

**AMINOKWASY, GLIKANY, PEPTYDY I BIAŁKA
W ŚCIEŻKACH DIAGNOSTYCZNYCH
I TERAPEUTYCZNYCH CHOROÓB
CYWILIZACYJNYCH XXI WIEKU –
PROJEKTOWANIE I CHARAKTERYSTYKA
FIZYKOCHEMICZNA ORAZ STRUKTURALNA**

AMINO ACIDS, GLYCANS, PEPTIDES
AND PROTEINS IN THE DIAGNOSTIC
AND THERAPEUTIC PATHWAYS OF THE 21ST
CENTURY CIVILIZATION DISEASES - DESIGN,
PHYSICOCHEMICAL AND STRUCTURAL
CHARACTERISATION

**Irena Bylińska, Maria Dzierżyńska, Małgorzata
Giżyńska, Katarzyna Guzow, Elżbieta Jankowska,
Przemysław Jurczak, Zbigniew Kaczyński, Natalia
Karska, Agnieszka Kowalczyk, Katarzyna
Kuncewicz, Marta Orlikowska, Justyna Sawicka,
Marta Spodzieja, Nikola Szpakowska, Aneta
Szymańska, Ewa Wieczerek, Julia Witkowska,
Sylvia Rodziewicz-Motowidło***

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Biomedycznej,
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: s.rodziewicz-motowidlo@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

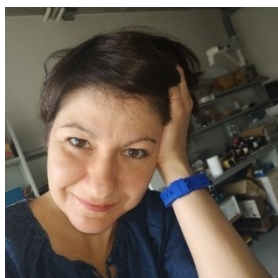
Wprowadzenie

1. Poszukiwania nowych efektywnych fluoroforów o potencjale aplikacyjnym w obszarze chemii, biologii i medycyny
2. Związki przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe
3. Cystatyna C - białko o potencjale amyloidogennym
4. Aktywacja proteasomu jako strategia w powstrzymywaniu rozwoju procesów starzeniowych i neurodegeneracyjnych
5. Fibryle i hydrożele peptydowe
6. Peptydowe inhibitory punktów kontrolnych układu immunologicznego
7. Badania konformacyjne homologów glikoproteiny N herpeswirusów
8. Glikany i glikokoniugaty pochodzenia naturalnego
 - 8.1. Bakterie Gram-ujemne
 - 8.2. Bakterie Gram-dodatnie
 - 8.3. Grzyby podstawkowe

Uwagi końcowe

Podziękowania

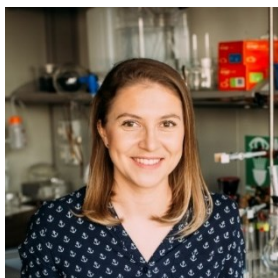
Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Irena Bylińska (mgr 2005, inż. 2008, dr 2011) zajmuje się poszukiwaniem nowym efektywnych fluoroforów. W ostatnich latach skupiła się na projektowaniu, syntezie oraz badaniu właściwości spektroskopowych układów o znaczącym potencjale biologicznym. W centrum jej zainteresowań znajdują się fluorofory, które bada pod kątem ich zdolności do przenikania błony komórkowej wykorzystując konfokalną mikroskopię fluorescencyjną.



<https://orcid.org/0000-0001-9053-3043>



Dr Maria Dzierżyńska (mgr 2008, dr 2014) poszukuje zależności struktura - aktywność peptydomimetyków przeciwdrobnoustrojowych, których struktura oparta jest na *N*-terminalnym fragmencie ludzkiej cystatyny C. Zajmuje się również hybrydowymi hydrożelami peptydowymi wykorzystywanymi do hodowli komórek skóry. Jest stypendystką Fulbrighta.



<https://orcid.org/0000-0003-0861-2514>



Dr Małgorzata Giżyńska (mgr 2014, dr 2020) zajmuje się badaniem oddziaływań ludzkiego proteasomu 20S z białkami wykazującymi właściwości amyloidogenne oraz projektowaniem i syntezą peptydów zdolnych do aktywacji proteasomu 20S.



<https://orcid.org/0000-0002-3206-5605>



Dr Katarzyna Guzow (mgr 2000, dr 2005) zajmuje się syntezą fluorozujących aminokwasów niebiałkowych, opartych na szkieletie benzoksazyloalaniny oraz modyfikowanych nimi peptydów, poszukuje zależności struktura-aktywność biologiczna dla tej grupy związków.



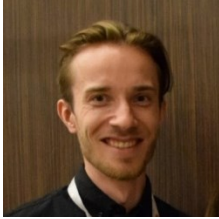
<https://orcid.org/0000-0001-6343-4787>



Dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG (mgr 1995, dr 2001, dr hab. 2013) Poszukuje skutecznych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S i testuje ich zdolność do pobudzania enzymu do degradacji oligomerów polipeptydowych i białkowych. Zajmuje się badaniem biocząsteczek wykazujących tendencje do oligomeryzacji i agregacji (osoczowe białko amyloidu A, amylina).



<https://orcid.org/0000-0002-1099-8885>



Dr Przemysław Jurczak (mgr 2012, dr 2019) zajmuje się badaniami nad wpływem istotnych biologicznie molekuł na proces oligomeryzacji ludzkiej cystatyny C oraz projektowaniem nośników czynników aktywnych, otrzymanych na bazie nanomateriałów.



<https://orcid.org/0000-0001-7962-3953>



Dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG (mgr 1995, dr 2002, dr hab. 2012). Odbił trzyletni staż podoktorski w grupie prof. Otto Holsta w Research Center Borstel (Niemcy). Zainteresowania naukowe obejmują badania strukturalne glikanów i glikokoniugatów, głównie pochodzenia bakteryjnego i grzybowego. Od 2013 roku kieruje Pracownią Biochemii Strukturalnej



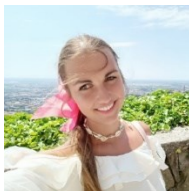
<https://orcid.org/0000-0002-4590-4690>



Dr Natalia Karska (mgr 2011, dr 2018) zajmuje się projektowaniem, syntezą oraz badaniami strukturalnymi peptydów techniką magnetycznego rezonansu jądrowego. Badania skupią się głównie na białkach herpeswirusów (ligandy białka TAP).



<https://orcid.org/0000-0003-2429-4157>



Mgr Agnieszka Kowalczyk (mgr 2018) zajmuje się analizą strukturalną lipopolisacharydów bakteryjnych. Badania polegają na wyodrębnianiu lipopolisacharydów z fitopatogenów bakteryjnych, a następnie ustaleniu ich struktury chemicznej, wykorzystując metody chemiczne, GC-MS i techniki NMR.




<https://orcid.org/0000-0002-5890-9618>



Dr Katarzyna Kuncewicz (mgr 2013, dr 2019) zajmuje się projektowaniem, syntezą oraz badaniami oddziaływań z celami molekularnymi związków o właściwościach przeciwnowotworowych, będących inhibitorami punktów kontrolnych układu immunologicznego.




 <https://orcid.org/0000-0003-4730-3343>



Dr Marta Orlikowska (mgr 2007, dr 2012) odbyła staż doktorski w grupie prof. Zbyszka Otwinowskiego (University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) oraz w grupie prof. Grzegorza Bujacza (Politechnika Łódzka). Zajmuje się otrzymywaniem białek i wyznaczaniem ich struktur przestrzennych metodą rentgenografii strukturalnej. W wolnych chwilach fotografuje.




 <https://orcid.org/0000-0002-5814-8767>



Dr Justyna Sawicka (mgr 2013, dr 2019) zajmuje się projektowaniem, syntezą oraz charakterystyką fizyko-chemiczną rusztowań peptydowych o właściwościach pro-regeneracyjnych i przeciwbakteryjnych a także opracowaniem biotuszu do druku 3D w medycynie regeneracyjnej.




 <https://orcid.org/0000-0002-1506-3202>



Dr Marta Spodzieja (mgr 2007, dr 2012) zajmuje się projektowaniem i syntezą inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego. Jej badania skupiają się głównie na badaniu wpływu otrzymanych związków na kompleksy białek BTLA/HVEM, PD-1/PD-L1, CD160/HVEM oraz HVEM/LIGHT.




 <https://orcid.org/0000-0003-2712-0048>



Mgr Nikola Szpakowska (mgr 2018) zajmuje się badaniami strukturalnymi polisacharydów o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych. Jej zainteresowania naukowe głównie koncentrują się na wyodrębnieniu bioaktywnych polisacharydów z grzybów leśnych oraz ustaleniu ich struktury chemicznej z wykorzystaniem GC, MS oraz NMR.




 <https://orcid.org/0000-0002-6129-4239>



Dr hab. Aneta Szymańska, prof. UG (mgr 1996, dr 2001, dr hab. 2013) od początku kariery zawodowej związana z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Odbyła staż podoktorski w grupie prof. Lili Gierasch na Uniwersytecie Massachusetts w Amherst (USA). Zajmuje się badaniami peptydów i białek o charakterze amyloidogennym. Głównym przedmiotem badań jest ludzkie białko cystatyna C i jej analogi. Jest autorką ponad 50 publikacji w czasopismach naukowych i kilku patentów.




