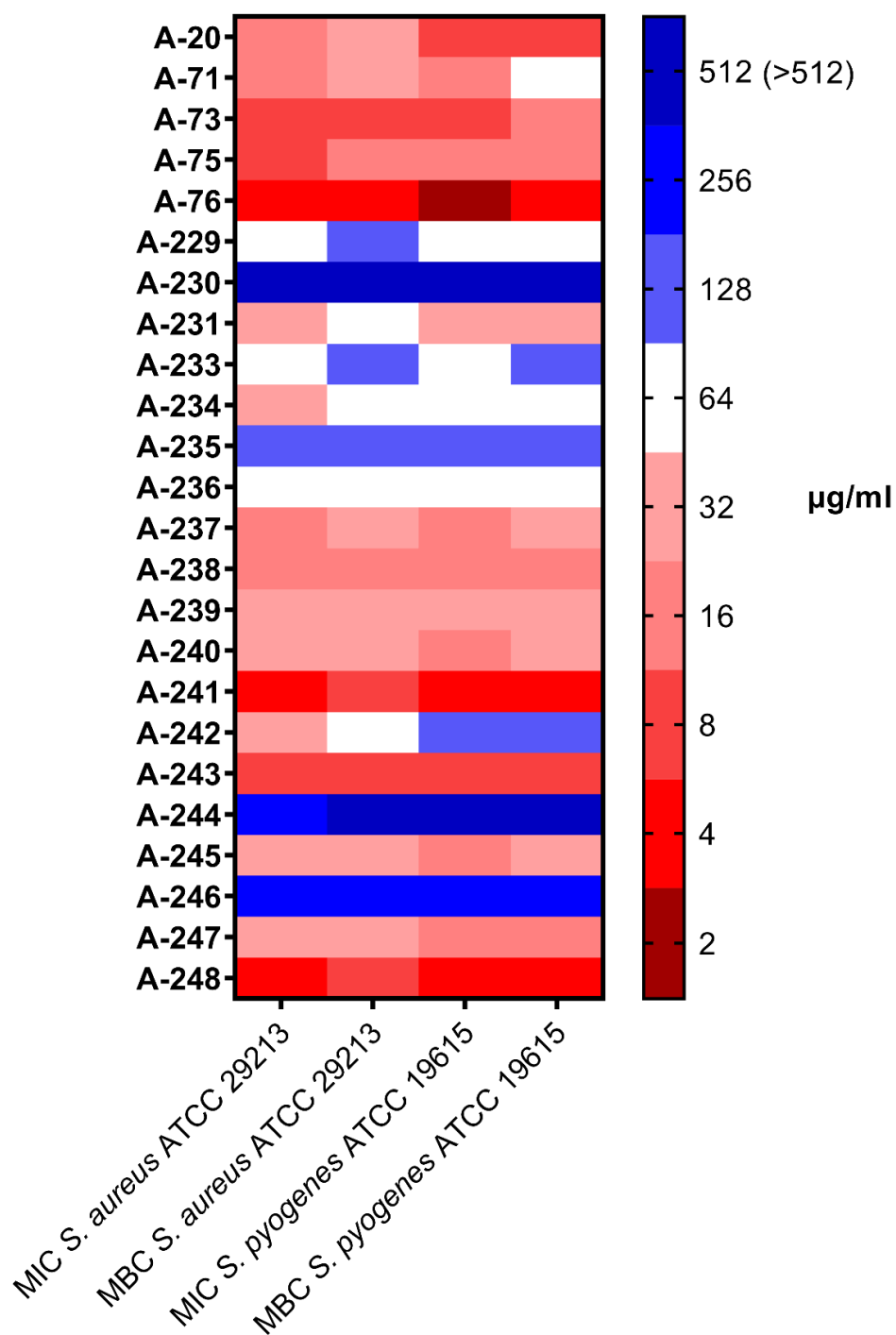
Otrzymane wyniki przedstawiłam w Tabeli 4 oraz dla lepszego zobrazowania różnic w aktywności pomiędzy związkami, w formie mapy cieplnej (Rysunek 27). Spośród badanych związków najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową wykazywały się peptydomimetyki A-76, A-241, A-243 oraz A-248, dla których wartości MIC oraz MBC mieściły się głównie w zakresie 2-8 µg/ml. Związki te wykazywały aktywność wyższą niż związek wyjściowy A-20, dla którego wartości MIC/MBC wynosiły 32/32 µg/ml wobec *S. aureus* ATCC 29213 oraz 8/16 µg/ml wobec *S. pyogenes* ATCC 19615.

Umiarkowaną aktywność wobec badanych szczepów wykazywały związki A-71, A-73, A-75, A-231, A-237, A-238, A-239, A-240, A-245 oraz A-247, dla których wartości MIC mieściły się w zakresie 8-32 µg/ml. Niższą aktywność obserwowałam dla związków A-229, A-233, A-234 i A-236, dla których wartości MIC wynosiły najczęściej 32-64 µg/ml, zależnie od szczepu oraz zastosowanego układu rozpuszczalników. Z kolei najslabszą aktywność obserwowałam dla peptydomimetyków A-230, A-235, A-244 oraz A-246, których wartości MIC wynosiły >128 µg/ml. W przypadku tych związków wartości MBC były zwykle równe wartościom MIC albo wyższe od nich, a dla najslabiej aktywnych analogów niekiedy przekraczały zakres badanych stężeń, co wskazuje na ograniczoną aktywność bakteriobójczą w zastosowanych warunkach doświadczenia.

Tabela 4. Wartości MIC oraz MBC badanych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich.

Związek	MIC/MBC [$\mu\text{g/ml}$]					
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213			<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615		
	H ₂ O	1% EtOH	1% DMSO	H ₂ O	1% EtOH	1% DMSO
A-20	32/32	32/32	32/32	8/16	8/16	8/16
A-71	16/32	16/32	16/32	16/64	16/64	16/64
A-73	8/32	8/8	8/8	8/16	8/8	8/8
A-75	16/16	8/16	8/8	16/16	16/16	16/16
A-76	*	4/4	2/2	*	2/4	2/2
A-229	64/128	64/64	64/128	64/64	64/64	64/64
A-230	>512	>512	>512	512/>512	512/>512	512/>512
A-231	32/32	32/64	32/32	16/32	32/32	32/64
A-233	64/64	64/64	64/128	64/64	64/128	64/512
A-234	32/32	32/64	32/64	64/64	32/32	64/64
A-235	128/128	128/128	128/128	128/256	128/128	128/128
A-236	64/64	32/64	64/128	64/64	32/64	32/32
A-237	16/32	16/32	16/16	16/16	16/32	16/16
A-238	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
A-239	32/32	32/32	16/32	32/32	32/32	32/32
A-240	32/32	32/32	16/32	32/32	16/32	16/32
A-241	*	4/8	4/4	*	4/4	4/4
A-242	-	32/64	-	-	128/128	-
A-243	*	8/8	8/8	*	4/4	8/8
A-244	256/512	256/256	128/256	512/512	>512	>512
A-245	32/32	32/32	32/32	16/32	16/32	16/32
A-246	256/256	256/256	256/256	256/256	256/512	256/256
A-247	32/32	32/32	32/32	16/16	16/16	16/16
A-248	4/8	4/4	4/8	4/4	4/4	4/4

Objaśnienie: wartości podano w formacie MIC/MBC [$\mu\text{g/ml}$]; pierwsza wartość oznacza minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii, druga – minimalne stężenie bakteriobójcze. Symbol „*” oznacza, że badany związek nie rozpuszczał się w stężeniu 1024 $\mu\text{g/ml}$ w H₂O, natomiast „-” oznacza, że nie otrzymano wystarczającej ilości związku, aby przebadać go w trzech rozpuszczalnikach.



Rysunek 27. Mapa cieplna porównująca aktywność przeciwbakteryjną badanych peptydomimetyków wobec bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus* ATCC 29213 oraz *S. pyogenes* ATCC 19615. Przedstawiono wartości MIC i MBC wyznaczone dla związków rozpuszczonych w 2% DMSO. Kolor skali odpowiada wartościom stężeń w µg/ml, przy czym niższe wartości oznaczają większą aktywność przeciwbakteryjną. Wartości przekraczające najwyższe badane stężenie są oznaczone jako >512 µg/ml.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane peptydomimetyki wykazywały zazwyczaj wyższą aktywność wobec szczepu *S. pyogenes* niż wobec *S. aureus*, co wskazuje na

odmienną wrażliwość badanych szczepów referencyjnych na otrzymane związki. Nie można tutaj jednak stwierdzić jednoznacznej selektywności gatunkowej całej grupy peptydomimetyków, ponieważ obserwowane różnice zależały również od struktury związku.

W porównaniu z związkiem wyjściowym A-20 (MIC wobec *S. aureus* 32 µg/ml), większość korzystnych modyfikacji dotyczyła końcowego fragmentu hydrofobowego P5. Największą poprawę aktywności obserwowałam dla analogów, w których wprowadziłam wydłużone fragmenty alifatyczno-aromatyczne lub odpowiednio podstawione układy aromatyczne. Szczególnie wyraźny efekt uzyskałam dla A-76 (MIC 2 µg/ml), A-241 i A-248 (MIC 4 µg/ml) oraz A-73, A-75 i A-243 (MIC 8 µg/ml), co sugeruje, że zwiększenie hydrofobowości i odpowiednie ułożenie fragmentu P5 sprzyja aktywności wobec *S. aureus*. Umiarkowaną poprawę względem A-20 wykazywały również A-71, A-237, A-238, A-239 i A-240 (MIC 16 µg/ml). Z kolei wprowadzenie zbyt rozbudowanych lub niekorzystnie podstawionych ugrupowań aromatycznych lub dodatkowego ugrupowania guanidynowego prowadziło do obniżenia aktywności, czego przykładem są A-229, A-233, A-235, A-236, A-244 i A-246 (MIC 64-256 µg/ml), a także A-230, dla którego MIC przekraczało 512 µg/ml. Część modyfikacji nie wpływała istotnie na aktywność względem A-20, jak w przypadku A-231, A-234, A-245 i A-247 (MIC 32 µg/ml). Otrzymane zależności potwierdzają, że aktywność tej grupy peptydomimetyków wymaga zachowania równowagi pomiędzy hydrofobowością, rozmiarem i geometrią fragmentu P5. Umiarkowane zwiększenie hydrofobowości było korzystne, natomiast nadmierne rozbudowanie fragmentu aromatycznego lub zwiększenie ładunku dodatniego cząsteczki poprzez wprowadzenie ugrupowania guanidynowego prowadziły do pogorszenia aktywności przeciwbakteryjnej.

Na podstawie analizy wartości MIC oraz MBC wytypowałam do dalszych badań biologicznych pięć peptydomimetyków, do których należą: A-75, A-76, A-238, A-241 i A-243. Do kolejnych badań włączyłam również związek A-20, który stanowił cząsteczkę wyjściową i punkt odniesienia dla nowo otrzymanych analogów.

Związki A-75 oraz A-238 wykazywały nieco słabszą aktywność niż peptydomimetyki o najkorzystniejszych wartościach MIC/MBC, tj. A-76, A-241, A-243 i A-248, jednak nadal charakteryzowały się korzystnym profilem przeciwbakteryjnym na tle pozostałych otrzymanych analogów. Ich uwzględnienie w dalszych badaniach pozwalało porównać związki o różnym poziomie aktywności biologicznej, a nie wyłącznie analogi o najwyższej aktywności.

Pomimo bardzo wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej analogu A-248, nie włączyłam go do pełnego panelu dalszych badań biologicznych w ramach niniejszej rozprawy. Decyzja ta wynikała z ograniczeń preparatywnych związanych z otrzymaniem odpowiedniej ilości materiału o czystości wymaganej do przeprowadzenia pełnego i porównywalnego zakresu analiz. Ze względu na obiecującą aktywność, związek A-248 został wybrany do dalszej optymalizacji syntetycznej, obejmującej m.in. analizę ścieżki syntezy, warunków oczyszczania oraz powiększenie skali otrzymywania. Badania te planowane są jako kolejny etap prac nad analogami Cystapep 1, wykraczający poza zakres niniejszej rozprawy doktorskiej.

3.2. Określenie wartości MIC oraz MBC wybranych peptydomimetyków wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych

W celu określenia spektrum aktywności przeciwbakteryjnej badanych peptydomimetyków przeprowadziłam również badania wobec wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych. Pozwoliło mi to ocenić, czy otrzymane związki wykazują aktywność także wobec bakterii o odmiennej budowie komórki. Rozszerzenie badań o szczepy *E. coli*, *P. aeruginosa* oraz *A. baumannii* pozwoliło na wstępną ocenę, czy otrzymane związki posiadają uniwersalny mechanizm działania wobec bakterii oraz czy są zdolne do pokonywania bariery ochronnej jaką jest zewnętrzna błona komórkowa, której nie posiadają w swojej budowie komórki bakterii Gram-dodatnich.

Uzyskane wyniki (Tabela 5) wskazują na wyraźnie niższą aktywność badanych peptydomimetyków lub jej brak wobec bakterii Gram-ujemnych w porównaniu z aktywnością obserwowaną wobec bakterii Gram-dodatnich. W niemal wszystkich przypadkach wyznaczone stężenia MIC i MBC przekraczały 512 µg/ml, co wskazuje, że zaprojektowane peptydomimetyki wykazują aktywność głównie wobec badanych szczepów bakterii Gram-dodatnich.

Tabela 5. Wartości MIC oraz MBC badanych peptydomimetyków wobec wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych.

Symbol związku	MIC/MBC [µg/ml]								
	<i>E. coli</i> ATCC 25922			<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145			<i>A. baumannii</i> CRAB 24133571		
	H ₂ O	1% EtOH	1% DMSO	H ₂ O	1% EtOH	1% DMSO	H ₂ O	1% EtOH	1% DMSO

A-20	512/>5 12	256/51 2	256/51 2	>512	>512	>512	>512	>512	>512
A-75	512	512	512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
A-76	*	>512	>512	*	>512	>512	*	>512	>512
A-238	512/51 2	512/51 2	512/>5 12	>512	>512	>512	>512	>512	>512
A-241	*	512	512	*	>512	>512	*	>512	>512
A-243	*	512	128	*	>512	>512	*	>512	>512

Symbol „*” oznacza, że badany związek nie rozpuszczał się w stężeniu 1024 µg/ml w H₂O.

Podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych analogów Cystapep 1, badane peptydomimetyki wykazywały niską aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych. W badaniach Jasir i in. oraz Pikuły i in. wykazano, że Cystapep 1 działa przede wszystkim na bakterie Gram-dodatnie, natomiast wobec większości bakterii Gram-ujemnych jest słabo aktywny lub nieaktywny [128], [130]. Ograniczona aktywność wobec *E. coli*, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* może wynikać głównie z obecności błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, która stanowi dodatkową barierę przepuszczalności. Istotne znaczenie ma również selektywność poryn, czyli białkowych kanałów błony zewnętrznej, przez które mogą przenikać tylko cząsteczki o określonych właściwościach fizykochemicznych [203].

3.3. Ocena aktywności wybranych peptydomimetyków wobec szczepów MRSA metodą monitorowania wzrostu bakterii w czasie

W następnym etapie badań mikrobiologicznych oceniłam aktywność wybranych związków wobec szerszego panelu szczepów MRSA, obejmującego 11 izolatów, w tym zarówno szczepy kliniczne, jak i laboratoryjne. Dodatkowo, badania wykonałam również dla szczepu referencyjnego *S. aureus* ATCC 29213, który zastosowałam w badaniach wstępnych jako szczep odniesienia. Analiza wzrostu bakterii metodą pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 600 nm (OD₆₀₀) umożliwiła mi szerszą ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków wobec szczepów o zróżnicowanym pochodzeniu. Zastosowanie takiego panelu izolatów MRSA pozwoliło określić, czy obserwowana aktywność utrzymuje się wobec różnych szczepów, czy też zależy od konkretnego szczepu bakteryjnego. Badania te są szczególnie ważne w przypadku

szczepów szpitalnych MRSA, które różnią się pod względem mechanizmów oporności i wirulencji.

Zastosowane stężenia peptydomimetyków w tym badaniu wyznaczyłam na podstawie wyznaczonych wartości MIC względem szczepu *S. aureus* ATCC 29213.

Krzywe wzrostu badania wrażliwości szczepów MRSA przedstawiłam na rysunkach 29 do 33. Dodatkowo wartości MIC wyznaczone na podstawie przebiegu krzywych wzrostu zestawiałam w formie mapy cieplnej (Rysunek 28). Analizowane szczepy MRSA cechowały się zbliżoną wrażliwością na testowane, poszczególne peptydomimetyki, a pomiędzy szczepami klinicznymi i laboratoryjnymi nie obserwowałam istotnych różnic w zakresie stężeń hamujących wzrost bakterii. Częsteczka A-20 hamowała wzrost bakterii w stężeniach 64-128 µg/ml, natomiast pozostałe analogi wykazywały wyraźnie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Najkorzystniejszy profil aktywności zaobserwowałam dla związków A-76 oraz A-241, które skutecznie hamowały wzrost szczepów MRSA już w zakresie 4-8 µg/ml. Wysoką aktywność wykazywał również peptydomimetyk A-75, dla którego efekt bakteriostatyczny obserwowałam w większości szczepów przy stężeniu 8-16 µg/ml. Spośród zbadanych analogów najslabsze działanie wykazywał związek A-238, dla którego aktywność była najbardziej zbliżona do aktywności związku wyjściowego A-20.

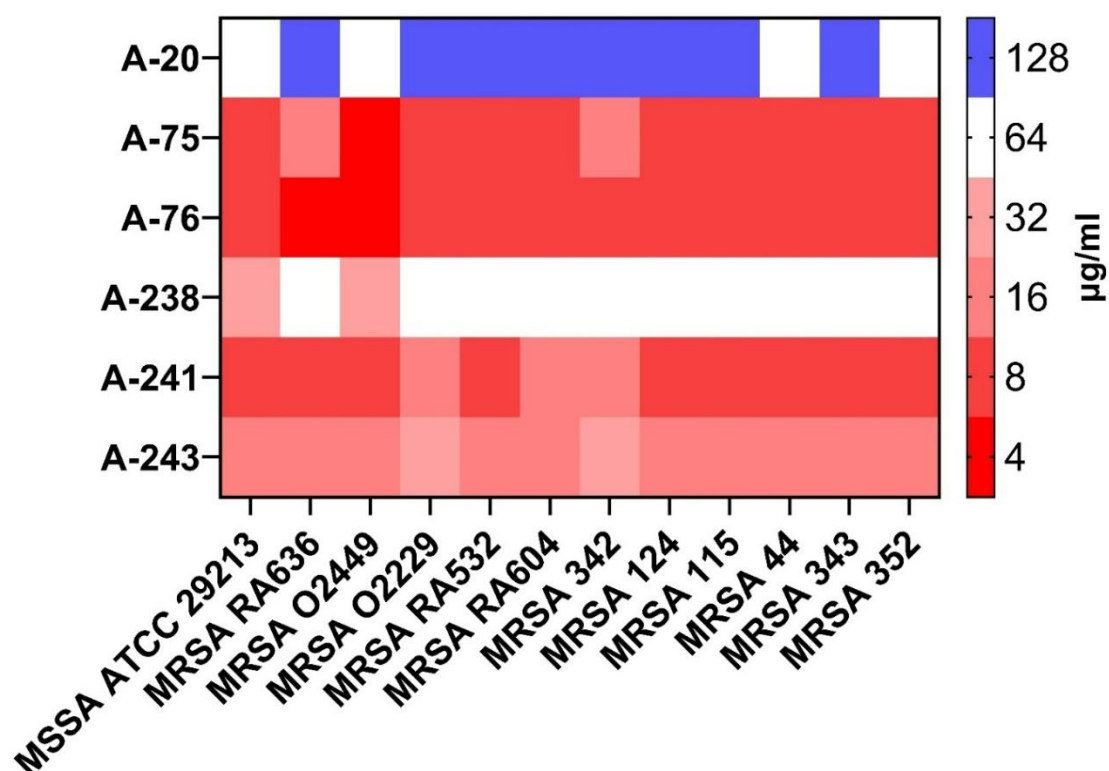
Istotną obserwacją było również szybkie zahamowanie wzrostu bakterii przez badane peptydomimetyki. Efekt ten był widoczny już po 30 minutach inkubacji, co może wskazywać na szybki mechanizm oddziaływania z komórkami bakteryjnymi.

Szczep kliniczny MRSA 342 wykazywał niższą wrażliwość na badane związki w porównaniu z pozostałymi izolatami. W przypadku tego szczepu zahamowanie wzrostu obserwowałam przy wyższych stężeniach peptydomimetyków, niekiedy około jednego rzędu wielkości wyższych niż dla pozostałych szczepów. Może to wskazywać na częściowo odmienny profil wrażliwości MRSA 342 na badane związki.

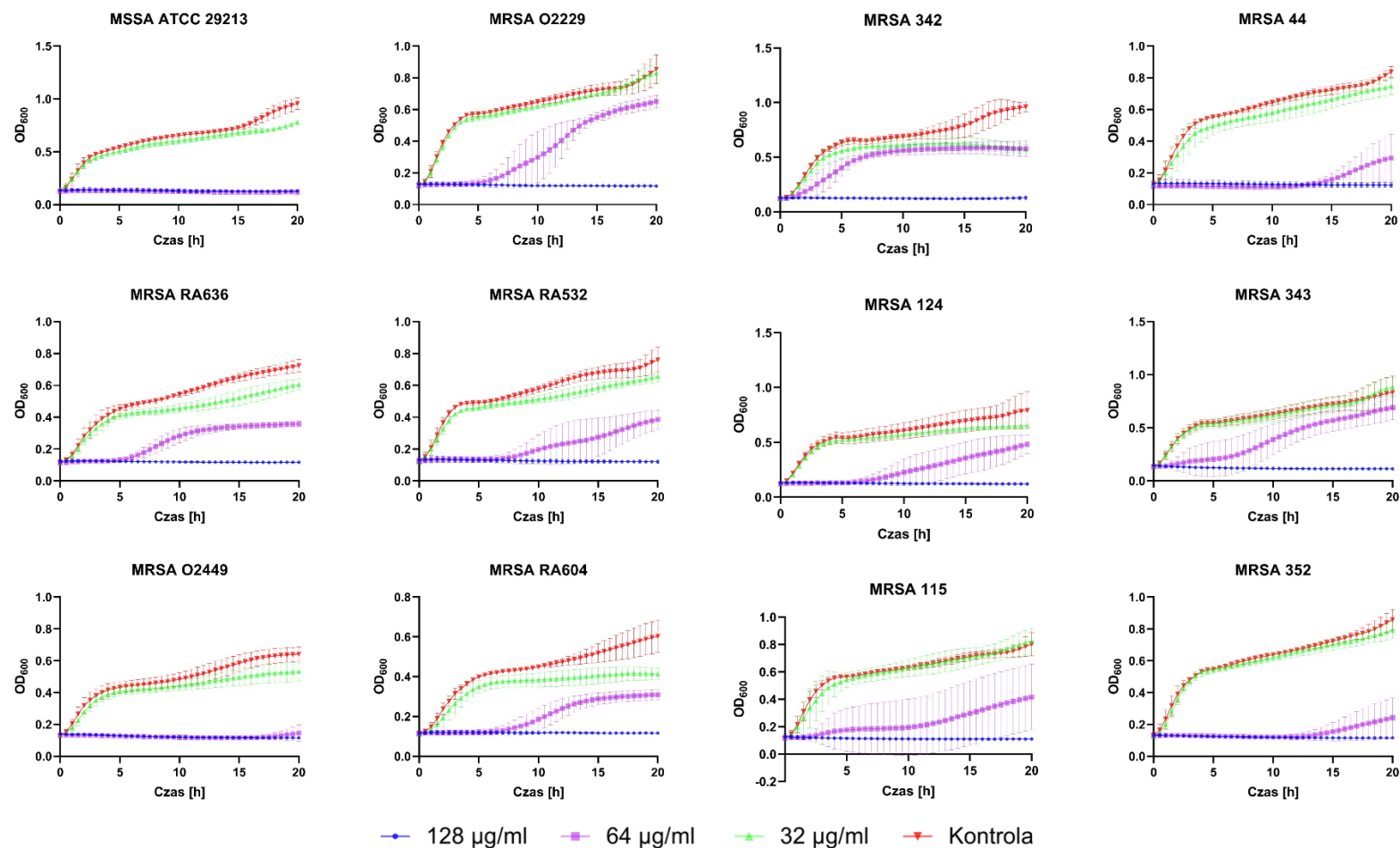
Podsumowując ten etap badań, uzyskane wyniki wskazują na względnie uniwersalny profil aktywności badanych związków wobec różnych szczepów MRSA, niezależnie od ich pochodzenia klinicznego lub laboratoryjnego.

Monitorowanie wzrostu bakterii metodą pomiaru gęstości optycznej w czasie dostarcza informacji nie tylko o skuteczności badanych peptydomimetyków, ale również o kinetyce hamowania wzrostu bakterii [204]. Uzyskane krzywe wzrostu pozwoliły ocenić, czy związki są zdolne do hamowania wzrostu bakterii bezpośrednio po kontakcie, czy też do zahamowania wzrostu dochodzi po upływie określonego czasu. Informacji

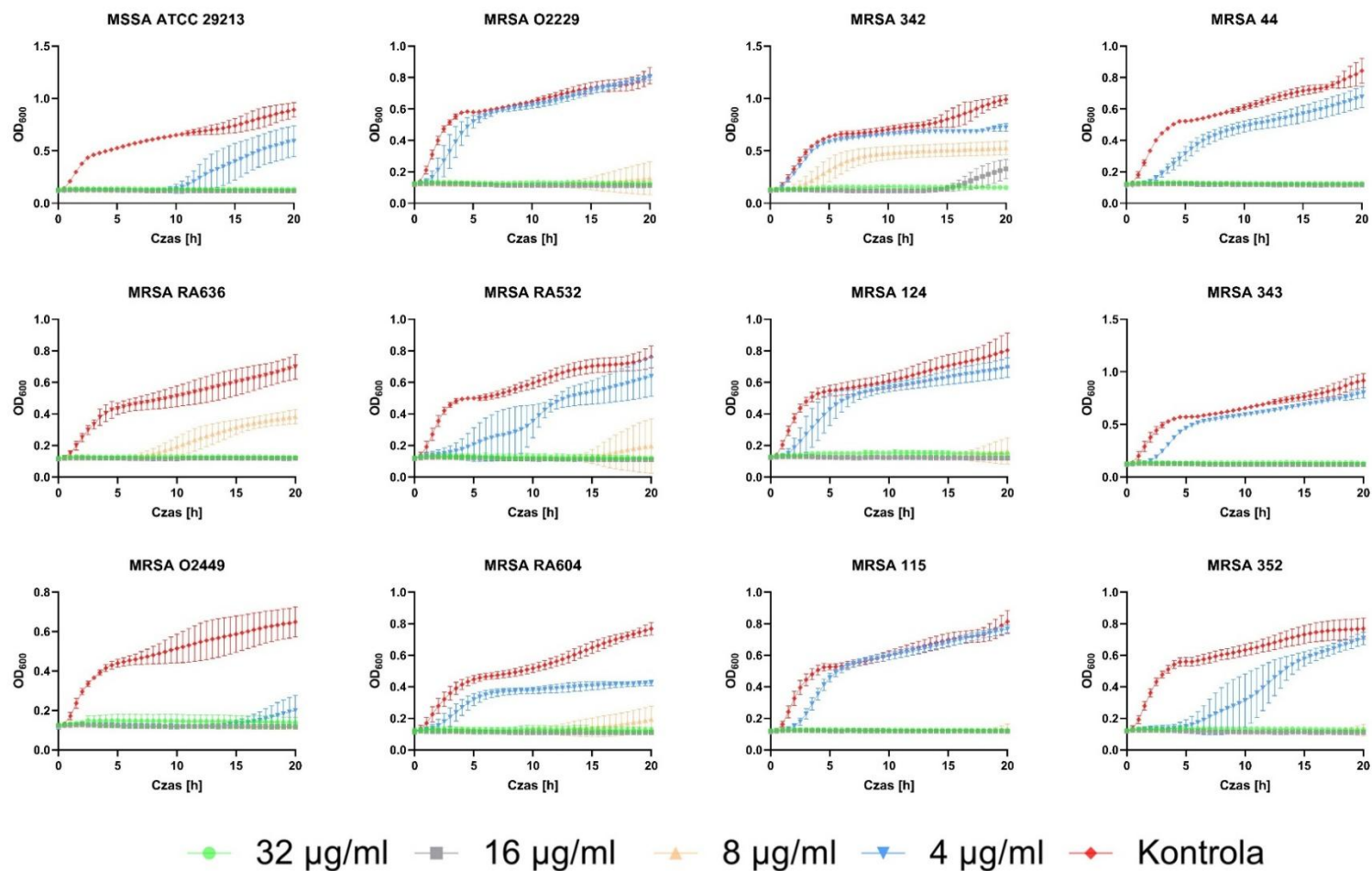
tych nie można uzyskać podczas samego oznaczania MIC, które wskazuje jedynie informację końcową o wartości MIC po określonym czasie inkubacji [205], [206]. Dodatkowo analiza przebiegu wzrostu bakterii ułatwiła mi projektowanie kolejnych eksperymentów poprzez optymalizację czasów inkubacji oraz dobór stężeń związków wykorzystywanych w dalszych przeprowadzonych badaniach.



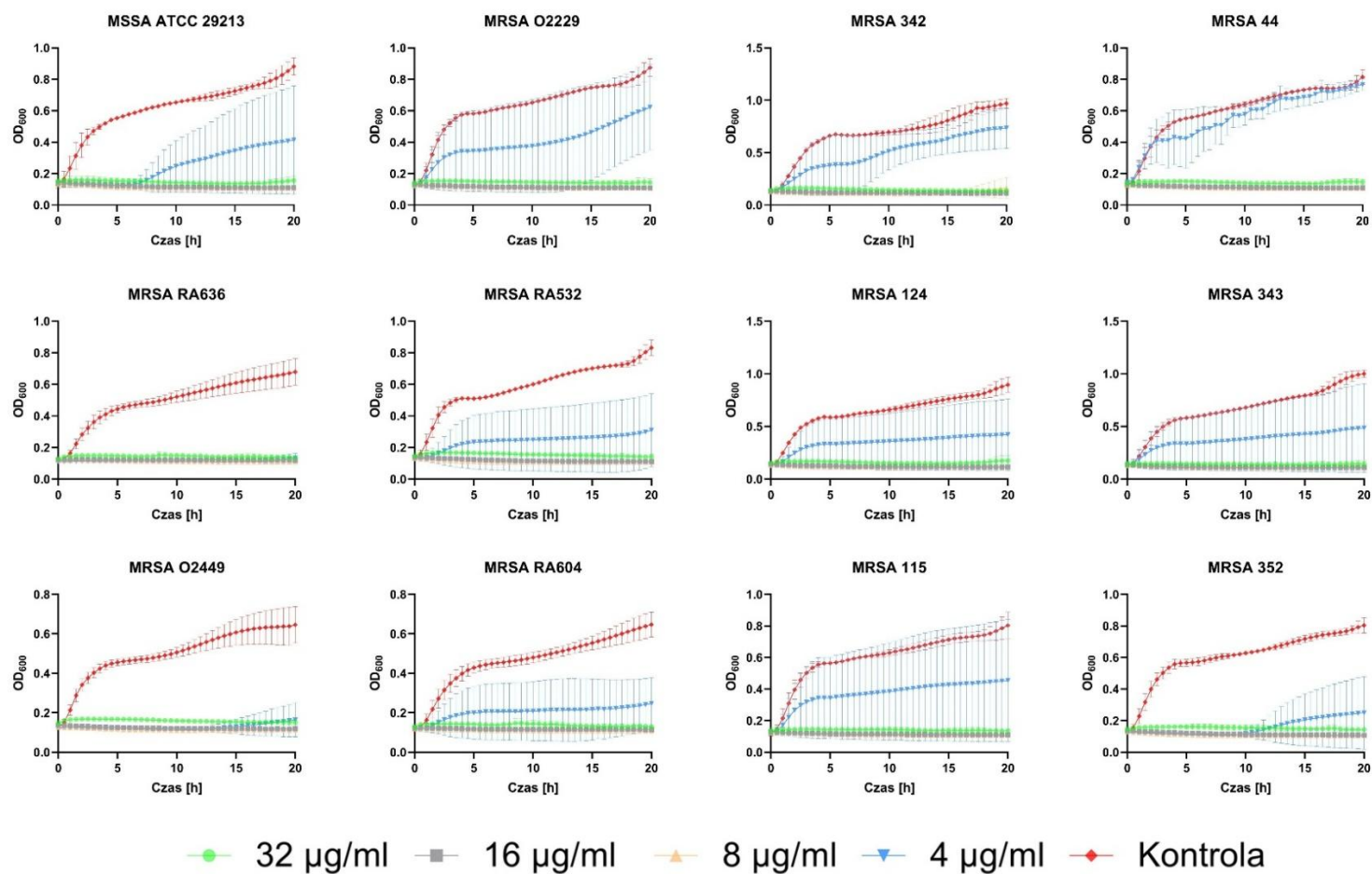
Rysunek 28. Mapa cieplna przedstawiająca podsumowanie wyników MIC badanych peptydomimetyków wobec szczepów MRSA oraz szczepu referencyjnego ATCC 29213, określonych za pomocą pomiarów gęstości optycznej w czasie.



