

**ODDZIAŁYWANIE  
PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH PEPTYDÓW  
Z JONAMI METALI – RELACJA MIĘDZY  
CHEMIĄ KOORDYNACYJNĄ, STRUKTURĄ,  
TERMODYNAMIKĄ A SPOSOBEM DZIAŁANIA**

THE INTERACTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES  
WITH METAL IONS – THE RELATIONSHIP BETWEEN  
COORDINATION CHEMISTRY, STRUCTURE,  
THERMODYNAMICS AND MODE OF ACTION

**Dorota Dudek<sup>1</sup>, Kinga Garstka<sup>1</sup>, Adriana Miller<sup>1</sup>,  
Emilia Dzień<sup>1</sup>, Joanna Wątły<sup>1</sup>, Aleksandra Hecel<sup>1</sup>,  
Henryk Kozłowski<sup>1,2</sup>, Magdalena Rowińska-Żyrek<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, F. Joliot-Curie 14,  
50-383 Wrocław, Polska*

<sup>2</sup>*Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Opolskiego, Katowicka 68,  
45-060 Opole, Polska*

*\*e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@chem.uni.wroc.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – dlaczego warto zainteresować się ich sposobem oddziaływania z jonami metali?
2. Jony metali – dlaczego są aż tak istotne?
3. Kompleksy amyliny – przeciwcukrzycowe i przeciwgrzybicze
4. Kalcystermina z ludzkich dróg oddechowych
5. Semenogeliny z osocza nasienia
6. Alloferony – peptydy przeciwwirusowe z owadów
7. Ślinowe histatyny
8. Klawaniny i piscydyny – efektywnie działające peptydy przeciwdrobnoustrojowe ze stworzeń morskich

Podsumowanie i perspektywy na przyszłość

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr Dorota Dudek** stopień doktora uzyskała w 2021 roku i od tego czasu balansuje między pracą naukową i pracą w przemyśle. Pionierka badań kompleksów peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Drużynowa wicemistrzyni świata juniorów w Taekwon-do ITF (2009).



<https://orcid.org/0000-0002-4699-7665>



**Mgr Kinga Garstka** od 2020 roku we współpracy z Uniwersytetem w Ferrarze zgłębia tajniki białkowych cynkoforów, stanowiących potencjalne cząsteczki kierujące dla kompleksów peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Pasjonuje się fotografią.



<https://orcid.org/0000-0002-3073-094X>



**Mgr Adriana Miller** od 2018 roku m.in. skutecznie odkrywa tajemnice kompleksów peptydów przeciwdrobnoustrojowych ze stworzeń morskich. Instruktorka żeglarstwa, reprezentuje UW r w tej dziedzinie.



<https://orcid.org/0000-0002-9722-2755>



**Mgr Emilia Dzień** od 2020 roku we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu bada chemię koordynacyjną i właściwości biologiczne ślinowych histatyn. Oaza spokoju i królowa parkietu. W wolnych chwilach gotuje.



<https://orcid.org/0000-0003-1125-0876>



**Dr Joanna Wątyły** (dr od 2017 roku; w latach 2018-2019 odbyła staż doktorski w grupie prof. Kręzła na Wydziale Biotechnologii UW r) to specjalistka od kompleksów peptydomimetyków. Polihistydylowe białka z jadu węża to temat, który zawsze zwróci jej uwagę. Gdy nie pracuje, co zdarza się rzadko, robi torty – dzieła sztuki.



<https://orcid.org/0000-0003-3770-5189>



**Dr Aleksandra Hecel** (dr od 2017 roku; w latach 2020-2022 pracowała w grupie prof. Evy Freisinger na Uniwersytecie w Zurychu) skupia się na tematyce kompleksów metalotionein i bogatych w reszty cysteinyłowe peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Uwielbia wędrowki po górach w dobrym towarzystwie.



<https://orcid.org/0000-0002-4314-9599>



**Prof. dr hab. Henryk Kozłowski** (mgr 1968, dr 1973, dr hab. 1979, prof. 1990) – twórca polskiej chemii bionieorganicznej, członek rzeczywisty PAN, wypromował 37 doktorów, a jego prace były cytowane ponad 14 000 razy. W wolnych chwilach zaraża pasją do nauki; jest mentorem pozostałych autorek rozdziału.



<https://orcid.org/0000-0001-5769-8583>



**Dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek, prof. UWr** (mgr 2008, dr 2011, dr hab. 2018; w latach 2012-2015 pracowała w grupie prof. Sigela na Uniwersytecie w Zurychu). Wypromowała dwie doktorantki. Intensywnie poszukuje związku między chemią koordynacyjną peptydów przeciwdrobnoustrojowych a ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Od 2021 kieruje zespołem Biologiczne Aktywnych Metalopeptydów.



<https://orcid.org/0000-0002-0425-1128>

## ABSTRACT

Increasing bacterial and fungal drug resistance makes novel, effective antimicrobial treatments actively sought. Because of the general lack of resistance towards antimicrobial peptides (AMPs), they are being relied on as a novel class of therapeutics aimed to conquer drug-resistant bacteria and fungi.

There are numerous ways in which AMPs might interact with pathogens, such as membrane disruption, production of reactive oxygen species, inhibition of cell wall, nucleic acid and protein synthesis or by the withdrawal of essential metal ions. Biologically indispensable metal ions, such as Zn(II) and Cu(II), which are the key players of this project, have a dual effect on the activity of antimicrobial peptides: (i) AMPs bind them, so that microbes cannot get enough metals essential for their life and virulence (withdrawal of metal ions, nutritional immunity) or (ii) AMPs need the given metal ion as a booster of their antimicrobial activity (metal ions affect the AMP charge and/or structure).

In this chapter, we discuss the impact of the coordination of Cu(II) and Zn(II) to several antimicrobial peptides, focusing on the thermodynamics, structure and coordination chemistry. The comparison of these data to the outcome of biological growth studies (determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of metal-AMP complexes and their derivatives allows to draw conclusions about the relationship between the metal-antimicrobial peptide complex structure, stability mode of action and efficacy. In the nearest future, the most efficient complexes may serve as templates for a rational design of novel, more potent AMP-based therapeutics. Further improvement can be reached through the modification of the most promising AMP complexes using (i) specifically targeted antimicrobial peptides, in which the AMP will be covalently linked to a targeting peptide (Figure 1) or (ii) chimeric compounds comprising AMPs bound to conventional antimicrobials or peptidomimetic modifications (Figure 2).

Keywords: antimicrobial peptides, metal coordination, antibiotic resistance

Słowa kluczowe: peptydy przeciwdrobnoustrojowe, koordynacja metali, antybiotykooporność

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AMP	– peptyd przeciwdrobnoustrojowy (ang. <i>Antimicrobial peptide</i> )
AFM	– mikroskopia sił atomowych (ang. <i>Atomic force microscope</i> )
ATCUN	– amino-terminalny motyw wiążący jony Cu(II) oraz Ni(II) (ang. <i>Amino terminal Cu(II) and Ni(II) binding site</i> )
Atox1	– białko chaperonowe wiążące jony miedzi ang. <i>Copper metallochaperone protein</i> )
ATP7A	– ATP-aza ATP7A transportująca miedź (ang. <i>Copper-transporting P-type ATPase</i> )
ATP7B	– ATP-aza ATP7B transportująca miedź (ang. <i>Copper-transporting P-type ATPase</i> )
CCS	– chaperon miedziowy dysmutazy nadadtlenkowej (ang. <i>Copper chaperone for superoxide dismutase</i> )
COX17	– metalochaperon COX17 (ang. <i>Copper chaperone for cytochrome c oxidase</i> )
CTR1	– metalochaperon CTR1 (ang. <i>Copper transporters and chaperone</i> )
CTR2	– metalochaperon CTR2(ang. <i>Copper transporters and chaperone</i> )
DFT	– teoria funkcjonału gęstości (ang. <i>Density functional theory</i> )
ESKAPE	– patogeny bakteryjne wysoce zjadliwe i odporne na antybiotyki (ang. <i>Highly virulent and antibiotic resistant bacterial pathogens</i> )
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High-performance liquid chromatography</i> )
HPV	– wirus brodawczaka ludzkiego (ang. <i>Human papillomavirus infection</i> )
IAPP	– amyloidowy polipeptyd wyspowy – (ang. <i>Islet amyloid polypeptide</i> )
IL-18	– interleukina 18 (ang. <i>Interleukin-18</i> )
IL-1 $\alpha$	– interleukina 1 $\alpha$ (ang. <i>Interleukin-1<math>\alpha</math></i> )
IL-1 $\beta$	– interleukina 1 $\beta$ (ang. <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> )
IL-6	– interleukina 6 (ang. <i>Interleukin-6</i> )
MAPK	– kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )
MIC	– minimalne stężenie hamujące (ang. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
NK cells	– komórki NK (ang. <i>Natural killer cells</i> )
PSA	– swoisty antygen sterczowy (ang. <i>Prostate-specific antigen</i> )
RFT	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive oxygen species</i> )
SCO1	– białko składające się z oksydazy cytochromu c kodowane przez gen SCO1 (ang. <i>Cytochrome c oxidase assembly protein SCO1 homolog</i> )
SCO2	– białko składające się z oksydazy cytochromu c kodowane przez gen SCO2 (ang. <i>Cytochrome c oxidase assembly protein SCO2 homolog</i> )
SDS	– laurylosiarczan sodu (ang. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SOD	– dysmutaza nadadtlenkowa (ang. <i>Superoxide dismutase</i> )
STAMP	– specjalnie ukierunkowane peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>Specifically targeted antimicrobial peptides</i> )

---

ZIP	– regulowane cynkiem, regulowane żelazem białko podobne do transportera (ang. <i>The zinc-regulated, Iron-regulated transporter-like Proteins</i> )
ZnT	– transporter cynku (ang. <i>Zinc transporter</i> )

Zastosowane skróty jedno- i trójliterowe dla nazw aminokwasów w sekwencjach wszystkich opisywanych peptydów oraz badanych ligandów przedstawiono zgodnie z zaleceniami IUB-IUPAC.