 <https://orcid.org/0000-0002-8664-2041>



Dr Ewa Wieczerzak (mgr 1997, dr 2002) odbyła staże podoktorskie w grupach prof. Andersa Grubba (Lund University, Szwecja) i prof. Emanuela Eschera (Sherbrooke University, Kanada). Zajmuje się projektowaniem, syntezą i badaniem peptydów i peptydomimetyków o potencjalnym działaniu terapeutycznym.




 <https://orcid.org/0000-0003-2539-5160>



Dr Julia Witkowska (mgr 2011, dr 2017) poszukuje zależności struktura-aktywność dla biologicznie aktywnych peptydów wykorzystując badania strukturalne – krystalografię oraz sieciowanie chemiczne połączone ze spektrometrią mas.




 <https://orcid.org/0000-0003-0518-0162>



Prof. Sylwia Rodziewicz-Motowidło (mgr 1997, dr 2001, dr hab. 2011, prof. 2021) – odbyła staż podoktorski w grupie prof. Harolda Scheragi w Cornell Univeristy (USA), wypromowała 9 doktorów, a jej prace były cytowane ponad 1500 razy. Jest autorką ponad 100 publikacji w czasopismach naukowych i kilku patentów. Intensywnie poszukuje zależności struktura-aktywność dla biologicznie aktywnych peptydów. Od 2012 kieruje Katedrą Chemii Biomedycznej. Zараża optymizmem do nauki i poznaje historię Gdańska.



 <https://orcid.org/0000-0002-4471-5951>

ABSTRACT

The civilization diseases of the 21st century are non-infectious disorders, affecting a large part of modern society. They are associated with the significant development of industry and technology, and hence with environmental pollution and an unhealthy lifestyle. These factors have led to the development of many civilization diseases, which currently include: cardiovascular diseases, respiratory diseases, diabetes, obesity, malignant tumors, gastrointestinal diseases, mental disorders and allergic diseases. The development of technologies, including modern therapies and new drugs, resulted in increase in life expectancy. This creates a global problem of an aging population with an increasing number of diseases of the old age, i.e. dementias. In addition, sedentary lifestyles and changing diets are the reasons why more and more people develop metabolic diseases, as well as neurological and cognitive disorders characterized by progressive damage to nerve cells and dementia. Currently, problem on a global scale is also the growing resistance to existing antimicrobial drugs. Therefore, the scientists face many challenges related to searching for the causes of these diseases, their diagnosis and treatment. Scientific research conducted at the Department of Biomedical Chemistry at the Faculty of Chemistry of the University of Gdańsk is part of this research trend.

In this publication, we discuss various research topics with the long-term aim of solving the problems associated with the diseases mentioned above. The following chapters are dedicated to (i) looking for new effective fluorophores with diagnostic and anti-cancer activity; (ii) designing of new compounds with antibacterial and antiviral activity and their synthesis; (iii) investigating the mechanisms of amyloid deposit formation by human cystatin C and possibilities of inhibition of this process; (iv) designing and studies of compounds activating the proteasome with the potential to suppress the development of neurodegenerative diseases; (v) designing peptide fibrils and hydrogels as drug carriers; (vi) searching for peptide inhibitors of immune checkpoint as potential drugs for immunotherapy; (vii) studying the mechanism of action of selected herpesviruses by determining the structure of viral proteins and (viii) studying the composition of natural glycans and glycoconjugates in order to better understand the mechanisms of interaction of bacteria with the environment or with the host.

Keywords: fluorophores, fluorescence spectroscopy, antimicrobial and anticancer activity, Cystapep, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial compounds, amyloidogenic protein, mutagenesis, fibrilization, proteasome, aging, neurodegeneration, self-assembling peptides, tissue engineering, biomaterials, immune checkpoints, peptide inhibitors, immunotherapy, ligands of TAP protein, viral diseases, NMR structure of the UL49.5 protein, glycans, glycoconjugates

Słowa kluczowe: fluorofory, spektroskopia fluorescencyjna, aktywność przeciwdrobnoustrojowa i antynowotworowa, Cystapep, *Staphylococcus aureus*, związki przeciwbakteryjne, białko amyloidogenne, mutageneza, fibrylizacja, proteasom, procesy starzeniowe, neurodegeneracja, peptydy samoorganizujące, inżynieria tkankowa, biomateriały, punkty kontrolne układu immunologicznego, inhibitory peptydowe, immunoterapia, ligandy białka TAP, choroby wirusowe, struktura NMR białka UL49.5, glikany, glikokoniugaty

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APC	- komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen presenting cell</i>)
BoHV-1	- bydłęcy herpeswirus typu 1
BTLA	- inhibitor limfocytów T i B (ang. <i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>)
CNAntAcDMA	- 9-(2-(4-(N,N-dimetylamino)fenylo)etynylo)antraceno-10-karbonitryl (ang. 9-(2-(4-(N,N-dimetylamino)phenyl)ethynyl)anthracen-10-carbonitrile)
CPS	- polisacharyd kapsularny
CPXV012	- wirus ospy krowiej
Cy5	- karboksymetyloindocyjanina (ang. <i>carboxymethylindocyanine</i>)
DPC	- dodecylofosforylocholina (ang. <i>dodecylphosphorylcholine</i>)
EBV	- wirus Epstein-Barr
EHV-1	- koński herpeswirus typu 1
EHV-4	- koński herpeswirus typu 4
EPS	- egzopolisacharyd
FAD	- dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FLIM	- mikroskopia obrazowania oparta na pomiarze czasów życia fluorescencji (ang. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
FITExP	- identyfikacja celu molekularnego za pomocą ekspersji proteomu (ang. <i>functional identification of target by expression proteomics</i>)
FMN	- mononukleotyd flawinowy (ang. <i>flavin mononucleotide</i>)
gD	- białko wirusowe glikoproteina D
gN	- glikoproteina N
h20S	- ludzki proteasom 20S
h26S	- ludzki proteasom 26S
hCC	- ludzka cystatyna C (ang. <i>human cystatin C</i>)
HCMV	- ludzki wirus cytomegalii
HVEM	- białko wejścia wirusa opryszczki (ang. <i>herpesvirus entry mediator</i>)
LPS	- lipopolisacharyd
LTA	- kwas lipoteichojuowy
MHC	- główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
MHC I	- główny układ zgodności tkankowej klasy I
MRSA	- gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MSSA	- gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę (ang. <i>methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>)
NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
OPS	- O-swoisty polisacharyd
PRV	- wirus pseudowścieklizny
Rh ₁₁₀	- rodamina 110 (ang. <i>rhodamine 110</i>)
SAP	- peptydy samoorganizujące (ang. <i>self-assembling peptides</i>)
SDS	- siarczanu dodecyłu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TAP	- transporter związany z przetwarzaniem antygenu
TCR	- receptor komórek T (ang. <i>T-cell receptor</i>)

TEM	- transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i>)
TPP	- termiczne profilowanie proteomu (ang. <i>thermal proteome profiling</i>)
WTA	- kwas tejchojowy

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

WPROWADZENIE

Katedra Chemii Biomedycznej wywodzi się z jednej z najstarszych szkół naukowych gdańskiej chemii uniwersyteckiej – chemii aminokwasów i peptydów. Jej historia sięga roku 1959, kiedy to na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Gdańsku, w powstałym w 1957 roku Zakładzie Chemii Ogólnej, rozpoczął pracę dr inż. Bogdan Liberek. W 1970 roku, wraz z powstaniem Uniwersytetu Gdańskiego (UG) i Zakładu Chemii Organicznej w Instytucie Chemii na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii został powołany Zespół Naukowy Chemii Aminokwasów i Peptydów pod kierownictwem doc. dr hab. inż. Bogdana Liberka (prof. od 1971). Funkcjonował on, pod kierownictwem prof. Liberka, do roku 1994. W latach 1994-1996, już na powstałym w 1991 r. Wydziale Chemii UG, Zespołem kierował prof. dr hab. inż. Zbigniew Grzonka. W roku 1996 Zespół przekształcił się w Zakład Chemii Peptydów – w ramach Katedry Chemii Organicznej, kierowanej przez prof. dr hab. inż. Gotfryda Kupryszewskiego – a jego kierownikiem pozostał prof. Zbigniew Grzonka. Zakład Chemii Peptydów rozwijał się i od roku 1999 funkcjonował jako Katedra Chemii Organicznej pod kierownictwem prof. Zbigniewa Grzonki. Wraz z przejściem prof. Grzonki na emeryturę w roku 2008 Katedra Chemii Organicznej zmieniła nazwę na Katedra Chemii Medycznej, a jej kierownikiem został prof. dr hab. Franciszek Kasprzykowski, prof. nadzw. (prof. od 2014). W roku 2012 obowiązki kierownika Katedry Chemii Medycznej przejęła dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło, prof. nadzw. (prof. od 2021). Rok później nazwa katedry zyskała przedrostek Bio- i powstała Katedra Chemii Biomedycznej. W Katedrze realizowane są rozliczne projekty naukowe we współpracy z partnerami zagranicznymi i krajowymi. Poniżej opisane zostały jedynie główne wątki tematyki badawczej realizowanej w Katedrze Chemii Biomedycznej.