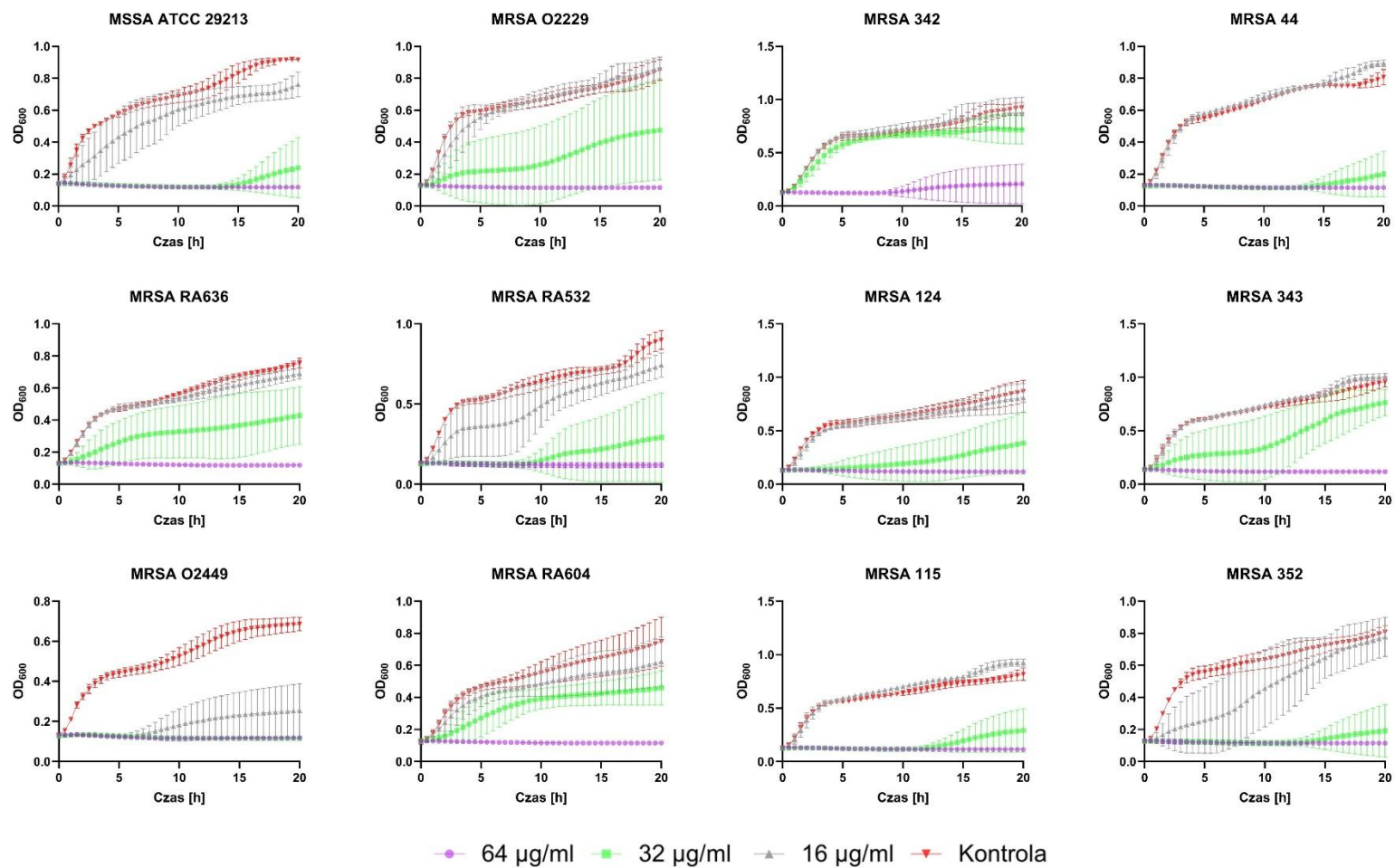
Rysunek 29. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-20 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).



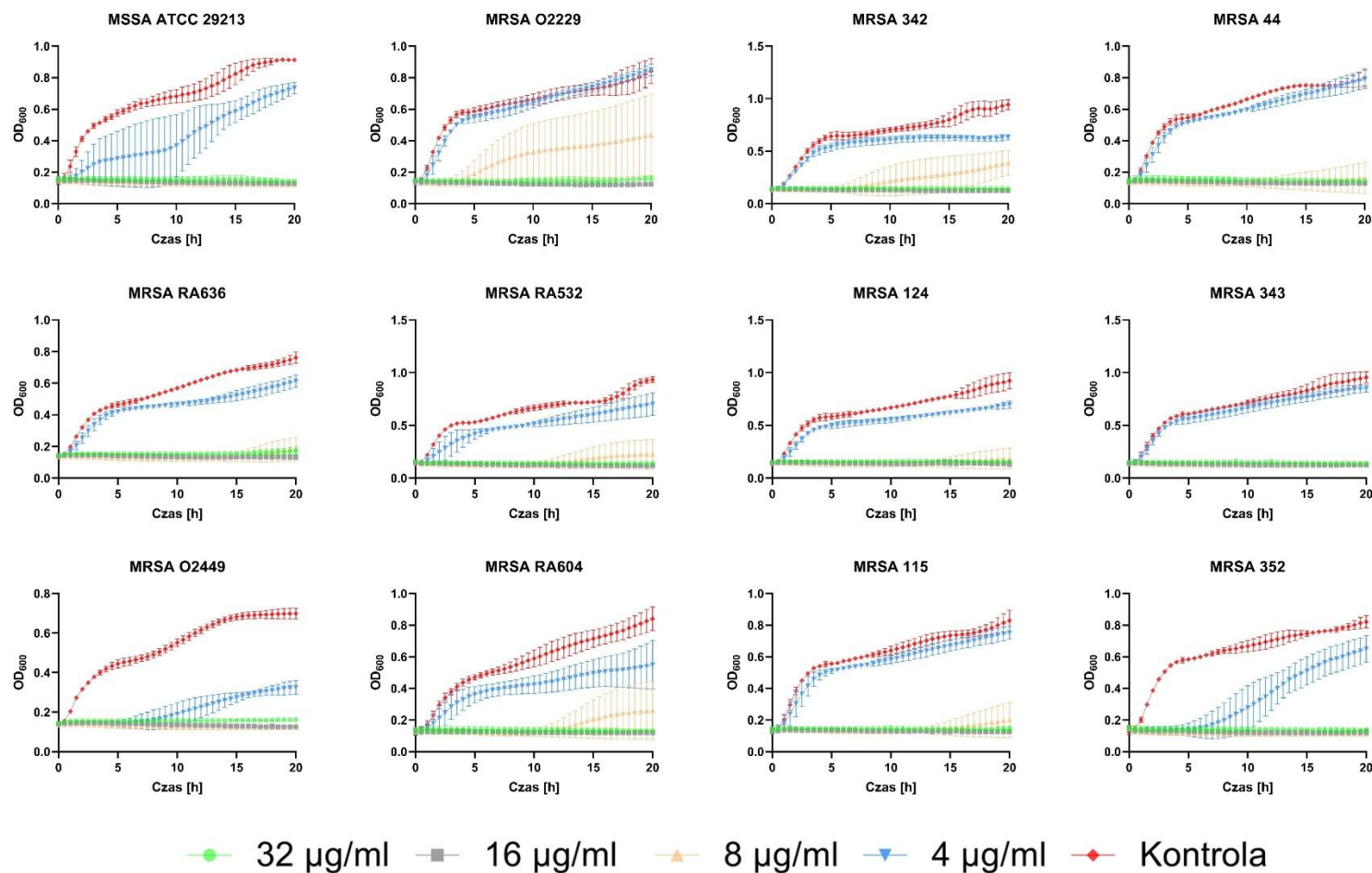
Rysunek 30. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-75 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).



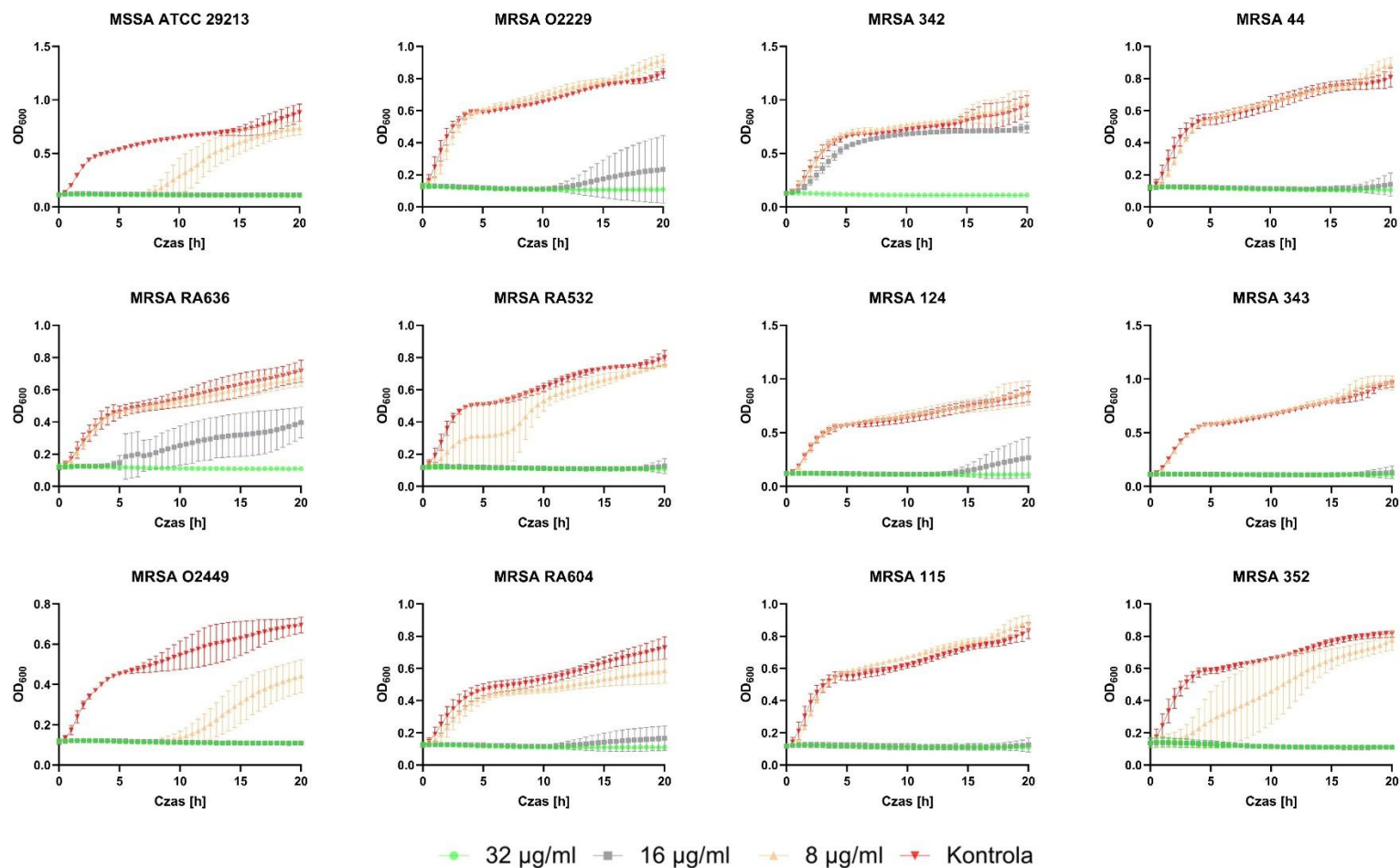
Rysunek 31. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-76 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).



Rysunek 32. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-238 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).



Rysunek 33. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-241 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).



Rysunek 34. Krzywe wzrostu szczepów *S. aureus* w obecności peptydomimetyku A-243 w różnych stężeniach. Wzrost monitorowano przez pomiar gęstości optycznej przez 20 h. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z sześciu powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).

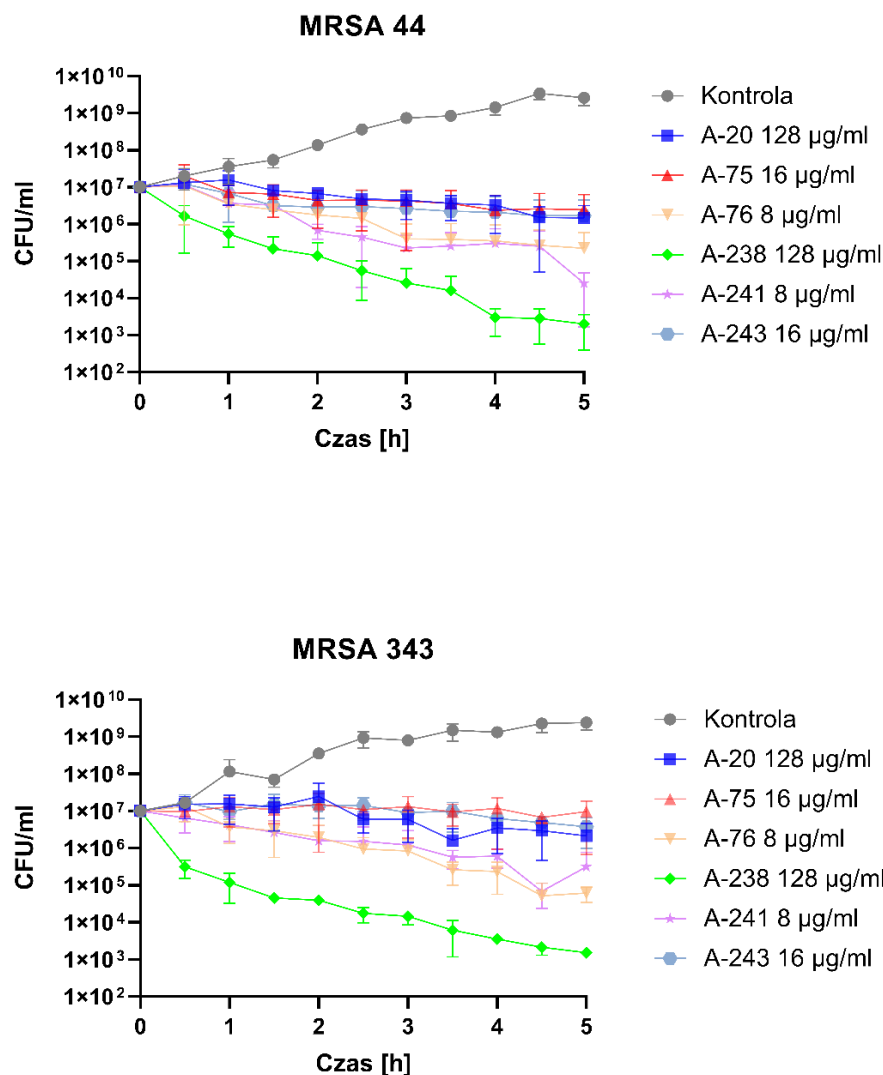
Monitorowanie zmian gęstości optycznej hodowli bakteryjnej (OD_{600}) jest powszechnie stosowaną metodą oceny aktywności przeciwbakteryjnej nowych związków, w tym peptydów i peptydomimetyków [207]. Metoda ta jest szeroko wykorzystywana w badaniach nad nowymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi ze względu na prostotę wykonania oraz możliwość prowadzenia pomiarów na mikropłytkach.

3.4. Ocena wpływu peptydomimetyków na przeżywalność szczepów

MRSA metodą oznaczania CFU/ml

Do dalszych analiz wybrałam dwa szczepy szpitalne MRSA 44 oraz MRSA 343, które pochodzą z materiału klinicznego i lepiej odzwierciedlają problem zakażeń wywoływanych przez MRSA niż szczepy laboratoryjne. Dlatego przeprowadziłam oznaczenie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) (Rysunek 35), co umożliwiło pogłębienie analizy wpływu badanych związków na przeżywalność bakterii.

Stężenia peptydomimetyków zastosowane w oznaczeniu CFU/ml dobrałam na podstawie wyników badań wstępnych. Najsilniejsze działanie (największą redukcję CFU/ml) zaobserwowałam dla peptydomimetyku A-238, jednak efekt ten występował przy stosunkowo wysokim stężeniu wynoszącym 128 $\mu\text{g/ml}$. Po 5 h inkubacji zaobserwowałam zmniejszenie liczby żywych komórek bakteryjnych zdolnych do tworzenia kolonii o około 4 rzędy wielkości. Pozostałe analogi również wykazywały zdolność do redukcji komórek bakteryjnych, jednak w mniejszym stopniu niż A-238. Związek A-20 cechował się słabym działaniem, pomimo zastosowania dość wysokiego stężenia.



Rysunek 35. Analiza kinetyki przeżywalności szczepów MRSA 44 i 343 w obecności peptydomimetyków w różnych stężeniach. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).

Oznaczenie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) przeprowadziłam dla dwóch reprezentatywnych szczepów MRSA. W przeciwieństwie do pomiarów gęstości optycznej, które odzwierciedlają jedynie zmiany mętności hodowli, oznaczenie CFU/ml umożliwia ocenę liczby żywych komórek bakteryjnych zachowujących zdolność do wzrostu i tworzenia kolonii na podłożu stałym [208], [209]. Dzięki temu metoda ta pozwala na bardziej precyzyjną weryfikację, czy obserwowane zahamowanie wzrostu rzeczywiście wiąże się ze zmniejszeniem liczby żywych komórek bakteryjnych.

Badania przeprowadziłam w większej objętości pożywki BHI niż poprzednie eksperymenty wykonywane na płytkach 96-dołkowych. Takie warunki umożliwiały prowadzenie hodowli w układzie objętościowym, zapewniały większą dostępność

składników odżywczych oraz ograniczały wpływ czynników technicznych charakterystycznych dla mikropłytek, takich jak parowanie czy efekt brzegowy. Doświadczenie przeprowadziłam dla dwóch szczepów, ponieważ jego celem nie była ponowna ocena spektrum aktywności badanych peptydomimetyków, lecz potwierdzenie obserwowanego wcześniej efektu przeciwbakteryjnego z wykorzystaniem metody umożliwiającej bardziej bezpośrednią ocenę przeżywalności bakterii.

3.5. Ocena termostabilności wybranych peptydomimetyków na podstawie ich aktywności przeciwbakteryjnej

W celu oceny stabilności badanych peptydomimetyków po ekspozycji na podwyższoną temperaturę oraz określenia, czy po ekspozycji na takie warunki zachowują one aktywność przeciwbakteryjną przeprowadziłam badania termostabilności.

Wartości MIC oraz MBC wybranych peptydomimetyków po ich inkubacji w 70 oraz 90 °C wobec szczepu *S. aureus* ATCC 29213 przedstawiłam w Tabeli 6 oraz wobec szczepu *S. pyogenes* ATCC 19615 w Tabeli 7. Uzyskane wyniki wskazują, że większość badanych związków zachowała aktywność przeciwdrobnoustrojową po ekspozycji na podwyższoną temperaturę. Dla analogów A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243 wartości MIC i MBC po inkubacji w temperaturze 70 °C lub 90 °C były takie same lub różniły się nieznacznie od wartości wyznaczonych dla próbek niepoddanych inkubacji termicznej.

Największe zmiany zaobserwowałam dla związku wyjściowego A-20, dla którego po inkubacji w podwyższonej temperaturze wartości MIC i/lub MBC były wyższe niż dla próbki kontrolnej. Nie wskazuje to jednak na całkowitą utratę aktywności przeciwbakteryjnej, lecz raczej na częściowe obniżenie aktywności A-20 po ekspozycji na temperaturę 70 °C lub 90 °C. W przypadku pozostałych badanych analogów aktywność przeciwbakteryjna została zasadniczo zachowana, co sugeruje ich dobrą stabilność termiczną w zastosowanych warunkach doświadczenia.

Lepsze zachowanie aktywności przez analogi A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243 może wynikać z korzystnych modyfikacji strukturalnych wprowadzonych względem A-20. Mogły one sprzyjać stabilizacji cząsteczek poprzez dodatkowe oddziaływania wodorowe, jonowe lub hydrofobowe, ograniczając ich podatność na zmiany pod wpływem podwyższonej temperatury. Mechanizm ten nie był jednak bezpośrednio badany i wymagałby dalszej weryfikacji, np. z wykorzystaniem metod analizy strukturalnej lub modelowania molekularnego [210], [211].

Tabela 6. Wartości MIC oraz MBC wybranych peptydomimetyków wobec szczepu *S. aureus* ATCC 29213 po inkubacji związków w temperaturze 70 °C oraz 90 °C.

Analog	<i>S. aureus</i> ATCC 29213					
	MIC [μg/ml]	MIC [μg/ml]	MIC [μg/ml]	MBC [μg/ml]	MBC [μg/ml]	MBC [μg/ml]
		70 °C	90 °C		70 °C	90 °C
A-20	32	64	32	32	64	64
A-75	8	8	8	16	8	8
A-76	4	4	4	4	4	4
A-238	16	16	16	16	16	16
A-241	4	4	4	8	8	8
A-243	8	8	8	8	16	8

Tabela 7. Wartości MIC oraz MBC wybranych peptydomimetyków wobec szczepu *S. pyogenes* ATCC 19615 po inkubacji związków w temperaturze 70 °C oraz 90 °C.

Analog	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615					
	MIC [μg/ml]	MIC [μg/ml]	MIC [μg/ml]	MBC [μg/ml]	MBC [μg/ml]	MBC [μg/ml]
		70 °C	90 °C		70 °C	90 °C
A-20	8	32	32	16	32	32
A-75	16	8	8	32	16	16
A-76	2	4	44	4	4	4
A-238	16	16	16	16	16	16
A-241	4	4	4	4	4	4
A-243	8	8	8	8	8	8

4. Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków w wodzie i ludzkim osoczu

Oprócz wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej istotną cechą potencjalnych chemioterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych jest odpowiednia stabilność chemiczna i metaboliczna. W celu sprawdzenia degradacji wybranych peptydomimetyków poddałam ocenie stabilności w środowisku wodnym w celu potwierdzenia, że nie ulegają one samoistnemu rozpadowi w warunkach stosowanych podczas badań chemicznych i

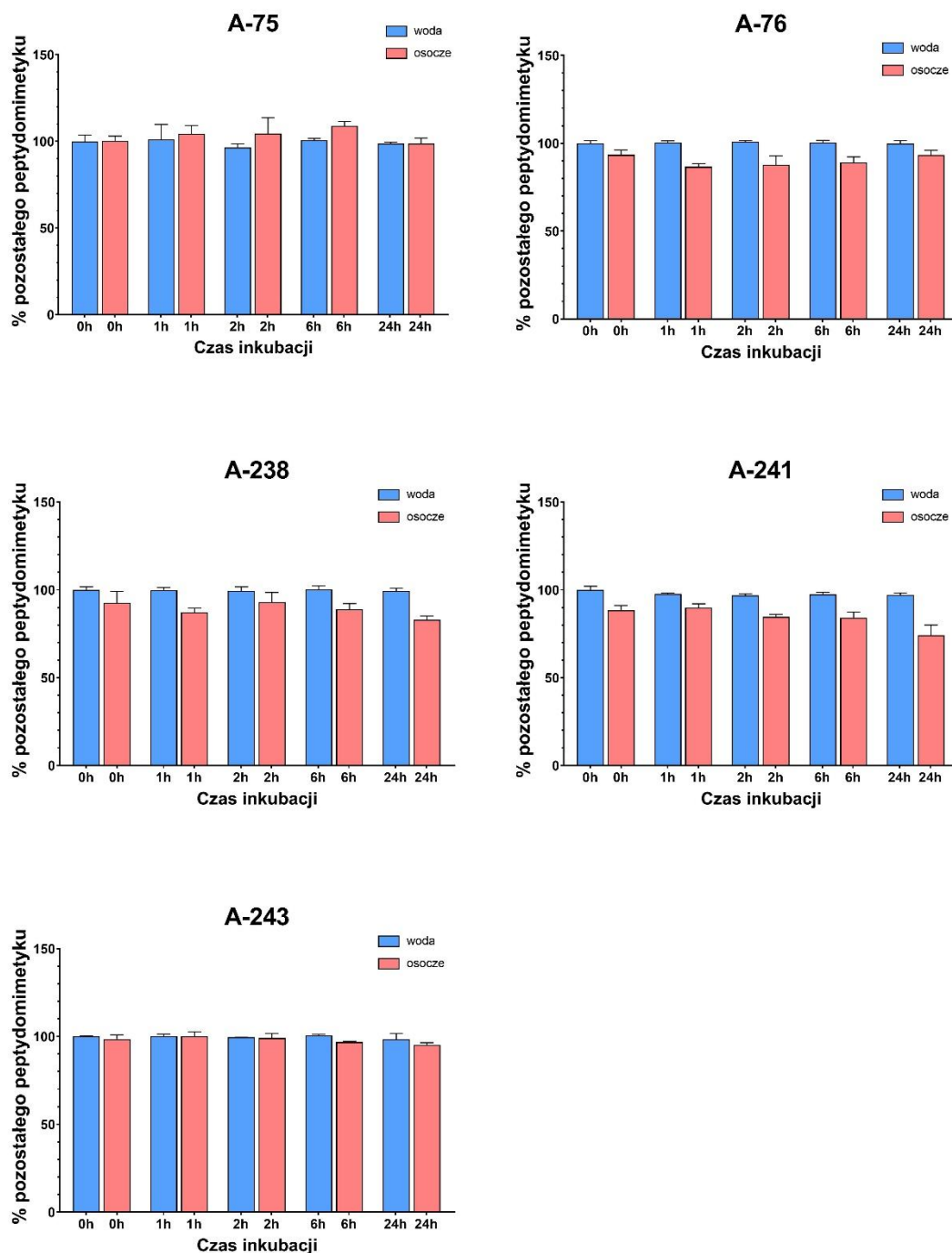
mikrobiologicznych. Natomiast w celu określenia wrażliwości związków na degradację proteolityczną oraz oceny potencjalnych właściwości farmakokinetycznych zbadalam ich stabilność w ludzkim osoczu.

Badania przeprowadziłam poprzez inkubację związków w wodzie i osoczu w 37 ° C. Próbkę pobierałam po 0, 1, 2, 6 i 24 h, a zawartość związków w próbce oznaczałam za pomocą HPLC.

Wszystkie analizowane peptydomimetyki wykazały wysoką stabilność w wodzie (Rysunek 36), zachowując po 24 h ponad 97% początkowej zawartości. Natomiast w warunkach biologicznych stabilność była bardziej zróżnicowana. Największą odporność na proteazy zawarte w osoczu wykazały związki A-75 oraz A-243, których stabilność była bliska 100% w każdym badanym czasie inkubacji. Spadkiem stabilności na poziomie ~90% cechował się związek A-76. W przypadku peptydomimetyków A-238 oraz szczególnie A-241 widoczna była stopniowa degradacja, osiągając odpowiednio po 24 h ~80% oraz ~75% wartości początkowej. Stabilność związku A-20 została wcześniej zbadana i przedstawiona w literaturze [129], gdzie wykazano jego wysoką trwałość zarówno w wodzie, jak i w osoczu.

Zróżnicowana stabilność związków w ludzkim osoczu może wynikać nie tylko z podatności na degradację enzymatyczną, lecz także z ich odmiennego powinowactwa do białek surowicy, zwłaszcza albuminy [212], [213]. Wiązanie peptydomimetyków z białkami może potencjalnie wpływać na odzysk związku po strącaniu białek acetonitrylem, a tym samym na obserwowane zmiany pola powierzchni pików chromatograficznych [214].

Wysoka stabilność badanych peptydomimetyków zarówno w środowisku wodnym oraz ich stosunkowo dobra stabilność w ludzkiej surowicy mogą być związane z obecnością niestandardowych elementów strukturalnych, takich jak zredukowany izoster wiązania peptydowego oraz rozbudowane fragmenty hydrofobowych, które mogą ograniczać dostęp enzymów proteolitycznych do podatnych miejsc cząsteczki. W literaturze opisano wiele strategii poprawy stabilności peptydów, obejmujących modyfikacje końców cząsteczki, zmianę szkieletu peptydowego, wprowadzanie nietypowych reszt aminokwasowych [215].



Rysunek 36. Wykresy stabilności peptydomimetyków: A-75, A-76, A-238, A-241, A-243 w wodzie oraz ludzkim osoczu. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z trzech niezależnych powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD).

Przeprowadzone badania wykazały, że wybrane pochodne związku A-20 zachowują wysoką stabilność w środowisku wodnym oraz zróżnicowaną, ale nadal znaczną stabilność w ludzkim osoczu. Szczególne znaczenie ma odporność na degradację w osoczu, które zawiera liczne enzymy hydrolityczne zdolne do rozkładu wielu związków peptydowych. Warto podkreślić, że AMPs często charakteryzują się słabą stabilnością w warunkach

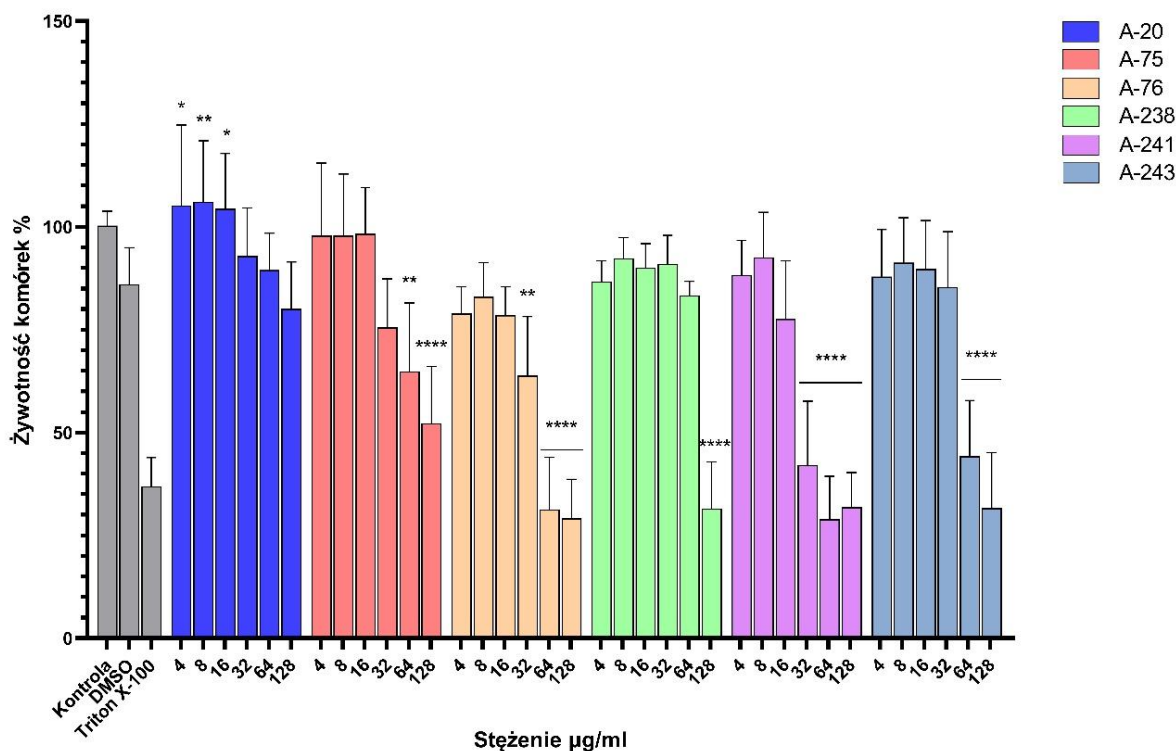
fizjologicznych [216], [217]. Uzyskane wyniki wskazują, że badane peptydomimetyki w znacznym stopniu ograniczają ten problem, co stanowi jedną z istotnych zalet tej grupy związków i wspiera ich dalszą ocenę jako potencjalnych kandydatów terapeutycznych.

5. Badania komórkowe

5.1. Wpływ wybranych peptydomimetyków na przeżywalność komórek linii HaCaT

Ze względu na częstą obecność szczepów *S. aureus* na powierzchni skóry oraz ich udział w zakażeniach skóry i ran, przeprowadziłam ocenę cytotoksyczności wybranych zsyntezowanych związków wobec ludzkiej skórnej linii keratynocytów HaCaT.