## WPROWADZENIE

Problem oporności przeciwdrobnoustrojowej stał się poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia, w wyniku oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe na całym świecie umiera ponad 700 000 osób rocznie. Już teraz znajdujemy się w krytycznym punkcie walki z opornością przeciwdrobnoustrojową, tak więc jeśli nie zostaną podjęte żadne działania liczba ta drastycznie wzrośnie. W związku z tym zaleca się nasilenie działań profilaktycznych, zapewnienie dostępu do czystej wody i urządzeń sanitarnych, jak również przeprowadzanie wzmożonych kontroli w placówkach medycznych, czy budowanie świadomości społeczeństwa w zakresie antybiotykoterapii. Jednak główny nacisk należy położyć przede wszystkim na rozwój nowych, skutecznych i specyficznych leków przeciwdrobnoustrojowych. Z uwagi na fakt, że od około 30 lat nie została opracowana żadna nowa klasa antybiotyków, poszukuje się alternatywnych metod walki z chorobotwórczymi mikroorganizmami. Jedną z obiecujących klas związków stanowią peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs – ang. *Antimicrobial peptides*), wobec których drobnoustroje praktycznie nie wykazują oporności.

### 1. PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE – DLACZEGO INTERESUJĄCY JEST SPOSÓB ICH ODDZIAŁYWANIA Z JONAMI METALI?

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią jeden z elementów nieswoistej odpowiedzi odpornościowej organizmów żywych i są to niewielkie peptydy, które zawierają od 5 do 100 reszt aminokwasowych. Ich wspólną cechą jest zdolność do zabijania bądź hamowania wzrostu drobnoustrojów. Ze względu na niezwykłą różnorodność tej grupy związków, jednoznaczna klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest bardzo trudna. AMPs można podzielić biorąc pod uwagę wiele kryteriów, takich jak: źródło pochodzenia, właściwości fizykochemiczne czy cel działania przeciwdrobnoustrojowego. Wśród AMPs najliczniejszą i najlepiej poznaną grupę stanowią peptydy o działaniu przeciwbakteryjnym, których działanie opiera się na dwóch mechanizmach: (i) prowadzącym do permeabilizacji lub przerwania ciągłości błon i ścian komórkowych patogenów lub (ii) atakującym cele wewnątrzkomórkowe [1]. Niezależnie od właściwego mechanizmu działania danego AMP, niezbędna jest interakcja pomiędzy peptydem, a powierzchnią drobnoustroju, która zachodzi poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationowym peptydem a negatywnie naładowanymi elementami zewnętrznej powłoki patogenu [2]. Dotychczas zaproponowano kilka modeli, które wyjaśniają, w jaki sposób AMPs mogą przenikać przez błonę komórkową, a następnie tworzyć w niej pory lub kanały

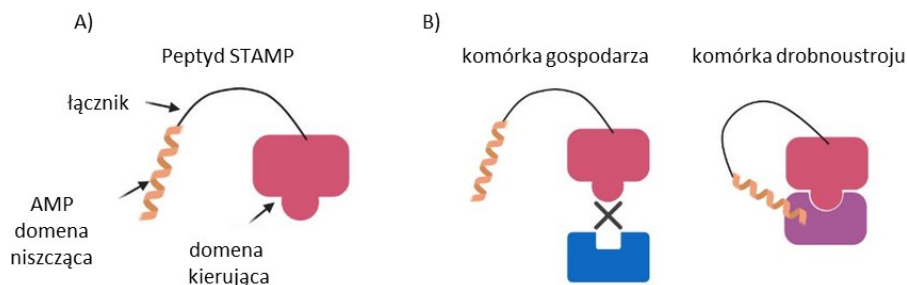
transbłonowe. Wśród nich można wyróżnić: model klepek beczki, model toroidalnych porów oraz model dywanowy [1].

Dlaczego warto zrozumieć sposób oddziaływania AMPs z jonami metali? Aktywność wielu peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest zależna od obecności biologicznie niezbędnych, dwuwartościowych jonów metali, takich jak Zn(II) oraz Cu(II), które mogą być wykorzystywane przez AMPs na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest tzw. odporność odżywcza. Jest to proces, w którym organizm gospodarza w odpowiedzi na infekcję, ogranicza dostęp do niezbędnych dla przeżycia i wirulencji patogenu jonów metali takich jak żelazo, cynk, miedź oraz mangan [3]. Niektóre AMPs mogą tworzyć z jonami metali związki kompleksowe o wysokim powinowactwie, dzięki czemu nie są one łatwo dostępne dla drobnoustrojów. Drugi sposób działania AMPs opiera się na wykorzystaniu dwuwartościowych jonów metali do zmiany swoich właściwości fizykochemicznych takich jak struktura czy ładunek wypadkowy, co umożliwia lub wzmacnia ich aktywność przeciwdrobnoustrojową [4].

Ze względu na szereg zalet oraz fakt, że AMPs funkcjonują jako podstawowy składnik wrodzonej odporności organizmu, stały się one obiecującym kandydatem na nową klasę leków o działaniu antybiotycznym, bakteriostatycznym, ale również przeciwwirusowym oraz przeciwgrzybiczym. Do ich niewątpliwych zalet zalicza się fakt, że (i) często wykorzystują więcej niż jeden mechanizm działania, dzięki czemu ryzyko wykształcenia wobec nich oporności jest mniejsze, w porównaniu do konwencjonalnych antybiotyków [5], (ii) charakteryzują się krótkim czasem działania i szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co ma szczególne znaczenie w leczeniu rozległych, wielogatunkowych infekcji skóry i tkanek miękkich, (iii) produktami degradacji AMPs są aminokwasy, wobec czego ryzyko ogólnoustrojowej toksyczności, a także zachodzenia interakcji pomiędzy innymi lekami jest minimalne. Jednakże AMPs nie są wolne od mankamentów. Jednym z czynników ograniczających ich kliniczne zastosowanie jest niska stabilność metaboliczna. Ze względu na degradację enzymatyczną i słabą penetrację błony śluzowej jelit, leki peptydowe charakteryzują się niską biodostępnością przy stosowaniu doustnym, a stosowanie AMPs ogólnoustrojowo ograniczone jest przez stosunkowo krótki czas półtrwania i ich szybką eliminację z organizmu przez wątrobę i nerki [6]. Zastosowanie ogólnoustrojowe ogranicza również potencjalna toksyczność wobec komórek eukariotycznych, w szczególności nefronów [7] oraz względnie wysoki koszt produkcji w porównaniu z lekami o podobnej masie cząsteczkowej [8]. Tak więc w celu zwiększenia skuteczności działania AMPs oraz przezwyciężenia przedstawionych ograniczeń, opracowano kilka strategii, które obejmują: (i) modyfikacje chemiczne peptydu oraz (ii) stosowanie różnych systemów dostarczania leków, które mają na celu poprawienie stabilności peptydu w obecności enzymów proteolitycznych. Jedną z najbardziej obiecujących technik jest projekto-



wanie peptydów STAMP (ang. *Specifically targeted antimicrobial peptides*). W odróżnieniu od klasycznych AMPs, są one specyficzne wobec danego szczepu, dzięki czemu nie wyniszczają naturalnej mikroflory organizmu i wykazują obiecującą aktywność *in vitro* oraz w badaniach przedklinicznych. Zbudowane są z dwóch niezależnych od siebie domen: (i) klasycznego AMP lub jego analogu, stanowiącego domenę niszczącą, której zadaniem jest szybki atak na komórkę drobnoustroju oraz (ii) domeny kierującej, która dzięki charakterystycznym oddziaływaniom na powierzchni patogenu zwiększa specyficzność wobec danego



gatunku i powoduje selektywną akumulację AMP wokół komórek drobnoustroju [9]. Na Rysunku 1 przedstawiony został schematyczny sposób działania STAMP.

Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie A) budowy peptydu STAMP oraz B) sposobu działania peptydów STAMP wobec komórek gospodarza i komórek patogenów

Figure 1. Schematic representation of A) the structure of the STAMP peptide and B) the mode of action of STAMP peptides against host cells and pathogen cells

Drugą strategią poprawy właściwości AMPs jest zastosowanie specyficznych systemów dostarczania leku do organizmu, które obejmują: (i) materiały nieorganiczne, (ii) materiały polimerowe, (iii) dyspersję związków surfaktantowych oraz (iv) systemy samoorganizacji peptydów. Ich zastosowanie pozwala na lepszą kontrolę ekspozycji i uwalniania peptydów w organizmie, ochronę przed degradacją, a w niektórych przypadkach może również zwiększać działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Dodatkową zaletą stosowania AMPs jest relatywnie niska oporność drobnoustrojów na ich działanie. Należy zaznaczyć również, że w środowisku naturalnym drobnoustroje spotykają się z AMPs od przynajmniej 2 milionów lat, wobec czego całkowita oporność na ich działanie wydaje się być niemożliwa [10], natomiast proces ten jest nieporównywalnie wolniejszy niż w przypadku oporności wobec konwencjonalnych antybiotyków. Wytworzenie oporności drobnoustrojów przeciwko AMPs może zachodzić poprzez mechanizmy bierne (konstytutywne), które związane są z ekspresją odpowiednich genów oraz indukowane (adaptacyjne).

Do wykształcenia oporności indukowanej bakterie wykorzystują mechanizmy opierające się na: (i) syntezie enzymów proteolitycznych, (ii) modyfikacji zewnętrznych osłon komórkowych, (iii) modyfikacji ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, (iv) tworzeniu biofilmu bakteryjnego czy (v) pomp wyrzutu.