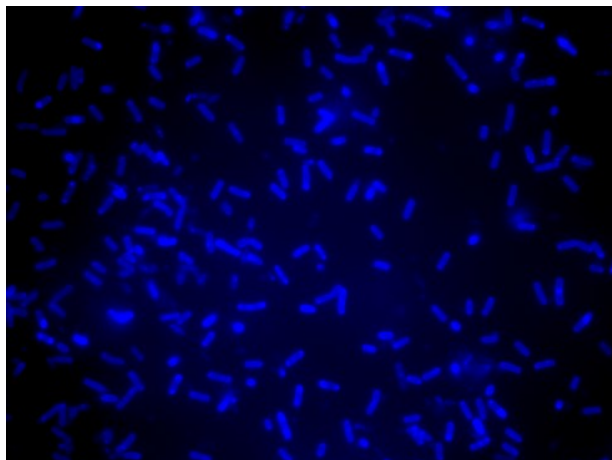
1. POSZUKIWANIA NOWYCH EFEKTYWNYCH FLUOROFORÓW O POTENCJALE APLIKACYJNYM W OBSZARZE CHEMII, BIOLOGII I MEDYCYN

Czułe metody monitorowania zarówno ludzkiego ciała, jak i jego otoczenia mają krytyczne znaczenie dla zapewnienia zdrowia i bezpieczeństwa publicznego. Wśród technik instrumentalnych, które to umożliwiają, spektroskopia fluorescencyjna jest uznawana za jedną z najbardziej czułych i selektywnych. Właściwości te pozwalają na pracę z niskimi stężeniami próbek (co jest ważne zwłaszcza w badaniach biomedycznych) i wizualizację nawet bardzo subtelných zmian w badanym układzie. Warunkiem koniecznym, by móc wykorzystać spektroskopię fluorescencyjną, jest obecność odpowiedniego fluoroforu w analizowanym układzie. Wybór znacznika jest kluczowy dla powodzenia zaprojektowanego eksperymentu, ponieważ od jego właściwości zależy zakres informacji uzyskiwanych w toku badań. Sondy fluorescencyjne można podzielić na dwie główne klasy: wewnętrzne (naturalnie występujące) i zewnętrzne (wprowadzane sztucznie). Przykładami naturalnych fluoroforów są: aminokwasy aromatyczne (Trp, Tyr,

Phe), kofaktory enzymów fluorescencyjnych (NADH, ryboflawina FMN, FAD). W takich przypadkach zastosowanie technik fluorescencyjnych do ich badania wydaje się stosunkowo proste. Układy z fluoroforami o nieodpowiednich właściwościach lub bez nich powinny być wyznakowane zewnętrznymi sondami. Dla przykładu w przypadku białek często wymagane jest wprowadzenie znacznika wzbudzanego bardziej długofalowo niż aminokwasy aromatyczne (naturalne fluorofory obecne w próbce). Ponadto, rosnąca złożoność zadań badawczych podnosi wymagania stawiane narzędziom badawczym, takim jak fluorofory. Pomimo ogromnej ich liczby wciąż istnieje zapotrzebowanie na bardziej czułe i selektywne układy dedykowane konkretnym zadaniom badawczym, których potrzeby uwzględnia się już na etapie projektowania fluoroforu. Ze względu na to wielu naukowców zajmuje się obecnie syntezą i określaniem właściwości zsyntezowanych fluoroforów. W ten nurt badań wpisuje się nasza grupa badawcza. Wśród naszych aktualnych tematów badań można wyróżnić syntezę oraz badanie aktywności mikrobiotycznej peptydów zawierających fluoryzujący niebiałkowy aminokwas oparty na szkielecie benzoksazolyloalaniny a także projektowanie, syntezę oraz badanie właściwości spektralnych oraz fotofizycznych:

- symetrycznych i asymetrycznych pochodnych aromatycznych mono- oraz diacetyleny;
- znakowanych fluorescencyjnie pochodnych izotiocyanianów, wykazujących właściwości antynowotworowe;
- fluorogennych niebiałkowych aminokwasów zawierających wiązanie potrójne między atomami węgla;
- nowych znaczników fluorescencyjnych opartych na strukturze oksazolony o potencjale diagnostycznym oraz terapeutycznym w chorobach nowotworowych.

Dotychczas otrzymane przez nas wyniki badań pozwoliły wyselekcjonować aktywne biologicznie pochodne benzoksazolyloalaniny oraz ustalić wpływ sąsiadującego aminokwasu i sekwencji na ich aktywność względem bakterii oraz grzybów (**Rysunek 1**) [1]. Ponadto, dla otrzymanych peptydów zweryfikowaliśmy cytotoksyczność względem nowotworowych oraz prawidłowych linii komórkowych. Wnikliwa analiza wyników badań uzyskanych dla licznej grupy tych związków, otrzymanych metodami chemii kombinatorycznej, pozwoliła nam ustalić sekwencje najbardziej obiecujących peptydów, wykazujących także aktywność względem szczepów bakterii wielolekoopornych. Efektem tych badań jest uzyskany w 2017 r patent. [2].

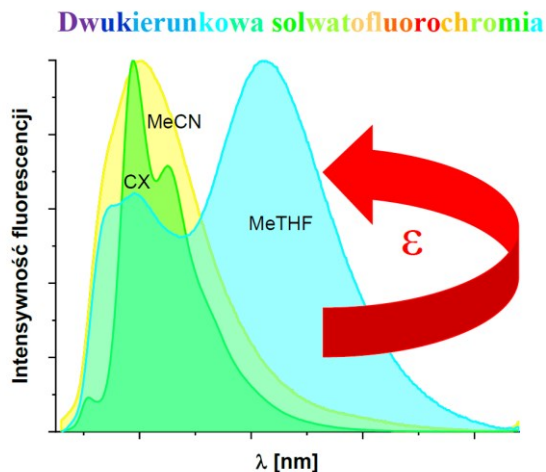


Rysunek 1. Bakterie *B. subtilis* potraktowane estrem metylowym 3-[2-(8-chinolilo)benzoksazol-5-ylo]alaniny

Figure 1. Bacteria *B. subtilis* treated with 3-[2-(8-quinolinyl)benzoxazol-5-yl]alanine methyl ester

W toku badań symetrycznych pochodnych acetylenowych oraz diacetylenowych ustaliliśmy wpływ wielkości podstawnika, ilości jednostek acetylenowych między aromatycznymi podstawnikami, polarności otoczenia oraz temperatury na ich właściwości spektralne oraz fotofizyczne. Widma absorpcyjne badanych związków wykazują dużą spójność w przeciwieństwie do widm emisji. Intensywność fluorescencji i fosforescencji jest silnie zależna od wielkości podstawnika oraz temperatury [3]–[8].

Pośród pochodnych asymetrycznych zbudowanych z fragmentu donorowego oraz akceptorowego, które połączone są mostkiem π -elektronowym, niezwykle ciekawe właściwości wykazuje 9-(2-(4-(N,N-dimetylamino)fenylo)etynylo)antraceno-10-karbonitryl (CNAntAcDMA). W przypadku widm absorpcyjnych zaobserwowaliśmy rozmywanie struktury oscylacyjnej oraz standardowe tendencje do batochromowego przesuwania się widm wraz ze wzrostem polarności otoczenia [9]. Z kolei na widmach emisji w rozpuszczalnikach o małych wartościach stałych dielektrycznych wzrost polarności powoduje batochromowe przesuwanie się widma, natomiast dla większych wartości tych stałych tendencja ta ulega zmianie, co wskazuje na niezwykle rzadkie zjawisko dwukierunkowej solwatofluorochromii (**Rysunek 2**).

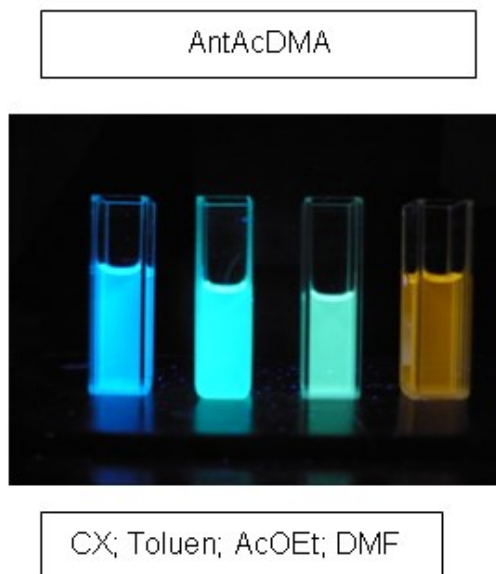


Rysunek 2. Widma fluorescencji pochodnej CNAntAcDMA (9-(2-(4-(N,N-dimetylamino)fenylo)etynylo)antraceno-10-karbonitryl) zarejestrowane w acetonitrylu, cykloheksanie oraz 2-metylotetrahydrofuranie

Figure 2. Emission spectra of CNAntAcDMA (9-(2-(4-(N,N-dimethylamino)phenyl)ethynyl)anthracen-10-carbonitrile) in acetonitrile, cyclohexane and 2-methyltetrahydrofurane

Pozostałe otrzymane i przebadane pochodne tego typu charakteryzują się silnym, ale zgodnym z oczekiwaniem wpływem rozpuszczalnika na właściwości spektralne oraz fotofizyczne i mogą znaleźć zastosowanie np. jako sondy środowiskowe (**Rysunek 3**) [10].