W większości przypadków wraz ze wzrostem stężenia peptydomimetyku obserwowałam spadek żywotności komórek (Rysunek 37). Najniższą cytotoksyczność wykazywały peptydomimetyki A-20 i A-238. W przypadku A-238 istotne obniżenie żywotności komórek zaobserwowałam dopiero przy najwyższym badanym stężeniu 128 µg/ml. Związek A-75 zaczynał obniżać żywotność komórek przy stężeniu około 32 µg/ml, natomiast A-76 i A-241 wykazywały wyraźniejszy efekt cytotoksyczny w zakresie 32–128 µg/ml. Dla związku A-243 żywotność komórek pozostawała na stosunkowo wysokim poziomie w zakresie stężeń aktywnych przeciwbakteryjnie. W zakresie 4–16 µg/ml żaden z badanych peptydomimetyków nie powodował istotnego obniżenia żywotności komórek HaCaT.



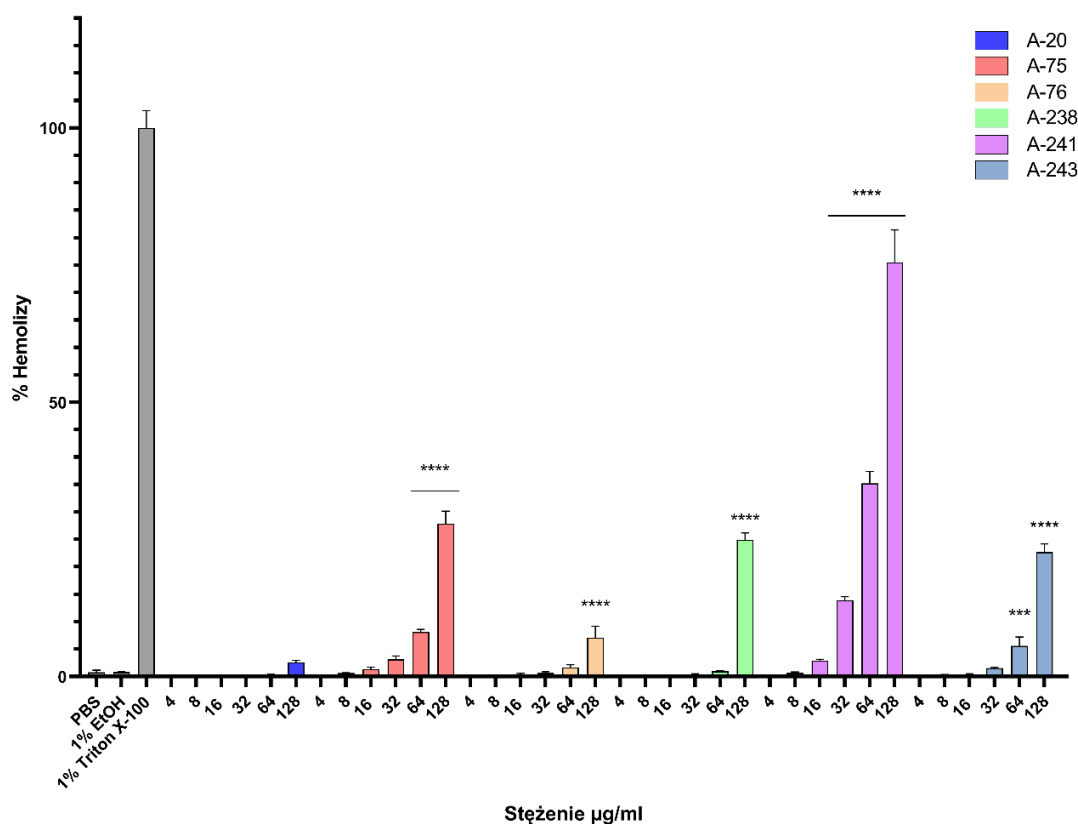
Rysunek 37. Cytotoksyczność peptydomimetyków A-20, A-75, A-76, A-238, A-241, A-243 wobec linii komórkowej HaCaT po 24 h inkubacji. Procent żywotności komórek obliczyłam względem kontroli negatywnej (komórki nietraktowane). Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna ($n=9$) $\pm$ odchylenia standardowe (SD). Analizę statystyczną wykonałam metodą one-way ANOVA, gdzie * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

Jednym z głównych wyzwań w rozwoju peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest zachowanie równowagi pomiędzy wysoką aktywnością przeciwbakteryjną a niską toksycznością wobec komórek gospodarza [79], [218]. Z tego względu przeprowadziłam badania cytotoksyczności wobec ludzkich keratynocytów. Uzyskane wyniki wykazały, że badane związki nie wywierały działania cytotoksycznego w zakresie stężeń odpowiadających wartościom MIC wyznaczonym dla szczepów MRSA. Wyniki te sugerują korzystną selektywność działania badanych peptydomimetyków wobec komórek bakteryjnych w porównaniu z komórkami HaCaT, szczególnie w zakresie stężeń aktywnych przeciwbakteryjnie. Jednocześnie obserwowane obniżenie żywotności komórek przy wyższych stężeniach, zwłaszcza dla A-76 i A-241, wskazuje na konieczność uwzględnienia zakresu terapeutycznego przy dalszej ocenie tych związków.

5.2. Ocena aktywności hemolitycznej wybranych peptydomimetyków

W celu dodatkowej oceny bezpieczeństwa badanych peptydomimetyków przeprowadziłam analizę ich aktywności hemolitycznej wobec ludzkich erytrocytów. Czerwone krwinki stanowią prosty model uszkodzenia błon komórek eukariotycznych, dlatego ich uszkodzenie może wskazywać na nieswoiste, błonowo-destabilizujące działanie badanych związków. Wysoki poziom hemolizy wskazuje na potencjalnie wysoką toksyczność wobec komórek eukariotycznych, natomiast jej niski poziom, szczególnie w zakresie stężeń aktywnych przeciwbakteryjnie, świadczy o bezpieczeństwie i selektywności działania.

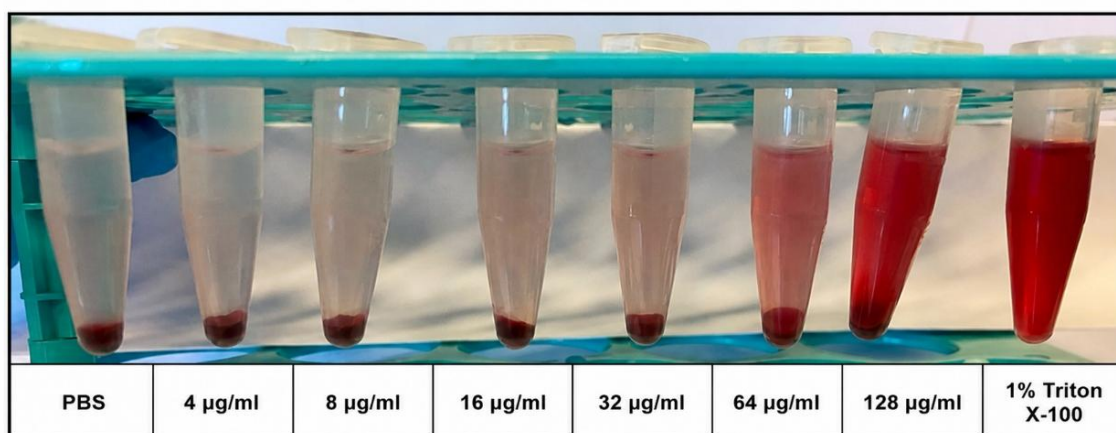
Związek A-20 nie wykazywał istotnego potencjału hemolitycznego w żadnym z badanych stężeń (Rysunek 38). Jego analogi nie wykazywały działania hemolitycznego w zakresie stężeń od 4 do 32 $\mu\text{g/ml}$. Peptydomimetyki A-75 oraz A-243 powodowały jedynie niewielką hemolizę w stężeniu 64 $\mu\text{g/ml}$, związek A-238 indukował hemolizę jedynie w najwyższym badanym stężeniu, tj. 128 $\mu\text{g/ml}$. Analog A-241 wykazywał wyraźniejszy potencjał hemolityczny wobec erytrocytów przy stężeniu powyżej 32 $\mu\text{g/ml}$.



Rysunek 38. Aktywność hemolityczna związku A-20 i jego analogów po 2 h inkubacji. Procent hemolizy obliczono względem kontroli pozytywnej (1% roztwór Triton X-100). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia

standardowe (SD). Analizę statystyczną wykonano metodą one-way ANOVA, gdzie * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Na Rysunku 39 przedstawiłam przykładowe zdjęcie próbek po inkubacji ze związkiem A-75. Stopień zabarwienia supernatantu odzwierciedla poziom hemolizy i uwolnienia hemoglobiny. W próbie kontrolnej negatywnej (PBS) nie odnotowałam hemolizy, natomiast w kontroli pozytywnej (1% Triton X-100) zaobserwowałam całkowitą hemolizę.



Rysunek 39. Przykładowe zdjęcie próbek po inkubacji z peptydomimetykiem A-75. Intensywność zabarwienia supernatantu odzwierciedla stopień hemolizy i ilość uwolnionej hemoglobiny.

Analiza aktywności hemolitycznej jest standardowym etapem charakterystyki nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, ponieważ wiele peptydów przeciwdrobnoustrojowych, pomimo wysokiej aktywności wobec bakterii, może wykazywać zdolność do uszkodzania komórek gospodarza [219], [220]. Wynika to zwykle z różnic w składzie i ładunku błon bakteryjnych oraz eukariotycznych, a także z równowagi między kationowością, hydrofobowością i amfipatycznością cząsteczki [221]. W literaturze przedstawiono, że dla α -helikalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych wzrost hydrofobowości może zwiększać aktywność hemolityczną, natomiast aktywność przeciwbakteryjna zwykle wymaga optymalnego, a nie maksymalnego poziomu hydrofobowości [222].

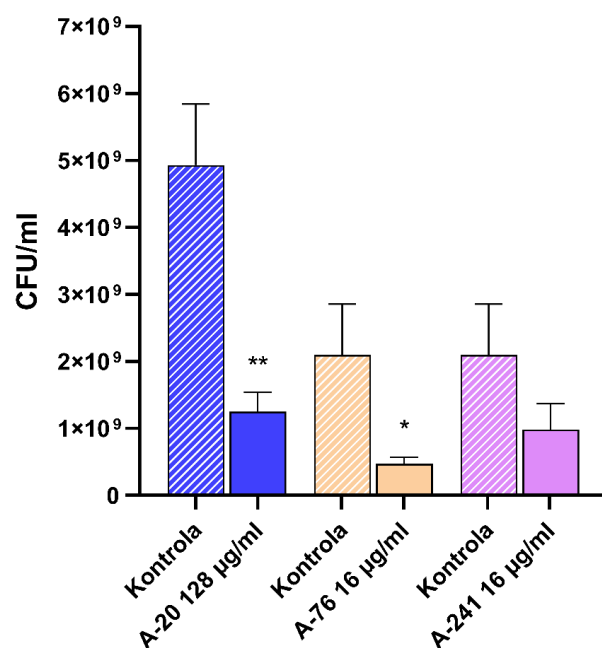
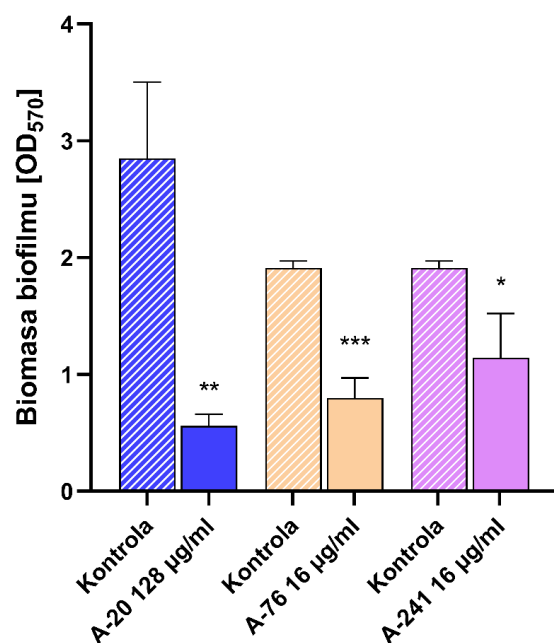
Uzyskane wyniki wykazały, że badane związki nie powodowały istotnej hemolizy w zakresie stężeń odpowiadających wartościom MIC wyznaczonym wobec szczepów MRSA, tak jak w przypadku badania cytotoksyczności. Jednocześnie wzrost hemolizy przy wyższych stężeniach, zwłaszcza dla związku A-241, wskazuje na konieczność dalszej oceny zakresu terapeutycznego oraz bezpieczeństwa tego związku.

6. Ocena zdolności wybranych peptydomimetyków do redukcji biofilmu MRSA

Kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie, czy otrzymane peptydomimetyki są zdolne do redukcji biofilmu utworzonego przez szczep bakterii MRSA 44. Biofilm stanowi wyzwanie terapeutyczne, ponieważ komórki występujące w tej formie wykazują znacznie większą oporność na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych niż komórki planktoniczne analizowane w poprzednich doświadczeniach. W literaturze wskazuje się, że komórki w biofilmie mogą być nawet 10-1000 razy mniej wrażliwe na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowych niż komórki planktoniczne [223]. Rysunek 40

Do badań wybrałam związek wyjściowy A-20 oraz dwa analogi o najwyższej aktywności przeciwbakteryjnej, A-76 i A-241. Ze względu na zwiększoną tolerancję komórek biofilmowych związki zastosowałam w stężeniach odpowiadających $2 \times \text{MIC}$, wyznaczonych wcześniej metodą pomiaru gęstości optycznej w czasie. Należy jednak podkreślić, że ze względu na różnice w wartościach MIC nominalne stężenie A-20 było 8-krotnie wyższe niż stężenie A-76, dlatego bezpośrednie porównanie siły działania tych związków wymaga uwzględnienia zastosowanych stężeń.

Wpływ peptydomimetyków na biofilm oceniłam dwiema metodami: barwieniem fioletem krystalicznym, które umożliwia ocenę całkowitej biomasy biofilmu, oraz oznaczeniem liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml), pozwalającym określić liczbę żywych komórek bakteryjnych zdolnych do wzrostu na podłożu stałym. Uzyskane wyniki wykazały, że badane związki zmniejszały zarówno biomasę biofilmu, jak i liczbę żywych komórek bakteryjnych w biofilmie MRSA 44 (Rysunek 40). Najsilniejszą redukcję obserwowałam dla A-20 i A-76, przy czym interpretacja tego efektu wymaga uwzględnienia różnic w zastosowanych stężeniach obu związków.



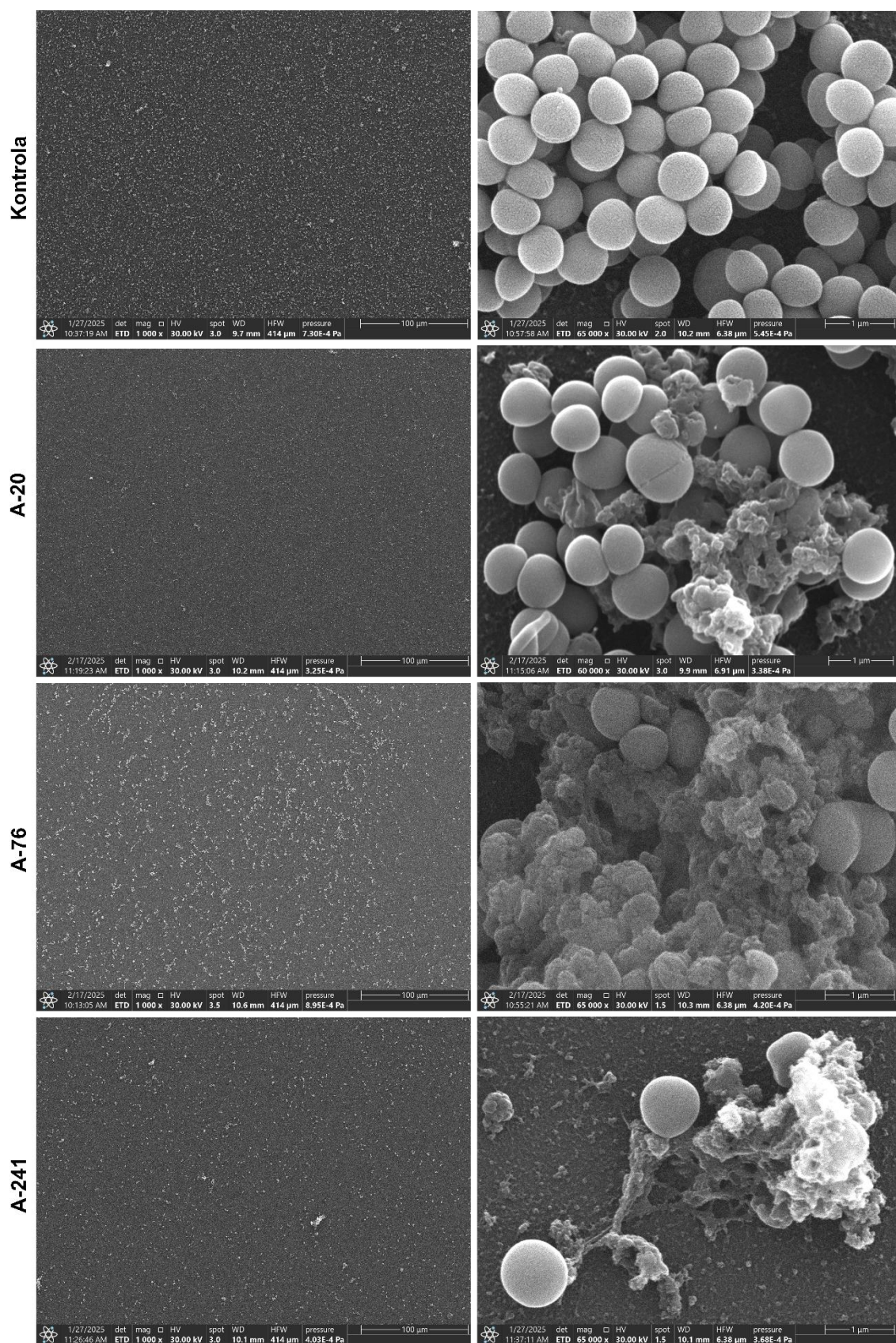
Rysunek 40. Redukcja biofilmu MRSA 44 przez A-20 oraz jego analogi A-76 i A-241, oznaczona metodą barwienia fioletem krystalicznym (A) oraz poprzez pomiar CFU/ml (B). Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe (SD). Statystykę wykonano testem t-Studenta, porównując uzyskane wyniki względem nietraktowanej kontroli, gdzie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dodatkowym potwierdzeniem wpływu peptydomimetyków na biofilm były obserwacje wykonane metodą SEM, których wyniki przedstawiłam na Rysunek 41. W

próbkach traktowanych peptydomimetykami obserwowałam zmniejszenie liczby komórek przytwierdzonych do powierzchni oraz mniej zwartą strukturę komórek bakteryjnych w porównaniu do próby kontrolnej. Przedstawione obrazy z SEM wskazują, że otrzymany biofilm znajdował się prawdopodobnie we wczesnej fazie wzrostu. Obrazy uzyskane dla próbek poddanych działaniu peptydomimetyków wskazują na obecność nieregularnych struktur, które mogą odpowiadać pozostałościom uszkodzonych komórek bakteryjnych, podczas gdy w próbie kontrolnej komórki zachowywały regularny, kulisty kształt, charakterystyczny dla *S. aureus*.

Biofilm bakteryjny jest złożoną strukturą, której właściwości zależą od wielu czynników, takich jak szczep bakterii, warunki hodowli, skład pożywki, rodzaj powierzchni czy czas inkubacji [224], [225]. Ponadto zdolność do tworzenia biofilmu może znacząco różnić się pomiędzy poszczególnymi izolatami *S. aureus* [226]. Wraz z dojrzewaniem biofilmu dochodzi do zmian w jego organizacji oraz składzie macierzy zewnątrzkomórkowej, co może wpływać na skuteczność działania substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Przeprowadzony eksperyment wskazuje, że badane związki są zdolne do redukcji biomasy biofilmu oraz liczby żywych komórek bakteryjnych w biofilmie utworzonym przez szczep MRSA 44. Wyniki te wskazują na obiecujący potencjał przeciwbiofilmowy A-20 oraz jego przebadanych analogów (A-76 i A-241) w zastosowanym modelu doświadczalnym. Ze względu na to, że badania przeprowadziłam dla jednego szczepu MRSA i w określonych warunkach tworzenia biofilmu, uzyskane wyniki należy traktować jako wstępną charakterystykę działania przeciwbiofilmowego. Dalsze badania obejmujące większy panel izolatów MRSA oraz biofilm na różnych etapach dojrzewania pozwoliłyby pełniej ocenić zakres tego działania.



Rysunek 41. Obrazy mikroskopowe (SEM) biofilmu wytworzonego przez bakterie MRSA 44 nietraktowanego (kontrola) oraz traktowanego peptydomimetykami A-20 w stężeniu 128 μ g/ml, A-76 i A-241 w stężeniu 16 μ g/ml.

Zastosowanie kilku metod oceny biofilmu pozwala odróżnić wpływ związków na biomasę biofilmu, liczbę żywych komórek oraz architekturę struktury biofilmowej. Barwienie fioletem krystalicznym informuje głównie o całkowitej biomase biofilmu, oznaczenie CFU/ml o przeżywalności komórek, natomiast SEM pozwala jakościowo ocenić zaburzenia struktury biofilmu. Ocena aktywności przeciwbiofilmowej wymaga uwzględnienia różnych parametrów opisujących strukturę i żywotność biofilmu, ponieważ sama redukcja biomasy nie musi oznaczać zmniejszenia liczby żywych komórek, a spadek CFU/ml nie musi w pełni odzwierciedlać zmian zachodzących w macierzy biofilmowej. W literaturze dostępne są liczne przykłady badań, w których aktywność przeciwbiofilmową również analizowano z zastosowaniem kilku niezależnych metod badawczych, pozwalających na ocenę zarówno biomasy biofilmu, jak i żywotności komórek oraz zmian jego struktury [227], [228].

7. Analiza mechanizmu działania wybranych peptydomimetyków w komórkach MRSA

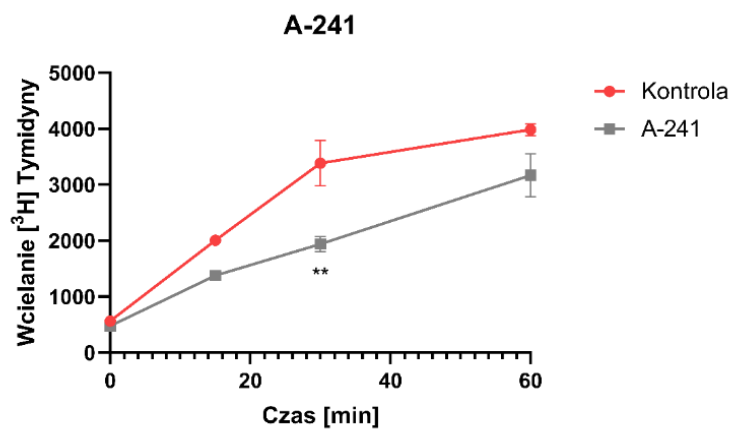
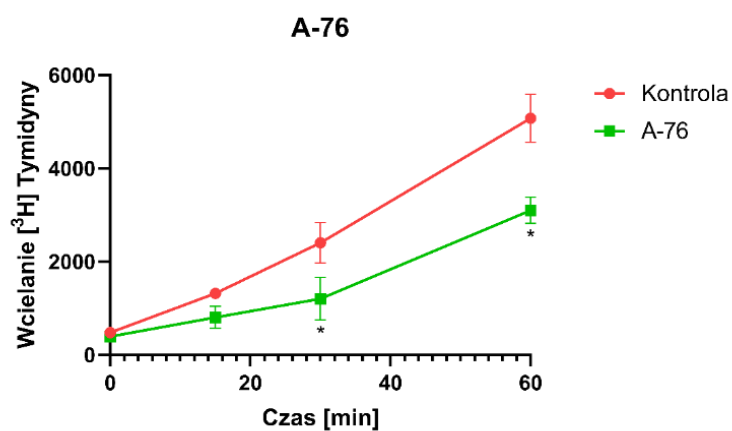
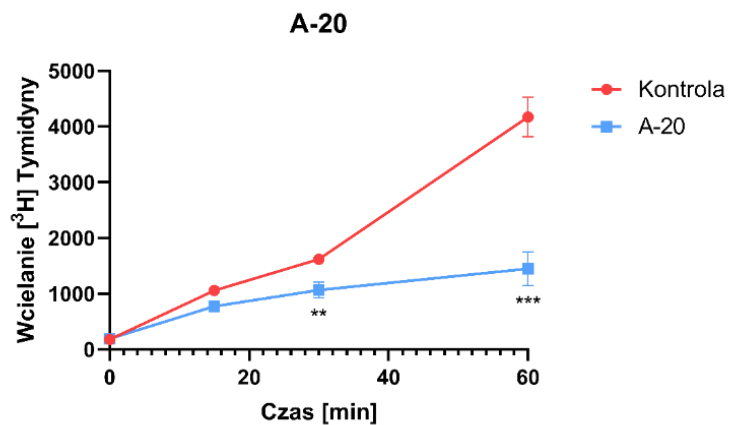
Celem określenia potencjalnego mechanizmu działania cząsteczki A-20 i jej analogów A-76 i A-241, oceniłam ich wpływ na podstawowe procesy biosyntetyczne zachodzące w komórkach bakteryjnych szczepu MRSA 44. Syntezę DNA, RNA oraz białek analizowałam z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanych prekursorów, stosując odpowiednio [³H]tymidynę, [³H]urydynę oraz [³H]leucynę. Badania prowadziłam przy zastosowaniu stężeń odpowiadających ½ wartości MIC dla każdego związku, co umożliwiała zachowanie wzrostu komórek bakteryjnych, a jednocześnie pozwoliło ocenić wpływ badanych związków na przebieg wymienionych procesów.

Analiza uzyskanych wyników przedstawionych na Rysunkach 42-44 wykazała, że związki A-20 i A-76 wyraźnie hamowały inkorporację [³H]tymidyny oraz [³H]urydyny, co wskazuje na ograniczenie syntezy DNA oraz RNA w komórkach bakteryjnych. Podobny efekt obserwowałam dla analogu A-241, ale stopień inhibicji był słabszy. Odminną aktywność zaobserwowałam dla procesu translacji. Związek A-20 wykazywał niewielki wpływ hamujący na inkorporację [³H]leucyny (synteza białek), podczas gdy pozostałe badane analogi 76 i A-241 nie powodowały wyraźnego ograniczenia tego procesu.

Silniejsze zahamowanie inkorporacji [³H]tymidyny i [³H]urydyny niż [³H]leucyny wskazuje, że badane peptydomimetyki w większym stopniu zaburzają procesy związane z syntezą kwasów nukleinowych niż biosyntezę białka. Efekt ten może mieć charakter

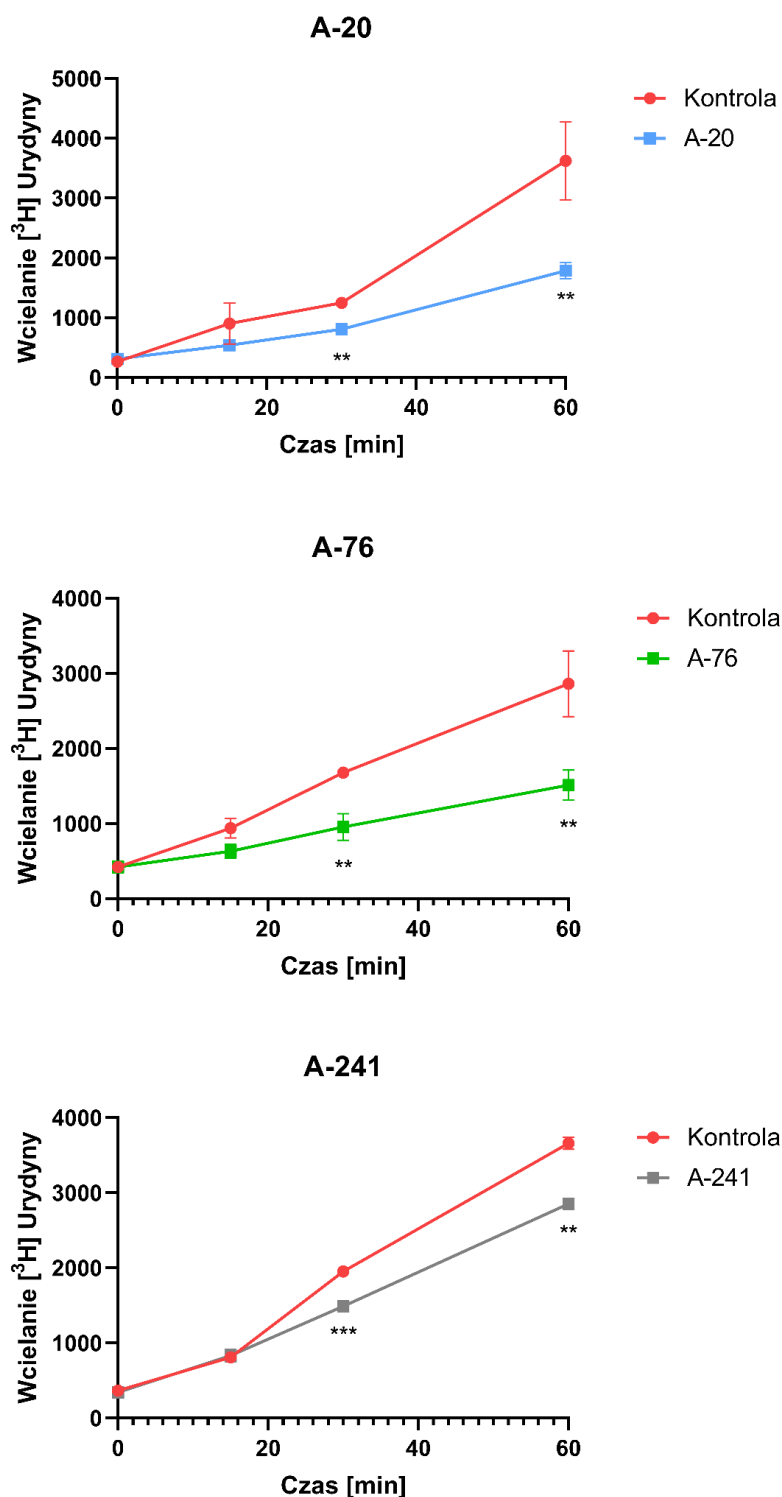
wtórny wobec zaburzeń integralności osłon komórkowych, zmian przepuszczalności błony lub zaburzenia homeostazy komórkowej, ale może również wskazywać na udział procesów wewnątrzkomórkowych związanych z replikacją DNA lub transkrypcją RNA. Brak wyraźnego hamowania syntezy białek przez A-76 i A-241 sugeruje, że rybosom bakteryjny prawdopodobnie nie stanowi głównego miejsca działania tych analogów. Wyniki te wspierają hipotezę o złożonym i wieloetapowym mechanizmie działania, obejmującym zarówno oddziaływanie z osłonami komórkowymi bakterii, jak i zakłócenie wybranych procesów metabolicznych wewnątrz komórki MRSA.

Pomimo podobieństw strukturalnych pomiędzy badanymi peptydomimetykami zaobserwowałam różnice w sile hamowania biosyntezy kwasów nukleinowych. Przeprowadzony eksperyment sugeruje, że nawet niewielkie modyfikacje strukturalne mogą wpływać na oddziaływanie peptydomimetyków z komórką bakteryjną.