## 2. JONY METALI – DLACZEGO SĄ AŻ TAK ISTOTNE?

Cynk jest mikroelementem niezbędnym do wzrostu i rozwoju, nie tylko dla organizmu ludzkiego, ale dla wszystkich form życia. W organizmie dorosłego człowieka znajduje się 3 g cynku, a jego średnie stężenie w tkankach wynosi ok. 0.6 mM. Po żelazie, cynk jest drugim najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w organizmie [11]. Szacuje się, że jest on zaangażowany w działanie ok. 10% wszystkich białek znajdujących się w ludzkim organizmie [12], gdzie pełni rolę strukturalną oraz katalityczną w ponad 300 enzymach, należących do wszystkich sześciu klas. W większości przypadków cynk katalizuje hydrolizę lub przenoszenie specyficznych grup funkcyjnych. Ponadto: (i) stabilizuje strukturę palców cynkowych, czyli domen białkowych, które występują w białkach wiążących kwasy nukleinowe, (ii) jest niezbędny do podziału i różnicowania komórek, (iii) bierze udział w reakcjach układu immunologicznego, (iv) procesie spermatogenezy, (v) procesie gojenia ran oraz (vi) syntezie hormonów steroidowych. Cynk pełni także rolę w sygnalizacji międzykomórkowej, zmieniając swoje stężenie w odpowiedzi na dany czynnik, np. stres oksydacyjny, apoptozę, stymulację elektryczną czy ekspozycję na glukozę [13]. Ma również szczególne znaczenie dla ośrodkowego układu nerwowego, a zaburzenia homeostazy jonów cynku w strukturach mózgu mogą wpływać na działanie receptorów odpowiedzialnych za przewodzenie sygnałów nerwowych, indukować stres oksydacyjny oraz prowadzić do śmierci neuronów i astrocytów. Za homeostazę i transport cynku w organizmie odpowiedzialne są białka z rodzin ZIP, które odpowiadają za import cynku do cytozolu oraz ZnT - transporter cynku (ang. *Zinc transporter*) odpowiadające za jego eksport. Za magazynowanie i odpowiednie uwalnianie cynku odpowiadają natomiast metalotioneiny - niskocząsteczkowe białka bogate w reszty cysteiny, o wysokim powinowactwie do dwuwartościowych jonów metali [14]. W odróżnieniu od innych dwuwartościowych jonów metali, Zn(II) nie wykazuje właściwości oksydoredukcyjnych, a jego konfiguracja elektronowa ( $[Ar]3^{10}$ ) sprawia, że przejścia elektronowe typu d-d nie występują, przez co nie są widoczne w badaniach spektroskopii absorpcyjnej. W przypadku peptydów i białek, najbardziej preferowanymi atomami donorowymi dla jonu cynku są atomy azotu, tlenu i siarki znajdujące się odpowiednio w łańcuchach bocznych reszty histydylowej, kwasu glutaminowego lub asparaginowego i cysteiny. Otoczenie koordynacyjne może być także uzupełnione cząsteczką wody [11]. Charakterystyczna dla cynku jest wysoce

elastyczna geometria koordynacyjna, która zależna jest wyłącznie od wielkości i ładunku liganda. Liczba koordynacyjna dla cynku może wynosić 4, 5 lub 6 przyjmując odpowiednio geometrię tetraedru, bipiramidy trygonalnej lub piramidy kwadratowej i oktaedru. Jednakże najczęściej spotykaną w białkach i peptydach cynkowych, jest geometria tetraedryczna [15].

Innym niezbędnym mikroelementem, który odgrywa niezwykle istotną rolę w utrzymaniu zdrowia i życia wielu organizmów jest miedź. U ludzi jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania narządów i procesów metabolicznych, a jej zawartość kształtuje się na poziomie ok. 2 mg/kg masy ciała. Jej przyswajalność z przewodu pokarmowego wynosi ok. 50%, a ilość wchłanianej miedzi zależna jest od obecności jonów żelaza oraz cynku, które rywalizują z miedzią o miejsca absorpcji w jelicie cienkim. Następnie, po związaniu do albuminy, jony tego metalu transportowane są do wątroby, gdzie są magazynowane. Większość jonów miedzi obecnych we krwi związana jest z ceruloplazminą - enzymem odpowiedzialnym za homeostazę żelaza, który bierze udział w mechanizmach obronnych w warunkach stresu oksydacyjnego. Nadmiar wolnych jonów miedzi w organizmie może być toksyczny. Zredukowana forma - Cu(I), katalizuje reakcję Fentona, której produktami są reaktywne formy tlenu (RFT) mogące uszkadzać żywe komórki, prowadząc do oksydacyjnego uszkodzenia białek, peroksydacji lipidów oraz pęknięcia nici kwasów nukleinowych [16]. Za utrzymywanie odpowiedniego stężenia jonów miedzi w komórkach odpowiedzialne są transbłonowe transportery jednowartościowych jonów metali CTR1 i CTR2, białka chaperonowe CCS, Atox1, Cox17, SCO1 i SCO2 oraz białka ATP7A oraz ATP7B, które biorą udział w aktywnym eksporcie miedzi z komórki lub jej przyłączanie do białek enzymatycznych [17]. Zaburzenia homeostazy jonów miedzi skutkują występowaniem wielu schorzeń takich jak choroba Wilsona, choroba Menkesa, choroba Huntingtona, aceruloplazminemia, choroba Alzheimerera czy choroba Parkinsona [18]. Ponadto miedź warunkuje działanie wielu enzymów, z których duża część bierze udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych, np. oksydaza cytochromowa, odpowiedzialna za transport elektronów w łańcuchu oddechowym czy dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalizująca dysproporcjonowanie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) do tlenu ( $O_2$ ) i nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ). Zazwyczaj miedź występuje na +I (forma zredukowana) lub +II (forma utleniona) stopniu utlenienia, dzięki czemu może pełnić rolę donora lub akceptora elektronów i brać udział w kluczowych reakcjach redoks [16]. Forma zredukowana, Cu(I) o konfiguracji elektronowej:  $[Ar]3d^{10}$ , może tworzyć związki kompleksowe o liczbie koordynacyjnej 2, 3 lub 4 przyjmując przy tym odpowiednio geometrię liniową, trygonalną oraz tetraedryczną. Forma utleniona, o konfiguracji elektronowej:  $[Ar]3d^9$  tworzy związki kompleksowe o liczbie koordynacyjnej równej 4, 5 lub 6, preferując geometrię odpowiednio płaskiego kwadratu, piramidy kwadratowej lub zniekształ-

conego oktaedru, który powstaje na skutek efektu Jahna-Tellera. Większość związków Cu(II) jest koloru niebieskiego lub zielonego, z charakterystycznymi przejściami elektronowymi typu d-d w zakresie 600-900 nm [19]. Atomami donorowymi, znajdującymi się w peptydach i białkach są reszty histydyny, cysteiny oraz metioniny, a zgodnie z teorią twardych i miękkich kwasów i zasad: Cu(I) jest kwasem miękkim i preferuje miękkie ligandy, takie jak ugrupowania tiolowe oraz tioeterowe, natomiast Cu(II), o charakterze pośrednim, silnie wiąże ligandy pośrednie takie jak atom azotu. Twardszy jon Cu(II) oddziałuje również silniej z cząsteczkami wody, wobec czego jest znacznie bardziej stabilny w roztworach wodnych [19].

### 3. KOMPLEKSY AMYLINY – PRZECIWCUKRZYCOWE I PRZECIWGRZYBICZE

Amylina (ang. *Islet Amyloid Polypeptide* – IAPP) jest polipeptydem wytwarzanym oraz wydzielanym przez komórki beta wysp Langerhansa trzustki. Należy do białek z rodziny kalcytoniny, do której zalicza się hormony peptydowe. Jej obecność potwierdzono również w innych narządach układu pokarmowego oraz w komórkach układu nerwowego [20]. Wydzielana jest razem z insuliną z pęcherzyków sekrecyjnych, w których zidentyfikowano również proinsulinę, C-polipeptyd oraz jony metali Zn(II) i Ca(II). W odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy po spożyciu pokarmu, amylna hamuje wydzielanie glukagonu, w efekcie obniżając stężenie glukozy we krwi. Aktywna biologicznie amylna zbudowana jest z 37 reszt aminokwasowych, zawiera mostek disulfidowy pomiędzy resztami cystein znajdującymi się w pozycjach 2 i 7 oraz amid na C-końcu. Jedną z ważniejszych cech charakteryzujących amylinę jest jej skłonność do fibrylacji. Złogi amyloidowe, znajdujące się w komórkach trzustki u ponad 90% pacjentów chorych na cukrzycę, zbudowane są głównie z amyliny. Najbardziej toksyczne dla komórek  $\beta$ -trzustki są tzw. struktury prefibrylarne, które powstają podczas konwersji natywnej postaci amyliny do amyloidu [21]. W zależności od gatunku, sekwencja aminokwasowa amyliny oraz skłonność do fibrylacji różnią się. Modelowym przykładem nietworzącego fibryli peptydu jest amylna szczurza, która różni się od tworzącej fibryle amyliny ludzkiej sześcioma aminokwasami. Największe znaczenie wydaje się mieć fragment 20-29, w którym zawiera się aż pięć z nich [22]. W pozycjach 25, 28 i 29 znajdują się reszty proliny (sekwencje analizowanych peptydów przedstawiono w Tabeli 1), z czego szczególne znaczenie ma reszta proliny w pozycji 25, która ogranicza interakcję z sąsiadującymi aminokwasami uniemożliwiając tworzenie się struktur  $\beta$  [23]. Na szczególną uwagę zasługuje również reszta histydyny znajdująca się wyłącznie w sekwencji amyliny ludzkiej [24]. U pozostałych gatunków w tym miejscu (pozycja 18) znajduje się reszta argininy. Histydyna jako aminokwas wrażli-