Ponadto zsyntezowaliśmy i zbadaliśmy aminokwasy niebiałkowe zawierające wiązanie potrójne między atomami węgla będące pochodnymi alaniny, dla których ustaliliśmy jak na właściwości spektroskopowe wpływają modyfikacje strukturalne oraz polarność rozpuszczalnika. Związki te charakteryzują się wysokimi lub średnimi molowymi współczynnikami absorpcji, dużym przesunięciem Stokesa, wysoką wydajnością kwantową fluorescencji oraz bardzo wysoką jasnością [11]. Ich jasność jest prawie 20 razy wyższa od jasności często stosowanego wzorca fluorescencyjnego chininy. Parametr ten dla otrzymanych związków jest większy lub zbliżony do jasności stosowanych obecnie znaczników z rodziny cyjanin lub rodamin (ponad 1,5 razy wyższa od jasności Cy5, a zbliżona do Rh₁₁₀). Takie wysokie wartości jasności umożliwiają pracę z małymi stężeniami tych związków w badanym analizie, prostą i łatwą detekcję zarówno absorpcji, jak i fluorescencji. Dodatkowo, obecność fragmentu aminokwasowego umożliwia kowalencyjne wbudowanie takiego znacznika w łańcuch peptydowy lub białko i wykorzystanie tych fluoroforów do analizy układów biologicznych. Badania tej grupy związków są obecnie rozwijane w kierunku poszukiwania efektywnego fluoroforu, którego struktura oparta jest na szkieletcie naturalnego aminokwasu aromatycznego – tyrozyny.



Rysunek 3. Fluorescencja wybranej asymetrycznej pochodnej acetylenowej w rozpuszczalnikach o różnej polarności

Figure 3. Fluorescence of selected asymmetric acetylene derivative in solvents with different polarity

Otrzymaliśmy także aktywne, znakowane fluorescencyjnie pochodne izotiocyanianów o aktywności przeciwnowotworowej, w których obecność znacznika nie pozbawiła ich aktywności, a ją wzmocniła. Umożliwia to zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej do dalszej eksploracji tej niezwykle interesującej grupy związków.

Dodatkowo poszukujemy fluoroforów o potencjale diagnostycznym i terapeutycznym w chorobach nowotworowych, które mogą być skutecznymi narzędziami w nowym nurcie medycyny - teranostyce. Pierwsze zaprojektowane i zsyntezowane pochodne oparte na strukturze oksazolonu mają satysfakcjonujące właściwości spektroskopowe i wnikają do komórek, co zostało zweryfikowane z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu techniki FLIM. W toku badań wstępnych ustaliliśmy, że po 24 godzinach ekspozycji większość komórek wykazuje morfologiczne cechy apoptozy, co wskazuje na duży potencjał tej grupy związków i zachęca do dalszych badań.

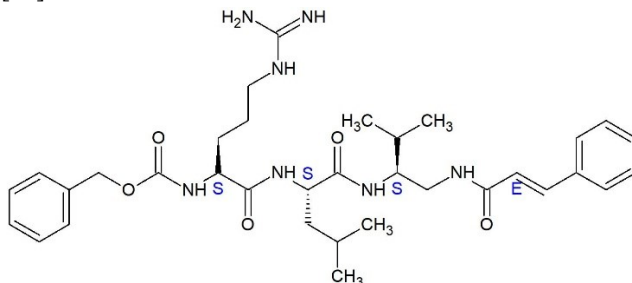
2. ZWIĄZKI PRZECIWBAKTERYJNE I PRZECIWWIRUSOWE

Związki przeciwbakteryjne stanowią zainteresowanie wielu naukowców ze względu na problem lekooporności. Lata nadużywania antybiotyków w infekcjach niebakteryjnych, rolnictwie oraz hodowli zwierząt doprowadziły do powstania takich mikroorganizmów, które po wniknięciu do organizmu mogą prowadzić nawet do śmierci gospodarza ze względu na brak dostępnych skutecznych terapii. Poszukiwanie chemo-

terapeutyków o odmiennym mechanizmie działania niż wykazują do tej pory poznane antybiotyki jest ważnym elementem tej gałęzi nauki. Peptydy i małe białka mogą być inspiracją do tworzenia nowych typów związków. Jednym z takich białek jest inhibitor proteaz cysteinowych cystatyna C (hCC), która wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe [12], [13].

Wykazaliśmy, że *N*-terminalny fragment hCC o sekwencji -Arg-Leu-Val-Gly-uczestniczy w wiązaniu z enzymem, dlatego nową grupę antybiotyków oparto strukturalnie na inhibitorowym centrum ludzkiej cystatyny C. Pokazaliśmy, że *N*-benzyloksykarbonylo-leucylo-walilo-glicylo-diazometan (*Z*-Leu-Val-Gly-DAM) hamuje wzrost bakterii *Streptococcus pyogenes* [13]. Bakteriobójcze działanie tego związku przypisano zdolności do inhibicji proteaz cysteinowych, a konkretnie tzw. proteazy streptokokowej. Podjęte później badania aktywności antybakteryjnej jego analogów wykazały brak jednoznacznego związku pomiędzy aktywnością antybakteryjną a zdolnością do inhibicji proteaz cysteinowych [14].

W dalszych etapach badań zaprojektowaliśmy związki przeciwbakteryjne z tzw. szeregu A o ogólnej strukturze: X-Arg-Leu-ValΨ[CH₂-NH]-Y. Spośród wielu liniowych analogów, związek o nazwie Cystapep 1 (A-20, **Rysunek 4**) wykazywał największą aktywność. Jest on aktywny wobec bakterii *Staphylococcus aureus* (MSSA oraz MRSA) oraz *Streptococcus pyogenes*. Jego protekcyjne działanie wobec *Streptococcus pyogenes* wykazaliśmy eksperymentalnie. W eksperymencie tym związek A-20 podano myszom, wraz z letalną ilością bakterii. Przeżywalność myszy w tym eksperymencie wyniosła 100% [14], [15]. Ponadto nie udało się wyhodować bakterii, które byłyby odporne na działanie tego związku. Do tej pory otrzymaliśmy wiele analogów związku A-20, na podstawie budowy których próbowaliśmy wyjaśnić mechanizm jego działania. Dzięki tym badaniom znaleźliśmy wiele związków, których działanie jest silniejsze wobec *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*, co dało możliwość określenia składowych budowy, które związek wykazujący działanie przeciwbakteryjne musi posiadać. Charakterystyczne elementy stałe to niepodstawione pierścienie fenylowe na obu końcach związku oraz reszta 1,2-diaminy w środkowej części struktury łańcucha peptydowego [16].



Rysunek 4. Struktura jednego z szeregu związków zaprojektowanych na podstawie *N*-terminalnego fragmentu wiążącego cystatyny C – Cystapep 1 (A-20)

Figure 4. One of the structures of the designed peptidomimetics based on *N*-terminal binding fragment of human cystatin C – Cystapep 1 (A-20)

Z uwagi na fakt, iż mechanizm działania związku A-20 nie jest znany, a wiele peptydów przeciwbakteryjnych oddziałuje z błonami komórkowymi, zbadaliśmy oddziaływanie tego związku oraz jego aktywnych i nieaktywnych analogów z mimetykami bakteryjnej błony komórkowej. Wyniki te zostały skorelowane ze strukturą przestrzenną związków oraz ich aktywnością przeciwbakteryjną. Uzyskane rezultaty nie dały jednoznacznej odpowiedzi na temat mechanizmu działania tych związków, co sugeruje, iż związek A-20 i jego analogi najprawdopodobniej wykazują inny mechanizm działania niż oddziaływanie z błoną komórkową bakterii [16].

Cystapep 1 wykazuje aktywność wobec bakterii koagulazo-pozytywnych Gram-dodatnich szczepów streptokoków (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*) oraz szczepów koagulazo-negatywnych (*Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprofiticus* i *Staphylococcus cohnii*). Dodatkowo jest on również aktywny wobec *Streptococcus pyogenes* (serogrupa A), *Streptococcus agalactiae* (serogrupa B), *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium* oraz *Enterococcus faecalis*. A-20 nie działa na bakterie Gram-ujemne takie jak *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Klebsiella pneumonia*. Posiada niewielkie działanie wobec *Escherichia coli* [17].