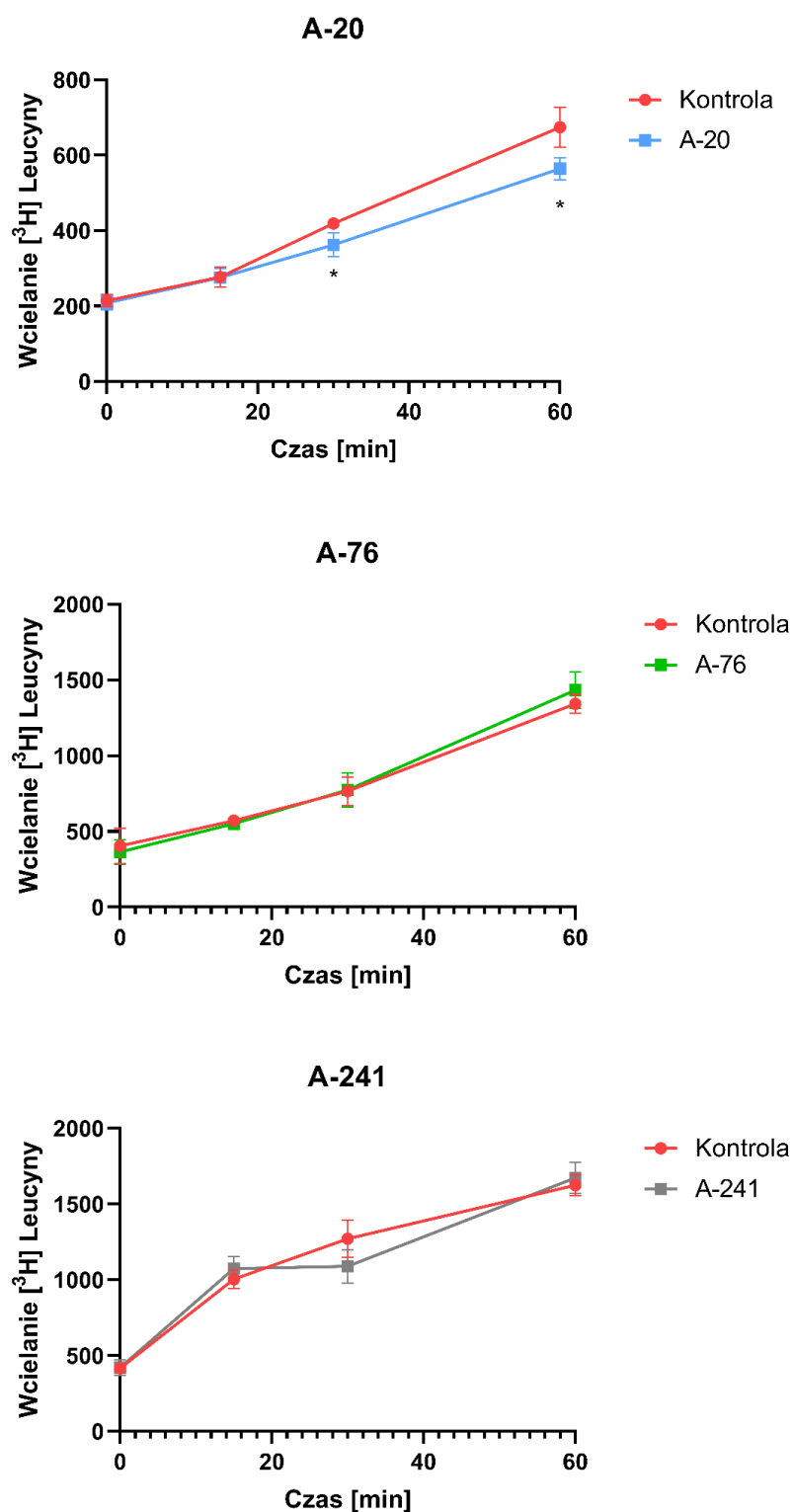
Rysunek 42. Kinetyka syntezy DNA w komórkach bakterii MRSA 44 w obecności A-20 w stężeniu 32 $\mu\text{g/ml}$ i jego analogów A-76 oraz A-241 w stężeniach 16 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe

(SD). Statystykę wykonano testem t-Studenta, porównując uzyskane wyniki względem kontroli nietraktowanej peptydomimetykiem; gdzie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Rysunek 43. Kinetyka syntezy RNA w komórkach bakterii MRSA 44 w obecności A-20 w stężeniu 32 $\mu\text{g/ml}$ i jego analogów A-76 oraz A-241 w stężeniach 16 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia standardowe

(SD). Statystykę wykonano testem t-Studenta, porównując uzyskane wyniki względem kontroli nietraktowanej peptydomimetykiem; gdzie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

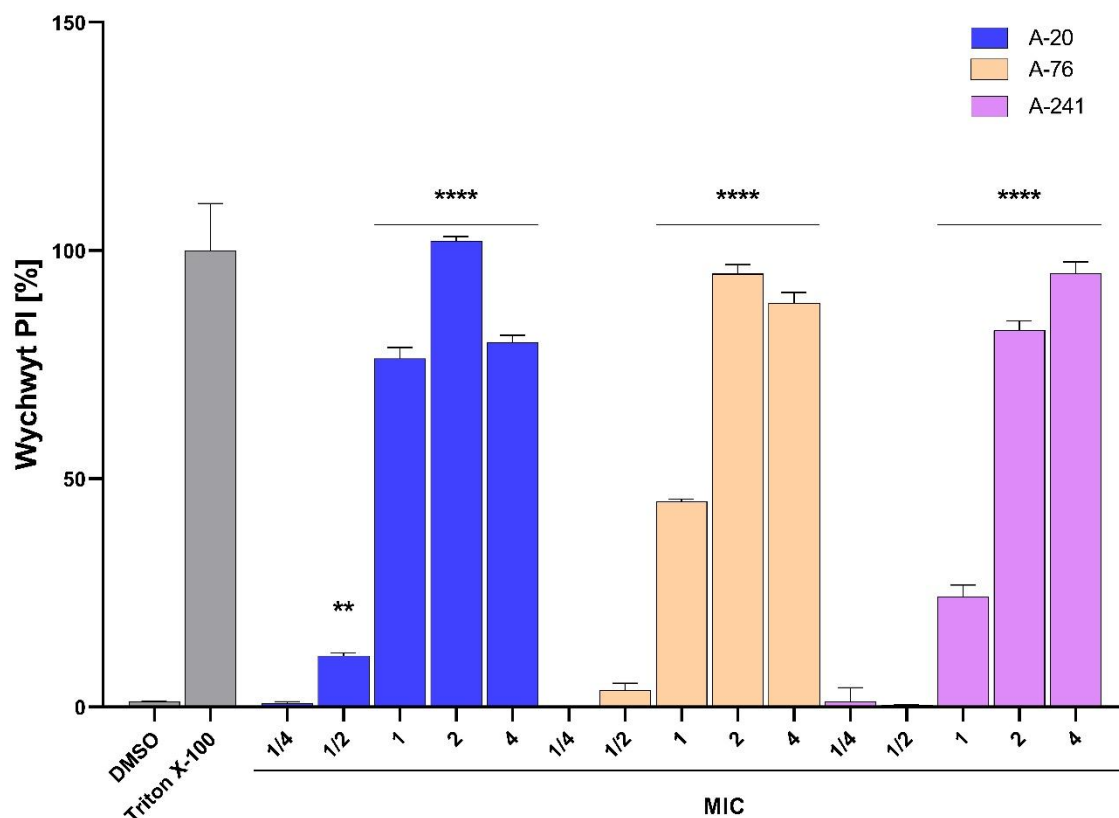


Rysunek 44. Kinetyka syntezy białek w komórkach bakterii MRSA 44 w obecności A-20 w stężeniu 32 $\mu\text{g/ml}$ i jego analogów A-76 oraz A-241 w stężeniach 16 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń $\pm$ odchylenia

standardowe (SD). Statystykę wykonano testem t-Studenta, porównując uzyskane wyniki względem kontroli nietraktowanej peptydomimetykiem; gdzie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

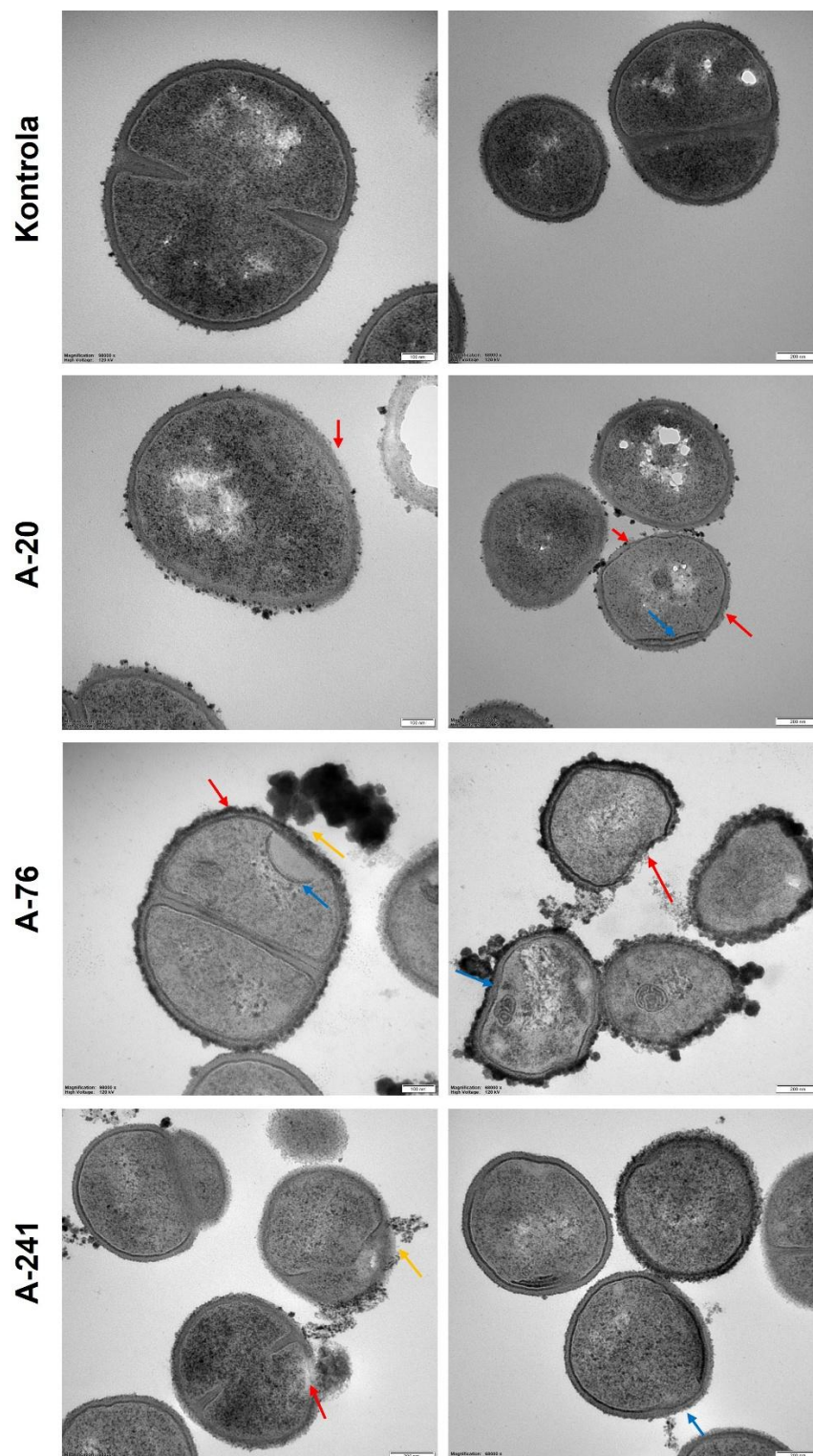
Przeprowadziłam również ocenę wpływu wybranych peptydomimetyków na integralność wewnętrznej błony komórkowej (błony cytoplazmatycznej) szczepu MRSA 44 za pomocą testu wychwyty jodku propidyny (PI) (Rysunek 45). PI jest barwnikiem, który przenika głównie do komórek o zaburzonej integralności błony cytoplazmatycznej. Po związaniu z DNA obserwuje się wzrost sygnału fluorescencji, dlatego zwiększenie sygnału PI traktowałam jako wskaźnik przepuszczalności komórek bakteryjnych. Badania wykonałam dla stężeń odpowiadających $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 oraz 4 razy wartości MIC, co miało umożliwić ocenę zależności pomiędzy stężeniem peptydomimetyku a stopniem destabilizacji błony komórkowej.

Badane analogi nie powodowały istotnej destabilizacji błony cytoplazmatycznej w najniższych stężeniach ($\frac{1}{4}$ i $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$). Wzrost sygnału fluorescencji obserwowałam dopiero przy stężeniu odpowiadającym MIC, jednak efekt ten był umiarkowany (w przypadku A-76 i A-241). Wyrażna destabilizacja błony następowała przy stężeniach $2 \times \text{MIC}$ i $4 \times \text{MIC}$, dla których obserwowałam znaczny wzrost fluorescencji względem kontroli. Może to wskazywać, że przy niższych stężeniach badane peptydomimetyki nie osiągały ilości niezbędnej do istotnego zaburzenia integralności błony cytoplazmatycznej lub oddziaływały przede wszystkim z innymi strukturami komórkowymi lub wymagały dłuższego czasu inkubacji.



Rysunek 45. Badanie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórek szczepu MRSA 44 z wykorzystaniem jodku propidyny (PI), przedstawione jako intensywność fluorescencji po 30 minutach inkubacji z A-20 i jego analogami. Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna ($n=3$) $\pm$ odchylenia standardowe (SD). Analizę statystyczną wykonano metodą one-way ANOVA, gdzie $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$.

W celu uzupełnienia wyników uzyskanych w teście wychwytu PI wykonałam również obrazowanie komórek MRSA metodą TEM (Rysunek 46). Analiza struktury komórek umożliwiła ocenę zmian morfologicznych zachodzących po inkubacji z badanymi peptydomimetykami, w tym potencjalnych zaburzeń w obrębie ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej.



Rysunek 46. Reprezentatywne obrazy TEM szczepu MRSA 44 po inkubacji z peptydomimetykami w stężeniu odpowiadającym $1 \times \text{MIC}$ przez 30 min. Czerwonymi strzałkami oznaczono zmiany w obrębie ściany komórkowej, niebieskimi zmiany w

integralności błony, żółtymi – zmiany mogące odpowiadać uwalnianiu zawartości śródplazmatycznej.

Obrazy TEM komórek MRSA po inkubacji z badanymi peptydomimetykami wykazywały zmiany strukturalne obejmujące zaburzenie jednorodności cytoplazmy oraz nierównomierny zarys osłon komórkowych. Obserwacje te mogą sugerować oddziaływanie badanych związków z błoną cytoplazmatyczną, ścianą komórkową bakterii.

Wyniki testu wychwytu PI oraz obserwacje TEM sugerują, że badane peptydomimetyki mogą wpływać na integralność błony komórki MRSA. Jednak na podstawie samych obrazów TEM trudno jednoznacznie określić, czy obserwowane zmiany w obrębie ściany komórkowej stanowiły bezpośredni efekt działania badanych peptydomimetyków, czy były wtórnym następstwem destabilizacji błony cytoplazmatycznej lub ogólnego zaburzenia homeostazy komórki bakteryjnej.

Zgodnie z tym, co przedstawiłam we wstępie teoretycznym, peptydy oraz peptydomimetyki przeciwdrobnoustrojowe mogą wykazywać wielokierunkowy mechanizm działania obejmujący zarówno destabilizację błon komórkowych, jak i oddziaływanie na procesy zachodzące wewnątrz komórki bakteryjnej. Ponadto, literatura donosi, że nawet związki o zdefiniowanych pierwotnych celach mogą indukować rozległe wtórne zaburzenia metabolizmu, w tym zmiany związane z pulami nukleotydów, czyli dostępnych w komórce zasobach nukleotydów niezbędnych do syntezy DNA i RNA oraz prowadzić do uszkodzeń komórkowych [229], [230].

Z przeprowadzonych badań wynika, że A-20 oraz jego analogi wykazują złożony, wielokierunkowy wpływ na komórki MRSA. Analiza biosyntezy makrocząsteczek wykazała zdolność tych związków do hamowania syntezy DNA oraz RNA, natomiast wyniki testu wychwytu PI oraz obserwacje TEM sugerują ich wpływ na integralność błony cytoplazmatycznej. Mechanizm związany z destabilizacją błony komórkowej jest charakterystyczny dla peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs), co może wskazywać na podobny sposób oddziaływania otrzymanych peptydomimetyków na komórki bakteryjne. Podobne właściwości opisywano dla niektórych AMPs, takich jak pleurocydyna czy indolicydyna, które po oddziaływaniu z błoną bakteryjną mogą przenikać do wnętrza komórki i wpływać na procesy związane z funkcjonowaniem materiału genetycznego bakterii [192], [231].

Przedstawione powyżej badania wskazują na ograniczenie syntezy kwasów nukleinowych przez związek A-20 oraz jego analogi, jednak analiza inkorporacji radioaktywnie znakowanych prekursorów nie pozwala na jednoznaczne wskazanie

bezpośredniego mechanizmu. Obserwowane zmiany mogą wynikać zarówno z bezpośredniego oddziaływania na procesy biosyntezy kwasów nukleinowych, jak i z efektów wtórnych zachodzących w komórce bakteryjnej. Ograniczenia te były opisywane zarówno dla klasycznych związków przeciwbakteryjnych, jak i peptydów przeciwdrobnoustrojowych [232], [233].

Dodatkowym wnioskiem z przeprowadzonych eksperymentów nad określeniem mechanizmu działania związku A-20 oraz jego zsyntezowanych pochodnych jest to, że badania te nie pozwalają na jednoznaczne określenie, które struktury stanowią pierwotny cel działania w komórkach MRSA. W szczególności nie mogą wykluczyć, że obserwowane zmiany są częściowo związane z oddziaływaniem na ścianę komórkową. W przypadku MRSA jest ona istotną barierą ochronną ze względu na swoją wielowarstwową budowę. Chociaż obrazy TEM sugerują możliwość występowania zmian w obrębie ściany komórkowej, sama analiza morfologiczna nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie takiego mechanizmu.

W celu dokładniejszego określenia mechanizmu działania badanych peptydomimetyków konieczne byłoby przeprowadzenie dodatkowych badań. Oddziaływanie ze ścianą komórkową mogłoby zostać zweryfikowane poprzez np. analizę biosyntezy peptydoglikanu z wykorzystaniem znakowanych radioaktywnie prekursorów. Cennym uzupełnieniem byłoby również zastosowanie fluorescencyjnie znakowanych peptydomimetyków, co umożliwiłoby śledzenie ich lokalizacji w komórce bakteryjnej oraz ocenę, czy związki akumulują się na powierzchni komórki, czy przenikają do jej wnętrza [234]. Jednak zastosowanie takiego podejścia w przypadku badanych związków było ograniczone przez ich niewielki rozmiar. Przyłączenie znacznika fluorescencyjnego mogłoby prowadzić do istotnych zmian strukturalnych wpływających na aktywność przeciwbakteryjną oraz sposób oddziaływania z komórką bakteryjną.

Uzupełnieniem przeprowadzonych analiz mogłyby być również badania wiązania z DNA, ocena wpływu peptydomimetyków na aktywność enzymów kluczowych dla replikacji i transkrypcji oraz analiza transkryptomyczna [165], [235].

Testy wychwytu jodku propidyny oraz zmiany ultrastrukturalne obserwowane za pomocą TEM wskazują, że badane peptydomimetyki zaburzają integralność osłon komórkowych MRSA. Wynik ten jednak nie może jednoznacznie potwierdzić, że błona cytoplazmatyczna jest jedynym celem działania. W analizie mechanizmów AMPs zaleca się łączenie testów przepuszczalności błony z metodami oceny potencjału błonowego, morfologii komórki, syntezy makrocząsteczek oraz analizami globalnymi, takimi jak

proteomika [236]. Dodatkowo PI jest markerem utraty integralności błony, ale wynik może zależeć od stanu fizjologicznego komórek i obecności materiału nukleinowego poza komórką, co szczególnie może komplikować interpretację wyników [237]. Dlatego wyniki PI i TEM należy interpretować jako potwierdzenie istotnego udziału komponentu błonowego w mechanizmie działania, a nie jako pełne wyjaśnienie aktywności badanych związków.

8. Analizy proteomiczne

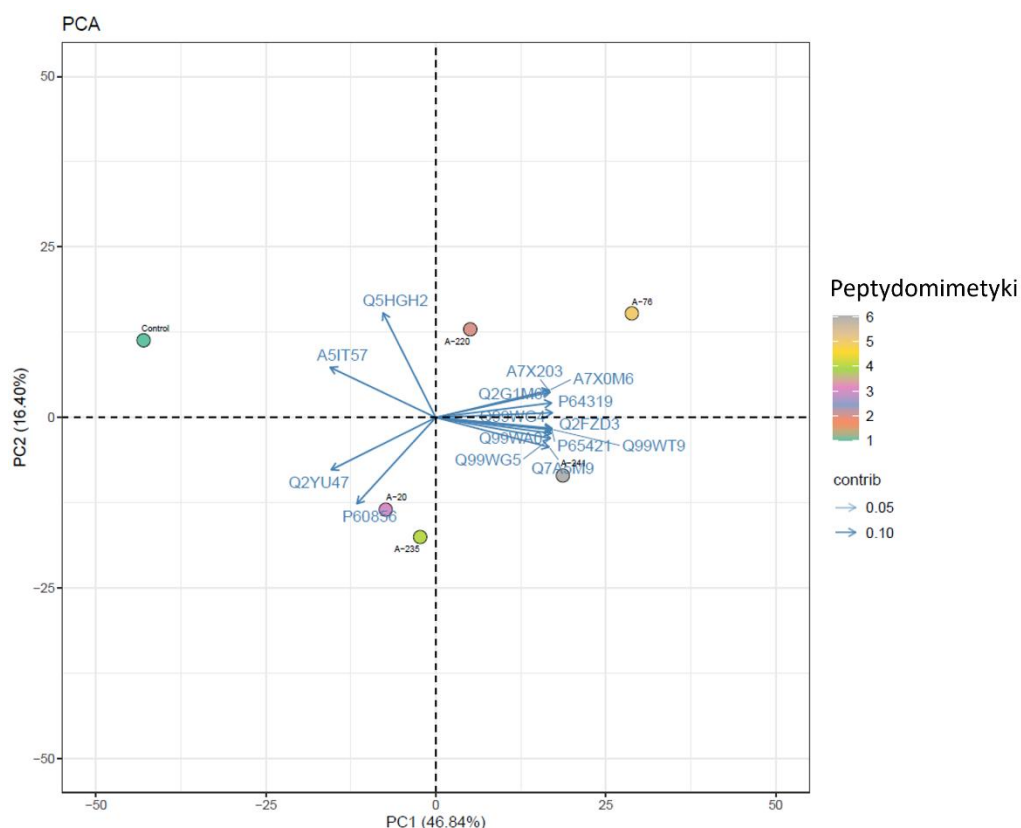
8.1. Analiza integralnych zmian rozpuszczalności proteomu metodą

PISA

Ostatnim etapem badań była próba wskazania białek kandydujących do dalszej analizy mechanizmu działania badanych peptydomimetyków w proteomie szczepu MRSA 44. W tym celu zastosowałam analizę PISA (ang. *Proteome Integral Solubility Alteration*), opartą na ocenie zmian rozpuszczalności białek po inkubacji lizatu bakteryjnego z badanymi związkami oraz po ekspozycji próbek na gradient temperatury. Zmiana stabilności termicznej białka może wskazywać na bezpośrednie oddziaływanie badanego związku z danym białkiem (celem molekularnym) lub pośrednią zmianę jego właściwości w obecności związku.

Wizualizację danych przygotowała dr hab. Agnieszka Gajewicz-Skrętna w ramach współpracy.

W celu oceny, czy badane peptydomimetyki różnią się pod względem wpływu na profil stabilności termicznej białek MRSA 44 oraz czy próbki traktowane poszczególnymi związkami tworzą odrębne grupy względem kontroli, przeprowadziłam analizę PCA. Wykazała ona wyraźne różnice pomiędzy badanymi peptydomimetykami a kontrolą. Związki A-76 oraz A-241 grupowały się po jednej stronie, co może sugerować częściowo zbliżony wpływ tych analogów na profil stabilności termicznej białek MRSA 44. Z kolei A-20 oraz A-235 lokalizowały się po przeciwnej stronie wykresu względem A-76 i A-241. Natomiast nieaktywny analog A-220 oraz próba kontrolna wykazywały odmienne profile zmian proteomicznych.



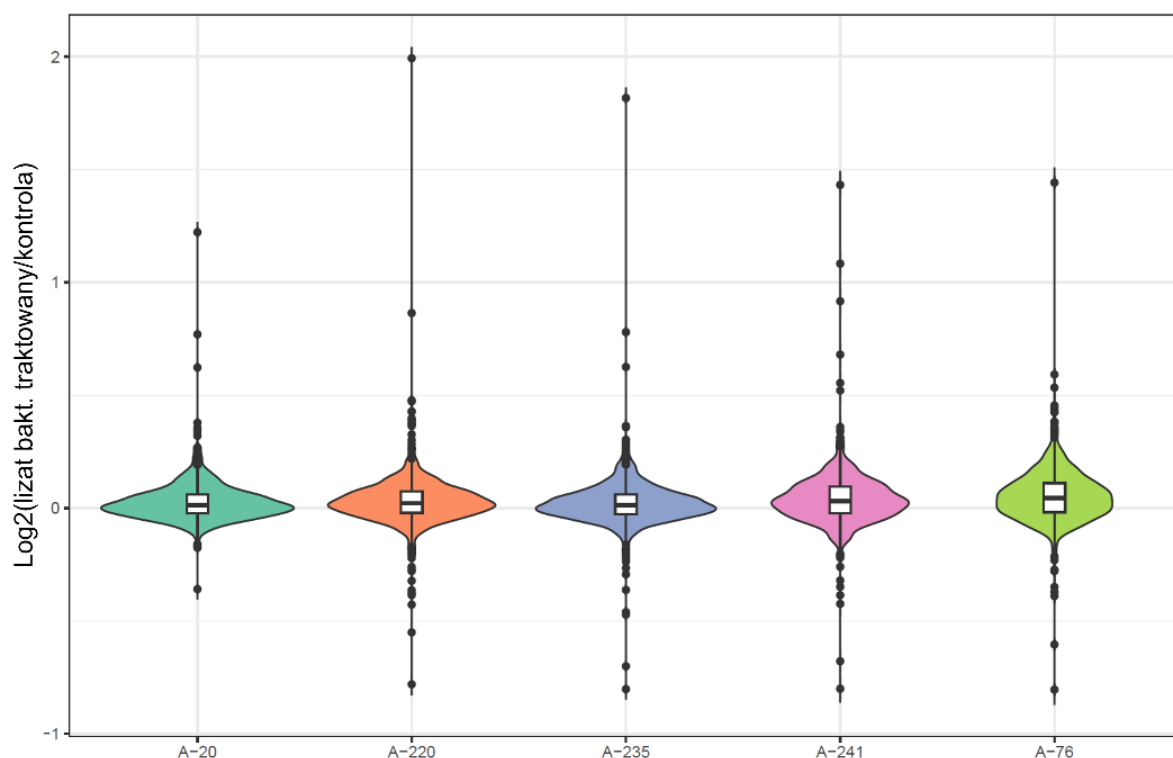
Rysunek 47. Analiza PCA wyników PISA przedstawiająca różnice w profilach stabilności termicznej białek MRSA po inkubacji z A-20 i jego analogami. Punkty odpowiadają próbkom, natomiast wektory wskazują białka o największym udziale w rozdziale próbek w przestrzeni głównych składowych.

Na podstawie danych uzyskanych w ramach tego eksperymentu zidentyfikowałam ilościowo 1083 białek (Załącznik 2). W próbkach traktowanych peptydomimetykami część białek MRSA 44 charakteryzowała się zmienionym profilem stabilności termicznej względem kontroli. Wśród białek o potencjalnym znaczeniu wyróżniłam białka oznaczone identyfikatorami UniProt: P64319 oraz P65421, mogące być związane odpowiednio z procesami replikacji DNA lub metabolizmu energetycznego, a także Q2FZD3 i Q2G1M6, które mogą uczestniczyć w kontroli jakości translacji oraz metabolizmie żelaza (Tabela 8). Białka te należy traktować jako kandydatów do dalszej weryfikacji, a nie jako jednoznacznie potwierdzone cele molekularne badanych peptydomimetyków.

Tabela 8. Wytypowane białka w analizie PISA oraz ich przewidywane lub opisane funkcje w komórce bakteryjnej.

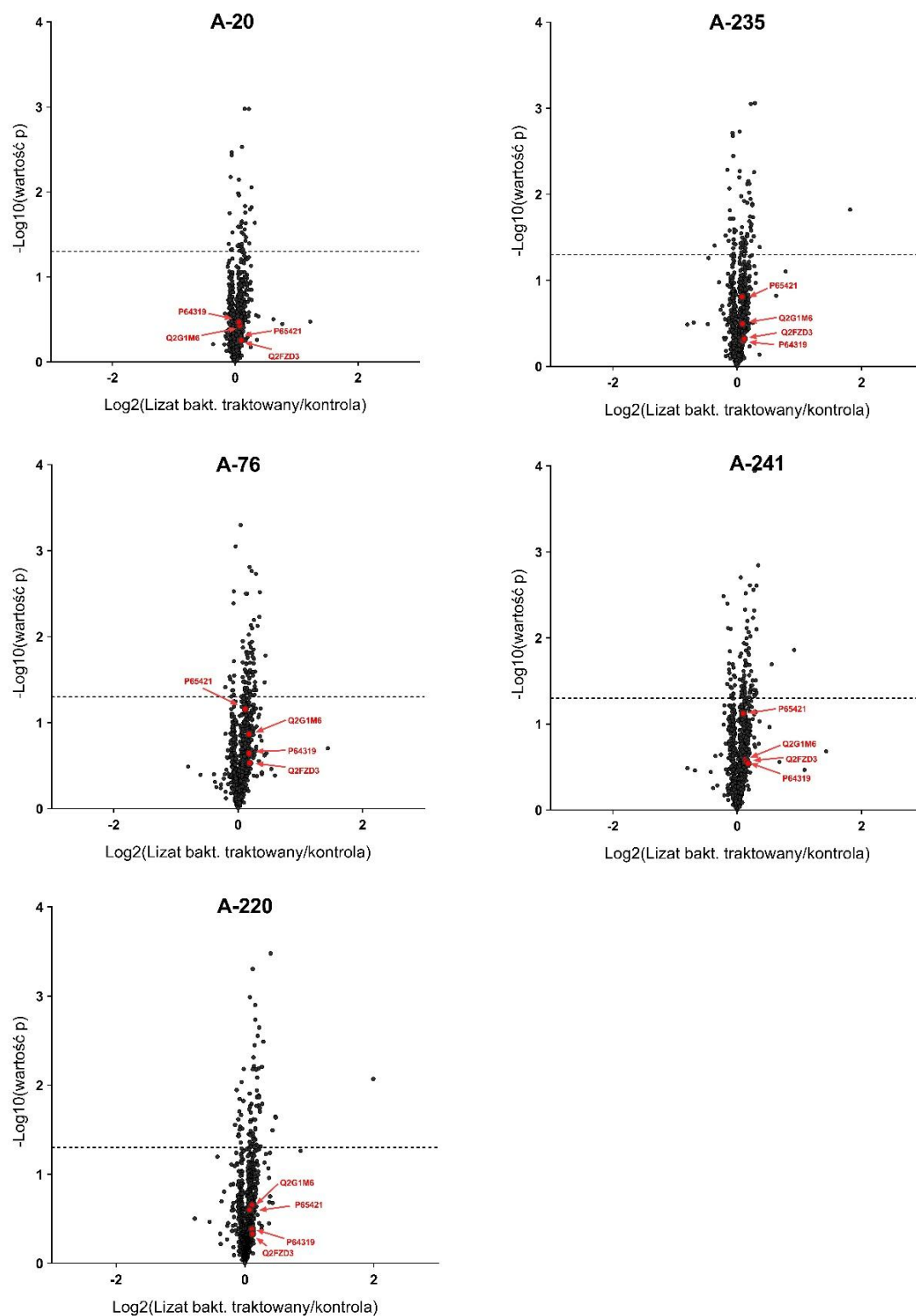
Symbol białka	Funkcja
P64319	Helikaza DNA, wykorzystuje energię z hydrolizy ATP do rozplątywania dwuniciowego DNA podczas replikacji i naprawy materiału genetycznego.
P65421	Uczestniczy w metabolizmie energetycznym bakterii.
Q2FZD3	Bierze udział w kontroli jakości translacji poprzez rozpoznawanie i rozdzielanie zatrzymanych rybosomów 70S.
Q2G1M6	Uczestniczy w biosyntezie stafyloferryiny B, sideroforu odpowiedzialnego za pozyskiwanie żelaza przez <i>S. aureus</i> .

Dodatkowo przeprowadziłam analizę rozkładu, zwizualizowaną jako wykres typu violin (Rysunek 48). Rozkład wartości $\text{Log}_2(\text{lizat bakteryjny traktowany/kontrola})$ dla większości białek był skupiony wokół wartości 0, co wskazuje na brak globalnych zmian w stabilności całego proteomu po inkubacji z badanymi peptydomimetykami. W przypadku najbardziej aktywnych peptydomimetyków A-76 oraz A-241 zaobserwowałam większą zmienność rozkładu wartości $\text{Log}_2(\text{lizat bakt. traktowany/kontrola})$, co może wskazywać na bardziej selektywne zmiany stabilności wybranych białek lub grup białek.