wy na zmianę pH, a także efektywny ligand dla jonów metali może istotnie wpływać na proces fibrylizacji [25]. Analogiem amyliny, dopuszczonym do stosowania jako lek u pacjentów cukrzycowych, u których terapia insuliną nie daje odpowiednich rezultatów jest pramlintyd. W sekwencji aminokwasowej pramlintydu trzy aminokwasy (Ala-25, Ser-28 i Ser-29) zostały zastąpione resztami proliny, na wzór nietworzącej fibryli amyliny szczurzej. Peptydy amyloidowe, do których zalicza się amylinę oraz niektóre peptydy przeciwdrobnoustrojowe posiadają szereg wspólnych cech, które skłoniły badaczy do poszukiwania powiązań pomiędzy tymi dwiema grupami. Obie klasy wykazują podobny mechanizm niszczenia błon komórkowych poprzez tworzenie kanałów jonowych. Część AMPs przyjmuje drugorzędową strukturę  $\beta$ -kartki, podobną do struktury peptydów amyloidowych. Podobieństwo tworzonych kanałów w błonie komórkowej, oprócz badań empirycznych, zostało potwierdzone również poprzez obliczenia teoretyczne, które pokazały, że organizacja podjednostek  $\beta$  w kanałach błonowych tworzonych przez proteogrynę-1 i  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) jest podobna [26]. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe amyliny wykazano wobec bakteriom *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Autorzy publikacji [27] zaproponowali następujący sposób działania: w fizjologicznym pH monomery amyliny posiadają ładunek dodatni. W pierwszym etapie następuje ich elektrostatyczne przyciąganie do negatywnie naładowanej błony *S. aureus*, a następnie dochodzi do zmiany struktury drugorzędowej z nieuporządkowanej do  $\alpha$ -helikalnej, dzięki czemu peptyd zostaje zakotwiczony w błonie. Po osiągnięciu odpowiedniego stężenia, peptydy tworzą strukturę przypominającą micelę, a wtedy błona zostaje przerwana. Struktury fibrylarne wykazują znacznie mniejszą toksyczność wobec błon i prawdopodobnie układają się równolegle do błony komórkowej bakterii, a po czasie tworzą nierozpuszczalne złogi amyloidowe [27]. Jony metali takich jak Zn(II), Cu(II) i Fe(II) są powszechnie kojarzone z procesem agregacji amyliny i innych peptydów amyloidogennych oraz z rozwojem cukrzycy typu II. Jony Zn(II) biorą udział w procesie regulacji glikemii oraz znajdują się razem z amyliną w pęcherzykach sekrecyjnych. Zaburzenie równowagi pomiędzy stężeniem amyliny i jonów Zn(II) powoduje wzmożoną agregację peptydu. Jony Fe(II) przyczyniają się do wzrostu tworzenia pofałdowanych struktur  $\beta$ . Żelazo zawarte w hemie, może z amyliną tworzyć kompleks hem-amylinę prowadząc do tworzenia toksycznych reaktywnych form tlenu [28].

Przeprowadzone przez nas badania umożliwiły określenie termodynamicznych i strukturalnych kompleksów amyliny szczurzej i pramlintydu (Tabela 1). W przypadku jonów Zn(II), kompleks z pramlintydem, w którym koordynacja następuje przez dwa atomy azotu, jest znacznie bardziej stabilny w porównaniu do kompleksu z amyliną szczurzą, w której atomem donorowym jest tylko jeden N-końcowy atom azotu. Kompleksy z jonami Cu(II) wykazują porównywalną stabilność. Powyżej pH 6, kompleks z pramlintydem jest minimalnie mniej stabilny,

co prawdopodobnie spowodowane jest występowaniem równowagi pomiędzy dwoma sposobami koordynacji dla tego układu. Znacząca aktywność przeciwdrobnoustrojowa została zarejestrowana wyłącznie dla układu Zn(II)-pramlintyd wobec gatunku grzybiczego *Candida albicans*. Dodatkowo, kompleks Zn(II)-pramlintyd jest jedynym układem, w którym struktury fibrylarne tworzą się w przeciągu 24 h, co sugeruje, że ich obecność może mieć bezpośredni związek z działaniem przeciwdrobnoustrojowym tego kompleksu. Badania AFM (ang. *Atomic force microscope*) dla acetylowanego pramlintydu i jego kompleksów z jonami metali, wskazują na istotną rolę koordynacji cynku zarówno do imidazolu His-18, jak i wolnej N-końcowej grupy aminowej w tworzeniu struktur fibrylarnych. Prawdopodobnie ten sposób koordynacji Zn(II) powoduje istotną zmianę konformacji peptydu (przypuszczalnie jego zgięcie), która inicjuje powstawanie (podobnych do 'igieł') struktur fibrylarnych, które najprawdopodobniej odpowiadają za fizyczne uszkodzenia komórek *C. albicans*. W kompleksie Cu(II)-pramlintyd, w którym w pH fizjologicznym w koordynację zaangażowane są trzy azoty amidowe oraz N-końcowy azot aminowy lub azot imidazolowy (dwa sposoby koordynacji są ze sobą w równowadze) nie obserwujemy tworzenia się struktur fibrylarnych, ani aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Nie zauważamy równoczesnej koordynacji jonów Cu(II) do N-końcowej aminy i imidazolu His-18, a więc nie obserwujemy, w przeciwieństwie do Zn(II), konieczności wygięcia się łańcucha peptydowego. Prawdopodobnie, płaskokwadratowa geometria, którą przyjmuje kompleks Cu(II) zapobiega agregacji peptydu. Udział drugorzędowej struktury  $\alpha$ -helikalnej zwiększa się w środowisku imitującym błonę komórkową (SDS), zarówno dla pramlintydu, jak i amyliny szczerzej (która nie wykazuje działania przeciwdrobnoustrojowego) niezależnie od obecności jonów metali. Przyjmowanie uporządkowanej struktury drugorzędowej może ułatwiać oddziaływanie z zewnętrzną powłoką drobnoustroju, natomiast w tym przypadku nie determinuje mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowego. Przypuszczalnie, fibryle formujące się na skutek tworzenia kompleksu Zn(II)-pramlintyd, uszkadzają błonę komórkową patogenu, w sposób przypominający nakłucie igłą co prowadzi ostatecznie do utraty ciągłości błony i śmierci komórki. Podobny mechanizm został przedstawiony dla amyliny ludzkiej, która w warunkach fizjologicznych jest wyjątkowo skłonna do tworzenia fibryli [27], a także dla innych amyloidowych białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi np.  $\alpha$ -synukleiny – białka biorącego udział w patogenezie choroby Parkinsona, która koordynuje jony Cu(II) przez N-końcową grupę aminową Met-1, sąsiadujący z nią azot amidowy, grupę karboksylową Asp-2 i oddalony od nich imidazol His-50, przyspieszając proces fibrylacji tego białka [24].

#### 4. KALCYTERMINA Z LUDZKICH DRÓG ODDECHOWYCH

Kalcytermina jest peptydem przeciwdrobnoustrojowym występującym w wydzielinie ludzkich dróg oddechowych. Stanowi 15-aminokwasowy, C-końcowy fragment kalgranuliny C (S100A12), należącej do rodziny białek wiążących wapń – S100, która obejmuje przynajmniej 25 białek o niskiej masie cząsteczkowej (9-14 kDa) [29]. Białka z tej rodziny zaangażowane są w: (i) fosforylację białek, (ii) regulację aktywności niektórych enzymów, (iii) utrzymywanie homeostazy Ca(II), (iv) proces krzepnięcia krwi oraz (v) proliferację i różnicowanie komórek. Ponadto wykazują także właściwości przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe oraz pobudzające układ odpornościowy [30]. Sekwencja tych białek jest wysoce konserwatywna wśród różnych gatunków kręgowców. Sekwencje peptydów, które zostały poddane badaniom zestawiono w Tabeli 1. W swojej strukturze posiadają dwa charakterystyczne miejsca wiązania jonów wapnia tzw. motywy typu ręki EF i przyjmują strukturę typu helisa-pętla-helisa. W roztworze białka S100 występują najczęściej jako dimery [31], a koordynacja jonów Ca(II) wpływa na zmiany konformacyjne tych białek, umożliwiając im interakcje z innymi białkami efektorowymi. Oprócz jonów Ca(II), wiele białek z rodziny S100 może wiązać również jony Zn(II) i Cu(II). Oddziaływanie z dwuwartościowymi jonami metali powoduje zmiany konformacyjne oraz zwiększenie powinowactwa białka do jonów Ca(II). Działanie przeciwdrobnoustrojowe kalcyterminy warunkowane jest wartością pH środowiska [29]. Aktywność przeciwbakteryjna przeciwko *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* została zaobserwowana po obniżeniu pH z wartości fizjologicznej (pH 7.4) do lekko kwasowej (pH 5.4), w której reszty histydylowe są uprotonowane, co zwiększa dodatni ładunek peptydu. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym działanie przeciwbakteryjne kalcyterminy jest obecność jonów Zn(II). W przypadku bakterii *Listeria monocytogenes*, działanie bójcze kalcyterminy warunkowane było obydwoma czynnikami. Badania przeprowadzone z udziałem kalcyterminy oraz jej trzech mutantów H9A, H11A oraz H13A dowiodły, że najwyższe powinowactwo do jonów Zn(II) oraz Cu(II) wykazuje natywna kalcytermina, która w swojej sekwencji zawiera trzy reszty histydylowe, a jony Cu(II) nie wykazują szczególnych preferencji pomiędzy resztami imidazolowymi. Powinowactwo Cu(II) do mutantu H11A jest najniższe spośród badanych ligandów, co jest zgodne z hipotezą dotyczącą koordynacji tylko jednej z dwóch obecnych w łańcuchu reszt histydylowych. Zauważono, że większa część reszt histydylowych w łańcuchu zapewnia bardziej stabilny kompleks z jonami Cu(II), a układy w których histydyliny oddzielone są od siebie tylko jedną inną resztą są bardziej skutecznie w wiązaniu Cu(II), w porównaniu do układów, w których dwie reszty histydylowe oddzielone są od siebie trzema resztami. W przypadku jonów Zn(II), oprócz liczby reszt histydylowych w sekwencji, wpływ na efektywność wiązania jonów Zn(II) ma również ich położenie. Tak jak w przypadku jonów Cu(II), najwyższe powinowactwo do Zn(II)