Dalsze badania związku A-20 wykazały jego brak cytotoksyczności wobec komórek skóry (tj. keratynocytów oraz fibroblastów) do stężenia 50 µg/ml, brak odczynu alergizującego oraz pro-zapalnego. Badania wykazały jego działanie immunomodulujące [17]. Oprócz aktywności przeciwbakteryjnej, związek A-20 wykazuje aktywność przeciwwirusową wobec wirusa opryszczki (*Herpes simplex* type 1). Jego działanie jest chronione patentem [18], [19].

Obecnie prowadzimy prace nad poznaniem celu molekularnego oraz mechanizmu działania A-20 i jego analogów z wykorzystaniem zaawansowanych technik spektrometrii mas, takich jak TPP (termiczne profilowanie proteomu) oraz FITEp (identyfikacja celu molekularnego za pomocą ekspresji proteomu). Dodatkowo, mając bazę już ponad 100 związków o znanej aktywności biologicznej wykorzystujemy techniki chemometryczne do analizy i poszukiwania elementów strukturalnych tych związków odpowiedzialnych za ich określone działanie.

3. CYSTATYNA C - BIAŁKO O POTENCJALE AMYLOIDOGENNYM

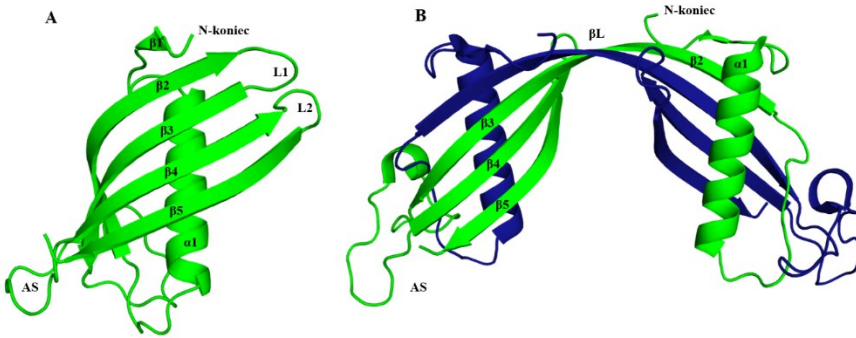
Białka, podstawowy składnik każdej komórki, spełniają kluczową rolę we wszelkich przejawach aktywności biologicznej organizmów żywych. Warunkiem ich prawidłowego funkcjonowania jest osiągnięcie przez nie określonej struktury przestrzennej, czyli prawidłowe sfałdowanie. Zdarza się jednak, że białka przyjmują konformacje inne od natywnej. Nastąpić to może już podczas ekspresji białka w komórce, często w wyniku pojawiania się spontanicznych mutacji punktowych, lub też na późniejszych etapach „życia” białka, jako następstwo przemian konformacyjnych, wymuszonych przez czynniki środowiskowe (napromieniowanie, zmiana pH lub tempe-

ratury, stres oksydacyjny, oddziaływanie z innymi cząsteczkami, etc.). Każda taka zmiana w strukturze przestrzennej białka może mieć konsekwencje biologiczne. Jedną z nich są tzw. choroby konformacyjne (proteopatie), do których zalicza się m.in. choroby Parkinsona, Alzheimerera, Huntingtona, prionozy i ponad 40 innych rodzajów amyloidoz [20]–[22].

Cystatyna C (hCC) jest jednym z białek organizmu ludzkiego, którego nieprawidłowe fałdowanie, będące następstwem mutacji punktowej (zamiana reszty leucyny w pozycji 68 na glutaminę) prowadzi do amyloidowej angiopatii mózgowej, powodującej śmierć w młodym wieku z powodu licznych krwotoków mózgowych [23]. Są one konsekwencją odkładania się w naczyniach krwionośnych mózgu złogów amyloidowych wspomnianego mutantu. Cystatyna C znajduje się również w złogach tworzonych przez inne amyloidogenne białka i peptydy, w tym peptyd β -amyloidowy [24]–[26].

Cystatyna C jest niewielkim, 120-aminokwasowym białkiem o strukturze trzeciorzędowej charakterystycznej dla wszystkich cystatyn z rodziny II (I25), w której wokół pojedynczej, centralnej α -helisy owinięta jest β -kartka zbudowana z pięciu β -nici (**Rysunek 5 A**). W warunkach fizjologicznych hCC występuje w płynach ustrojowych i tkankach człowieka gdzie pełni rolę efektywnego inhibitora proteaz cysteinowych z rodziny papain i legumain [27]–[29]. Epitop, rozpoznawany przez proteazy cysteinowe, tworzą reszty aminokwasowe znajdujące się w *N*-końcowej części białka oraz pętle L1 i L2 [30]. Cystatyna C wykazuje aktywność w szerokim zakresie i obejmuje m.in. udział w obronie organizmu ludzkiego przed zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi. Białko to bierze również udział w procesach nowotworowych, stanach zapalnych i resorpcji kości [31]. Przypisuje mu się również funkcję neuroprotekcijną [26], [32], [33]. Aktywna biologicznie cystatyna C jest monomerem, jednak w stanach patologicznych obserwuje się występowanie znacznych ilości zewnątrzkomórkowych dimerów białka [34]. Struktury te powstają w następstwie procesu określanego mianem trójwymiarowej wymiany domen (3D domain swapping), zaobserwowanego dla hCC podczas prób określenia struktury przestrzennej białka za pomocą metod rentgenografii strukturalnej [35]. W procesie dimeryzacji hCC istotną rolę odgrywa pętla L1, która łączy fragmenty białka ulegające wymianie: *N*-kończącą domenę zbudowaną z α -helisy oraz nici β 1 i β 2, z *C*-kończącym fragmentem o charakterze β -kartki [35]. Pętla L1 jest również jedynym fragmentem białka ulegającym znaczącym zmianom konformacyjnym podczas wymiany domen polegającym na przejściu od struktury typu „spinka do włosów” do długiej, prostej β -nitki (β L, **Rysunek 5B**). Zjawisko dimeryzacji przez wymianę domen nie jest jednak unikalne dla cystatyny C. Obserwuje się je także dla innych przedstawicieli inhibitorów proteaz cysteinowych z rodziny I25, stefiny A i B [36], [37], oraz szeregu białek o charakterze amyloidogennym [38], [39]. Dlatego też, proces wymiany domen rozważany jest jako jeden z mechanizmów prowadzących do tworzenia fibryli amyloidowych [40]. Zależność pomiędzy zdolnością do ulegania procesowi wymiany domen i fibrylizacją wykazano również w przypadku cystatyny C [41]. Jak się okazuje

proces oligomeryzacji hCC można modulować wprowadzając niewielkie zmiany w strukturze białka. Stabilizacja struktury cystatyny C w formie monomerycznej, przez wprowadzenie dodatkowych mostków disulfidowych, łączących ze sobą elementy struktury drugorzędowej białka ulegające wymianie, powoduje istotne zmniejszenie szybkości tworzenia wyższych form oligomerycznych (z fibrylami włącznie) nie tylko przez białko dzikiego typu, ale również jego amyloidogennego mutantu hCC L68Q [41].



Rysunek 5. Reprezentacje wstążkowe monomeru (A) i dimeru (B) cząsteczki cystatyny C. Model przygotowany na podstawie danych krystalograficznych dla mutantu hCC V57G (monomer, kod pdb 6ROA) i białka typu dzikiego (dimer, kod pdb 1G96) w programie PyMol

Figure 5. Ribbon presentations of monomer (A) and dimer (B) of cystatin C molecule. Models prepared based on crystallographic data for mutant hCC V57G (monomer, pdb code 6ROA) and wild type protein (dimer, pdb code 1G96) in PyMol [42]

W toku naszych badań wykazaliśmy, że wymiana labilnej konformacyjnie reszty waliny w pozycji 57 pętli L1 na resztę asparaginy, kwasu asparaginowego lub glicyny (hCC V57N, hCC V57D i hCC V57G) prowadzi do stabilizacji cząsteczki w formie monomerycznej [43]–[45]. Stabilizacja ta nie blokuje całkowicie fibrylizacji wariantu asparaginowego, jednak wariant glicynowy jest na tyle trwały, by możliwe było otrzymanie jego nie tylko struktury krystalograficznej, ale również wyznaczenie struktury w roztworze za pomocą techniki NMR [45]. Nasze prace obejmowały także wariant hCC w którym reszta waliny została zastąpiona resztą proliny. Zmiana ta przyczyniła się do powstania formy otwartej, białko hCC V57P wykazywało zwiększoną skłonność do ulegania procesowi dimeryzacji [46]

Inherentną cechą cystatyny C jest jej skłonność do samoasocjacji i tworzenia wyższych form oligomerycznych z fibrylami włącznie [47], [48]. W kryształach zaś tendencja cystatyny C do samoasocjacji przejawia się w sposobie upakowania molekuł. Zarówno dla białka dzikiego typu, jak i dla dimerycznego wariantu (hCC V57P), obserwuje się tendencję do tworzenia oktaedrycznych asocjatów zbudowanych z czterech wymienionych domenowo dimerów, oddziałujących za pośrednictwem wiązań wodorowych [46], [47].