Rysunek 48. Rozkład wartości $\text{Log}_2(\text{lizat bakt. traktowany/kontrola})$ dla białek identyfikowanych w analizie PISA.

Obserwowane zmiany sugerują, że badane peptydomimetyki mogą wpływać na kilka szlaków komórkowych jednocześnie, a ich działanie nie ogranicza się do pojedynczego celu molekularnego. Ze względu na dużą różnorodność obserwowanych zmian proteomicznych, brak jednoznacznego grupowania wszystkich aktywnych peptydomimetyków względem siebie oraz stosunkowo niewielkie zmiany stabilności części białek, wskazanie białek charakterystycznych wyłącznie dla określonych grup związków było utrudnione.



Rysunek 49. Wykresy typu volcano plot przedstawiające zmiany intensywności białek w lizacie komórkowym MRSA 44 po inkubacji z badanymi peptydomimetykami względem kontroli. Pozioma przerywana linia oznacza próg istotności statystycznej dla $p = 0,05$.

Czerwonym kolorem zaznaczono wybrane białka potencjalnie związane z odpowiedzią komórki bakteryjnej na działanie peptydomimetyków.

W celu jednoczesnej wizualizacji zmian intensywności białek w lizacie komórkowym MRSA 44 traktowanym peptydomimetykami oraz istotności statystycznej tych zmian wykorzystałam wykresy typu volcano plot (Rysunek 49). Uzyskane wyniki wskazują, że dla wszystkich badanych peptydomimetyków większość zidentyfikowanych białek, skupiała się w pobliżu wartości $\text{Log}_2(\text{lizat traktowany peptydomimetykiem/kontrola}) = 0$, co wskazuje na brak globalnych zmian stabilności lub rozpuszczalności proteomu MRSA 44. Wytypowane białka za pomocą analizy PCA (zaznaczone na czerwono): P64319, P65421, Q2FZD3 oraz Q2G1M6 wykazywały pewne różnice względem kontroli, jednak zmiany te były umiarkowane i w większości przypadków nie przekraczały jednoznacznie progu istotności statystycznej.

Uzyskane wyniki sugerują, że A-20 i jego analogi mogą wywoływać selektywne, ale stosunkowo subtelne zmiany w proteomie bakteryjnym. Analiza PISA nie potwierdziła jednego dominującego celu białkowego, co potwierdza hipotezę o złożonym i wielokierunkowym mechanizmie działania badanych związków.

Istotnym ograniczeniem zastosowanego podejścia jest fakt, że badane peptydomimetyki inkubowałam z lizatem bakteryjnym, a nie z żywymi komórkami MRSA 44. W takim układzie związki mają bezpośredni dostęp do białek, które w warunkach komórkowych mogą być niedostępne lub chronione przez strukturę komórki bakteryjnej. Nie można więc wykluczyć, że część obserwowanych zmian stabilności termicznej wynikała z bezpośredniego, częściowo nieswoistego oddziaływania peptydomimetyków z białkami obecnymi w lizacie [238], [239]. W takim modelu eksperymentalnym związki mogą wiązać się z białkami w sposób, który niekoniecznie odzwierciedla ich rzeczywiste oddziaływanie w żywej komórce. Tym samym obserwowane przesunięcia stabilności mogą częściowo wynikać z ekspozycji białek na związek w warunkach poza komórkowych, a nie wyłącznie z biologicznego mechanizmu działania peptydomimetyków.

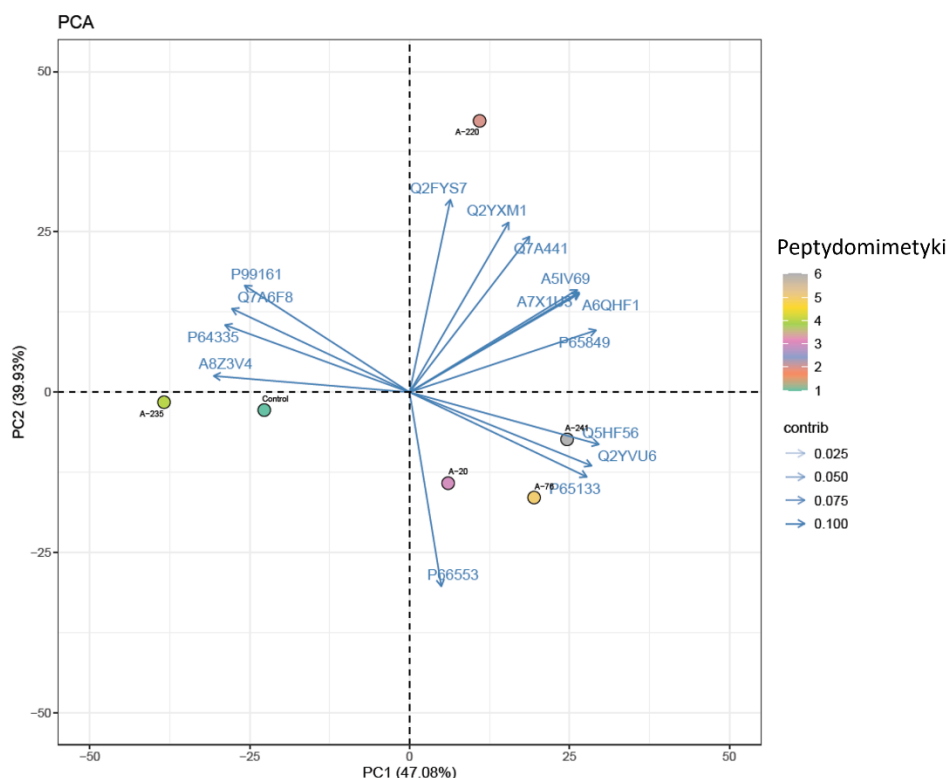
Dlatego szczególnie wartościowe byłoby porównanie dwóch modeli eksperymentalnych: podejścia, które zastosowałam w niniejszej pracy, w którym najpierw przygotowałam lizat bakteryjny, a następnie inkubowałam go z peptydomimetykami oraz podejścia odmiennego, w którym związki byłyby inkubowane z żywymi komórkami przed lizą. W publikacji Mateus i in. [240] prowadzili badania termicznego profilowania proteomu na bakteriach i wykazali, że wyniki uzyskiwane w lizatach i komórkach *in vivo*

mogą się różnić ze względu na wpływ środowiska komórkowego, obecność kompleksów białkowych oraz metabolitów.

8.2. Analiza zmian proteomu komórek MRSA metodą proteomiki ekspresyjnej FITExP

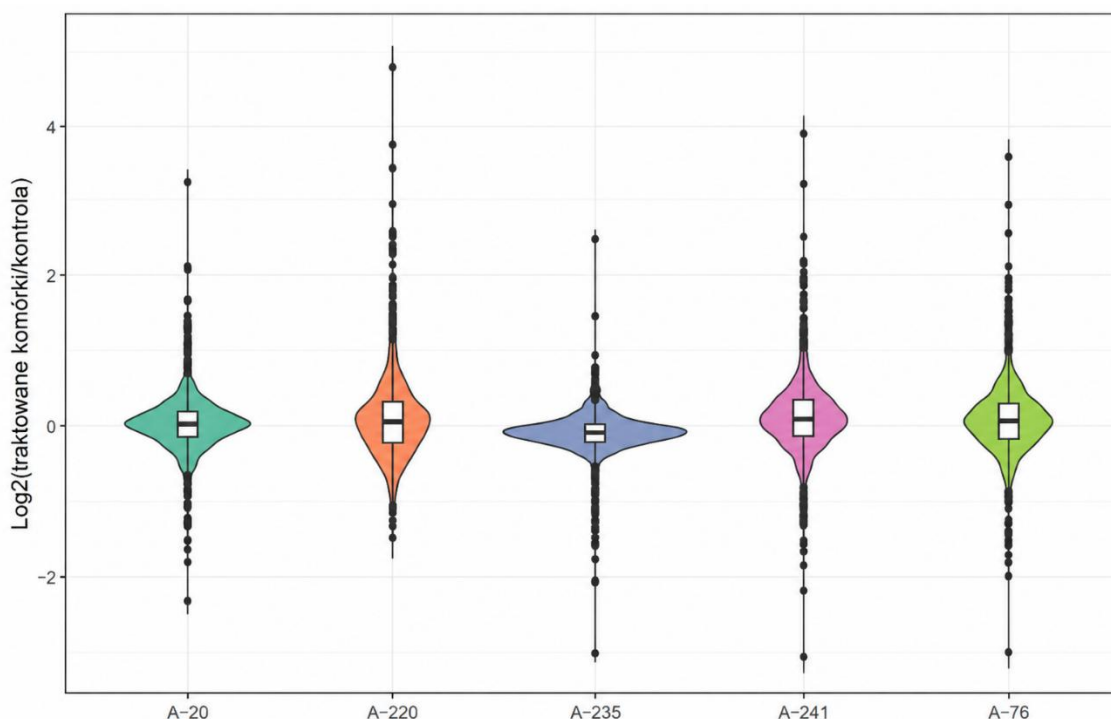
Kolejnym badaniem proteomicznym była analiza FITExP. W przypadku analizy PISA badane peptydomimetyki inkubowałam bezpośrednio z lizatem bakteryjnym, a następnie oceniałam zmiany stabilności termicznej białek w gradiencie temperatur, co pozwalało zidentyfikować białka potencjalnie oddziałujące z badanymi związkami. Z kolei metoda FITExP opierała się na inkubacji żywych komórek bakteryjnych z peptydomimetykami, a następnie analizie zmian proteomicznych zachodzących w odpowiedzi komórki na działanie badanych związków. Metoda ta umożliwia zatem ocenę globalnej odpowiedzi proteomu komórki bakteryjnej, obejmującej zmiany w ekspresji i funkcjonowaniu białek indukowanych stresem wywołanym działaniem peptydomimetyków.

W wyniku tego eksperymentu wykonałam podobny zestaw danych, jak w przypadku PISA i zidentyfikowałam 1109 białek (Załącznik 3). Otrzymane wyniki analizy podobieństwa (Rysunek 50) potwierdzają, że najbardziej aktywne peptydomimetyki A-76 oraz A-241 charakteryzowały się zbliżonym profilem zmian proteomicznych w komórkach bakterii MRSA 44, a związek A-20 wykazywał częściowe podobieństwo do najbardziej aktywnych analogów. Natomiast nieaktywny peptydomimetyk A-220 charakteryzował się wyraźnie odmiennym profilem proteomicznym. Co ciekawe, peptydomimetyk A-235 charakteryzował się podobieństwem do próby kontrolnej, pomimo zbliżonej aktywności do A-20.



Rysunek 50. Analiza głównych składowych (PCA) zmian proteomicznych komórek MRSA 44 po inkubacji z badanymi peptydomimetykami w stężeniu odpowiadającym $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$. Strzałki wskazują białka najsilniej wpływające na rozmieszczenie próbek w przestrzeni PCA.

W celu oceny globalnych zmian ekspresji proteomu indukowanych przez badane peptydomimetyki wykonałam analizę rozkładu wartości $\text{Log}_2(\text{komórki traktowane/kontrola})$ przedstawioną w postaci wykresów typu violin plot na Rysunek 51. Wykresy te obrazują rozkład zmian intensywności białek względem kontroli dla poszczególnych badanych związków. Największy rozrzut wartości oraz największą liczbę białek wykazujących istotniejsze odchylenia od kontroli obserwowano dla związków A-76 oraz A-241, co może świadczyć o silniejszym wpływie tych peptydomimetyków na proteom komórki bakteryjnej. Związek A-235 wykazywał natomiast profil najbardziej zbliżony do kontroli, co pozostaje zgodne z jego słabszą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Odmienny profil uzyskano również dla nieaktywnego związku A-220, dla którego zaobserwowałam szeroki rozkład zmian proteomicznych. Może to wskazywać na niespecyficzne lub odmienne oddziaływanie tego związku z komórką bakteryjną, które nie przekłada się na wyraźny efekt przeciwbakteryjny.



Rysunek 51. Rozkład wartości $\text{Log}_2(\text{komórki traktowane/kontrola})$ dla zmian intensywności białek w komórkach bakterii MRSA 44 po inkubacji z badanymi peptydomimetykami. Wykresy violin plot przedstawiają globalny profil zmian proteomicznych względem kontroli.

W analizie FITEp wytypowałam kilka białek, dla których zaobserwowałam zmiany względnej intensywności sygnału białkowego po traktowaniu komórek MRSA peptydomimetykami, szczególnie A-76 oraz A-241. Białka oraz ich funkcje zestawiałam w Tabeli 9.

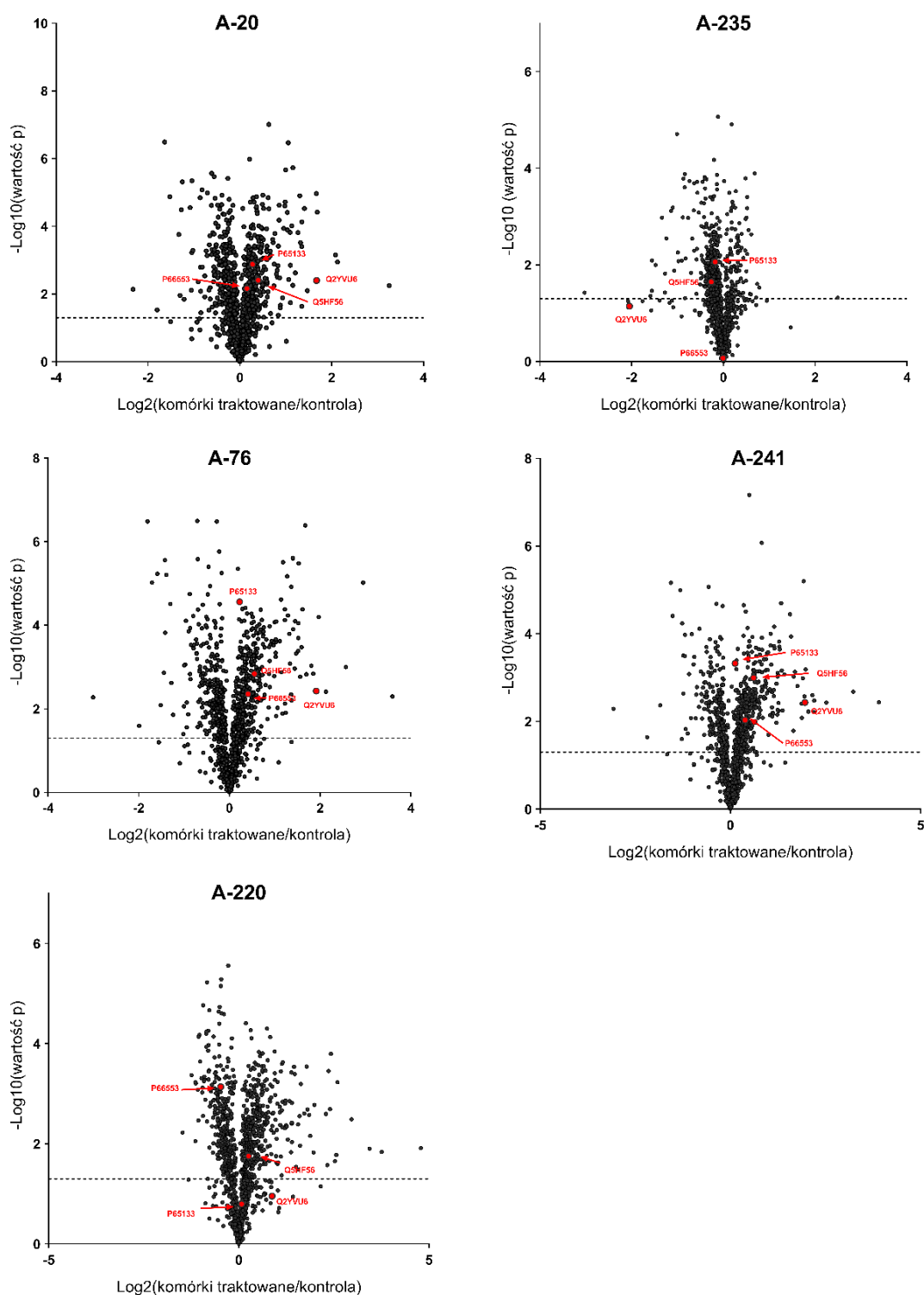
Tabela 9. Wytypowane białka w analizie FITEp oraz ich funkcje w komórce bakteryjnej.

Symbol białka	Funkcja
Q5HF56	Negatywny regulator tworzenia pierścienia FtsZ (ang. <i>filamenting temperature-sensitive protein Z</i>) uczestniczącego w podziale komórki bakteryjnej. Kontroluje lokalizację i częstotliwość formowania kompleksu podziałowego oraz uczestniczy w depolimeryzacji FtsZ.
Q2YVU6	Enzym uczestniczący w końcowych etapach biosyntezy UDP-N-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc), będącej prekursorem peptydoglikanu ściany komórkowej. Katalizuje acetylację glukozamino-1-fosforanu oraz przyłączenie UMP.

P65133	Jeden z podstawowych czynników inicjacji translacji. Stabilizuje inicjatorowy formylometionylo-tRNA oraz uczestniczy w tworzeniu aktywnego kompleksu rybosomalnego 70S.
P66553	Białko rybosomalne odpowiedzialne za wiązanie mRNA w obrębie rybosomu 70S oraz jego prawidłowe pozycjonowanie podczas translacji. Uczestniczy w stabilizacji procesu odczytu informacji genetycznej.

Identyfikacja białka Q2YVU6 może wskazywać na związek odpowiedzi komórki z procesami biosyntezy prekursorów peptydoglikanu ściany komórkowej. Natomiast obecność białek związanych z translacją jest interesująca w kontekście wcześniejszych badań mechanizmu działania, ponieważ analiza biosyntezy makrocząsteczek nie wykazała wyraźnego zahamowania procesu translacji przez badane peptydomimetyki. Może to sugerować, że obserwowane zmiany stanowią bardziej element wtórnej odpowiedzi stresowej komórki bakteryjnej lub odzwierciedlają subtelniejsze zaburzenia organizacji procesu translacji, niewidoczne na poziomie całkowitej inkorporacji radioaktywnie znakowanej leucyny.

W celu wizualizacji białek wykazujących największe zmiany względem kontroli wykonałam analizę typu volcano plot dla poszczególnych badanych peptydomimetyków (Rysunek 52). Część obserwowanych zmian osiągała próg istotności statystycznej względem kontroli, co może wskazywać na uruchomienie określonych szlaków odpowiedzi komórkowej po ekspozycji MRSA na badane peptydomimetyki. Najbardziej wyraźne zmiany obserwowałam dla aktywnych analogów A-76 oraz A-241.



Rysunek 52. Wykresy typu volcano plot przedstawiające zmiany intensywności białek w komórkach MRSA 44 po inkubacji z badanymi peptydomimetykami względem kontroli. Pozioma przerywana linia oznacza próg istotności statystycznej dla $p = 0,05$. Czerwonym kolorem zaznaczono wybrane białka potencjalnie związane z odpowiedzią komórki bakteryjnej na działanie peptydomimetyków.

Analiza FITEpP wykazała wyraźne różnice w odpowiedzi proteomicznej komórek bakterii MRSA 44 na działanie badanych peptydomimetyków. Najbardziej zbliżony profil zmian obserwowałam dla związków A-76 oraz A-241, co może wskazywać na częściowo podobny sposób oddziaływania tych analogów z komórką bakteryjną. Związek A-20 wykazywał częściowe podobieństwo do aktywnych pochodnych, natomiast profil proteomiczny A-235 był bardziej zbliżony do kontroli, co jest zgodne z jego niższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Nieaktywny związek A-220 charakteryzował się odmiennym profilem odpowiedzi proteomicznej, co może sugerować brak aktywacji tych samych szlaków odpowiedzi komórkowej w porównaniu z aktywnymi peptydomimetykami.

Zbadanie celu molekularnego chemioterapeutyków jest bardzo trudnym zadaniem ze względu na złożoność struktur komórkowych, obecność wielu współzależnych szlaków metabolicznych oraz możliwość występowania pośrednich efektów działania związku. W przypadku peptydomimetyków dodatkową trudność stanowi potencjalnie wielokierunkowy mechanizm działania, obejmujący zarówno oddziaływanie z osłonami komórkowymi, jak i wtórne zaburzenia procesów wewnątrzkomórkowych [241], [242].

Analiza FITEpP posłużyła jako uzupełnienie PISA, ponieważ opiera się na identyfikacji białek, których zmiany ilościowe są nietypowe na tle globalnej odpowiedzi proteomicznej komórki. W literaturze metoda ta została wykorzystana m.in. jako narzędzie do wskazywania potencjalnych celów działania małych cząsteczek oraz mechanizmów ich działania na podstawie danych ekspresji proteomicznej [171].

Proteomika była wykorzystywana jako narzędzie do różnicowania odpowiedzi bakterii na klasyczne i nowe antybiotyki oraz do wskazywania procesów komórkowych zaburzanych przez badane związki [243]. Jednocześnie odpowiedź proteomiczna może obejmować zarówno białka bezpośrednio związane z miejscem działania związku, jak i białka zmienione wtórnie w wyniku stresu metabolicznego, zaburzenia homeostazy lub aktywacji mechanizmów obronnych bakterii [229]. W przypadku badanych peptydomimetyków otrzymane wyniki FITEpP dostarczają informacji na temat białek i procesów komórkowych potencjalnie związanych z odpowiedzią MRSA na działanie związków, a nie jako ostateczne potwierdzenie bezpośredniego celu molekularnego.

Uzyskane wyniki w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają, że analogi A-20 stanowią obiecującą klasę peptydomimetycznych związków przeciwbakteryjnych ukierunkowanych głównie na bakterie Gram-dodatnie. Praca rozszerza wcześniejsze

obserwacje dotyczące aktywności Cystapep 1 wobec *S. aureus* (w tym MRSA) i *S. pyogenes* [128], [130] oraz pogłębia wiedzę na temat badań struktura-aktywność wynikającą z badań Dzierżyńskiej i in. [129], [131]. Przeprowadzone badania pozwoliły na kompleksową charakterystykę biologiczną analogów A-20, obejmującą ocenę aktywności wobec szerokiego panelu szczepów MRSA, zdolności do redukcji biofilmu oraz mechanizmu działania. Uzupełnieniem tych analiz była próba identyfikacji potencjalnych celów molekularnych badanych peptydomimetyków z wykorzystaniem metod proteomicznych.

Przedstawione w niniejszej rozprawie podejście badawcze odpowiada współczesnym kierunkom rozwoju nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, w których obok oceny aktywności przeciwbakteryjnej coraz większe znaczenie przypisuje się badaniom aktywności przeciwbiofilmowej, bezpieczeństwa biologicznego oraz identyfikacji mechanizmu działania i potencjalnych celów molekularnych [236], [243], [244], [245].

V. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie, synteza oraz charakterystyka serii nowych analogów cząsteczki Cystapep 1 (A-20) jako potencjalnych peptydomimetycznych związków przeciwbakteryjnych, aktywnych wobec MRSA.

Najważniejsze wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy można podsumować następująco:

1. Zaprojektowałam nową serię analogów związku Cystapep 1 (A-20) stosując analizę danych eksperymentalnych, analizę chemometryczną oraz metody SAR. Podejście to umożliwiło mi identyfikację cech strukturalnych istotnych dla aktywności biologicznej i racjonalne zawężenie puli związków przeznaczonych do syntezy. Projektowanie analogów oparłam na wcześniejszych badaniach nad pochodnymi *N*-terminalnego fragmentu ludzkiej cystatyny C oraz na analizie zależności struktura–aktywność, z uwzględnieniem znaczenia ładunku dodatniego, hydrofobowości, charakteru fragmentów aromatycznych oraz właściwości fizykochemicznych cząsteczek.
2. Zsyntezowałam 28 pochodnych peptydomimetycznych metodą klasycznej syntezy w roztworze, z czego 23 oczyściłam za pomocą preparatywnego RP-HPLC oraz scharakteryzowałam z użyciem metod fizykochemicznych. Synteza otrzymanych peptydomimetyków obejmowała przygotowanie kluczowego fragmentu peptydomimetycznego ValΨ[CH₂-NH] lub jego zmodyfikowanych odpowiedników, a następnie klasyczną syntezę w roztworze. Tożsamość otrzymanych związków potwierdziłam metodą spektrometrii mas, natomiast ich czystość oceniałam z wykorzystaniem analitycznego RP-HPLC.
3. Dla otrzymanych związków wyznaczyłam wartości MIC oraz MBC dla szczepów referencyjnych *S. aureus* ATCC 29213 oraz *S. pyogenes* ATCC 19615. Analiza otrzymanych wyników potwierdza istotny wpływ modyfikacji strukturalnych na aktywność biologiczną badanych związków. W porównaniu z cząsteczką wyjściową A 20, część otrzymanych analogów

wykazywała wyraźnie wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec przebadanych szczepów. Najbardziej korzystny profil aktywności obserwowałam dla związków A-76, A-241, A-243 oraz A-248, dla których wartości MIC i MBC były najniższe wśród analizowanej serii. Analiza zależności struktura–aktywność wskazała, że szczególne znaczenie dla aktywności przeciwbakteryjnej miały modyfikacje końcowego fragmentu hydrofobowego P5. Najkorzystniejszy efekt obserwowałam dla analogów zawierających odpowiednio dobrane ugrupowania alifatyczno-aromatyczne lub aromatyczne, co wskazuje na konieczność zachowania równowagi pomiędzy hydrofobowością, rozmiarem i geometrią tego fragmentu.

4. Związek A-20 oraz jego analogi (A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243) przebadalam na szerszym panelu szczepów MRSA (laboratoryjnych oraz klinicznych). Badane związki hamują wzrost badanych szczepów, a najaktywniejsze z nich tj. A-76 oraz A-241 powodują zahamowanie wzrostu komórek bakteryjnych w stężeniu 4-16 µg/ml. Profil aktywności badanych związków potwierdził, że analogi A-20 są ukierunkowane przede wszystkim na bakterie Gram-dodatnie, natomiast wobec bakterii Gram-ujemnych wykazują wyraźnie niższą aktywność.
5. Wybrane badane pochodne tj. A-75, A-76, A-238, A-241 oraz A-243 cechują się wysoką stabilnością w badanych warunkach zarówno w wodzie, jak i ludzkim osoczu.
6. Przeprowadzone testy cytotoksyczności wobec komórek HaCaT oraz w ocena aktywności hemolitycznej wykazały, że badane peptydomimetyki nie wykazują istotnej toksyczności w zakresie stężeń odpowiadających ich aktywności przeciwbakteryjnej.
7. W badaniach aktywności przeciwbiofilmowej wykazałam, że A-20 oraz analogi A-76 i A-241 ograniczają biofilm tworzony przez szczep MRSA. Obserwacje te potwierdziłam z wykorzystaniem komplementarnych metod obejmujących oznaczanie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU), barwienie fioletem krystalicznym oraz obrazowanie SEM.
8. Analiza biosyntezy makrocząsteczek z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanych prekursorów wykazała, że związki A-20, A-76 i A-241 zaburzają syntezę DNA i RNA w komórkach MRSA. Jednocześnie analiza integralności błony komórkowej z zastosowaniem testu wychwyty jodku

propidyny oraz obserwacji TEM potwierdziła ich zdolność do uszkodzania błony komórkowej. Uzyskane wyniki potwierdzają, że mechanizm działania badanych peptydomimetyków ma charakter złożony i obejmuje zarówno oddziaływanie z błoną komórkową, jak i wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe.

9. W analizach proteomicznych PISA i FITeXP nie wskazałam jednoznacznie celu molekularnego badanych peptydomimetyków, jednak uzyskałam informacje o zmianach zachodzących w proteomie MRSA po ekspozycji na związki. Szczególnie istotne było podobieństwo profili odpowiedzi proteomicznej dla A-76 i A-241, co może wskazywać na częściowo zbliżony sposób działania tych analogów ze względu na ich zbliżoną aktywność. Brak jednoznacznego celu molekularnego ponownie sugeruje złożony mechanizm działania tej klasy peptydomimetyków, obejmującego zarówno oddziaływanie z osłonami komórkowymi, jak i wtórne zaburzenia procesów wewnątrzkomórkowych.
10. Analogi A-20 stanowią obiecującą grupę peptydomimetycznych kandydatów do dalszych badań nad nowymi strategiami zwalczania zakażeń wywołanych przez MRSA. Największe znaczenie aplikacyjne w niniejszej rozprawie mają analogi A-76 oraz A-241, które łączą wysoką aktywność przeciwbakteryjną, zdolność redukcji biofilmu, stabilność w warunkach zbliżonych do fizjologicznych oraz brak istotnej toksyczności (w stężeniach hamujących wzrost bakterii) wobec komórek gospodarza.

Dorobek naukowy

Publikacje:

1. Dzierżyńska M., Sawicka J., **Łada K.**, Gajewicz-Skrętna A., Deptuła M., Chernobrovkin A., Pogorzelska A., Grubb A., Zubarev R., Piśkuła M., Kasprzykowski F., Rodziewicz-Motowidło S. Role of Structural Modifications in Peptidomimetic Compounds as Potential Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*: Balancing Bioavailability, Safety, and Antimicrobial Activity. ACS Omega. 2025;10:33435–33460.

Wystąpienia konferencyjne:

1. **Katarzyna Łada**, Maria Dzierżyńska, Łukasz Grabowski, Monika Maciąg-Dorszyńska, Alicja Węgrzyn, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Short antimicrobial peptidomimetics against MRSA: cytotoxicity, anti-biofilm activity and mechanism of action, 12th International Meeting on Antimicrobial Peptides, 2025, 25 – 27.08.2025, Dublin, Irlandia, poster;
2. **Katarzyna Łada**, Maria Dzierżyńska, Agnieszka Gajewicz-Skrętna, Łukasz Grabowski, Alicja Węgrzyn, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Antimicrobial peptidomimetics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 37th European Peptide Symposium and 14th International Peptide Symposium (37th EPS and 14th IPS), 2024, 25 – 29.08.2024, Florencja, Włochy, poster;
3. Justyna Sawicka, Maria Dzierżyńska, **Katarzyna Łada**, Łukasz Grabowski, Alicja Węgrzyn, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Atywność biologiczna kompozytów hydrożelowych opartych na strukturze peptydu RADA16-I, VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Interdyscyplinarność w tworzeniu biomateriałów" (IMPLANTY 2024), 2024, 22 – 24.05.2024, Gdańsk, Polska, poster;
4. **Katarzyna Łada**, Maria Dzierżyńska, Agnieszka Gajewicz-Skrętna, Łukasz Grabowski, Alicja Węgrzyn, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-

- Motowidło: Synthesis and QSAR studies of antimicrobial peptidomimetics, 26th Polish Peptide Symposium, 2023, 03 – 07.09.2023, Stare Jabłonki, Polska, poster;
5. Maria Dzierżyńska, Milena Deptuła, Justyna Sawicka, **Katarzyna Łada (Łojewska)**, Michał Pikuła, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Antimicrobial peptidomimetics: antimicrobial activity, pro-proliferating properties, QSAR and ADME, International Meeting CYSTATINS 2022, 2022, 16 – 18.06.2022, Gdańsk, Polska; poster;
 6. Maria Dzierżyńska, Milena Deptuła, Justyna Sawicka, **Katarzyna Łada (Łojewska)**, Michał Pikuła, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Antimicrobial peptidomimetics: antimicrobial activity, pro-proliferating properties, QSAR and ADME, IUBMB-FEBS-PABMB 2022 Congress, 2022, 09 – 14.07.2022, Lizbona, Portugalia, poster;
 7. Maria Dzierżyńska, Milena Deptuła, Justyna Sawicka, **Katarzyna Łada (Łojewska)**, Michał Pikuła, Franciszek Kasprzykowski, Sylwia Rodziewicz-Motowidło: Peptydomimetyki przeciwdrobnoustrojowe: aktywność przeciwbakteryjna oraz QSAR, IV Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" (ChemBiŚ 2022), 2022, 24 – 25.06.2022, Gdańsk, Polska; poster.

Stáže naukowe:

1. Staż doktorski w ramach programu NAWA Preludium Bis 2, Karolinska Institutet, Katedra Biochemii i Biofizyki Medycznej (pod kierunkiem prof. Romana Zubareva), Sztokholm, Szwecja, 01.04.2025-30.06.2025 (3 miesiące).