można zaobserwować dla kalcyterminy, a analiza wyników uzyskanych dla jej mutantów wskazuje, że kluczową rolę w wiązaniu Zn(II) mają reszty histydylowe w pozycjach 9 oraz 11 [32]. Przeprowadzone badania mikrobiologiczne umożliwiły nam wyznaczenie wartości MIC i wykazanie działania przeciwdrobnoustrojowego kalcyterminy wobec bakterii *S. aureus* oraz *K. pneumoniae*. Jako pierwsi pokazaliśmy także działanie przeciwgrybicze, które warunkowane jest obecnością jonów metali. Analiza otrzymanych wyników umożliwiła nam stwierdzenie, że zarówno substytucja reszt histydylowych na alaninę, jak i obecność jonów metali mają korzystny wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ponadto, w wielu przypadkach wartości MIC były mniejsze od 8 µg/ml, co czyni kalcyterminę, jej analogi oraz ich kompleksy konkurencyjnymi wobec komercyjnie stosowanych terapeutyków. Najbardziej obiecujące wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych otrzymaliśmy dla mutantu H9A wobec *C. albicans*. Zarówno dla samego mutantu, jak i dla jego kompleksów z jonami Zn(II) oraz Cu(II) otrzymano niższe wartości niż dla amfoterycyny i flukonazolu, które są powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń grzybiczych. Porównywalne bądź dużo niższe wartości MIC w stosunku do stosowanych leków zaobserwowano również dla mutantu H13A oraz jego kompleksów z jonami metali wobec *S. aureus* oraz *Enterococcus faecalis*. Brak zależności między aktywnością biologiczną a termodynamiczną stabilnością tworzonych kompleksów pozwala wyciągnąć wnioski, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa kalcyterminy, jej analogów oraz kompleksów nie jest osiągana w procesie odporności odżywczej, a najprawdopodobniej dzięki zmianom w ładunku i/lub lokalnej strukturze. Przypuszczenie to potwierdza również tendencja kalcyterminy oraz jej mutantów do przyjmowania struktury  $\alpha$ -helikalnej w środowisku imitującym błonę komórkową (SDS), co może ułatwić interakcję z błoną komórkową [32].

## 5. SEMENOGELINY Z OSOCZA NASIENIA

Semenogelina I (SgI) oraz semenogelina II (SgII) są białkami dominującymi w osoczu nasienia ludzkiego [33]. SgI jest białkiem o masie molekularnej 52 kDa, zbudowanym z 462 reszt aminokwasowych. SgII ma masę 65 kDa i składa się z 582 aminokwasów. Sekwencje aminokwasowe SgI i SgII pokrywają się w 78%, jednakże kodowane są przez dwa różne geny. W sekwencjach białek SgI i SgII pojawiają się 60-aminokwasowe konserwatywne motywy, które wielokrotnie się w nich powtarzają [34]. Ich synteza zachodzi w nabłonku gruczołowym pęcherzyków nasiennych i stanowią one ok. 60% objętości wszystkich białek ejakulatu. Podczas ejakulacji wszystkie frakcje łączą się tworząc koagulat o żelowej strukturze, a w procesie tym dużą rolę odgrywają jony Zn(II), których stężenie w osoczu nasienia jest ok. 100-krotnie wyższe niż w osoczu krwi i wynosi ok. 2 mM. Wydzielina gruczołu krokowego bogata jest w wolne jony Zn(II) oraz PSA (ang. *Prostatespecific*



*antigen*), którego aktywność jest przez nie hamowana. Po połączeniu z frakcją nasienia zawierającą duże stężenie semenogelin, następuje wychwyt jonów Zn(II) przez semenogeliny. Koordynacja jonów metalu prowokuje zmianę konformacyjną białek, umożliwiając tworzenie się żelowego koagulatu, który ma za zadanie unieruchomić plemniki. Jednocześnie zmniejsza się stężenie wolnych jonów Zn(II), co powoduje aktywację PSA. Dochodzi do rozkładu proteolitycznego semenogelin, niszczenia macierzy koagulatu i umożliwienia plemnikom swobodnego ruchu [35]. Oprócz udziału w procesie koagulacji i upłynnienia nasienia, semenogeliny mogą służyć jako substraty dla transglutaminazy i aktywatory hialuronidazy plemników, które odpowiedzialne są za degradację otoczki wokół komórki jajowej, co ma znaczenie w procesie zapłodnienia [36]. Semenogeliny pełnią również funkcję przeciwdrobnoustrojową. W badaniach przeprowadzonych przez H. Zhao i in. [37] zidentyfikowano cztery fragmenty semenogeliny I, powstałe w wyniku rozpadu proteolitycznego. Jeden z nich, SgI-29 (sekwencja przedstawiona w Tabeli 1) wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec szeregu patogenów. Inna grupa badawcza zidentyfikowała przeciwbakteryjny fragment SgII (sekwencja przedstawiona w Tabeli 1), który nazwano „SgII peptide A” [38]. Badania mikrobiologiczne wykazały znaczącą aktywność wobec bakterii z rodzaju *Streptococcus*, oraz gatunków *E. coli*, *S. aureus* i *E. faecalis*, a także umiarkowane działanie wobec *P. aeruginosa*. Dodatkowo, udowodniono, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa fragmentów semenogelin zależy od jonów Zn(II). Eksperyment wykazał, że usunięcie jonów Zn(II) z osocza nasienia powoduje prawie całkowite zahamowanie właściwości bójczych, natomiast ich ponowny dodatek przywrócił działanie przeciwbakteryjne. Przeprowadzone przez nas, z wykorzystaniem wybranych fragmentów semenogelin (Tabela 1), badania dowiodły, że dla wszystkich kompleksów z jonami Cu(II) oraz Zn(II), w pH fizjologicznym, zestaw atomów donorowych biorących udział w koordynacji jonów metali jest taki sam, a w sferze koordynacyjnej znajdują się N-końcowy azot aminowy oraz trzy azoty imidazolowe, jednakże w przypadku kompleksów SgI-29 obserwujemy koordynację typu histaminowego (koordynacja jonów metali następuje przez N-końcową grupę aminową oraz resztę histydyny w pozycji 1), w którym tworzy się pięcioczłonowy pierścień. Analiza właściwości termodynamicznych wykazała, że w całym zakresie pH najbardziej stabilny kompleks tworzy SgI-29 z jonami Zn(II). SgIIA oraz Sg-15 koordynują jony Zn(II) z powinowactwem niższym, odpowiednio o 20% oraz 40%, co wskazuje na fakt, że histaminowy sposób koordynacji jest bardziej efektywny niż koordynacja przez N-końcowy azot aminowy oraz trzy imidazolowe atomy azotu. W sekwencji SgIIA znajdują się 3 miejsca, w których reszty histydylowe znajdują się w swoim bliskim sąsiedztwie (-His-13-Phe-14-His-15-, -His-20-His-21- i -His-27-His-28-). Wyniki potencjometryczne i spektroskopowe pokazały, że w roztworze mogą w równowadze

znajdować się kompleksy o takim samym sposobie koordynacji, w których atomy donorowe pochodzą od różnych zestawów reszt histydylowych, co najprawdopodobniej wyjaśnia wyższą stabilność termodynamiczną SgIIA w porównaniu do Sg-15. W przypadku jonów Cu(II) do pH ok. 6.5 najbardziej skuteczny w wiązaniu jonów miedzi jest histaminowy sposób koordynacji. Powyżej tego pH, w koordynacji zaczynają brać udział amidowe atomy azotu, w wyniku czego w przypadku SgIIA, tworzą się termodynamicznie stabilne, pięcio- i sześcioczłonowe pierścienie chelatowe. W układzie Cu(II)-SgI-29, w związku z koordynacją typu histaminowego, koordynacja grup amidowych zachodzi w kierunku C-końca z utworzeniem mniej stabilnego 7-członowego pierścienia, co może być przyczyną różnicy w stabilności porównywanych kompleksów. Wspólny fragment obu semenogelin, SgI-15, w obecności jonów Cu(II) oraz SgI-29 w natywnej postaci i z dodatkiem Zn(II) oraz Cu(II), jak i SgIIA w obecności Zn(II) i Cu(II) wykazują właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepu *E. faecalis* [39].