W strukturze cystatyny C występuje jeszcze jeden element odgrywający bardzo istotną rolę w procesie amyloidogenezy. Cząsteczka hCC posiada hydrofobowe jądro, tworzone na powierzchni styku amfipatycznej helisy i β -kartki, stabilizowane przez sieć oddziaływań hydrofobowych [35]. Naruszenie jego integralności przez wprowadzenie sterycznie rozbudowanej, polarnej reszty glutaminy w pozycji Leu68, nadaje białku właściwości wysoce amyloidogenne [49]. Jak się jednak okazuje to nie oddziaływania steryczne są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za obniżoną stabilność konformacyjną amyloidogenego wariantu cystatyny C – hCC L68Q. Przeprowadzone przez nas badania obejmujące zastąpienie krytycznej reszty leucyny (L68) za pomocą mniejszej sterycznie, hydrofobowej reszty waliny wykazały, że na destabilizację wariantu L68Q wpływają głównie zaburzenia elektrostatyczne, wynikające z obecności polarnej reszty glutaminy. Otrzymany wariant walinowy jądra hydrofobowego hCC L68V okazał się być rozpuszczalny w warunkach nadekspresji w systemie bakteryjnym, a jego izolacja i oczyszczanie prowadziło do otrzymania białka monomerycznego [50], [51], podobnie jak w przypadku dwóch stabilnych wariantów wykazujących mutacje w pętli L1 (hCC V57N, hCC V57G). W badaniach *in vitro* wariant hCC L68V wykazywał jednak podwyższoną tendencję do dimeryzacji w porównaniu z białkiem dzikiego typu, co wynika najprawdopodobniej z osłabienia sieci oddziaływań hydrofobowych w jądrze cząsteczki, w wyniku wprowadzenia mniejszej sterycznie reszty. W warunkach krystalizacji wariant ten zachowuje się jak białko dzikiego typu tworząc wymienione domenowo dimery [51].

Oprócz czynników wewnątrzcząsteczkowych proces asocjacji białka sterowany może być również za pomocą czynników środowiskowych, jak obecność niektórych molekuł czy jonów metali [52], [53]. Tym ostatnim poświęca się w ostatnich czasach sporo uwagi ze względu na ich postulowane powiązania z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych [54], [55]. Cystatyna C nie jest białkiem bezpośrednio rozpatrywanym jako ligand dla jonów metali, zwłaszcza przejściowych jak miedź(II), jednak w toku naszych badań wykazaliśmy istnienie w jej sekwencji miejsca, mogącego z tymi jonami oddziaływać [56], [57]. Zlokalizowane jest ono w labilnym konformacyjnie, C-końcowym fragmencie cząsteczki obejmującym tzw. appending structure (AS, **Rysunek 5**). 10-Aminokwasowy peptyd zaprojektowany na bazie sekwencji AS cystatyny C, obejmujący potencjalne miejsce wiązania jonów miedzi(II), wykazuje zdolność do tworzenia szeregu mono- i binuklearnych kompleksów z tymi jonami. Wykazaliśmy również, że z dwóch reszt histydyny obecnych w tym fragmencie jedna (His86 w notacji sekwencji białkowej) wykazuje wyższe powinowactwo do jonów metalu.

Nasze badania nad oddziaływaniami całego białka z jonami miedzi pokazały, że wpływają one na stabilność hCC w formie monomerycznej, ułatwiając proces dimeryzacji, nie modyfikują natomiast znacząco jego zdolności do fibrylizacji (Żygowska i wsp. manuskrypt przesłany do recenzji), jak to zaobserwowano w przypadku bliskiego analogu cystatyny C stefiny B [58], [59]. Badania za pomocą technik rentgeno-

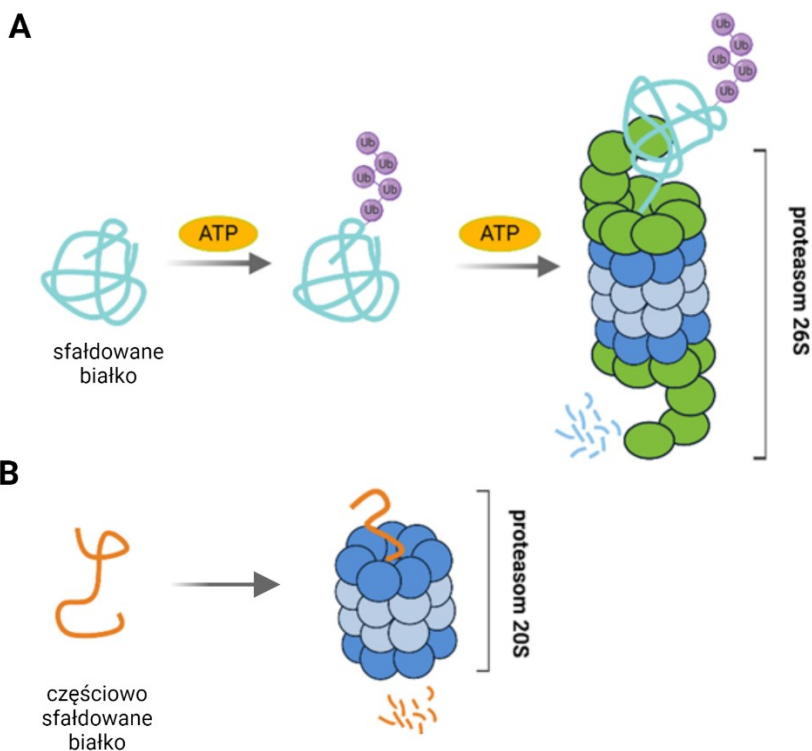
graficznych i NMR potwierdziły wiązanie jonów Cu(II) w zaproponowanym rejonie pętli AS, jednak poznanie genezy wpływu jonów metalu oraz znaczenia tych oddziaływań w kontekście fizjologicznym wymaga pogłębionych badań, które są obecnie prowadzone.

Innym czynnikiem wykazującym wysoki potencjał do modulowania procesu oligomeryzacji białek amyloidogennych jest obecność błon biologicznych, w tym błony komórkowej [60]. Badania wskazują, że błony biologiczne mogą stanowić powierzchnię promującą patologiczne procesy oligomeryzacji białek amyloidogennych i tworzenia fibryli amyloidowych. Ponadto, w trakcie oddziaływania z błonami, białka mogą potencjalnie tworzyć toksyczne oligomery przejściowe o kształcie obwarzanków (ang. *annular oligomers*), których destrukcyjny mechanizm działania jest podobny do tego obserwowanego w wypadku toksyn tworzących kanały transbłonowe.

W wyniku prowadzonych przez nas badań ustaliliśmy, że cystatyna C oddziałuje z różnymi fosfolipidowymi składnikami błony komórkowej, takimi jak DMPC, POPC, POPG, DOPE itp. Jednak w wypadku żadnego z nich nie udało się zaobserwować wpływu obecności lipidów na oligomeryzację białka. Co ciekawe, zastosowanie micelnarnego mimetyku błony komórkowej zbudowanego z DPC i SDS pozwoliło wykazać, że proces monomeryzacji dimerycznych form hCC oraz stabilizacji białka w postaci monomeru jest wprost proporcjonalny do stężenia miceli [61], [62].

4. AKTYWACJA PROTEASOMU JAKO STRATEGIA W POWSTRZYMYWANIU ROZWOJU PROCESÓW STARZENIOWYCH I NEURODEGENERACYJNYCH

W Katedrze Chemii Biomedycznej od 2008 roku zajmujemy się tematyką związaną z modulacją aktywności ludzkiego proteasomu. Proteasomy to ogromne kompleksy enzymatyczne odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy białkowej (**Rysunek 6**). W warunkach fizjologicznych występują głównie dwa rodzaje proteasomów: 20S i 26S. Ludzki proteasom 26S (h26S) to ATP-zależny kompleks enzymatyczny powstający w wyniku przyłączenia jednej lub dwóch cząsteczek regulatora 19S do rdzenia katalitycznego 20S. Jest on zdolny do rozpoznawania znakowanych ubikwityną substratów białkowych, ich rozfałdowywania i degradacji, a także odpowiada za proteolizę większości białek komórkowych, przede wszystkim krótko żyjących białek sterujących procesami zachodzącymi w komórkach. Z kolei proteasom 20S degraduje białka uszkodzone, na przykład w wyniku stresu oksydacyjnego, nie potrzebując do tego ATP, ubikwityny ani regulatora 19S. Spowodowane przez utlenienie rozfałdowanie białek powoduje bowiem wyeksponowanie rejonów hydrofobowych, rozpoznawane przez sam rdzeń katalityczny jako sygnał do degradacji białka [63], [64].