Udział w projektach naukowych:

1. Preludium Bis 2, „Nowa klasa związków przeciwbakteryjnych. Projektowanie, synteza oraz badanie mechanizmu działania”, kierownik: prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz Motowidło, nr 2020/39/O/NZ7/00430, Narodowe Centrum Nauki, 10.2021 – 09.2025, **wykonawca**;
2. Badania Młodych Naukowców, „Ocena wpływu działania A-20 oraz jego analogów na redukcję biofilmu tworzonego przez oporną na metycylinę bakterię *Staphylococcus aureus*” nr 539-T070-B210-25, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 03.2025 – 02.2026, **kierownik**;

3. Badania Młodych Naukowców, „Badanie potencjału hemolitycznego oraz wpływu temperatury inkubacji na aktywność przeciwbakteryjną cząsteczki A-20 oraz jej analogów” nr 539-T070-B136-24, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 03.2024 – 02.2025, **kierownik**;
4. Badania Młodych Naukowców, „Próba chemicznej syntezy rybosomalnego białka S16 bakterii *Staphylococcus aureus* i badanie jego oddziaływania z A-20 oraz jego analogami” nr 539-T070-B049-23, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 03.2023 – 02.2024, **kierownik**;
5. Badania Młodych Naukowców, „Synteza chemiczna rybosomalnego białka S16 (rpsP) bakterii *Escherichia Coli*” nr 539-T070-B022-22, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 03.2022 – 02.2023, **kierownik**;
6. Horizon Europe – EIC Pathfinder Challenges, „Bio4Pak (Biodegradable Bio-based Bioactive Packaging Technology for Supporting Food Safety)”, kierownik: dr Karolina Rudnicka, prof. UŁ (Uniwersytet Łódzki), nr 101223372, European Innovation Council, 12.2025 – obecnie, **wykonawca/asystent**;
7. Swiss-Polish Cooperation Programme (SPPW), „ChitoCare (Peptide-Chitosan Composites as New Biomaterials for Diabetic Wound Care with Peptide Power and Hydrogel Magic!)”, kierownik: prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło, nr SPPW/CHITOCARE/0074/2024-00, NCBR, 03.2026 – obecnie, **wykonawca**.

VI. Literatura cytowana

- [1] World Health Organization, “Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report,” Geneva, 2022.
- [2] J. O’Neill, “Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance,” London, 2016.
- [3] R. C. Founou *et al.*, “The COVID-19 pandemic: A threat to antimicrobial resistance containment,” *Future Sci. OA*, vol. 7, no. 8, 2021, doi: 10.2144/fsoa-2021-0012.
- [4] C. J. Murray *et al.*, “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,” *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [5] M. A. Salam *et al.*, “Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health,” *Healthcare (Basel)*, vol. 11, no. 13, 2023, doi: 10.3390/healthcare11131946.
- [6] K. W. K. Tang, B. C. Millar, and J. E. Moore, “Antimicrobial Resistance (AMR),” *Br. J. Biomed. Sci.*, vol. 80, p. 11387, 2023, doi: 10.3389/bjbs.2023.11387.
- [7] G. Ippolito, S. Leone, F. N. Lauria, E. Nicastrì, and R. P. Wenzel, “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug,” *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 14, no. Suppl. 4, pp. S7-11, 2010, doi: 10.1016/j.ijid.2010.05.003.
- [8] World Health Organization, “Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis,” Geneva, 2017.
- [9] A. S. Lee *et al.*, “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1, vol. 4, no. 1, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1038/nrdp.2018.33.
- [10] M. I. Crisóstomo, H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, and H. De Lencastre, “The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 17, p. 9865, 2001, doi: 10.1073/pnas.161272898.
- [11] Z. Xu and C. Yuan, “Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in China Reveals the Key Gene Features Involved in Epidemic Transmission and Adaptive Evolution,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 10, no. 5, 2022, doi: 10.1128/spectrum.01564-22.
- [12] Z. Hou, L. Liu, J. Wei, and B. Xu, “Progress in the Prevalence, Classification and Drug Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*,” *Infect. Drug Resist.*, vol. 16, pp. 3271–3292, 2023, doi: 10.2147/idr.s412308.
- [13] J. A. Hennekinne, *Staphylococcus aureus as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide*. Elsevier (Academic Press), 2017. doi: 10.1016/b978-0-12-809671-0.00007-3.
- [14] M. D. Miliotis and J. W. Bier, *Staphylococcus aureus*. CRC Press, 2003. doi: 10.1201/9780203912065-6.

- [15] T. J. Foster, "The Staphylococcus aureus 'superbug,'" *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 12, pp. 1693–1696, 2004, doi: 10.1172/jci23825.
- [16] G. Y. C. Cheung, J. S. Bae, and M. Otto, "Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus," *Virulence*, vol. 12, no. 1, pp. 547–569, 2021, doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- [17] M. Otto, "Staphylococcus aureus toxins," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 32–37, 2014, doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- [18] B. J. Berube and J. B. Wardenburg, "Staphylococcus aureus α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue," *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 6, pp. 1140–1166, 2013, doi: 10.3390/toxins5061140.
- [19] M. M. Dinges, P. M. Orwin, and P. M. Schlievert, "Exotoxins of Staphylococcus aureus," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 16–34, 2000, doi: 10.1128/cmr.13.1.16.
- [20] M. Huseby *et al.*, "Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 23, pp. 8719–8726, 2007, doi: 10.1128/jb.00741-07.
- [21] Z. Zhu, Z. Hu, S. Li, R. Fang, H. K. Ono, and D. L. Hu, "Molecular Characteristics and Pathogenicity of Staphylococcus aureus Exotoxins," *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 395, vol. 25, no. 1, p. 395, 2023, doi: 10.3390/ijms25010395.
- [22] M. Pivard *et al.*, "Complex Regulation of Gamma-Hemolysin Expression Impacts Staphylococcus aureus Virulence," *Microbiol. Spectr.*, vol. 11, no. 4, 2023, doi: 10.1128/spectrum.01073-23.
- [23] M. Su *et al.*, "Genomic analysis of variability in Delta-toxin levels between Staphylococcus aureus strains," *PeerJ*, vol. 2020, no. 3, p. e8717, 2020, doi: 10.7717/peerj.8717.
- [24] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, 2015, doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- [25] R. H. F. Bashabsheh, O. AL-Fawares, I. Natsheh, R. Bdeir, R. O. Al-Khreshieh, and H. H. F. Bashabsheh, "Staphylococcus aureus epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and application of nano-therapeutics as a promising approach to combat methicillin resistant Staphylococcus aureus," *Pathog. Glob. Health*, vol. 118, no. 3, p. 209, 2023, doi: 10.1080/20477724.2023.2285187.
- [26] K. Sivaraman, N. Venkataraman, and A. M. Cole, "Staphylococcus aureus nasal carriage and its contributing factors," *Future Microbiol.*, vol. 4, no. 8, pp. 999–1008, 2009, doi: 10.2217/fmb.09.79.
- [27] H. F. L. Wertheim *et al.*, "The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, pp. 751–762, 2005, doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4.
- [28] M. E. Mulcahy and R. M. McLoughlin, "Host–Bacterial Crosstalk Determines Staphylococcus aureus Nasal Colonization," *Trends Microbiol.*, vol. 24, no. 11, pp. 872–886, 2016, doi: 10.1016/j.tim.2016.06.012.
- [29] A. Sakr, F. Brégeon, J. L. Mège, J. M. Rolain, and O. Blin, "Staphylococcus aureus nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. Oct, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02419.

- [30] M. Z. David and R. S. Daum, "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 616–687, 2010, doi: 10.1128/cmr.00081-09.
- [31] A. Hassoun, P. K. Linden, and B. Friedman, "Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment," *Crit. Care*, vol. 21, no. 1, p. 211, 2017, doi: 10.1186/S13054-017-1801-3.
- [32] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, 2015, doi: 10.1128/cmr.00134-14.
- [33] M. Hutchings, A. Truman, and B. Wilkinson, "Antibiotics: past, present and future," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 51, pp. 72–80, 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [34] B. Ali Alghamdi *et al.*, "Antimicrobial resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 30, no. 4, p. 103604, 2023, doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103604.
- [35] S. Chhabra, A. B. Taksande, and P. Munjewar, "The Penicillin Pioneer: Alexander Fleming's Journey to a Medical Breakthrough," *Cureus*, 2024, doi: 10.7759/cureus.65179.
- [36] K. C. Nicolaou and S. Rigol, "A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 71, no. 2, pp. 153–184, 2018, doi: 10.1038/JA.2017.62.
- [37] B. L. Ligon, "Penicillin: Its Discovery and Early Development," *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 1, pp. 52–57, 2004, doi: 10.1053/j.spid.2004.02.001.
- [38] E. P. Abraham and E. Chain, "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin," *Nature*, vol. 146, no. 3713, p. 837, 1940, doi: 10.1038/146837A0.
- [39] Z. Hibstu, H. Belew, Y. Akelew, and H. M. Mengist, "Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections," *Biologics*, vol. 16, pp. 173–186, 2022, doi: 10.2147/BTT.S381237.
- [40] T. R. McCulloch, T. J. Wells, and F. Souza-Fonseca-Guimaraes, "Towards efficient immunotherapy for bacterial infection," *Trends Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 158–169, 2022, doi: 10.1016/j.tim.2021.05.005.
- [41] A. Osterloh, "Vaccination against Bacterial Infections: Challenges, Progress, and New Approaches with a Focus on Intracellular Bacteria," *Vaccines (Basel)*, vol. 10, no. 5, p. 751, 2022, doi: 10.3390/vaccines10050751/S1.
- [42] P. C. Appelbaum, "The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. Suppl. 1, pp. 16–23, 2006, doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01344.x.
- [43] E. Rubinstein and Y. Keynan, "Vancomycin revisited - 60 years later," *Front. Public Health*, vol. 2, no. Oct, p. 77697, 2014, doi: 10.3389/fpubh.2014.00217.
- [44] P. J. Stogios and A. Savchenko, "Molecular mechanisms of vancomycin resistance," *Protein Science*, vol. 29, no. 3, pp. 654–669, 2020, doi: 10.1002/pro.3819.

- [45] S. Jovetic, Y. Zhu, G. L. Marcone, F. Marinelli, and J. Tramper, “ β -Lactam and glycopeptide antibiotics: First and last line of defense?,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 12, pp. 596–604, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.09.004.
- [46] P. Courvalin, “Vancomycin resistance in gram-positive cocci,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 42, no. Suppl. 1, 2006, doi: 10.1086/491711.
- [47] K. Helen and K. Ashlesha, “Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Formidable Threat or Silence before the Storm?,” *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*, vol. 5, no. 5, 2019, doi: 10.23937/2474-3658/1510093.
- [48] T. R. Walsh and R. A. Howe, “The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, pp. 657–675, 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160806.
- [49] A. J. Flint and A. P. Davis, “Vancomycin mimicry: towards new supramolecular antibiotics,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 20, no. 39, pp. 7694–7712, 2022, doi: 10.1039/d2ob01381a.
- [50] M. Arthur, P. Reynolds, and P. Courvalin, “Glycopeptide resistance in enterococci,” *Trends Microbiol.*, vol. 4, no. 10, pp. 401–407, 1996, doi: 10.1016/0966-842X(96)10063-9.
- [51] B. Mlynarczyk-Bonikowska, C. Kowalewski, A. Krolak-Ulinska, and W. Marusza, “Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*,” *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 8088*, vol. 23, no. 15, p. 8088, 2022, doi: 10.3390/IJMS23158088.
- [52] C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, and Z. Wu, “Bacterial resistance to vancomycin: Five genes and one missing hydrogen bond tell the story,” *Chem. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 21–28, 1996, doi: 10.1016/S1074-5521(96)90079-4.
- [53] B. P. Howden, J. K. Davies, P. D. R. Johnson, T. P. Stinear, and M. L. Grayson, “Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 1, p. 99, 2010, doi: 10.1128/CMR.00042-09.
- [54] W. Li *et al.*, “Evaluation of culturable ‘last-resort’ antibiotic resistant pathogens in hospital wastewater and implications on the risks of nosocomial antimicrobial resistance prevalence,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 438, p. 129477, 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129477.
- [55] Z. Lu, R. S. McInnes, F. Allen, K. Gadar, and W. van Schaik, “Resistance to last-resort antibiotics in enterococci,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 49, 2025, doi: 10.1093/femsre/fuaf057.
- [56] D. A. Enoch, J. M. Bygott, M. L. Daly, and J. A. Karas, “Daptomycin,” *Journal of Infection*, vol. 55, no. 3, pp. 205–213, 2007, doi: 10.1016/j.jinf.2007.05.180.
- [57] R. M. Humphries, S. Pollett, and G. Sakoulas, “A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 4, pp. 759–780, 2013, doi: 10.1128/CMR.00030-13.
- [58] H. AlQahtani, S. Baloch, F. S. Aleanizy, F. Y. Alqahtani, and D. Tabb, “Influence of the minimum inhibitory concentration of daptomycin on the outcomes of *Staphylococcus aureus*

- bacteraemia,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 24, pp. 23–26, 2021, doi: 10.1016/J.JGAR.2020.11.015.
- [59] M. Heidary, A. D. Khosravi, S. Khoshnood, M. J. Nasiri, S. Soleimani, and M. Goudarzi, “Daptomycin,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, no. 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1093/jac/dkx349.
- [60] F. P. Tally and M. F. DeBruin, “Development of daptomycin for gram-positive infections,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 46, no. 4, pp. 523–526, 2000, doi: 10.1093/jac/46.4.523.
- [61] H. W. Huang, “DAPTOMYCIN, its membrane-active mechanism vs. that of other antimicrobial peptides,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1862, no. 10, p. 183395, 2020, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183395.
- [62] R. M. Antonello, D. Canetti, and N. Riccardi, “Daptomycin synergistic properties from in vitro and in vivo studies: a systematic review,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 78, no. 1, pp. 52–77, 2023, doi: 10.1093/jac/dkac346.
- [63] K. L. Tedesco and M. J. Rybak, “Daptomycin,” *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 24, no. 1, pp. 41–57, 2004, doi: 10.1592/phco.24.1.41.34802.
- [64] D. J. Cada, D. E. Baker, and T. Levien, “Linezolid,” *Hosp. Pharm.*, vol. 35, no. 9, pp. 980–993, 2000, doi: 10.1177/001857870003500907.
- [65] D. C. Vinh and E. Rubinstein, “Linezolid: a review of safety and tolerability,” *Journal of Infection*, vol. 59, no. Suppl. 1, pp. S59–S74, 2009, doi: 10.1016/S0163-4453(09)60009-8.
- [66] D. Clemett and A. Markham, “Linezolid,” *Drugs*, vol. 59, no. 4, pp. 815–827, 2012, doi: 10.2165/00003495-200059040-00007.
- [67] R. Norrby, “Linezolid-a review of the first oxazolidinone,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 2, no. 2, pp. 293–302, 2001, doi: 10.1517/14656566.2.2.293.
- [68] J. C. Hamel, D. Stapert, J. K. Moerman, and C. W. Ford, “Linezolid, critical characteristics,” *Infection*, vol. 28, no. 1, pp. 60–64, 2000, doi: 10.1007/PL00012242.
- [69] J. W. Chien, M. L. Kucia, and R. A. Salata, “Use of linezolid, an oxazolidinone, in the treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 1, pp. 146–151, 2000, doi: 10.1086/313597.
- [70] V. Patrulea, G. Borchard, and O. Jordan, “An Update on Antimicrobial Peptides (AMPs) and Their Delivery Strategies for Wound Infections,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 9, p. 840, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12090840.
- [71] A. Y. Chen, M. J. Zervos, and J. A. Vazquez, “Dalbavancin: A novel antimicrobial,” *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 61, no. 5, pp. 853–863, 2007, doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01318.x.
- [72] V. R. Anderson and G. M. Keating, “Dalbavancin,” *Drugs*, vol. 68, no. 5, pp. 639–648, 2012, doi: 10.2165/00003495-200868050-00006.
- [73] D. Cada, K. Ingram, and D. Baker, “Formulary drug reviews : Dalbavancin,” *Hosp. Pharm.*, vol. 49, no. 9, pp. 851–861, 2014, doi: 10.1310/hpj4909-851.
- [74] P. L. Gonzalez *et al.*, “Safety of Dalbavancin in the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections (ABSSSI): Nephrotoxicity Rates Compared with Vancomycin: A

- Post Hoc Analysis of Three Clinical Trials,” *Infect. Dis. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 471–481, 2021, doi: 10.1007/s40121-021-00402-0.
- [75] N. Monteagudo-Martínez, J. Solís-García Del Pozo, I. Ikuta, M. Galindo, and J. Jordán, “Systematic review and meta-analysis on the safety of dalbavancin,” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 20, no. 9, pp. 1095–1107, 2021, doi: 10.1080/14740338.2021.1935864.
- [76] K. D. Brade, J. M. Rybak, and M. J. Rybak, “Oritavancin: A New Lipoglycopeptide Antibiotic in the Treatment of Gram-Positive Infections,” *Infect. Dis. Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1007/S40121-016-0103-4.
- [77] G. G. Zhanel *et al.*, “New Lipoglycopeptides,” *Drugs*, vol. 70, no. 7, pp. 859–886, 2012, doi: 10.2165/11534440-000000000-00000.
- [78] A. Belley *et al.*, “Oritavancin kills stationary-phase and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in vitro,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 3, pp. 918–925, 2009, doi: 10.1128/AAC.00766-08.
- [79] N. G. Oliveira Júnior, C. M. Souza, D. F. Buccini, M. H. Cardoso, and O. L. Franco, “Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications,” 2025, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41579-025-01200-y.
- [80] R. Seyfi *et al.*, “Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action,” 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s10989-019-09946-9.
- [81] J. Lei *et al.*, “The antimicrobial peptides and their potential clinical applications,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 11, no. 7, p. 3919, 2019, Accessed: Nov. 27, 2025. [Online]. Available: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6684887/>
- [82] A. A. Bahar and D. Ren, “Antimicrobial Peptides,” *Pharmaceuticals*, vol. 6, no. 12, pp. 1543–1575, 2013, doi: 10.3390/PH6121543.
- [83] K. A. Brogden, “Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?,” *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:3, vol. 3, no. 3, pp. 238–250, Mar. 2005, doi: 10.1038/nrmicro1098.
- [84] M. Sadeeq, Y. Li, C. Wang, F. Hou, J. Zuo, and P. Xiong, “Unlocking the power of antimicrobial peptides: advances in production, optimization, and therapeutics,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 15, 2025, doi: 10.3389/FCIMB.2025.1528583.
- [85] S. Chaudhary, Z. Ali, and M. Mahfouz, “Molecular farming for sustainable production of clinical-grade antimicrobial peptides,” *Plant Biotechnol. J.*, vol. 22, no. 8, pp. 2282–2300, 2024, doi: 10.1111/PBI.14344.
- [86] C. Shao, Y. Zhu, Z. Lai, P. Tan, and A. Shan, “Antimicrobial peptides with protease stability: progress and perspective,” *Future Med. Chem.*, vol. 11, no. 16, pp. 2047–2050, 2019, doi: 10.4155/fmc-2019-0167.
- [87] H. Miao, L. Wang, Q. Wu, and Z. Huang, “Antimicrobial Peptides: Mechanism, Expressions, and Optimization Strategies,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 17, no. 2, pp. 857–872, 2025, doi: 10.1007/S12602-024-10391-4.
- [88] “POLYMYXIN B drug label.” Accessed: Jun. 08, 2026. [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/060716s018lbl.pdf

- [89] O. Simonetti *et al.*, “Efficacy of Cathelicidin LL-37 in an MRSA Wound Infection Mouse Model,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 10, p. 1210, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10101210.
- [90] O. E. Voronko, V. A. Khotina, D. A. Kashirskikh, A. A. Lee, and V. A. oglu Gasanov, “Antimicrobial Peptides of the Cathelicidin Family: Focus on LL-37 and Its Modifications,” *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 8103, vol. 26, no. 16, p. 8103, 2025, doi: 10.3390/IJMS26168103.
- [91] M. F. Burton and P. G. Steel, “The chemistry and biology of LL-37,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 26, no. 12, pp. 1572–1584, 2009, doi: 10.1039/B912533G.
- [92] K. Bandurska, A. Berdowska, R. Barczyńska-Felusiak, and P. Krupa, “Unique features of human cathelicidin LL-37,” *BioFactors*, vol. 41, no. 5, pp. 289–300, 2015, doi: 10.1002/biof.1225.
- [93] D. Vandamme, B. Landuyt, W. Luyten, and L. Schoofs, “A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin human cathelicidin peptide,” *Cell. Immunol.*, vol. 280, no. 1, pp. 22–35, 2012, doi: 10.1016/j.cellimm.2012.11.009.
- [94] K. E. Ridyard and J. Overhage, “The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 6, p. 650, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10060650.
- [95] M. F. Mohamed, A. Abdelkhalek, and M. N. Seleem, “Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*,” *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep29707.
- [96] J. Kang, M. J. Dietz, and B. Li, “Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms,” *PLoS One*, vol. 14, no. 6, p. e0216676, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0216676.
- [97] S. Gunasekera, T. Muhammad, A. A. Strömstedt, K. J. Rosengren, and U. Göransson, “Backbone Cyclization and Dimerization of LL-37-Derived Peptides Enhance Antimicrobial Activity and Proteolytic Stability,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 508209, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00168.
- [98] J. Lakshmaiah Narayana *et al.*, “Origami of KR-12 Designed Antimicrobial Peptides and Their Potential Applications,” *Antibiotics (Basel)*, vol. 13, no. 9, 2024, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS13090816.
- [99] C. D. Ciornei, T. Sigurdardóttir, A. Schmidtchen, and M. Bodelsson, “Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 7, pp. 2845–2850, 2005, doi: 10.1128/AAC.49.7.2845-2850.2005.
- [100] Y. Yuan *et al.*, “Exploring the Antimicrobial Potential of LL-37 Derivatives: Recent Developments and Challenges,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 11, no. 6, pp. 3145–3164, 2025, doi: 10.1021/acsbiomaterials.4C02029.
- [101] Y. Zhao *et al.*, “Efficacy and safety of Oral LL-37 against the Omicron BA.5.1.3 variant of SARS-COV-2: A randomized trial,” *J. Med. Virol.*, vol. 95, no. 8, p. e29035, 2023, doi: 10.1002/JMV.29035.

- [102] E. Miranda *et al.*, “Efficacy of LL-37 cream in enhancing healing of diabetic foot ulcer: a randomized double-blind controlled trial,” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 315, no. 9, pp. 2623–2633, 2023, doi: 10.1007/S00403-023-02657-8.
- [103] M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, W. Lu, and J. Lubkowski, “Human β -defensins,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 11, pp. 1294–1313, 2006, doi: 10.1007/s00018-005-5540-2.
- [104] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schröder, “Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 8, pp. 5707–5713, 2001, doi: 10.1074/jbc.M008557200.
- [105] Z. Feng, B. Jiang, J. Chandra, M. Ghannoum, S. Nelson, and A. Weinberg, “Human Beta-defensins: Differential Activity against Candidal Species and Regulation by *Candida albicans*,” *J. Dent. Res.*, vol. 84, no. 5, pp. 445–450, 2005, doi: 10.1177/154405910508400509.
- [106] M. E. Quiñones-Mateu *et al.*, “Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication,” *AIDS*, vol. 17, no. 16, 2003, doi: 10.1097/00002030-200311070-00001.
- [107] D. J. Schibli *et al.*, “The Solution Structures of the Human β -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 10, pp. 8279–8289, 2002, doi: 10.1074/JBC.M108830200.
- [108] O. Toke, “Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections,” *Biopolymers*, vol. 80, no. 6, pp. 717–735, 2005, doi: 10.1002/BIP.20286.
- [109] V. Dhople, A. Krukemeyer, and A. Ramamoorthy, “The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1758, no. 9, pp. 1499–1512, 2006, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2006.07.007.
- [110] M. Hans and V. Madaan Hans, “Epithelial Antimicrobial Peptides: Guardian of the Oral Cavity,” *Int. J. Pept.*, vol. 2014, no. 1, p. 370297, 2014, doi: 10.1155/2014/370297.
- [111] F. Semple and J. R. Dorin, “ β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more?,” *J. Innate Immun.*, vol. 4, no. 4, pp. 337–348, 2012, doi: 10.1159/000336619.
- [112] T. Ganz, “Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 9, pp. 710–720, 2003, doi: 10.1038/nri1180.
- [113] A. Peschel and H. G. Sahl, “The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, no. 7, pp. 529–536, 2006, doi: 10.1038/nrmicro1441.
- [114] N. Ganesan, B. Mishra, L. Felix, and E. Mylonakis, “Antimicrobial Peptides and Small Molecules Targeting the Cell Membrane of *Staphylococcus aureus*,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 87, no. 2, 2023, doi: 10.1128/mmbr.00037-22.

- [115] Z. Lai, X. Yuan, H. Chen, Y. Zhu, N. Dong, and A. Shan, "Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability," *Biotechnol. Adv.*, vol. 59, p. 107962, 2022, doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107962.
- [116] J. M. Sierra and M. Viñas, "Future prospects for Antimicrobial peptide development: peptidomimetics and antimicrobial combinations," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 16, no. 6, pp. 601–604, 2021, doi: 10.1080/17460441.2021.1892072.
- [117] J. I. Lachowicz *et al.*, "The Best Peptidomimetic Strategies to Undercover Antibacterial Peptides," *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 7349*, vol. 21, no. 19, p. 7349, 2020, doi: 10.3390/IJMS21197349.
- [118] E. J. A. Douglas, S. W. Wulandari, S. D. Lovell, and M. Laabei, "Novel antimicrobial strategies to treat multi-drug resistant Staphylococcus aureus infections," *Microb. Biotechnol.*, vol. 16, no. 7, pp. 1456–1474, 2023, doi: 10.1111/1751-7915.14268.
- [119] R. P. Kowalski, E. G. Romanowski, K. A. Yates, and F. S. Mah, "An Independent Evaluation of a Novel Peptide Mimetic, Brilacidin (PMX30063), for Ocular Anti-Infective," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 32, no. 1, pp. 23–27, 2016, doi: 10.1089/jop.2015.0098.
- [120] A. Panjla, G. Kaul, S. Chopra, A. Titz, and S. Verma, "Short Peptides and Their Mimetics as Potent Antibacterial Agents and Antibiotic Adjuvants," *ACS Chem. Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 2731–2745, 2021, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.1C00626.
- [121] B. Mensa, G. L. Howell, R. Scott, and W. F. DeGrado, "Comparative Mechanistic Studies of Brilacidin, Daptomycin, and the Antimicrobial Peptide LL16," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 9, p. 5136, 2014, doi: 10.1128/AAC.02955-14.
- [122] A. C. Nilsson *et al.*, "Ltx-109 is a novel agent for nasal decolonization of methicillin-resistant and -sensitive staphylococcus aureus," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 1, pp. 145–151, 2015, doi: 10.1128/AAC.03513-14.
- [123] J. Isaksson, B. O. Brandsdal, M. Engqvist, G. E. Flaten, J. S. M. Svendsen, and W. Stensen, "A Synthetic Antimicrobial Peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical Impact on Membrane Disruption," *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 16, pp. 5786–5795, 2011, doi: 10.1021/JM200450H.
- [124] L. D. Saravolatz *et al.*, "In vitro activities of LTX-109, a synthetic antimicrobial peptide, against methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, daptomycin-nonsusceptible, and linezolid-nonsusceptible Staphylococcus aureus," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 8, pp. 4478–4482, 2012, doi: 10.1128/AAC.00194-12.
- [125] L. Björck, A. Grubb, and L. Kjellén, "Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of herpes simplex virus," *J. Virol.*, vol. 64, no. 2, pp. 941–943, 1990, doi: 10.1128/JVI.64.2.941-943.1990.
- [126] M. Mussap and M. Plebani, "Biochemistry and clinical role of human cystatin C," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 41, no. 5–6, pp. 467–550, 2004, doi: 10.1080/10408360490504934.
- [127] F. Kasprzykowski, C. Schalén, R. Kasprzykowska, B. Jastrzebska, and A. Grubb, "Synthesis and antibacterial properties of peptidyl derivatives and cyclopeptides structurally based upon the inhibitory centre of human cystatin C: Dissociation of antiproteolytic and antibacterial

- effects,” *APMIS*, vol. 108, no. 7–8, pp. 473–481, 2000, doi: 10.1034/J.1600-0463.2000.01087-8473.
- [128] A. Jasir, F. Kasprzykowski, R. Kasprzykowska, V. Lindström, C. Schalen, and A. Grubb, “New antimicrobial cystatin C-based peptide active against gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci,” *APMIS*, vol. 111, no. 11, pp. 1004–1010, 2003, doi: 10.1111/j.1600-0463.2003.t01-1-apm1111110.x.
- [129] M. Dzierżyńska *et al.*, “Role of Structural Modifications in Peptidomimetic Compounds as Potential Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*: Balancing Bioavailability, Safety, and Antimicrobial Activity,” *ACS Omega*, vol. 10, no. 30, pp. 33435–33460, 2025, doi: 10.1021/ACSOMEGA.5C03775.
- [130] M. Piśkuła *et al.*, “Cystatin C peptidomimetic derivative with antimicrobial properties as a potential compound against wound infections,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 25, no. 4, pp. 1431–1439, 2017, doi: 10.1016/J.BMC.2017.01.004.
- [131] M. Dzierżyńska *et al.*, “Synthesis and SAR Studies of Antibacterial Peptidyl Derivatives Based upon the Binding Site of Human Cystatin C,” *Protein Pept. Lett.*, vol. 26, no. 6, pp. 423–434, 2019, doi: 10.2174/0929866526666190311162716.
- [132] A. Pogorzelska, “Badanie zależności między strukturą a aktywnością związków antybakteryjnych zaprojektowanych w oparciu o sekwencję N-terminalnego fragmentu wiążącego ludzkiej cystatyny C,” Praca doktorska, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 2010.
- [133] M. A. Smużyńska, “Badania wpływu modyfikacji cząsteczki Cystapep 1 na jej aktywność biologiczną,” Praca doktorska, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 2013.
- [134] G. Lancini, F. Parenti, and G. G. Gallo, “The Mechanism of Action of Antibiotics,” *J. Ark. Med. Soc.*, vol. 50, no. 8, pp. 37–83, 1995, doi: 10.1007/978-1-4757-9200-3_3.
- [135] S. Saikia and P. Chetia, “Antibiotics: From Mechanism of Action to Resistance and Beyond,” *Indian J. Microbiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 821–845, 2024, doi: 10.1007/S12088-024-01285-8.
- [136] R. Fernandes, P. Amador, and C. Prudêncio, “ β -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance,” *Reviews and Research in Medical Microbiology*, vol. 24, no. 1, pp. 7–17, 2013, doi: 10.1097/MRM.0B013E3283587727.
- [137] H. Grundmann, M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, and E. Tiemersma, “Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat,” *Lancet*, vol. 368, no. 9538, pp. 874–885, 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)68853-3.
- [138] K. Poole, “Resistance to β -lactam antibiotics,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, no. 17, pp. 2200–2223, 2004, doi: 10.1007/s00018-004-4060-9.
- [139] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, “Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians,” *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, vol. 33, no. 3, pp. 300–305, 2017, doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.

- [140] B. Bechinger and S. U. Gorr, "Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance," *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 3, pp. 254–260, 2017, doi: 10.1177/0022034516679973.
- [141] B. Bechinger, "The SMART model: Soft Membranes Adapt and Respond, also Transiently, in the presence of antimicrobial peptides," *J. Pept. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 346–355, 2015, doi: 10.1002/PSC.2729.
- [142] K. Sharma, S. Aaghaz, K. Shenmar, and R. Jain, "Short Antimicrobial Peptides," *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 13, no. 1, pp. 12–52, 2018, doi: 10.2174/1574891X13666180628105928.
- [143] X. Z. Li, P. Plésiat, and H. Nikaido, "The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 2, pp. 337–418, 2015, doi: 10.1128/CMR.00117-14.
- [144] K. Poole, "Efflux-mediated antimicrobial resistance," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, no. 1, pp. 20–51, 2005, doi: 10.1093/jac/dki171.
- [145] M. M. Alam, N. Kobayashi, N. Uehara, and N. Watanabe, "Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes qacA and qacB in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*," *Microbial drug resistance*, vol. 9, no. 2, pp. 109–121, 2003, doi: 10.1089/107662903765826697.
- [146] S. Hassanzadeh, S. ganjloo, M. R. Pourmand, R. Mashhadi, and K. Ghazvini, "Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review," *Microb. Pathog.*, vol. 139, p. 103850, 2020, doi: 10.1016/J.MICPATH.2019.103850.
- [147] T. G. Littlejohn *et al.*, "Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 95, no. 2–3, pp. 259–265, 1992, doi: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB05376.X.
- [148] K. S. Long and B. Vester, "Antibiotic Resistance Mechanisms, with an Emphasis on Those Related to the Ribosome," *EcoSal Plus*, vol. 3, no. 1, 2008, doi: 10.1128/ecosalplus.2.5.7.
- [149] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, and J. J. Collins, "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 423–435, 2010, doi: 10.1038/nrmicro2333.
- [150] D. N. Wilson, "The A-Z of bacterial translation inhibitors," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 44, no. 6, pp. 393–433, 2009, doi: 10.3109/10409230903307311.
- [151] P. M. Dowling, "Aminoglycosides and Aminocyclitols," *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, pp. 233–255, 2013, doi: 10.1002/9781118675014.CH14.
- [152] G. D. Wright, "Mechanisms of resistance to antibiotics," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 563–569, 2003, doi: 10.1016/J.CBPA.2003.08.004.
- [153] D. N. Wilson, "Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–48, 2013, doi: 10.1038/nrmicro3155.
- [154] K. Drlica and M. Malik, "Fluoroquinolones: Action and Resistance," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 249–282, 2005, doi: 10.2174/1568026033452537.