## 6. ALLOFERONY – PEPTYDY PRZECIWWIRUSOWE Z OWADÓW

Alloferon 1 oraz alloferon 2, bioaktywne peptydy pochodzenia owadziego, po raz pierwszy zostały wyizolowane z limfy eksperymentalnie zakażonych bakteriami *E. coli* oraz *Micrococcus luteus* larw plujek pospolitych (*Calliphora vicina*) [40]. Ich sekwencje przedstawiono w Tabeli 1. W początkowej fazie badań stwierdzono, że wykazują działanie stymulujące oporność przeciwwirusową oraz przeciwnowotworową u myszy, którym wstrzyknięto hemolimfę owadów. Zaobserwowano znaczący wzrost aktywności komórek NK (ang. *Natural killer cells*), które stanowią ważny element odporności wrodzonej. Następnie przeprowadzono oczyszczanie hemolimfy metodą HPLC, dzięki czemu wyizolowano dwa peptydy: 13-aminokwasowy alloferon 1 oraz odpowiadający jego fragmentowi 2-13, alloferon 2. Nie stwierdzono natomiast czy obecność tych dwóch peptydów w hemolimfie zainfekowanych owadów jest wynikiem degradacji alloferonu 1, czy są one kodowane przez różne geny. W szeregu testów biologicznych wykazano, że syntetyczny alloferon 1 pobudza cytotoksyczność naturalną ludzkich limfocytów poprzez aktywację komórek NK oraz indukuje syntezę interferonu w modelach ludzkich i mysich, dzięki czemu wzmacnia odporność na wirusy oraz nowotwory u myszy. Grupa badawcza, która po raz pierwszy wyizolowała peptyd udokumentowała także jest działanie przeciwko wirusowi grypy A i B. Działanie przeciwnowotworowe wykazano natomiast *in vivo* u myszy uprzednio zaszczepionych komórkami białaczkowymi w ilości  $10^2$ - $10^3$ , u których zastosowano terapię alloferonem 1. Terapia okazała się natomiast nieskuteczna, gdy komórki nowotworowe podane były w wyższym stężeniu ( $10^4$ ) [40]. W kolejnych badaniach wykazano, że alloferon 1 zmniejsza wytwarzanie cytokin prozapalnych tj. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz IL-18, indukowanych przez promieniowanie UVB oraz hamuje aktywa-

cję kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38 (MAPK), która po czasie może przyczynić się do rozwoju zapalenia i raka skóry [41]. Sprawdzono również działanie neurotoksyczne alloferonu 1 u szczurów i nie stwierdzono żadnych negatywnych skutków stosowania alloferonu 1 na ich ośrodkowy układ nerwowy [42]. Alloferon 1 wykazuje również skuteczność przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV). Związki kompleksowe alloferonu 1 i alloferonu 2 oraz ich syntetycznych analogów z jonami miedzi, zostały szczegółowo zbadane i opisane w pracach [43-45]. W pH około fizjologicznym alloferon 1 tworzy kompleks typu 4N. W roztworze dominuje wówczas forma CuL, w której w sferze koordynacyjnej znajdują się N-końcowy atom azotu oraz 3 imidazolowe atomy azotu  $\{NH_2, 3N_{im}\}$ . Wraz ze wzrostem pH, sposób koordynacji zmienia się i w koordynację metalu zaangażowane są trzy amidowe atomy azotu  $\{N_{im}, 3N^-\}$ . W przypadku alloferonu 2, koordynacja jonów miedzi następuje przez 3 atomy azotu, w tym dwa pochodzące z pierścieni imidazolowych i jeden z N-końcowej grupy aminowej. Sferę koordynacyjną dopełnia grupa karboksylowa. Wraz ze wzrostem pH, podobnie jak w przypadku alloferonu 1, sposób koordynacji miedzi zmienia się na  $\{N_{im}, 3N^-\}$  [43]. Przeprowadzone przez nas badania pokazują, że w roztworze o pH fizjologicznym dominującą formą kompleksową dla alloferonu 1 oraz alloferonu 2 jest ZnL, a jony Zn(II) koordynowane są przez następujący zestaw atomów donorowych  $\{NH_2, 3N_{im}\}$ . Badane ligandy różnią się między sobą wyłącznie jedną resztą aminokwasową. W alloferonie 1, w pozycji 1 znajduje się reszta histydyny, która nie występuje w alloferonie 2. Ze względu na tę różnicę, szczegółowy sposób koordynacji Zn(II) jest różny dla obu ligandów. Dla alloferonu 1 obserwuje się koordynację typu histaminowego, gdzie w sferze koordynacyjnej znajdują się: N-końcowa grupa aminowa oraz trzy imidazolowe atomy azotu w pozycjach 1, 6 oraz 9. W przypadku alloferonu 2, w koordynację jonów Zn(II) zaangażowana jest natomiast N-końcowa grupa aminowa oraz reszty histydylowe w pozycjach 4, 7 oraz 13. Sporządzone wykresy kompetycyjne umożliwiające analizę powinowactwa ligandów do jonu metalu w szerokim zakresie pH pokazały, że kompleks Zn(II) z alloferonem 1 jest termodynamicznie bardziej stabilny w całym zakresie pH, niż ten tworzony przez alloferon 2. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że sposób koordynacji typu histaminowego jest znacznie bardziej stabilny niż sposób koordynacji zaobserwowany dla alloferonu 2 [46].

## 7. ŚLINOWE HISTATYNY

Histatyny to grupa małych, bogatych w reszty histydylowe, kationowych peptydów, które są wydzielane przez gruczoły ślinowe człowieka oraz niektórych wyższych naczelnych. Rodzina histatyn obejmuje 12 peptydów, których sekwencje przedstawiono w Tabeli 1, spośród których tylko histatyna 1 i 3 są kodowane genetycznie. Pozostałe peptydy są produktami ich cięć proteolitycznych lub modyfi-

kacji post-transkrypcyjnych. Histatyny stanowią pierwszą linię obrony przeciwko patogenom jamy ustnej. Wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii z grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* oraz bakterii z rodziny *Enterobacter*) [47], a także działanie przeciugrzybiczne głównie przeciwko grzybom z rodzaju *Candida*, *Cryptococcus neoformans* oraz *Aspergillus fumigatus*. Największą aktywnością przeciugrzybiczną *in vitro*, szczególnie wobec *C. albicans*, charakteryzuje się histatyna 5 [48-49].

Pomimo wieloletnich badań, mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego histatyn nie został jak dotąd dokładnie poznany. Ostatnie doniesienia wskazują, że celem ich działania są elementy wewnątrzkomórkowe, a szczególnie mitochondria. Wykazano, że histatyna 5 obniża potencjał błony mitochondrialnej i może hamować oddychanie komórkowe izolowanych organelli [50]. Co więcej, konsekwencją ingerencji w aparat oddechowy komórki jest zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) [51], która może także wynikać z faktu, iż histatyny są zdolne do tworzenia kompleksów z jonami metali dwuwartościowych, takich jak jony miedzi(II) lub cynku(II), co dodatkowo zaburza homeostazę jonów tych metali w komórce patogenu, potencjalnie wpływając na aktywność przeciwdrobnoustrojową histatyn [52].

Analizując sekwencje aminokwasowe histatyn, można zauważyć, że wiele z nich posiada wiążący jony niklu(II) i miedzi(II) motyw NH<sub>2</sub>-XXH, czyli tzw. motyw ATCUN - amino-terminalny motyw wiążący jony Cu(II) oraz Ni(II) (ang. *Amino terminal Cu(II) and Ni(II) binding site*). Wiązanie jonów miedzi zachodzi poprzez N-końcowy atom azotu, pierścień imidazolowy histydyny w pozycji 3, a także dwa amidowe azoty z wiązania peptydowego. Także obecność motywu HH w sekwencji aminokwasowej sprzyja wiązaniu jonów miedzi(II) [53-54] oraz dodatkowo jonów miedzi(I). Oprócz tego, histatyny są dobrymi ligandami dla jonów cynku(II), dzięki obecności motywu HEXXH, gdzie w koordynację jonów metali zaangażowane są dwie reszty histydyny oraz grupa boczna kwasu glutaminowego [55].

## 8. KLAWANINY I PISCYDYNY – EFEKTYWNE DZIAŁAJĄCE PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE ZE STWORZENI MORSKICH

Klawaniny są peptydami przeciwdrobnoustrojowymi wyizolowanymi z morskich organizmów *Styela clava* (osłonice). Do tej grupy należy sześć peptydów – klawaniny A-E oraz klawaspiryna [56-57]. Peptydy te posiadają 23 reszty aminokwasowe, z czego cztery (bądź w przypadku klawaniny D – trzy) to reszty histydylowe. W środowisku imitującym błonę komórkową, klawaniny przyjmują strukturę  $\alpha$ -helisy [57]. Dane literaturowe wskazują, że w pH 5.5 klawaniny działają

przeciw bakteriom *L. monocytogenes*, *E. coli* czy *K. pneumoniae* oraz grzybom *C. albicans* [58-59]. Dodatkowo zaobserwowano, że w przypadku klawaniny A związanie jonów Zn(II) w pH 5.5 powoduje szesnastokrotny wzrost aktywności przeciwko bakteriom *E. coli* [58].

Badania mające na celu ustalenie stechiometrii, geometrii tworzonych kompleksów, struktury drugorzędowej badanych układów oraz ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec wybranych bakterii i grzybów (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* i *C. albicans*) wykazały, że wszystkie peptydy tworzą – zarówno z cynkiem(II), jak i z miedzią(II) – kompleksy o stechiometrii 1:1. W przypadku Cu(II), zaobserwowano tworzenie się kompleksów o strukturze płaskiego kwadratu, gdzie w pH około 7.4 atomami donorowymi są trzy azoty pochodzące z histydylowych pierścieni imidazolowych oraz jednej grupy amidowej. Nieco inaczej wygląda sytuacja w przypadku klawaniny C, która posiadając specyficzny N-końcowy motyw wiążący (tzw. motyw ATCUN) koordynuje jon miedzi(II) poprzez N-końcową grupę aminową, dwa kolejne azoty amidowe z łańcucha głównego oraz azot imidazolowy z łańcucha bocznego reszty His-3 [59].