Rysunek 6. Schemat przedstawiający dwie możliwe ścieżki degradacji białek przez system proteasomalny. (A) Białka oznakowane przez ubikwitynę są trawione przez proteasom 26S przy udziale energii pochodzącej z hydrolizy ATP. (B) Częściowo lub całkowicie rozfałdowane białka mogą być bezpośrednio degradowane przez proteasom 20S lub 20S związany z regulatorami

Figure 6. Schematic diagram of two possible pathways of proteins degradation by the proteasomal system. (A) Ubiquitin tagged proteins are digested by the 26S proteasome using energy from ATP hydrolysis. (B) Partially or fully unfolded proteins can be directly degraded by the 20S or 20S proteasome associated with regulators

Upośledzenie funkcjonowania szlaku proteolitycznego realizowanego przez proteasom skutkuje rozwojem procesów starzeniowych, objawiających się m.in. gromadzeniem uszkodzonych białek w komórkach, czego konsekwencją jest np. powstawanie zaćmy w soczewce oka, zmniejszona tolerancja mięśnia sercowego na niedokrwienie/reperfuzję, czy też powstawanie zmian barwnikowych w skórze na skutek odkładania się złogów lipofuscyny [65]. Jeszcze poważniejszą konsekwencją zbyt mało aktywnego proteasomu jest wzrost ilości niepotrzebnych i uszkodzonych białek, a następnie powstawanie z nich toksycznych form oligomerycznych [66]. Gromadzenie się tych form w komórkach nerwowych zaburza ich funkcjonowanie, prowadząc do obumierania neuronów i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienie boczne zanikowe [65], [67].

Związane z agregacją białek tzw. choroby konformacyjne stanowią poważny i rosnący problem społeczny. Szybko starzejące się społeczeństwa, siedzący tryb życia, a także zmieniający się sposób odżywiania, stanowią przyczyny, z powodu których coraz więcej ludzi zapada na choroby metaboliczne, a także zaburzenia neurologiczne i poznawcze, charakteryzujące się postępującym uszkodzeniem komórek nerwowych i demencją. Odkładające się u tych osób uszkodzone białka w młodych, zdrowych organizmach byłyby skutecznie usuwane przez systemy proteolityczne, głównie przez proteasom 20S. Niestety, efektywność proteolizy wraz z wiekiem słabnie. Prowadzone w ostatnich latach badania wyraźnie pokazują, że aktywacja proteasomu, czy to na poziomie ekspresji genów, czy przy użyciu naturalnych lub syntetycznych związków, może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną, zapewniającą opóźnienie wystąpienia związanych z wiekiem chorób neurodegeneracyjnych [68].

Badania prowadzone w naszym zespole koncentrują się na możliwości przywrócenia efektywnego funkcjonowania ludzkiego proteasomu 20S (h20S) za pomocą syntetycznych, niskocząsteczkowych aktywatorów. Jednak mechanizm aktywacji proteasomu 20S nie jest dokładnie wyjaśniony, co utrudnia projektowanie potencjalnych terapeutyków. Struktur wiodących do ich projektowania można poszukiwać opierając się na kompleksach proteasomu z jego naturalnymi, białkowymi aktywatorami. Liczne badania wykazują, że krótkie peptydy wywodzące się z regulatorów 19S i PA200, zawierające ich C-końcowy motyw HbYX (reszta hydrofobowa - tyrozyna - dowolna reszta aminokwasowa) są w stanie stymulować proteasom 20S [69]–[72]. Wyniki naszych badań również to potwierdzają - odkryliśmy nową grupę bardzo skutecznych aktywatorów proteasomu, których sekwencje wywodzą się z C-końcowego fragmentu drożdżowego ortologu regulatora PA200, białka BIm10 (publikacja w przygotowaniu). Odkryliśmy także, że wprowadzenie motywu HbYX do niekompetycyjnego inhibitora PR11 powoduje, że aktywuje on h20S [73]. Zdolność stymulowania proteasomu 20S przez otrzymane przez nas peptydy wykazaliśmy zarówno w testach aktywności ze standardowymi substratami fluorogennymi, jak i z modelowymi białkami (α -synukleina, Tau441, enolaza).

Nasze aktywatory w swej obecnej postaci nie są, niestety, w stanie wnikać do komórek, a także charakteryzują się niską stabilnością proteolityczną. W prowadzonych przez nas obecnie badaniach projektujemy peptydomimetyki, które mają być pozbawione dwóch głównych wad ograniczających terapeutyczne zastosowanie peptydowych aktywatorów typu BIm: krótkiego okresu półtrwania w osoczu i braku przenikalności przez błony komórkowe. Aktywatory modyfikujemy za pomocą nienaturalnych aminokwasów, a także wprowadzając do sekwencji mimetyki wiązania peptydowego.

Równolegle prowadzimy badania, których celem jest zweryfikowanie, czy możliwe jest zapobieganie gromadzeniu się oligomerycznych form polipeptydowych biocząsteczek. Wyniki ostatnich badań wskazują, że to nie fibryle amyloidowe, ale poprzedzające je w procesie agregacji rozpuszczalne oligomery stanowią formy najbardziej toksyczne dla komórek [74], [75]. Gdyby wewnątrzkomórkowe systemy

proteolityczne działały prawidłowo, te niewielkie oligomery mogłyby być trawione i usuwane z komórek. Niestety jednak, wraz ze starzeniem się organizmu wydajność proteolizy słabnie. Ponadto, same oligomery są w stanie hamować aktywność odpowiedzialnego za degradację nieprawidłowych białek proteasomu 20S. Fakt ten został potwierdzony dla kilku peptydów/białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi: peptydu β -amyloidowego związanego z chorobą Alzheimera, α -synukleiny, której agregacja jest powiązana z chorobą Parkinsona i zmutowanej formy huntingtyny, tworzącej złoży u chorych cierpiących na chorobę Huntingtona [76]. W ramach prowadzonych przez nas badań chcemy sprawdzić czy hamowanie aktywności proteasomu 20S przez rozpuszczalne oligomery ma miejsce tylko w przypadku polipeptydów zaangażowanych w rozwój chorób neurodegeneracyjnych, czy też jest właściwością ogólną agregujących białek. Badania prowadzimy z wykorzystaniem ludzkiej amyliny, której agregacja jest powiązana z rozwojem cukrzycy typu drugiego. Zajmujemy się również sprawdzaniem, czy zawierające motyw HbYX peptydowe aktywatory proteasomu są w stanie przeciwdziałać hamowaniu aktywności enzymu przez oligomery, a być może nawet ułatwiać i intensyfikować ich degradację.

Kolejnym kierunkiem naszych badań jest zgłębianie wiedzy na temat mechanizmu allosterycznej modulacji aktywności proteasomu. Jest to temat zyskujący coraz większe zainteresowanie wśród naukowców, niemniej jednak bardzo słabo zbadany. W celu określenia miejsca wiązania peptydowych, allosterycznych modulatorów badamy struktury proteasomu 20S. Określiliśmy dotąd struktury krystaliczne dwóch kompleksów drożdżowego proteasomu 20S z cząsteczkami zdolnymi do pobudzania aktywności enzymu (kod PDB: 4X6Z, 5NIF). Dzięki temu określiliśmy wstępnie preferencje strukturalne proteasomu względem małych cząsteczkowych aktywatorów [77]. W ostatnim czasie współpraca z dr Ashwinem Chari i dr Fabianem Hannebergiem z MaxPlanck Institute w Getyndze doprowadziła do otrzymania kompleksów aktywatorów z ludzkim proteasomem 20S oraz ludzkim immunoproteasomem (publikacja w przygotowaniu). Prowadzone przez nas udokładnianie otrzymanych struktur pozwoli bardziej precyzyjnie określić preferencje konformacyjne względem aktywatorów i ułatwi ich projektowanie. Poszerzy też wiedzę na temat mechanizmu działania małych cząsteczkowych modulatorów. Dodatkowo, miejsce wiązania aktywatorów badamy także za pomocą trawienia enzymatycznego połączonego ze spektrometrią mas, uprzednio wprowadzając do sekwencji peptydów reszty sieciujące. Sieciowanie chemiczne planujemy także wykorzystać do określenia miejsca wiązania oligomerów β -amyloidu i amyliny do proteasomu 20S.

Medycyna nie zna obecnie żadnej skutecznej metody terapii chorób konformacyjnych, wpływających nie tylko na centralny układ nerwowy, ale też na inne tkanki i narządy w organizmie. Proponowane przez nas podejście zapobiegania chorobom związanym z agregacją białek jest nowatorskie, ponieważ nie koncentruje się na samych agregujących cząsteczkach. Otrzymane wyniki mogą pozwolić na otrzymanie w przy-

szości terapeutyków zdolnych do przeciwdziałania upośledzeniu aktywności proteasomu przez toksyczne dla komórek formy oligomeryczne białek, a także do intensyfikowania usuwania różnego typu oligomerów z komórek, co może zaowocować odtworzeniem homeostazy u osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne i metaboliczne.