- [155] M. A. Abushaheen *et al.*, “Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance,” *Disease a Month*, vol. 66, no. 6, p. 100971, 2020, doi: 10.1016/J.DISAMONTH.2020.100971.
- [156] S. A. Darst, “New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 29, no. 4, pp. 159–162, 2004, doi: 10.1016/j.tibs.2004.02.005.
- [157] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. V. Piddock, “Molecular mechanisms of antibiotic resistance,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2014, doi: 10.1038/nrmicro3380.
- [158] M. T. Cabeen and C. Jacobs-Wagner, “Bacterial cell shape,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 8, pp. 601–610, 2005, doi: 10.1038/NRMICRO1205.
- [159] J. P. Creecy and T. Conway, “Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 23, pp. 133–140, 2015, doi: 10.1016/J.MIB.2014.11.011.
- [160] N. J. Loman and M. J. Pallen, “Twenty years of bacterial genome sequencing,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 12, pp. 787–794, 2015, doi: 10.1038/nrmicro3565.
- [161] K. R. Kukurba and S. B. Montgomery, “RNA Sequencing and Analysis,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2015, no. 11, pp. 951–969, 2015, doi: 10.1101/pdb.top084970.
- [162] A. E. Saliba, S. C. Santos, and J. Vogel, “New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 35, pp. 78–87, 2017, doi: 10.1016/J.MIB.2017.01.001.
- [163] A. O’Rourke *et al.*, “Mechanism-of-Action Classification of Antibiotics by Global Transcriptome Profiling,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 64, no. 3, 2020, doi: 10.1128/AAC.01207-19.
- [164] M. B. Jones *et al.*, “Reducing the Bottleneck in Discovery of Novel Antibiotics,” *Microb. Ecol.*, vol. 73, no. 3, pp. 658–667, 2017, doi: 10.1007/S00248-016-0889-3.
- [165] N. J. Croucher and N. R. Thomson, “Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 619–624, 2010, doi: 10.1016/J.MIB.2010.09.009.
- [166] C. Wangsanuwat, K. A. Heom, E. Liu, M. A. O’Malley, and S. S. Dey, “Efficient and cost-effective bacterial mRNA sequencing from low input samples through ribosomal RNA depletion,” *BMC Genomics*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.1186/S12864-020-07134-4.
- [167] S. J. Salipante, D. J. SenGupta, L. A. Cummings, T. A. Land, D. R. Hoogestraat, and B. T. Cookson, “Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 1072–1079, 2015, doi: 10.1128/JCM.03385-14.
- [168] M. Kuroda *et al.*, “Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Lancet*, vol. 357, no. 9264, pp. 1225–1240, 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(00)04403-2.
- [169] J. M. Heather and B. Chain, “The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA,” *Genomics*, vol. 107, no. 1, p. 1, 2016, doi: 10.1016/J.YGENO.2015.11.003.
- [170] P. C. Ng and E. F. Kirkness, “Whole Genome Sequencing,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 628, pp. 215–226, 2010, doi: 10.1007/978-1-60327-367-1_12.

- [171] A. Chernobrovkin, C. Marin-Vicente, N. Visa, and R. A. Zubarev, “Functional Identification of Target by Expression Proteomics (FITeXP) reveals protein targets and highlights mechanisms of action of small molecule drugs,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, 2015, doi: 10.1038/srep11176.
- [172] A. A. Saei *et al.*, “Comprehensive chemical proteomics for target deconvolution of the redox active drug auranofin,” *Redox Biol.*, vol. 32, no. 2, p. 101491, 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101491.
- [173] M. Gaetani *et al.*, “Proteome Integral Solubility Alteration: A High-Throughput Proteomics Assay for Target Deconvolution,” *J. Proteome Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 4027–4037, 2019, doi: 10.1021/ACS.JPROTEOME.9B00500.
- [174] X. Zhang, O. Lytovchenko, S. L. Lundström, R. A. Zubarev, and M. Gaetani, “Proteome Integral Solubility Alteration (PISA) Assay in Mammalian Cells for Deep, High-Confidence, and High-Throughput Target Deconvolution,” *Bio. Protoc.*, vol. 12, no. 22, 2022, doi: 10.21769/bioprotoc.4556.
- [175] R. Maity *et al.*, “Merging multi-omics with proteome integral solubility alteration unveils antibiotic mode of action,” *Elife*, vol. 13, 2024, doi: 10.7554/elife.96343.
- [176] Y. Wang *et al.*, “The Development of Microscopic Imaging Technology and its Application in Micro- and Nanotechnology,” *Front. Chem.*, vol. 10, 2022, doi: 10.3389/FCHEM.2022.931169.
- [177] M. Hartmann, M. Berditsch, J. Hawecker, M. F. Ardakani, D. Gerthsen, and A. S. Ulrich, “Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 8, pp. 3132–3142, 2010, doi: 10.1128/AAC.00124-10.
- [178] T. Nishida, S. Seino, and Y. Imoto, “Visualizing Antimicrobial Effects on Bacterial Surfaces by SEM: A Comparative Study of Hexamethyldisilazane (HMDS) and Freeze-Drying,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 88, no. 12, pp. 3273–3281, 2025, doi: 10.1002/JEMT.70037.
- [179] N. A. Muhamad Hendri, N. A. Nor Amdan, S. O. Dounis, N. Sulaiman Najib, and S. R. Louis, “Ultrastructural and morphological studies on variables affecting Escherichia coli with selected commercial antibiotics,” *The Cell Surface*, vol. 11, 2024, doi: 10.1016/j.tcs.2024.100120.
- [180] S. Dumpati and D. Dutta, “Bacterial Dye Release Measures in Response to Antimicrobial Peptides,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 2402, pp. 285–290, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-1843-1_21.
- [181] C. Riccardi and I. Nicoletti, “Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.
- [182] B. L. Roth, M. Poot, S. T. Yue, and P. J. Millard, “Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 6, p. 2421, 1997, doi: 10.1128/AEM.63.6.2421-2431.1997.

- [183] S. Pengfei *et al.*, “L007-0069 kills *Staphylococcus aureus* in high resistant phenotypes,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 79, no. 11, 2022, doi: 10.1007/S00018-022-04588-5.
- [184] M. Rosenberg, N. F. Azevedo, and A. Ivask, “Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42906-3.
- [185] P. N. Tawakoli, A. Al-Ahmad, W. Hoth-Hannig, M. Hannig, and C. Hannig, “Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm,” *Clin. Oral Investig.*, vol. 17, no. 3, pp. 841–850, 2012, doi: 10.1007/s00784-012-0792-3.
- [186] J. Robertson, C. McGoverin, F. Vanholsbeeck, and S. Swift, “Optimisation of the protocol for the liVE/DEAD®BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. APR, p. 448819, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00801.
- [187] H. M. Davey and P. Hexley, “Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide,” *Environ. Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 163–171, Jan. 2011, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
- [188] P. Stiefel, S. Schmidt-Emrich, K. Maniura-Weber, and Q. Ren, “Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide,” *BMC Microbiol.*, vol. 15, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s12866-015-0376-x.
- [189] S. A. R. Naqvi, “^{99m}Tc-labeled antibiotics for infection diagnosis: Mechanism, action, and progress,” *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 99, no. 1, pp. 56–74, 2022, doi: 10.1111/CBDD.13923.
- [190] M. Maciag-Dorszyńska, G. Wegrzyn, and B. Guzow-Krzemińska, “Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 353, pp. 57–62, 2014, doi: 10.1111/1574-6968.12409.
- [191] L. de León, M. R. López, and L. Moujir, “Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*,” *Microbiol. Res.*, vol. 165, no. 8, pp. 617–626, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.MICRES.2009.12.004.
- [192] A. Patrzykat, C. L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza, and R. E. W. Hancock, “Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 3, pp. 605–614, 2002, doi: 10.1128/AAC.46.3.605-614.2002.
- [193] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalén, F. Kasprzykowski, and R. Kasprzykowska, “Novel peptide derivatives useful as antimicrobial agents for treating wounds,” US20090118198A1, May 07, 2009
- [194] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalén, F. Kasprzykowski, and R. Kasprzykowska, “Use of derivatives of dipeptides for the manufacture of a medicament for the treatment of microbial infections,” US20080255055A1, Oct. 16, 2008
- [195] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalén, F. Kasprzykowski, and R. Kasprzykowska, “Antimicrobial compounds,” US20060116327A1, Jun. 01, 2006

- [196] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalén, F. Kasprzykowski, and R. Kasprzykowska, "Antimicrobial compounds," US7691805B2, Apr. 06, 2010
- [197] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalén, F. Kasprzykowski, and R. Kasprzykowska, "Antimicrobial compounds," US7691805B2, Apr. 06, 2010
- [198] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery," *Current computer aided drug design*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, 2011, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [199] A. Cherkasov *et al.*, "QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?," *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 12, pp. 4977–5010, 2014, doi: 10.1021/JM4004285.
- [200] R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, 2002, doi: 10.1021/JA00897A025.
- [201] J. M. Palomo, "Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 62, pp. 32658–32672, 2014, doi: 10.1039/C4RA02458C.
- [202] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 2, pp. 163–175, 2008, doi: 10.1038/NPROT.2007.521.
- [203] H. Nikaido, "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, no. 4, pp. 593–656, 2003, doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- [204] M. Luisa Navarro-Pérez, M. Coronada Fernández-Calderón, and V. Vadillo-Rodríguez, "Decomposition of Growth Curves into Growth Rate and Acceleration: a Novel Procedure To Monitor Bacterial Growth and the Time-Dependent Effect of Antimicrobials," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 88, no. 3, 2022, doi: 10.1128/AEM.01849-21.
- [205] J. W. Mouton and A. A. Vinks, "Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 44, no. 2, pp. 201–210, 2005, doi: 10.2165/00003088-200544020-00005.
- [206] M. Mueller, A. De La Peña, and H. Derendorf, "Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 2, pp. 369–377, 2004, doi: 10.1128/AAC.48.2.369-377.2004.
- [207] F. H. Waghv *et al.*, "Designing antibacterial peptides with enhanced killing kinetics," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. FEB, p. 320734, Feb. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.00325.
- [208] P. Mira, P. Yeh, and B. G. Hall, "Estimating microbial population data from optical density," *PLoS One*, vol. 17, no. 10, 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0276040.
- [209] C. T. Meyer, G. K. Lynch, D. F. Stamo, E. J. Miller, A. Chatterjee, and J. M. Kralj, "A high-throughput and low-waste viability assay for microbes," *Nat. Microbiol.*, vol. 8, no. 12, 2023, doi: 10.1038/S41564-023-01513-9.
- [210] J. L. Klepeis *et al.*, "Integrated computational and experimental approach for lead optimization and design of compstatin variants with improved activity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 28, pp. 8422–8423, 2003, doi: 10.1021/JA034846P.

- [211] M. Karplus and J. A. McCammon, "Molecular dynamics simulations of biomolecules," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 646–652, 2002, doi: 10.1038/NSB0902-646.
- [212] G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, and P. Ascenzi, "Human serum albumin: from bench to bedside," *Mol. Aspects Med.*, vol. 33, no. 3, pp. 209–290, 2012, doi: 10.1016/J.MAM.2011.12.002.
- [213] F. Kratz, "Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles," *Journal of Controlled Release*, vol. 132, no. 3, pp. 171–183, 2008, doi: 10.1016/J.JCONREL.2008.05.010.
- [214] A. Kohler, E. M. Jülke, J. Stichel, and A. G. Beck-Sickinger, "Comparison of Protocols to Test Peptide Stability in Blood Plasma and Cell Culture Supernatants," *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, vol. 7, no. 11, pp. 3618–3625, 2024, doi: 10.1021/ACSPTSCI.4C00503.
- [215] M. Werle and A. Bernkop-Schnürch, "Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs," *Amino Acids*, vol. 30, no. 4, pp. 351–367, 2006, doi: 10.1007/S00726-005-0289-3.
- [216] N. Molchanova, P. R. Hansen, and H. Franzyk, "Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs," *Molecules*, vol. 22, no. 9, 2017, doi: 10.3390/MOLECULES22091430.
- [217] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock, and G. Schneider, "Designing antimicrobial peptides: form follows function," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, no. 1, pp. 37–51, 2011, doi: 10.1038/NRD3591.
- [218] Y. Niu *et al.*, "Lipo- γ -AApeptides as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 8, pp. 4003–4009, 2012, doi: 10.1021/JM300274P.
- [219] J. Zhao, C. Zhao, G. Liang, M. Zhang, and J. Zheng, "Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, no. 12, pp. 3280–3296, 2013, doi: 10.1021/CI400477E.
- [220] C. Zhang *et al.*, "Antimicrobial activity of novel symmetrical antimicrobial peptides centered on a hydrophilic motif against resistant clinical isolates: in vitro and in vivo analyses," *Microbiol. Spectr.*, vol. 12, no. 11, 2024, doi: 10.1128/SPECTRUM.00265-24.
- [221] K. Matsuzaki, "Control of cell selectivity of antimicrobial peptides," *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, vol. 1788, no. 8, pp. 1687–1692, 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.013.
- [222] Y. Chen, M. T. Guarnieri, A. I. Vasil, M. L. Vasil, C. T. Mant, and R. S. Hodges, "Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 4, pp. 1398–1406, 2007, doi: 10.1128/AAC.00925-06.
- [223] T. F. Mah, "Biofilm-specific antibiotic resistance," *Future Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1061–1072, 2012, doi: 10.2217/FMB.12.76.
- [224] N. K. Archer, M. J. Mazaitis, J. William Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers, and M. E. Shirtliff, "Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease," *Virulence*, vol. 2, no. 5, p. 445, 2011, doi: 10.4161/VIRU.2.5.17724.

- [225] M. Otto, “Staphylococcal Biofilms,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 6, no. 4, 2018, doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0023-2018.
- [226] S. Croes, R. H. Deurenberg, M. L. L. Boumans, P. S. Beisser, C. Neef, and E. E. Stobberingh, “Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage,” *BMC Microbiol.*, vol. 9, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-229.
- [227] N. Kaźmierczak, B. Grygorcewicz, M. Roszak, B. Bochentyn, and L. Piechowicz, “Comparative Assessment of Bacteriophage and Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus Biofilms,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ijms23031274.
- [228] N. Akhash, A. Farajzadeh Sheikh, and Z. Farshadzadeh, “Design of a novel analogue peptide with potent antibiofilm activities against Staphylococcus aureus based upon a sapecin B-derived peptide,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, 2024, doi: 10.1038/s41598-024-52721-0.
- [229] J. M. Stokes, A. J. Lopatkin, M. A. Lobritz, and J. J. Collins, “Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy,” *Cell Metab.*, vol. 30, no. 2, pp. 251–259, 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.009.
- [230] P. Belenky *et al.*, “Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage,” *Cell Rep.*, vol. 13, no. 5, pp. 968–980, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.059.
- [231] C. Subbalakshmi and N. Sitaram, “Mechanism of antimicrobial action of indolicidin,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 160, no. 1, pp. 91–96, 1998, doi: 10.1111/J.1574-6968.
- [232] M. L. Cunningham, B. P. Kwan, K. J. Nelson, D. C. Bensen, and K. J. Shaw, “Distinguishing on-target versus off-target activity in early antibacterial drug discovery using a macromolecular synthesis assay,” *J. Biomol. Screen.*, vol. 18, no. 9, pp. 1018–1026, 2013, doi: 10.1177/1087057113487208.
- [233] B. Jana, K. R. Baker, and L. Guardabassi, “Macromolecule biosynthesis assay and fluorescence spectroscopy methods to explore antimicrobial peptide mode(s) of action,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1548, pp. 181–190, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6737-7_12.
- [234] B. H. Gan, T. N. Siriwardena, S. Javor, T. Darbre, and J. L. Reymond, “Fluorescence Imaging of Bacterial Killing by Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL,” *ACS Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, pp. 2164–2173, 2019, doi: 10.1021/ACSINFECDIS.9B00299.
- [235] J. Yan *et al.*, “Two Hits Are Better than One: Membrane-Active and DNA Binding-Related Double-Action Mechanism of NK-18, a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, p. 220, 2013, doi: 10.1128/AAC.01619-12.
- [236] A. B. Schäfer and M. Wenzel, “A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, 2020, doi: 10.3389/FCIMB.2020.540898.

- [237] L. Shi, S. Günther, T. Hübschmann, L. Y. Wick, H. Harms, and S. Müller, “Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria,” *Cytometry A*, vol. 71, no. 8, pp. 592–598, 2007, doi: 10.1002/CYTO.A.20402.
- [238] L. Dai *et al.*, “Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle,” *Cell*, vol. 173, no. 6, pp. 1481–1494, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.065.
- [239] A. Mateus, T. A. Määttä, and M. M. Savitski, “Thermal proteome profiling: unbiased assessment of protein state through heat-induced stability changes,” *Proteome Sci.*, vol. 15, no. 1, 2017, doi: 10.1186/S12953-017-0122-4.
- [240] A. Mateus *et al.*, “Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state in vivo,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 14, no. 7, 2018, doi: 10.15252/MSB.20188242.
- [241] M. A. Farha and E. D. Brown, “Strategies for target identification of antimicrobial natural products,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 5, pp. 668–680, 2016, doi: 10.1039/C5NP00127G.
- [242] M. Schenone, V. Dančák, B. K. Wagner, and P. A. Clemons, “Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 232–240, 2013, doi: 10.1038/NCHEMBIO.1199.
- [243] J. E. Bandow, H. Brötz, L. I. O. Leichert, H. Labischinski, and M. Hecker, “Proteomic approach to understanding antibiotic action,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 3, pp. 948–955, 2003, doi: 10.1128/AAC.47.3.948-955.2003.
- [244] N. Mookherjee, M. A. Anderson, H. P. Haagsman, and D. J. Davidson, “Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, no. 5, pp. 311–332, 2020, doi: 10.1038/S41573-019-0058-8.
- [245] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, and C. Björn, “Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 6, no. DEC, 2016, doi: 10.3389/FCIMB.2016.00194.

Załącznik 1

SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) zawierające struktury zaprojektowanych peptydomimetyków.

Sym bol zwią zku	Grupa	SMILES
A-20	Struktura wyjściowa	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)C=Cc1ccccc1)C(C)C</chem>
A-71	I	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)CCCCCc1ccccc1)C(C)C</chem>
A-73	I	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)CCCCCc1ccccc1)C(C)C</chem>
A-75	I	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)C=Cc1ccc(cc1)c1ccccc1)C(C)C</chem>
A-76	I	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)CCCCCCCCc1ccccc1)C(C)C</chem>
-	I	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)[C@H](O)c1ccc(CC(C)C)cc1</chem>
-	I	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)[C@H](Br)c1ccc(CC(C)C)cc1</chem>
-	I	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)[C@H](F)c1ccc(CC(C)C)cc1</chem>
-	I	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)[C@H](I)c1ccc(CC(C)C)cc1</chem>
A-229	II	<chem>O=C(OCc1ccccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)c1ccc2ccccc12)[C@@H](C)C</chem>
A-230	II	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@H](CNC(=O)c1ccc2ccccc12)C(C)C</chem>
A-231	II	<chem>O=C(OCc1ccccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)c1cc2ccccc2cc1)[C@@H](C)C</chem>
A-232	II	<chem>O=C(OCc1ccccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CNC(=O)c1cc2ccccc2cc1)[C@@H](C)C</chem>
A-233	II	<chem>O=C(OCc1ccccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CNC(=O)c1cc2ccccc2cc1)[C@@H](C)C</chem>
A-235	III	<chem>Cc1ccc(cc1)C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(=N)N)CC(C)C)C(C)C</chem>

A-236	III	<chem>CC(C)[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(=N)N)CC(C)C)CNC(=O)c1ccc(CC)cc1</chem>
A-237	III	<chem>CC(C)[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(=N)N)CC(C)C)CNC(=O)c1ccc(cc1)CCC</chem>
A-238	III	<chem>CC(C)[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)Cc1ccc(cc1)CCC</chem>
A-243	III	<chem>CC(C)[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)Cc1ccc(CC(C)C)cc1</chem>
A-239	IV	<chem>C/C(=C/c1cccc1)C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)C(C)C</chem>
A-240	IV	<chem>CC(C)[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)CNC(=O)CCCCCCC</chem>
A-241	IV	<chem>CC(C)(C)c1ccc(/C=C/C(=O)NC[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)OCc2cccc2)CCCNC(N)=N)CC(C)C)C(C)C)cc1</chem>
-	IV	<chem>CC(C)[C@@H](CNC(=O)CCCCCCCCCCCC)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1</chem>
-	IV	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN)C(=O)CCCCCCCCCCCC)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>C[N+](C)(C)CCCC(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>O=C(C1CCCN1C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C)N(CC=C)CC=C</chem>
-	IV	<chem>O=C(/C=C/c1ccco1)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>

-	IV	<chem>COCCOCCNC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>O=C1NC2C(CCCCOCOCNC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CC(C)NC(=N)N)NC(=O)OCc3cccc3)C(C)C)SCC2N1</chem>
-	IV	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)OCc1cccc1)C(=O)NCC(NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)[C@@H](C)C</chem>
-	IV	<chem>O=C(OCc1cccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)C1NCCCC1)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)OCC(CF)(OC)OC)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>CC(C)C(O)C(C)(C)COC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	IV	<chem>O=C1NCCC1CC(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
A-234	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1cccc1)c1cccc1</chem>
A-242	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N1Cc2cccc2CC1CNC(=O)/C=C/c1cccc1</chem>
A-244	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@H](CC(C)C)C(=O)N[C@@H](CNC(=O)/C=C/c1ccc(Br)cc1)C(C)C</chem>
A-245	V	<chem>Cc1ccc(/C=C/C(=O)NC[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)OCc2cccc2)CCCN(C(N)=N)CC(C)C)C(C)C)cc1</chem>
A-246	V	<chem>COc1c(OC)cc(cc1OC)/C=C/C(=O)NC[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)C(C)C</chem>
A-247	V	<chem>CC(C)(C)c1ccc(/C=C/C(=O)NC[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)OCc2cccc2)CCCNC(N)=N)CC(C)C)C(C)C)cc1</chem>

A-248	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@H](CC(C)C)C(=O)N[C@@H](CNC(=O)C=C\c1ccc(OCc2cccc2)cc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(Cc1ccnc1)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C)CN1CCCC1</chem>
-	V	<chem>S=C1N=NC(S1)C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>N=C(N)NCCC[C@H](NC(=O)OCc1cccc1)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CNC(=O)N1CCN(C/C=C/c2cccc2)CC1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OC)c1ccc(cc1)/C=C/C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)Nc1ncnc2nc[NH]c12)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)C1=NC(=O)c2[NH]cnc2N1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)C=1NC(=O)N=CC=1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)/C(O)=C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)/C(F)=C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)/C(I)=C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)C(F)Cc1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=C(OCc1cccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)C(I)Cc1cccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>O=N(=O)c1ccc(CCC(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc2cccc2)CCCNC(=N)N)CC(C)C)C(C)C)cc1</chem>

-	V	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](CN C(=O)\C=C\c1ccc(F)cc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>C[C@@H](C(=O)NCC(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1ccccc1)CCCNC(N)=N)CC(C)C)C(C)C)c1ccc(CC(O)O)cc1</chem>
-	V	<chem>N=C(N)NCCC[C@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N1c2ccccc2CC 1CNC(=O)/C=C/c1ccccc1</chem>
-	V	<chem>OC(=O)C1CC=C(Cl)CC1C(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)O Cc1ccccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>CC(C)C(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCC (CC)n1ccnc1</chem>
-	V	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)OC(C#C)CCCC)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccc cc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>CC(C)C(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCC 1CCC=CO1</chem>
-	V	<chem>Nc1ccc(cc1)S(=O)(=O)CC(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCN C(=N)N)NC(=O)OCc1ccccc1)C(C)C</chem>
-	V	<chem>CC(C)[C@@H](CNC(=O)C(Cc1ccccc1)CO)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCN C(=N)N)NC(=O)OCc1ccccc1</chem>
-	V	<chem>Oc1ccc(CC(C(=O)NC[C@@H](NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc2ccccc2)C(C)C)C(C)O)cc1</chem>
A- 249	VI	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@ H](CNC(=O)\C=C\c1ccc(cc1)C(C)(C)C)C(C)C</chem>
A- 250	VI	<chem>O=C(OCc1ccccc1)NC(CCCNC(N)=N)C(=O)NC(CCNC(N)=N)C(=O)NC(CNC(=O)Cc1ccc(C C(C)C)cc1)[C@H](C)C</chem>
A- 251	VI	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@ H](CNC(=O)\C=C\c1ccc(cc1)C(C)(C)C)C(C)C</chem>
A- 252	VI	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(N)=N)C(=O)N[C@ H](CNC(=O)CCCCCCCc1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VI	<chem>O=C(OCc1ccccc1)N[C@@H](NCCCCNCCCNC)C(=O)N[C@@H](CC(C)C)C(=O)N[C@H](C NC(=O)\C=C\c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCOC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)\C=C\C)C(C) C</chem>

-	VII	<chem>Cc1cc(CC)c(COC(=O)NC(CCCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/C)C(C)C)cc1</chem>
-	VII	<chem>Cc1cc(COC(=O)NC(CCCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/C)C(C)C)c(CC)cc1</chem>
-	VII	<chem>Cc1cc(CC)c(COC(=O)NC(CCCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/C)C(C)C)cc1</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1c(cccc1CCCC)CCCC)CCCCNC(=N)N)CC(C)C)CNC(=O)\C=C\C</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1cc(CCC)c(cc1)CCC)CCCNC(=N)N)CC(C)C)CN C(=O)\C=C\C</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1cc(CCCC)c(cc1)CCC)CCCNC(=N)N)CC(C)C)C NC(=O)\C=C\C</chem>
-	VII	<chem>Cc1cc(COC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/C)C(C)C)c (CC)cc1</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1cccc(CCC)c1CCCC)CCCNC(=N)N)CC(C)C)CN C(=O)\C=C\C</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1cccc(CCCC)c1CCCC)CCCNC(=N)N)CC(C)C)C NC(=O)\C=C\C</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(NC(=O)C(NC(=O)C(NC(=O)OCc1cccc1)CCCNC(=N)N)CC(C)C)CNC(=O)/C=C/C</chem>
-	VII	<chem>Cc1ccc(COC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)\C=C\C)C(C)C) cc1</chem>
-	VII	<chem>OC1COC2C(COC21)OC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C= C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>OC1COC2C(COC21)OC(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OC c1cccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)O/N=C/C(C)C)S(C)=O)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C= C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>OC1C(COC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c2cccc2) C(C)C)OC(O)C1O</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(CNC(=O)/C=C/c1cccc1)NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OC1 2COCN2COC1</chem>
-	VII	<chem>O=C(OCC1OC(=O)C(O)C1O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C =C/c1cccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)OCc1cccc1)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)N1CCC2(CC1) OCCO2)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>CC1CN(/C=C/C(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc2cccc2)C(C)C)CC(C)O1</chem>
-	VII	<chem>N=C1C=[N+](CCCC(NC(=O)OCc2cccc2)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c2cc ccc2)C(C)C)[N-]O1</chem>
-	VII	<chem>O=S1(=O)CC=CC1CC(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1 ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>OC1CC(/C=C/C(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc2cccc2)C(C)C)CC1O</chem>

-	VII	<chem>O=C(OCC1(C)CC=CC1=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>NC(Cc1ccccc1)C(C#N)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>OC1CCCOC1/C=C/C(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)O/N=C/C(C)(C)S(C)(=O)=O)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>CC(C)C(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)ONC(=N)c1cc(C)on1</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCCCC(NC(=O)OCC#CCOC(=O)C#C)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>OC1(/C=C/C(=O)NCC(NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)C(CCCNC(=N)N)NC(=O)OCc2ccccc2)C(C)C)C=CC(=O)C=C1</chem>
-	VII	<chem>OC1CC(C(=O)OC)N(C1)C(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)/C=C/c1ccccc1)C(C)C</chem>
-	VII	<chem>N=C(N)NCOC(=O)NC(CCCNC(=N)N)C(=O)NC(CC(C)C)C(=O)NC(CNC(=O)\C=C\C)C(C)C</chem>

Załącznik 2

Pełna lista białek zidentyfikowanych w eksperymencie PISA. Białka oznaczyłam za pomocą numerów akcesyjnych UniProt (ang. *UniProt accession numbers*).