W przypadku kompleksów z Zn(II), w pH 7.4 w koordynację metalu we wszystkich peptydach były zaangażowane po trzy azoty imidazolowe. Dla klawanin A, B oraz E były to azoty pochodzące z łańcuchów bocznych His-10, His-11 oraz His-17, a dla klawanin C i D – His-10, His-11 i His-21 [59].

Spośród badanych klawanin i ich kompleksów, układem o najbardziej wszechstronnym i skutecznym działaniu jest kompleks Zn(II)-klawanina C. Aby zrozumieć przyczyny tego zjawiska wykonano obliczenia DFT, które jednoznacznie wskazały, że powyższy układ wyróżnia się budową miejsca wiążącego. Podczas, gdy jon Zn(II) jest koordynowany przez trzy azoty imidazolowe, poniżej jonu metalu znajduje się grupa O=C-N-H pochodząca z łańcucha głównego. Wodór z tej grupy jest skierowany idealnie w stronę jonu Zn(II), a dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym powoduje wypychanie metalu z jego sfery koordynacyjnej, co skutkuje wydłużeniem wiązań Zn(II)-N. Dłuższe i słabsze oddziaływania najprawdopodobniej ułatwiają oddysocjowanie metalu, co najwyraźniej przekłada się na podwyższoną aktywność przeciwdrobnoustrojową [59].

Przeciwdrobnoustrojowe piscydyny naturalnie występują w komórkach tucznych ryb z gatunku *Morone saxatilis*; są to bogate w histydyny, kationowe peptydy zawierające 22 reszty aminokwasowe, które tworzą strukturę  $\alpha$ -helikalną w środowisku imitującym błonę komórkową [60].

Podczas badania oddziaływań piscydyn z jonami Zn(II) i Cu(II) zaobserwowano tworzenie się kompleksów o stechiometrii 1:1. W koordynacji miedzi(II) w piscydynach 1-3 uczestniczy wspomniany wcześniej motyw ATCUN, wiążący jon metalu poprzez wolną N-końcową grupę aminową, dwa sąsiadujące azoty amidowe oraz azot z pierścienia imidazolowego z łańcucha bocznego histydyny. W pH około

fizjologicznym w koordynację cynku najprawdopodobniej zaangażowane są trzy azoty pochodzące z łańcuchów bocznych histydyn.

Podczas badań aktywności biologicznej, zarówno piscydyny jak i ich kompleksy wykazały bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną (porównywalną lub wyższą od obecnie stosowanych antybiotyków (nitrofurantoina, fosfomycyna V)), przeciwrzybiczą, przeciwwirusową i przeciwnowotworową [61].

Tabela 1. Omawiane sekwencje peptydowe  
Table 1. Discussed peptide sequences

Nazwa	Sekwencja
Alloferon 1 (owady)	HGVSGHGQHGTVHG
Alloferon 2 (owady)	GVSFGHGQHGTVHG
Kalcytermina (człowiek)	VAIALKAAHYHTHKE
Kalcytermina mutant H9A	VAIALKAAAYHTHKE
Kalcytermina mutant H11A	VAIALKAAHYATHKE
Kalcytermina mutant H13A	VAIALKAAHYHTAKE
SgI-29	HNKQEGRDHDKSKGHFHRVVIHHKGGKAH
Semenogelina IIA (człowiek)	KQEGRDHDKSKGHFHMIVIIHHKGGQAHHG
Semenogelina 15	KQEGRDHDKSKGHFH
Amylina szczyrca (szczyr)	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY
Amylina ludzka (człowiek)	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
Pramlintyd	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY
Klwanina A (osłonice)	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV
Klwanina B (osłonice)	VFQFLGRIIHHVGNFVHGFSHFV
Klwanina C (osłonice)	VFHLLGKIIHHVGNFVYGFSHVF
Klwanina D (osłonice)	AFKLLGRIIHHVGNFVYGFSHVF
Klwanina E (osłonice)	LFKLLGKIIHHVGNFVHGFSHFV
Piscydyna 1 (ryby)	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG

---

Piscydyna 2 (ryby)	FFHHIFRGIVHVGKTIHKVTG
Piscydyna 3 (ryby)	FIHHIFRGIVHAGRSIGRFLTG
Ludzka histatyna 1 (człowiek)	DSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Ludzka histatyna 2 (człowiek)	RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Ludzka histatyna 3 (człowiek)	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
Ludzka histatyna 4 (człowiek)	RKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
Ludzka histatyna 5 (człowiek)	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY
Ludzka histatyna 6 (człowiek)	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYR
Ludzka histatyna 7 (człowiek)	RKFHEKHHSHRGY
Ludzka histatyna 8 (człowiek)	KFHEKHHSHRGY
Ludzka histatyna 9 (człowiek)	RKFHEKHHSHRGYR
Histatyna (makak)	DSHEERHHGRHGHHKYGRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN
Mfa-hst5 (makak)	DSHEERRQGRHGHHEYGRKFHEKHHSHRGY
Hcl-hst5 (gibbon)	DSHEKRHHEHRRKFHEKHHSHRGY

---

## PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

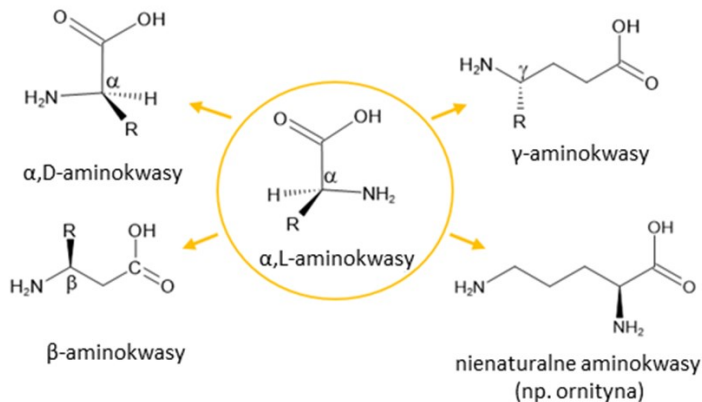
Jony metali są jednym z czynników zdolnych do precyzyjnego modulowania właściwości biologicznych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, obiecującej grupy potencjalnych leków. Ich wadą jest jednak problematyczna stabilność metaboliczna [62-63]. W rzeczywistości wiele endo- i egzopeptydaz działa tak, aby przekształcać peptydy o wysokiej masie cząsteczkowej w krótsze oligopeptydy, czyniąc je nieaktywnymi i ostatecznie degradowanymi [64]. Wyzwaniem, które należy pokonać, jest zmniejszenie aktywności biologicznej *in vivo* (w porównaniu z eksperymentami *in vitro*): różnice w pH i stężeniach soli oraz obecność różnych oddziałujących cząsteczek hamują skuteczność AMP. Te problemy łącznie przekładają się na krótkie okresy półtrwania (poniżej 30 minut) i słabą biodostępność [65].

W celu zwiększenia potencjału terapeutycznego tych (i innych) peptydów, stale poszukuje się nowych rozwiązań pozwalających na tworzenie innowacyjnych

związków naśladujących biologicznie aktywne peptydy. Niezwykle potrzebne jest racjonalne projektowanie nowych analogów peptydów w celu optymalizacji ich właściwości chemicznych. Nadrzędne cele, które zostały wyznaczone przy projektowaniu nowych bioaktywnych peptydów to: (i) zwiększenie ich stabilności biologicznej poprzez modyfikację szkieletu peptydowego lub przez włączenie nienaturalnych aminokwasów, co znacznie zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji przez enzymy oraz (ii) ograniczenie ruchliwości konformacyjnej peptydu, zwiększając w ten sposób prawdopodobieństwo reakcji z pożądanym celem i ograniczając niepożądane skutki uboczne [66-67].

Zmiany strukturalne mogą poprawić stabilność biologiczną, siłę wiązania i selektywność celu, a zatem rozsądną strategią jest projektowanie nowych pochodnych peptydów – peptydomimetyków - modyfikując naturalne peptydy przy zachowaniu zdolności do interakcji z ich biologicznymi celami, które powodują taki sam efekt biologiczny jak peptyd macierzysty [68].

Peptydomimetyki mogą zawierać nienaturalnie występujące elementy budulcowe i/lub zmiany chemiczne, które nadają odporność na proteolizę i degradację [69]. Wzmocnienie działania przeciwdrobnoustrojowego i polepszenie stabilności enzymatycznej AMP ze śliny wiążących jony metali można uzyskać poprzez wprowadzenie nienaturalnych elementów budulcowych, m.in. D-,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i nienaturalnych aminokwasów (Rysunek 2). Takie podejście może być milowym krokiem w kierunku znalezienia nowych, specyficznych terapii przeciwdrobnoustrojowych, opierających się na stabilnych metabolicznie kompleksach peptydomimetyków z jonami metali [70].



Rysunek 2. Przykłady modyfikacji aminokwasów  
Figure 2. Examples of amino acid modifications



**PODZIĘKOWANIE**

Działalność Zespołu Biologicznie Aktywnych Metalopeptydów jest finansowana przez granty NCN: SONATA BIS nr UMO-2017/26/E/ST5/00364 (M. R.-Ż.), OPUS nr UMO-2021/41/B/ST4/02654 (J. W.), MAESTRO nr UMO-2017/26/A/ST5/00363 (H. K.) oraz NAWA: nr PPN/BEK/2020/1/00268 (A. H.).