Q2FFI7	Q99RE7	Q2G2X4	Q2YXK4	Q99X26
A6QFF9	Q5HIS8	P64417	P64172	Q2FZD3
Q99XB3	A5ISB7	Q5HI95	Q5HHS4	A5IU87
Q2G1G5	Q6G9I4	Q2G181	P60299	Q2FZP9
A7WZ80	P0A0K9	P0A091	Q5HF02	P63469
A8Z059	P63618	A6QK86	A7X274	Q7A181
Q2FJH7	Q6G9V5	Q2FUX3	Q5HIA2	Q6G7L8
Q5HG12	Q6GGW9	Q932F5	Q2YZA5	Q6G6H3
A6QHF7	A6QGY6	Q2FWH6	A0A0H2WZY4	P0A0E2
Q6GC90	Q6G9C3	Q6GEK7	Q6GBZ8	Q6GFY8
A8Z347	A0A0H3K104	Q5HIG6	Q2FFH9	P99166
Q6GK49	A7X4S6	Q7A339	Q2G2P5	A6QHF8
A7WYS1	Q5HG59	Q7A5M9	Q6G7K2	Q6G990
Q6G905	Q2FEW4	P0A038	A7X574	P67640
Q2FJ50	Q5HI43	Q2FY15	Q2G2P8	Q99R80
Q2YSF0	Q2FDE7	Q99RE8	A5IQ98	Q5HG58
A6U3Z8	Q2YX92	P65896	Q931U2	Q99RE2
Q7A0D7	Q2FYG1	A6U152	P67717	P67513
P0A0D0	A6U317	Q6GHL1	A0A0H3JTL0	A7X1G4
A6TZR0	A7X2R9	P66656	Q7A5N7	P0A0P1
A6QFD6	Q99WG4	Q5HGE6	A0A0H3JNB0	Q6GI66
Q2YSV9	P60087	Q2YVH4	P67429	A8Z0V3
Q5HD56	A5IWA0	Q2FFM9	Q2FWD6	Q932F7
P64126	O32421	Q9ZHA2	A8Z5H6	P63664
Q7A2K9	Q5HE93	Q2FI18	A5IWB2	Q6GG09
P66553	A0A0H2XK79	Q5HH27	Q2FV54	Q99S65
A8YYT1	Q6GAV8	A7X0F8	Q6GHQ1	A6U4Y6
P65140	Q0Q2J7	P18357	Q99VC4	Q6GDP0
Q7A5H7	A7X5C4	A7X238	Q2FW35	Q2FXZ3
Q6GIT7	Q08854	P63333	A5IVC7	A8Z045
A6U271	Q7A1I3	A0A0H3JR16	A5INY7	A0A0H3JX98
Q6G723	Q99WG5	Q99UL1	A6QDF1	P64335
P0A0J7	A6QIU8	P19241	P65819	O05338
Q5HFJ0	A5IV75	P66905	A6U0T3	Q2FEM9
A5IVD7	P65445	Q2YX63	Q2G0E1	P67021
Q8NUR2	A5IV69	Q5HJQ7	P63335	Q2YTC2
Q99UH2	A6QID0	A7X1J2	Q2G2M4	Q5HFU2
A6QIN3	Q6GBY7	P63483	A8Z2M7	Q5HH63
P99174	Q6G609	P63538	Q931I5	Q2YUD8
P68820	P66358	Q6GCI6	A7X2P6	P58964

Q99S47	P60224	Q7A6L9	Q7A7F8	A0A0H3JUU7
P65421	Q2FH24	A5IPC8	Q2FER1	Q6GEJ6
Q99XB4	Q2FW39	Q99US8	P0A0E7	P99062
A7X569	A7X111	A5IVU3	Q6G9D4	A8YY02
P72358	P60380	Q2G1M9	Q2FV99	Q2G1C4
Q8NYD0	Q6GA19	Q2G1Z9	P0A0G8	P66775
Q6GB70	P81177	Q2YWA3	A7X0T9	P65862
A8Z425	Q7A0U4	Q2FFY7	A6QGZ7	Q6GGZ0
Q2YXX9	Q5HHQ4	Q6GJG1	A6U3W6	Q2G0P8
Q99S23	P63800	Q2YXE3	P66866	Q2YVY3
P45554	Q2FZ91	Q2FWZ0	Q2G0K7	A6U415
Q7A6C9	Q6GIN2	P0A033	Q7A0I2	Q6GIC0
P64324	Q99TX9	Q5HGV0	Q5HHG8	Q5HD73
A5IQN7	A7X0W1	P07767	Q5HDX8	A6U077
Q2G260	Q7A1Q0	Q5HGK7	A5IUJ9	P99173
Q2FX88	A5ISZ6	Q53588	Q99RJ0	Q5HF31
Q7A0Y4	A7X388	A6QGG5	A6QHD6	P65825
Q5HHD1	Q2G0S8	Q2YYB8	Q6G9Z2	A6QIM8
Q2G1B9	Q6GFT9	Q2FYM7	P0A053	Q2G182
Q99W68	Q2G178	Q99R54	Q2YX86	Q2G1M8
Q2FW20	A5IQA0	Q7A697	Q5HGN1	Q2G0I9
Q2FIR7	Q6GFB8	P63382	P99102	Q2FVR1
Q7A7B4	Q5HE97	A7X1T3	P0A0B6	P21224
Q6G6Y6	P68826	Q6GKE0	J7RUA5	Q2FG49
Q5HGI7	Q7A2R3	Q6GI11	A6TYW0	P66816
Q99QS1	Q2FGF8	Q2FWZ8	Q6G8S4	A0A0H2XHV5
Q99RQ9	P0A0H1	Q6G7I3	Q2G0P5	Q6G6I7
P64380	Q6G790	A5IS26	Q2G2A2	Q5HGF5
P65635	Q5HJ99	Q9L4S2	Q5HGA3	Q99QY4
A6QFY1	Q6G9T0	Q2FGF0	Q2YV11	Q7A1C0
A5ISF5	Q2FJN3	Q2FEQ0	A8Z4W5	Q5HGV5
Q5HCY9	A0A0H3JT74	P0A0M5	Q5HE48	Q2FKC6
A6U4B6	Q6GEN8	A5IQ45	Q6GFW9	Q99U75
P99177	Q2FJ80	Q99V50	P65424	P67370
P63549	Q5HGM7	Q6GCF3	Q2G2X2	Q6GBJ3
Q2YY39	Q8NXA0	Q6GJM8	Q99SY9	A6U0N9
P63980	P64269	P60961	A0A0H3JT43	P60476
Q2FEN5	Q6GJ03	Q99WG6	Q99VV3	Q6G867
Q2YSE8	Q6G786	Q2FY06	P60614	Q6G811
P00807	Q7A305	P0A0L7	Q2FVJ6	Q7A767
Q6G7P3	Q5HDR5	Q2FGA1	Q2YUH3	A0A0H2WWB5
Q931P4	Q6GFI4	A6U1A5	Q8NUQ4	Q6G970
Q99S97	Q2YSH7	P65966	A0A0H2XEK8	P65151
A8Z4B9	P0A0B0	P0A004	Q7A6F8	Q7A7G0
Q2YX11	Q5HDL2	Q6GHG0	P65664	Q8NWQ6

Q2YWW7	P64107	A5IRH5	P0A050	A6U209
Q6GEG7	P65601	P0A060	Q99WT9	Q2YZ25
A6U559	Q2G1N1	P67578	Q6GHW9	Q7A887
Q2G1C1	P65897	Q99TK9	Q5HGV4	P67040
Q2YWF3	Q6GDQ0	P67337	Q2FIC8	Q6GIN3
A6QED3	A6U1X3	Q6GEV0	Q2FUW2	Q79ZX9
Q5HHU6	Q7A4W3	Q2G1M6	Q99WA0	Q5HCR7
A0A0H2XI17	Q99R57	A7X3B0	A0A0H2XDF9	Q99VB5
Q2FG31	A6QH69	Q7A7P2	Q99WG0	P65708
Q6GHU5	A5IRB0	A7X1U3	A0A0H3JPC6	A7X624
Q2YXH8	A7X4V7	Q99VJ2	Q2G030	A7X2I1
A7X5Y6	Q8NUL0	Q6GFR0	Q6GH04	Q2G0T1
P11162	Q7A3L1	Q8NW17	Q6GJW4	Q7A338
A5IS68	Q6GF43	Q99VF6	P72367	A6TYK8
A7X4J1	Q7A5C0	Q6G7R8	Q2FDQ4	A8Z3U3
A7X782	P64227	Q99TL8	A6QK48	A7X4U5
Q6GEA1	Q2YZ47	Q5HI32	P65944	P99164
P99098	Q2YSA8	A7X735	Q931E9	Q2FWJ9
Q7A4E5	Q6GF73	Q932K6	Q2YYH4	Q2FWD8
A8Z242	Q2YSP8	A6QHF1	Q6GBR1	Q5HEL8
P07944	Q5HDD7	Q2YSB0	P99108	P66083
A6TZK7	Q7A6H4	P20384	P65205	Q2G1C2
A8Z2R5	Q99WM3	P64319	A5IT57	Q2G1B8
A6U1R8	Q2YV20	Q2YWP2	P63526	Q5HF86
Q8NWZ9	P68864	Q7A124	Q5HE70	Q2FG29
Q5HIV4	Q2FG64	Q2FK01	A6QEJ9	Q6GBR7
Q6GJQ9	A8Z2H5	Q2FJA2	Q6GDM7	A7X578
A6U2A8	Q6G986	P0C1U9	P65289	Q6G5Z7
Q8NUM5	Q2FH98	Q6GA90	Q2YUY9	Q6GCL7
Q6GEC9	A7X3G5	Q2G026	A6QEJ4	P65229
Q6GB77	Q2YUL3	Q6GD88	A6QIR1	Q2FUW3
Q7A083	Q99U87	Q2FV57	A6U170	P65479
A6U3L9	Q932F8	Q99W83	Q9F4G3	A7X1J3
Q2FEC4	Q5HDV7	Q6GGZ5	P65400	A6QHA9
A6U0W7	Q6G8Y3	A7X203	Q8NUH3	P20723
Q99V48	Q6G987	Q6GBT4	P60219	A7X1P4
Q2YXP3	Q2YSB4	A6U1L7	Q2FXA5	P66923
Q6G8R2	Q2YX35	Q7A4V2	Q2FZW3	Q2YSG0
Q5HID2	Q2YV76	Q6GEK1	Q2YXZ9	Q2YWC8
P65695	Q7A7S4	P0A042	P00644	Q2FXG9
Q8NYT6	Q6GEU7	Q2YXX8	Q2FK44	Q2FG63
A5ISA3	Q2YY05	A6U3D4	Q6GC45	Q5HHD9
Q7A8E1	P0C600	P0DP65	Q6GH31	A8YY10
P67744	P38507	Q2FHR7	Q7A780	Q2FW72
P67199	Q2YXZ6	A0A0H2WWP1	Q2FWX9	Q2YWN8

A7WYS8	Q2G1T3	Q2YX59	Q2FWC5	A5IPU6
Q2FZ95	Q5HH19	A7WXP7	Q2YU47	Q8NW55
Q2FEP0	P60855	Q2FI72	P64290	Q5HDM1
Q2FF95	A5IV51	P63433	A6TZT7	A7X0H6
Q2YXL5	Q5HFD3	P64240	Q8NUT2	Q7A2Q0
Q6GCR4	Q7A441	Q99RF2	P63949	P66013
A0A0H3JU73	Q2YXL1	Q2YT67	P67571	Q2G1E1
P66579	Q6GJA3	Q6GAT0	P63576	A6U0C2
A5IRD8	A8Z450	P99146	Q6GA89	Q7A6Q5
A6U113	Q8NX96	A5ITM3	A6U0C0	P64355
P99063	P99139	Q99TA0	P66918	P64231
Q8NUV0	Q99XB5	Q2YYP9	P0A0P7	Q7A5K4
P99090	Q2G2B2	P0A0D9	Q6GEI4	Q99U32
Q2FWE1	Q53638	A5IQG1	A0A0H2XKG3	A5IWD7
Q2YXT2	Q6GGX3	P99099	Q6GDH2	Q7A3F4
Q5HG56	Q5HE95	Q6GHN5	P64146	P99137
Q2FIE5	Q8NXF2	P0C1S0	Q6GKT9	Q7A086
P66174	Q2FEV9	Q5HEY4	Q6GJ63	P14738
Q5HHR5	A7X2A2	Q2YWV3	Q7A5L8	P66469
A6U4Y2	P64120	Q6GJH6	A6QIC6	D3ERJ1
A7X0M6	Q6GJ81	P65849	P63844	Q6GBW9
A5IVK5	Q2YWN2	P99068	Q6G8T4	P61431
Q5HG01	Q6GFZ2	Q99SU7	A6U1J1	Q5HDY1
Q5HF38	A6U515	Q2FHU5	A6QHH5	Q7A598
Q2FEZ3	P63584	A8YYR9	A5IQ83	Q6G890
A0A0H3KDT7	Q6GHW4	Q6GIE7	P65492	A6U3Z2
Q2FH09	Q2G297	P99161	P99150	Q2FYL1
A6QG68	P0A048	Q2G1N2	P31024	A6QEJ1
Q5HGH2	A6U2I2	P0A0K0	Q99SN6	Q2FDS6
A0A0H3JTK0	A5IS63	P0A079	P99087	Q5HEP4
A7X3A6	P63921	A0A0H3JQ59	A6U519	Q2FH55
P60856	P64217	A6U155	A7X0D9	Q6G9Y2
Q8NXY3	Q5HID8	Q2YTB5	Q2YSB5	Q2FK46
Q6GC85	Q5HIJ5	Q2FYS7	Q2FVT2	A5IRW0
P64054	Q7A2R8	Q2YUL6	A5IQL2	Q931H5
Q6GEG1	Q7A7R9	Q2G0P7	P67344	A7X202
Q2YY03	Q7A5G8	Q59801	A0A0H2WZ38	Q8NW87
P66416	A0A0H3JUG6	Q2FZE3	P0A065	A7X2Y4
Q2FVA4	Q6GJ80	A5IQL3	P67425	Q6GHY6
P63729	Q2G0D4	Q2YUU9	A6U2L4	P66971
P66759	P0A040	Q6GIR7	Q8NWR2	A8Z3V4
A5IU40	Q2FH71	Q99RF5	Q5TKS0	A8Z1W6
A7WZ06	A6U0C5	P0A069	Q5H DU4	P63764
A6TXF9	Q2YXF9	Q6GH60	P67272	Q5HFZ6
P03064	O31211	A6TYV4	P64142	P60609

Q2YT95	Q5HIE7	P63513	A6U3U8	A6U3K3
A6TZJ0	P67395	P0A0N1	Q6GJR8	P65133
A6U2E7	Q5HCY8	A0A0H3JXA3	A7X013	P66936
Q6GBC4	A6U3S5	A7X623	Q6GH63	Q2G1J0
Q2FV31	Q99W72	Q2FWG0	Q6GG30	A6U4Z2
P67011	P63939	A6QEJ2	A7X149	Q6GIM1
Q2FGL1	Q7A5I6	P99176	Q6GI01	Q2YT14
A5ITA3	A7X5F7	Q7A7S2	P99124	Q99RD2
P65230	Q6GHU7	Q2FJ77	Q6G642	Q2FZL3
A5ISL9	A6QHC1	A6U2Q2	Q2FZ71	Q6GC82
P99116	P64028	A6U174	A6QD41	Q5HG20
A6U574	A5IPW7	Q6GFZ6	A5ITD0	P52078
A6QIR5	Q6GB68	A7WZR5	Q2FW70	A6QJ60
A6QFJ3	A5ITV6	Q99VJ4	Q7A7E3	P64235
Q2FW11	P60296	Q2YWJ9	A6QHA6	Q2FY37
A6U4R9	P65659	Q8NVC9	Q2FXS9	Q2YUM9
A6QH79	A6QEK3	Q2G1M5	A5IVB5	A6QHR2
A6QGC0	Q6GJD9	P60944	P68799	Q2FXL6
A6QHL2	P63871	Q2YWG0	Q5HFC1	Q6GI75
A6TZ11	A5IV70	A6QJK3	A7X1P3	A7X5G3
Q5HF56	P0A097	Q932A8	A7X2I0	A7WZ02
Q6GJE0	O07319	P64341	A7X575	A6QIG6
A8Z018	Q2YY66	Q5HHZ9	P60074	P68262
A6QHK9	Q2YUY7	O52582	A5IU71	Q99WU3
A7X1H4	Q6GEV3	P64309	P99065	Q6GHQ9
A6U1G8	P0C0Z1	Q6G6H5	P60912	Q5HFZ7
Q99SG2	P60089	Q6G778	Q7A7X5	Q2FJJ6
A0A0H3JRU9	Q99W51	A6QE71	P63859	Q2YX06
A6QFH2	Q6G711	A7WXI2	A5IV71	Q2FZF1
Q2FUW9	P63892	P99086	Q6GK26	Q2G222
A5IUU9	A5ITM4	A7WXA5	Q8NVU6	Q7A0A0
A0A0H3JT80	Q2FZU0	Q5HIH8	Q5HF79	A6QFS5
Q7A7F9	A7X333	Q6GHU0	Q6GHN2	Q6G8Q1
Q8NVI5	Q2YVR0	Q5HEF5	Q2FZ28	Q6G7K4
Q7A417	Q7A5J0	Q2YWB1	Q2YUJ0	P65236
Q2YSJ9	Q2YT47	Q2FEJ8	A7X6T9	Q2G2T3
A5ITC3	Q99VX6	A7X240	Q6GH53	Q2YXW0
Q99XG5	Q99S37	P66563	Q6GFJ6	Q5HDM6
Q7A0N4	Q6G929	Q99W48	P99134	A8Z454
A6QGK1	A7X1L7	Q99VD0	A5ISS7	A7X113
A5IU67	P0A0N7	A6U122	Q6GGU4	Q5HI96
Q6GAF9	Q99SI6	Q5HFA5		

Załącznik 3

Pełna lista białek zidentyfikowanych w eksperymencie FITEp. Białka oznaczyłam za pomocą numerów akcesyjnych UniProt (ang. *UniProt accession numbers*).

A6U3Z2	Q6GEY3	A7X4U5	P0C0Z1	P0A079
A7X2Y4	P0A097	Q5HFC1	Q6GIM1	A5IRH5
Q6GB70	Q5HFA5	A7X203	A6QDF1	Q6GKJ3
Q2YYP9	P68826	Q2G1B8	Q5HE97	A6U2I2
A0A0H2WWP1	A6U317	Q5HHD1	Q6GHL1	Q2FZ91
Q5HFZ8	Q6GFV0	Q2YWW7	P0A0G8	P09616
O05338	Q7A7E3	Q2FEX4	Q2G218	Q6GHW4
P0A040	A6QKC4	Q2YUL6	Q99RF2	A8Z3V4
A6U1R8	A7X735	A6QHL2	Q5HG12	P65133
P66469	Q6GHC6	A0A0H3JU7	Q6GEA0	Q2G1N1
Q2FIR7	Q6GHK6	A5IWD7	Q5HE93	Q7A6C9
A5IU87	Q2FXZ3	Q2G1M8	Q2FG64	Q6GEC4
Q2YSB4	Q2FIE5	Q7A780	Q2FER1	Q2YY76
Q2FUW3	A6U2L4	P63483	Q2FDQ4	P63335
P66416	P99116	Q6GHW9	Q8NXX7	A6QHA9
A0A0H2WWB5	Q6G8Y3	Q7A7S4	Q6GIT7	Q2FW70
Q8NWZ9	Q5HJQ7	Q99RD2	Q6G9V5	Q2YTA7
A5IPC8	P0A0N1	Q6GHK5	P0A0K9	P99176
Q6GKG7	A5IWA0	P00807	P99065	A7X0H6
Q2FXL6	A0A0H3JQ59	Q8NUV0	Q2FUX3	Q6GJG1
P65695	P64054	Q2FF95	Q5HIG1	Q2YSJ9
A6TXF9	Q2FDK5	Q8NXX7	Q7A7R9	Q5HDM6
Q6GC82	Q5HEL8	Q6GJW4	A7X149	A6U0N9
A6U3U8	Q6G786	Q5HJC5	Q99VJ2	P64341
Q99V14	Q6GJE0	Q14U76	P65825	Q931I5
Q2FWG0	Q2G181	Q2YVH4	Q5HI32	A7X623
P64142	Q7A4W3	Q8NUR2	Q2YW62	P64002
Q6GJJ3	Q6G986	Q6G7L8	Q5HG56	Q7A7S2
P0A091	A8Z425	A6QHF7	A6U0C2	A5IU40
Q99VF6	A7WZR5	Q6G7R8	Q2FH51	P11162
Q5HHR5	Q2YU38	A8Z2R5	A6U1G8	Q932G7
P64172	Q5HIJ5	Q6GGW9	Q6GFW9	A5IVD7
Q99W72	A5IQ98	A0A0H2XK79	P0A060	Q2YT14
Q7A7G0	P31024	Q6GEC9	Q2FWD6	Q2FH55
Q8NW73	A7WZ02	Q2YX63	Q931P4	P64227
P63433	Q5HG20	P99098	A6QID0	A7X240
A6QHC1	P0A0N7	A7X202	Q5HXY8	Q2FZW3
Q6GEN8	Q2FE74	Q7A086	Q5HGA3	P99161
P64217	P64126	P64240	A5INY7	Q7A2Q0
P99166	Q2FGF8	Q6GBY7	Q5HE95	Q5HIH8

P0A0E7	Q99XB1	Q8NX19	A5IPW7	Q99RQ9
Q6GAT0	A0A0H3JNB0	Q6G990	Q2FJH7	Q6G6V7
Q5HDV8	P65849	Q6GEP3	A8YYR9	Q6G6Y6
P67040	A6U1X3	Q6GH63	Q6GHU0	Q6GHN0
Q6GIR7	P66991	Q2FK01	Q5HEY4	Q2G1N2
Q8NW87	A7X1P4	Q6GF43	P31716	A7WXP7
Q2YYB8	Q99W83	Q6GBC4	Q2YTB5	Q99UL1
A6U1N4	P65664	Q7A598	P81177	P64335
P0C600	A0A0H3JRU9	Q99S97	Q6GDH2	Q7A6F8
A6QHK9	Q6GIC2	Q6G9T0	A5IRB0	Q6GHN2
A6QFS5	P03064	Q2YXH8	Q5HEF5	P21224
A5IS26	A5IV75	A6QEJ9	A7X0T9	Q6GHL4
A5IVC7	A7X5Y6	Q5HES9	Q6G9C3	Q7A742
Q6GIE7	Q6GCL7	A5ITD0	Q99SU7	Q5HCY8
P99173	P64107	Q932A8	Q2G1C4	A8Z2M7
P66013	P66775	Q2YXW0	Q6GF73	Q7A7X5
P63871	A8Z018	A6QED3	Q2FXA5	A0A0H3KDT7
A5IUU9	Q2YWJ9	A6TYK8	Q7A6Q5	Q2YSP8
Q6G642	Q7A339	A6U0T3	Q7A7P2	A7X0F8
O52582	Q2FFM9	P18357	A8Z450	Q6GJR6
Q2G2X4	P65635	A6U3D4	P60609	A6QGG5
Q5HGI7	A6QD58	Q2YX59	P19529	Q8NUT2
Q6GA90	A0A0H3JXA8	Q2FEV9	Q932F7	P0A065
Q2YSB5	A6QIM8	Q2YYQ6	A0A0H3JT43	Q2FIC8
A0A0H2WZY4	Q6GDM7	Q931H5	Q6GDP0	A7X1T3
A5ISL9	A6U515	Q2FJ50	O31211	P0A069
A5IQL3	Q7A4E5	P0A0J7	Q2FJ77	Q6GEK7
A6U3Z8	Q7A3L1	A7X1U3	Q7A6L9	Q2G1M9
A6U1J1	Q99W48	Q8NVU6	Q6GJZ6	P0A048
A6U077	Q2YUH3	A0A0H3JR16	A5ISB7	P66656
Q2YZ47	A6QEJ4	Q99V86	A0A0H2XEK8	Q2YY39
A5ITM3	A0A0H3K6Z6	Q2G178	Q2G1B9	A5IPI5
Q6GJ81	Q2YXK4	A0A0H3JXA3	Q7A5L8	Q2YST2
A7X578	P0A050	Q99WA0	A6QGY6	Q6GC45
P65708	Q99X26	Q8NWM5	A6TZJ0	Q8NXY8
P65424	Q2FG31	A6QHH5	Q5HHB1	Q2YUT0
P66866	Q8NXY3	Q6GJ63	P65289	Q2G0P7
A8Z4B9	Q6G609	Q6G8Q1	Q2FUW9	P63953
Q99SY9	Q5HGK7	Q2YSF0	A7X6T9	P67272
Q99TL8	A5ITA3	Q5HHD9	P0A0B0	Q2FZ95
A7X3G5	P99068	Q2YWV3	P0A0E2	A7X4N1
Q932K6	Q2FZ28	Q6GAU2	Q2YU47	Q6G8T4
P99086	A7X5C4	Q2YX86	Q5HH12	A8Z5H6
Q99RE7	Q2FVT2	Q99VJ4	Q99QS1	Q5HCL3
Q2G2P8	A7X5F7	Q5HDY1	Q2G0D4	P65205

A6U271	Q6GG09	Q8NUQ4	A7X0D9	Q6GFR0
A5IVU3	A6QH69	A6U1L7	P20723	P60380
Q2G2T3	P65101	Q6GAF9	P68799	Q6GHQ9
A7X0W1	Q99R73	P64363	G0Z026	Q2YWE5
A6QJ60	P0A004	A5IV69	Q2FVK1	Q2FI23
P20384	A7WZ80	Q5HFZ7	Q2G222	A6QKG7
Q2YSA8	A6QHA6	Q5HHS4	Q6G723	Q2YUD8
A8Z4W5	Q2FYK3	Q99U87	A6QIG6	Q2YVU6
Q2FY06	Q6G790	Q2G1E1	Q99SG2	Q2G0P5
Q6G9Z2	A0A0H3JUG6	A6U2E7	Q2YWN2	P64355
Q8NW55	O07319	P66553	Q2YXE3	Q2YSH7
Q99WG5	Q6GJ80	Q5HF97	A6QFD6	A8Z446
P99164	A7X0M6	P67344	P64231	Q6GJD9
Q7A7F9	P65151	Q2YZB4	Q6GBZ8	Q6GFZ6
A7X2R9	Q2FEC4	Q2YXX1	Q7A5G8	Q6GFB8
A8Z454	Q6GEQ8	A7WYS8	A7WZ06	Q6GFJ6
A6QIC6	P0A0D0	A7X624	Q2G297	Q79ZX9
P60944	Q8NWZ1	Q7A1C0	Q2FJA2	Q2G0S8
Q5HHU6	P66816	Q6GC90	Q2YSE8	P52078
A7X1H4	Q2FW11	Q7A124	A6QGK1	A6QK86
Q6GJR8	A7X575	Q99RE8	Q6GBW9	P65492
P99087	P0A0L7	A6QFJ3	Q2FY15	Q2FVA4
Q99XB4	A6U4Z2	P14738	Q2FYZ5	A5IQG1
Q7A3F4	Q2YUL3	A6U174	Q6G9Y2	P67395
Q7A0N4	Q2FG29	Q5HI43	P65421	A5IQ91
P60074	Q5HI96	Q7A2K9	Q7A338	P64028
Q2G2A2	Q2G2X2	Q7A767	A7X1L7	A6U2A8
Q2YV73	A6QH79	Q2FJ70	P64417	Q5HI95
Q2FHR7	Q99US8	Q2FVR1	P66174	Q99V48
A6U2Q2	Q6GDK4	Q6GGZ5	Q2YZA3	P65479
Q6GB68	Q2G1J0	A5IQN7	P63584	Q2YY03
Q99WM3	Q08854	A6QFF9	P60219	Q2FFY7
A5ITC3	Q2FEZ3	Q8NX56	P99177	A6U3K3
P99062	P0A0H1	P0A0K0	P66358	A6U3S5
Q8NWQ6	P60855	P0A0D9	A8Z045	P67425
Q6G7I3	Q5HID2	Q2G0E1	Q2FWE1	P63844
Q5HFD3	Q7A5M9	Q6GGE0	A6U152	A5IQA0
Q6G9I4	A6U559	Q99TX9	P63939	P99174
A5IQ83	Q6GDV6	Q6GGU4	Q2YWN8	A5IQL2
Q2YYH4	P66936	P63618	P67717	Q6GEG1
Q2FV99	Q6GHY6	A5ITR2	A7X569	Q2YV76
Q99RE2	P99137	Q5HD61	Q99UH2	Q99TK9
P67513	P07944	Q2FDS6	P63526	Q2G0I9
Q2FWC5	A6U1A5	Q2YWQ8	Q6GFI4	P66923
P0A053	Q2FFH9	Q5HGE6	P66971	A5IT57

Q5HCY9	Q2G1C1	Q2FVB8	P63469	Q6GHN5
Q6GBT4	A0A0H3JT74	Q6GGA2	P63664	Q6G6Y5
Q2YSG0	A6U415	Q2FYS7	P99139	Q6GB71
Q6GB77	Q6GAV8	Q99R57	Q99R54	A0A0H2XDF9
Q2FEN5	Q2FEQ0	P65236	A6U3W6	Q2YUU9
Q2FW39	Q2FH98	A6QGZ7	Q2YXL5	Q6GI11
A6U122	A6TYV4	Q5HF38	A8Z059	Q2FEP0
Q6GI75	Q2G1T3	Q2FJN3	Q2YWP2	P65896
Q5HH38	P38507	P64309	Q6GEV0	Q2YUM5
Q6GF05	Q2FUW2	Q99VX6	P64146	Q2YSD3
Q2FXG9	P65659	P64290	A5ISF5	Q6G7P3
Q2FH24	P63764	Q7A1I3	P66918	A7X238
Q7A447	P99090	Q2G026	A6U0W7	Q2FKQ0
P66563	P60299	Q2FYL1	Q5HIA2	A5IU61
P0C1U9	Q99SN6	Q2YUM9	Q99WG0	A0A0H3JTL0
A6U4Y6	Q2YWW1	A7X2I0	A6QG48	A6QFH2
A6QGC0	Q2FZT9	A6QHF1	Q2FGF0	A5IRW0
P67199	A6QFY1	P99146	A7X4V7	Q2YT47
Q5HF56	P68820	A7X2A2	A5IU67	Q6GEI4
Q2FV54	Q2FH71	Q2FWV5	Q8NX44	P99108
Q2FWX9	Q6G905	Q6GH04	Q2FXV6	P67011
A6QE71	Q5HCR7	P65445	A6QIU8	Q6G8R2
A8Z552	Q5HDL2	Q7A887	A5IU71	A6QIR1
Q2FWE7	Q2FWH6	A5IV51	P0A0B6	A5IQ45
P64380	A6U4B6	A5IV70	Q99VC4	A7X2I1
P64319	P67571	P63333	Q2YSB0	Q99VD0
P67337	Q99WE9	Q6G6H5	Q7A6H4	P60912
P99063	P0A042	Q99SW6	Q7A185	Q2YXZ9
P63729	Q7A1Z1	Q2G1M6	Q6G778	A7X1G4
D3ERJ1	Q6G711	Q2FWZ8	P66579	Q6GEU7
A8Z347	P67744	A0A0H2XI17	P64269	Q6GBR1
Q5HGV5	P67759	A6U209	Q2YUJ0	P65944
A6QHD6	A5ISA3	Q2G1T7	P0A0P7	Q99U32
Q6GH31	P60224	A7X111	Q7A0U4	A6QEK3
Q7A0Y4	Q2YXF9	A6QD41	P60961	Q2YXX8
P68824	Q6GBJ3	Q99SI6	Q2FX88	Q99WT9
P63800	Q2G0P8	P60856	P99150	A8Z4L2
A7X013	Q2YT67	Q2FI18	Q5HF02	A6QGP1
Q6GA89	A6U311	Q2FHU5	Q5HGN1	Q2G2B2
A7WXA5	A6U0C5	Q6GJB7	Q2FFI7	Q5HIV4
P66083	P63513	A7X4S6	A5IS63	Q7A5H7
Q8NUH3	Q2FZU0	Q99WJ2	P65140	A6U170
Q6GKA4	Q6GHW0	Q5HF79	Q9F4G3	P99099
Q6GKT9	P65897	A0A0H2WZ38	Q5HE48	Q2FH58
Q5HF86	Q6G890	A7X3B0	Q2YT95	Q8NX78

A7X113	P0DP65	A6U0C0	Q5HGF5	Q99WU3
P60087	P68864	Q6GBR7	Q2G182	Q99U75
Q2Y TJ3	Q99RJ0	A6U3L9	Q2FXP7	Q2FVJ6
A0A0H3JPC6	Q2FG49	A7WXI2	Q6GCI6	Q2FY37
P63980	A6U4Y2	P0A008	Q6G867	Q2G0T1
Q7A5J0	A0A0H3JT80	Q2YU46	A5ISZ6	A6QEJ1
Q2YX14	Q99S23	A5ITV6	P0A038	Q7A697
Q2YXX9	A8YY10	Q2FH57	Q2G1Z9	Q9ZHA2
Q99R80	A7X1J2	P67640	Q99TA0	Q2YV20
Q99VB5	Q7A4V2	P0C1S6	P65230	A5IUJ9
A5IRD8	Q5HJ99	Q6GEK1	Q6GJG2	A5IVK5
Q99RF5	A7X274	Q7A441	Q2FZ71	P60614
Q2YTC2	A8Z2H5	Q5HDD7	Q6G7I8	A7X1J3
Q2YVR0	Q6GHG0	P07767	Q3V7T4	O32421
P60089	Q7A825	A7X4J1	Q2YSV9	P63576
P65229	P68262	Q7A2R8	Q2FYM7	A0A0H3JX98
Q5HIE7	Q5HH14	A6QK48	Q2G1M5	Q7A083
A6U4R9	A0A0H2XHV5	Q7A8E1	Q2YXT2	Q2YWB1
Q5HGV4	Q2YWF3	A5ISS7	Q6G9J9	P65400
P63382	P63892	Q6GK26	Q2YX92	Q2G2P5
A8Z1W6	Q6GG33	A5IS68	Q2YX11	P63949
Q2YYL3	Q2FW35	Q5HEP4	Q5HHQ4	Q99WG4
Q5HGH2	P99134	P99124	Q99W51	Q6GHE0
Q7A5C0	Q2G1C2	Q2FJJ6	A7X574	Q79ZY3
Q6G8S4	Q2FK44	Q5HF31	A8YYT1	Q2YZ25
Q6GEG7	Q2FWD8	Q6G929	Q2FEJ8	Q5HIG6
Q2YXP3	Q7A5K4	Q2FK46	Q6G8H6	A0A0H2XKG3
Q931E9	P0C1S0	Q6GFW8	A5IV71	Q2YVY3
A6TZT7	A5ITM4	P64120	A6QHR2	P60476
A6U155	A6QHF8	P63549	Q5HFJ0	P66905
Q5H DU4	Q2FV31	Q5HDR5	Q7A417	Q2YX35
P64324	Q99XG5	Q8NW61	Q6GG42	Q5HGU6
Q6GEX5	Q2FWZ0	A5IV34	Q7A1Q0	Q2FW20
Q2FXS9	A7X782	Q5H DV7	Q7A7F8	Q5HE70
Q2FG63	Q2G1G5	Q6GA19	A8YY02	Q6G9R7
Q8NVI5	Q2FGA1	Q5HF12	Q6GFE2	P65862
A7WYS1	Q99W68	A6TYW0	Q6GHP2	A6QEJ2
A5IPU6	Q2G2M4	Q2YXM1	Q2FGL1	Q5HH19
Q2FW72	Q6GEA4	Q2YY21	Q8NW75	P66759
Q6G9D4	P0A033	Q99S65	Q99V50	Q99VV3
P19241	Q2FJ80	P61431	Q6GD88	Q7A5N7
A6TZK7	Q5HFW9	Q2YYN5	A7X1P3	A6QIR5
Q8NYD0	Q2FDE7	Q5HG58	P67021	P64235
Q6GCF3	Q99S47	Q5HIS8	P63921	Q6GI15
Q6GEY2	P65601	Q6GH60	Q7A7B4	Q2YXL1

Q5HHZ9
P0A0P1

A6TZR0
P63538

Q99WG6
A7X2P6

Q8NXF2
Q2FZE3

P65966