**PIŚMIENNICTWO CYTOWANE**

- [1] K.A. Brogden, *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(3), 238.
- [2] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, **19**(3), 491.
- [3] M.I. Hood, E.P. Skaar, *Nature Reviews Microbiology*, 2012, **10**(8), 525.
- [4] L. Benov, H. Sage, I. Fridovich, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, **340**(2), 305.
- [5] J. Janiszewska, *Polimery*, 2014, **59**(10), 699.
- [6] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatsky, *Drug Discov Today*, 2010, **15**(1-2), 40.
- [7] Z. Gai, S.L. Samodelov, G. A. Kullak-Ublick, M. Visentin, *Molecules*, 2019, **24**(3), 653.
- [8] B. L. Bray, *Nat Rev Drug Discov.*, 2003, **2**(7), 587.
- [9] R. Eckert, K.M. Brady, E.P. Greenberg, F. Qi, D.K. Yarbrough, J. He, I. McHardy, M.H. Anderson, W. Shi, *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, **50**(11), 3833.
- [10] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, *Pharmacol. Rev.*, 2003, **55**(1), 27.
- [11] R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 10.1016/B978-044452740-0.50012-0.
- [12] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.*, 2006, **5**(1), 196.
- [13] J. Osredkar, *Journal of Clinical Toxicology*, 2011, S3 :001, DOI : 10.4172/2161-0495.S3-001.
- [14] T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami, T. Hirano, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**(7), 1123.
- [15] K. Patel, A. Kumar, S. Durani, *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1774**(10), 1247.
- [16] R.R. Crichton, *In Biological Inorganic Chemistry (Second Edition)*, Elsevier: Oxford, 2012, 279.
- [17] A. Gupta, S. Lutsenko, *Future medicinal chemistry*, 2009, **1**(6), 1125.
- [18] G.J. Brewer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**(2), 207.
- [19] R.R. Conry, *Copper: Inorganic & Coordination Chemistry Based in part on the article Copper: Inorganic & Coordination Chemistry by Rebecca R. Conry & Kenneth D. Karlin which appeared in the Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition. Encyclopedia of Inorganic Chemistry, 2005.*
- [20] M. Marszałek, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2015, **69**, 309.
- [21] E.T.A.S. Jaikaran, A. Clark, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2001, **1537**, 179.
- [22] M. Rowińska-Żyrek, *Dalton Trans.*, 2016, 19, 8099.
- [23] S. Chakraborty, B. Chatterjee, S. Basu, *Biophys. Chem.*, 2012, **168-169**, 1.
- [24] M. Alghrably, D. Dudek, A. H. Emwas, Ł. Jaremko, M. Rowińska-Żyrek, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 2527.
- [25] P. Westermark, A. Andersson, G.T. Westermark, *Physiol. Rev.*, 2011, **91**(3), 795.
- [26] H. Jang, B. Ma, R. Lal, R. Nussinov, *Biophys. J.*, 2008, **95**(10), 4631.
- [27] L. Wang, Q. Liu, J.C. Chen, Y.X. Cui, B. Zhou, Y.X. Chen, Y.F. Zhao, Y.M. Li, *Biol. Chem.*, 2012, **393**(7), 641.
- [28] P.H. Nguyen, A. Ramamoorthy, B.R. Sahoo, J. Zheng, P. Faller, J.E. Straub, L. Dominguez, J.-E. Shea, N.V. Dokholyan, A. De Simone, B. Ma, R. Nussinov, S. Najafi, S.T. Ngo, A. Loquet,

- M. Chiricotto, P. Ganguly, J. McCarty, M.S. Li, C. Hall, Y. Wang, Y. Miller, S. Melchionna, B. Habenstein, S. Timr, J. Chen, B. Hnath, B. Strodel, R. Kayed, S. Lesné, G. Wei, F. Sterpone, A. J. Doig, P. Derreumaux, *Chem. Rev.*, 2021, **121**(4), 2545.
- [29] A.M. Cole, Y.H. Kim, S. Tahk, T. Hong, P. Weis, A.J. Waring, T. Ganz, *FEBS Lett.*, 2001, **504** (1-2), 5.
- [30] R. Donato, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, **33**(7), 637.
- [31] G. Fritz, H. M. Botelho, L. A. Morozova-Roche, C. M. Gomes, *The FEBS Journal*, 2010, **277**(22), 4578.
- [32] D. Dudek (2021) Oddziaływanie jonów cynku i miedzi z wybranymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi, Rozprawa doktorska, Uniwersytet Wrocławski.
- [33] Å. Lundwall, A. Bjartell, A.Y. Olsson, J. Malm, *Molecular Human Reproduction*, 2002, **8**(9), 805.
- [34] The UniProt, C., UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 2019, **47**, (D1), D506.
- [35] J. Malm, M. Jonsson, B. Frohm, S. Linse, *The FEBS Journal*, 2007, **274**(17), 4503.
- [36] A. Peter, H. Lilja, A. Lundwall, J. Malm, *Eur J Biochem.*, 1998, **252**(2), 216.
- [37] H. Zhao, W.-H. Lee, J.-H. Shen, H. Li, Y. Zhang, *Peptides*, 2008, **29**(4), 505.
- [38] A.M.L. Edström, J. Malm, B. Frohm, J.A. Martellini, A. Giwercman, M. Mörgelin, A.M. Cole, O. E. Sørensen, *J Immunol.*, 2008, **181**(5), 3413.
- [39] D. Bellotti, M. Toniolo, D. Dudek, A. Mikołajczyk, R. Guerrini, A. Matera-Witkiewicz, M. Remelli, M. Rowińska-Żyrek, *Dalton Transactions*, 2019, **48**, 13740.
- [40] S. Chernysh, S.I. Kim, G. Bekker, V.A. Pleskach, N.A. Filatova, V.B. Anikin, V.G. Platonov, P. Bulet, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(20), 12628.
- [41] Y. Kim, S.K. Lee, S. Bae, H. Kim, Y. Park, N.K. Chu, S.G. Kim, H.-R. Kim, Y.-I. Hwang, J.S. Kang, W.J. Lee, *Immunology Letters*, 2013, **149**(1), 110.
- [42] M. Rykaczewska-Czerwińska, P. Oleś, M. Oleś, M. Kuczer, D. Konopińska, A. Plech, *Acta poloniae pharmaceutica*, 2015, **72**(1), 205.
- [43] T. Kowalik-Jankowska, Ł. Biega, M. Kuczer, D. Konopińska, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**(1), 135.
- [44] M. Kuczer, M. Błaszak, E. Czarniewska, G. Rosiński, T. Kowalik-Jankowska, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**(10), 595.
- [45] A. Kadej, M. Kuczer, T. Kowalik-Jankowska, *Dalton Trans.*, 2015, **44**(47), 20659.
- [46] D. Dudek, A. Miller, S. Draghi, D. Valensin, A. Mikołajczyk, A. Matera-Witkiewicz, D. Witkowska, K. Stokowa-Sołtys, M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, **213**:11127
- [47] H. Du, S. Puri, A. McCall, H.L. Norris, T. Russo, M. Edgerton, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, **7**, 41.
- [48] E.J. Helmerhorst, I.M. Reijnders, W. van't Hof, I. Simoons-Smit, E.C. Veerman, A.V. Amerongen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, **43**(3), 702.
- [49] S. Puri, M. Edgerton, *Eukaryotic Cell*, 2014, **13**(8), 958.
- [50] R. Petruzzelli, M.E. Clementi, S. Marini, M. Coletta, E. Di Stasio, B. Giardina, F. Misiti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **311**(4), 1034.
- [51] E.J. Helmerhorst, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**(25), 14637.
- [52] S.S. Bradford, M.J. Ross, I. Fidai, J.A. Cowan, *ChemMedChem*. 2014, **9**(6), 1275.
- [53] K. Kulon, D. Valensin, W. Kamysz, G. Valensin, P. Nadolski, E. Porciatti, E. Gaggelli, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 960.
- [54] R.A. Himes, G.Y. Park, G.S. Siluvai, N.J. Blackburn, K.D. Karlin, *Angew. Chem.*, 2008, Int. Ed. **47**, 9084.
- [55] P.M. Cummins, A. Pabon, E.H. Margulies, M.J. Glucksman, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 16003.

- [56] R.I. Lehrer, J. Andrew Tincu, S.W. Taylor, L.P. Menzel, A.J. Waring, *Integr. Comp. Biol.*, 2003, **43**, 313.
- [57] I.H. Lee, C. Zhao, Y. Cho, S.S.L. Harwig, E.L. Cooper, R.I. Lehrer, *FEBS Letters*, 1997, **400**, 158.
- [58] S.A. Juliano, S. Pierce, J.A. deMayo, M.J. Balunas, A.M. Angeles-Boza, *Biochem.*, 2017, **56**, 1403.
- [59] A. Miller, A. Matera-Witkiewicz, A. Mikołajczyk, R. Wiczorek, M. Rowińska-Żyrek, *Inorg. Chem.*, 2021, **60**, 12730.
- [60] E.J. Noga, U. Silphaduang, *Nature*, 2001, **414**, 268.
- [61] S.V. Raju, P. Sarkar, P. Kumar, J. Arockiaraj, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2021, **27**, 91.
- [62] D. Łoboda, H. Kozłowski, M. Rowińska-Żyrek, *J. Chem.* 2018, **42**, 7560.
- [63] J.L. Alexander, Z. Thompson, J.A. Cowan, *ACS Chemical Biology*, 2018, **13**(4), 844.
- [64] M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande, *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, **62**(3), 597.
- [65] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, **6**, 194.
- [66] A. Begum, D. Sujatha, K. Prasad, K. Bharathi, *Asian Journal of Chemistry*, 2017, **29**(9), 1879.
- [67] H.M. Werner, C.C. Cabaltega, W.S. Horne, *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 2016, **17**(8), 712.
- [68] J. Vagner, H. Qu, V.J. Hruby, *Current Opinion in Chemical Biology* 2008, **12**, 292.
- [69] I. Avan, C.D. Hall, A.R. Katritzky, *Chemical Society Reviews*, 2014, **43**, 3575.
- [70] J. Wąty, A. Miller, H. Kozłowski, M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2021, **217**, 111386.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 maja 2022 r.