5. FIBRYLE i HYDROŻELE PEPTYDOWE

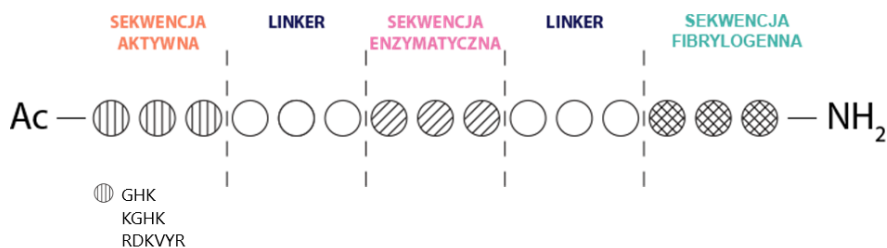
Niektóre peptydy i białka potrafią w spontaniczny sposób połączyć się w uporządkowane drugo- i trzeciorzędowe struktury. Takie peptydy nazywane są peptydami samoorganizującymi się (SAP, ang. self-assembling peptides). Za tworzenie struktury odpowiedzialne są wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz siły van der Waalsa. Ze względu na zdolność peptydów do samoorganizacji, związki te znajdują coraz szersze zastosowania jako biomateriały peptydowe [78].

Medycyna regeneracyjna oraz inżynieria tkankowa stanowią sektor medycyny zajmujący się poszukiwaniem sposobów zastępowania i/lub naprawiania uszkodzonych tkanek. Trzy komponenty stanowiące triadę inżynierii tkankowej to połączone ze sobą komórki (np. macierzyste), rusztowania oraz czynniki sygnalizacyjne (substancje aktywne). Biomateriały peptydowe stosowane jako rusztowanie, czyli jeden z filarów triady inżynierii tkankowej, powinny zapewnić komórkom odpowiednie środowisko do proliferacji, migracji czy różnicowania. Idealne rusztowania biomimetyczne muszą posiadać szereg cech: doskonałą biokompatybilność, niską immunogenność, odpowiednią porowatość, przepuszczalność i elastyczność mechaniczną oraz muszą być łatwo syntetyzowane. Cechy te wykazują SAP, które samoorganizują się w nanowłókna o średnicy około 10 do 20 nm, które układają się w sieć [79]. Tak utworzona struktura sieci ma rozmiary włókien i wielkości porów zbliżone do naturalnej macierzy pozakomórkowej. Stąd peptydy takie znalazły zastosowanie jako rusztowania do hodowli komórkowej.

Biomateriały peptydowe mogą być stosowane jako magazyny do przechowywania leków i uwalniania ich przez długi czas np. białek, które mogą być uwalniane przez okres dni, tygodni lub miesięcy bez utraty ich aktywności biologicznej. Biologicznie aktywne substancje mogą być również kowalencyjnie związane z łańcuchami peptydowymi, pod warunkiem że nie zaburzają one samoorganizacji łańcuchów peptydowych.

Z uwagi na fakt, że Katedra Chemii Biomedycznej posiada wieloletnie doświadczenie w pracy z peptydami ulegającymi fibrylizacji, zostały one wykorzystane jako nośniki substancji aktywnej. Do tego celu został wybrany przegrupowany fragment motywu zamka sterycznego ludzkiej cystatyny C o sekwencji QAGIVV. Rusztowania fibrylowe zostały zaprojektowane w taki sposób, aby uzyskać produkt multifunkcyjny, który po aplikacji na ranę utworzy środowisko dla optymalnego wzrostu komórek, a jednocześnie będzie stanowić rezerwuuar substancji o działaniu biologicznym, która zostanie uwolniona z fibryli pod wpływem aktywności elastazy neutrofilowej obecnej w ranie [80].

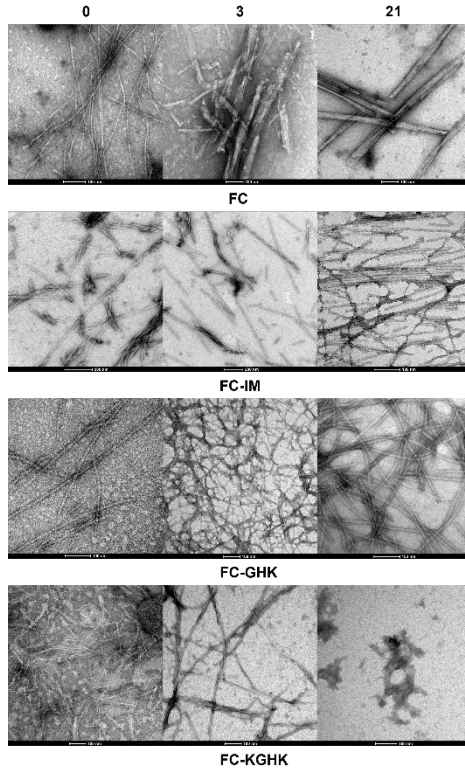
Sekwencja aminokwasowa zaprojektowanych przez nas rusztowań fibrylowych jest połączeniem 4 różnych sekwencji o zdefiniowanym działaniu. Pierwszy fragment, FC (QAGIVV), posiada potwierdzone właściwości agregacyjne. Fragment ten został połączony łącznikiem glicynowym (GGG) z fragmentem wrażliwym na działanie elastazy neutrofilowej (AAPV). Wprowadzenie łącznika glicynowego miało na celu odsunięcie sekwencji aktywnej od celowanego miejsca degradacji oraz ułatwienie enzymowi dostępu do sekwencji specyficznej AAPV. Czwarty fragment stanowi sekwencja o potencjalnym działaniu pro-regeneracyjnym (**Rysunek 7**). Spośród peptydów aktywnych wybraliśmy sekwencje GHK, KGHK oraz RDKVYR. Pierwsze dwa są znanymi peptydami pro-regeneracyjnymi, stymulującymi angiogenezę, wspomagającymi proces gojenia się ran oraz remodeling skóry poprzez zmniejszanie poziomu cytokin TNF- α , regenerację nerwów oraz stymulację proliferacji fibroblastów [81], [82]. Peptyd RDKVYR ma właściwości immunostymulujące odpowiedź humoralną i komórkową oraz wspomagającym migrację keratynocytów oraz jest zaangażowany w indukcję transkrypcyjną genu *POUF5F1* kodującego czynnik pluripotencji OCT4 oraz geny *TET1* i *TET3* uczestniczące w demetylacji DNA [83], [84].



Rysunek 7. Schemat zaprojektowanych hybrid fibrylowych [80]

Figure 7. Scheme of the peptide scaffold construct [80]

Uzyskane przez nas wyniki badań agregacyjnych z zastosowaniem tioflawiny T potwierdziły tworzenie się kompleksu z barwnikiem w inkubowanych roztworach. Zdjęcia mikroskopowe wykonane przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej, jak i mikroskopii sił atomowych, jednoznacznie potwierdziły obecność fibryli peptydowych o różnej długości i grubości. Analiza zdjęć mikroskopowych wykazała, że fibryle tworzą się bezpośrednio po rozpuszczeniu, tworząc coraz bardziej złożone formy aż do dnia 21, jak przedstawiono na zdjęciach TEM (**Rysunek 8**) [80].



Rysunek 8. Zdjęcia TEM otrzymanych fibryli peptydowych w 0,3,21 dniu inkubacji
 Figure 8. Transmission electron micrographs for fibril peptides obtained in 0, 3 and 21st day of incubation

Hybrydowa budowa peptydu w swoich założeniach zakładała uwalnianie fragmentu o sekwencji aktywnej pod wpływem działania enzymu. Analiza widm masowych po inkubacji peptydów z elastazą neutrofilową wykazała, że dla każdego ze związków nastąpiła hydroliza w zaplanowanym miejscu cięcia enzymatycznego.

Analiza wyników badań przeprowadzonych na liniach komórkowych dostarczyła informacji na temat cytotoksyczności oraz potencjału proregeneracyjnego peptydów. Badania te jednoznacznie potwierdziły, że badane związki nie są toksyczne wobec komórek skórných tj. fibroblastów 46BR.1N oraz keratynocytów HaCaT w całym badanym zakresie stężeń tj. 0,01-25 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie peptydy wykazały zwiększony efekt pro-proliferacyjny w porównaniu do peptydu bazowego FC. Efekt ten utrzymywał się na poziomie od 20 do 60%.

Obecnie prowadzimy prace badawcze nad drugim rodzajem nośnika peptydowego jakim są hydrożele peptydowe na bazie sekwencji RADA16-I. Peptyd RADA16-I ma wysoką skłonność do samodzielnego składania się w celu utworzenia bardzo stabilnych struktur β -katek, co prowadzi do szeregu zorganizowanych struktur. Na przykład w kwaśnych warunkach pH obserwuje się nanofibryle, natomiast rusztowanie uzys-

kuje się poprzez zwiększenie pH lub dodanie soli. Hydrożele RADA16-I są idealnymi materiałami do tworzenia trójwymiarowych rusztowań do hodowli komórkowej w inżynierii tkankowej. Prace badawcze z wykorzystaniem peptydu RADA16-I wykazały, że regeneruje on skórę, tkankę nerwową oraz zatrzymuje mikrokrwotoki [85]–[87].

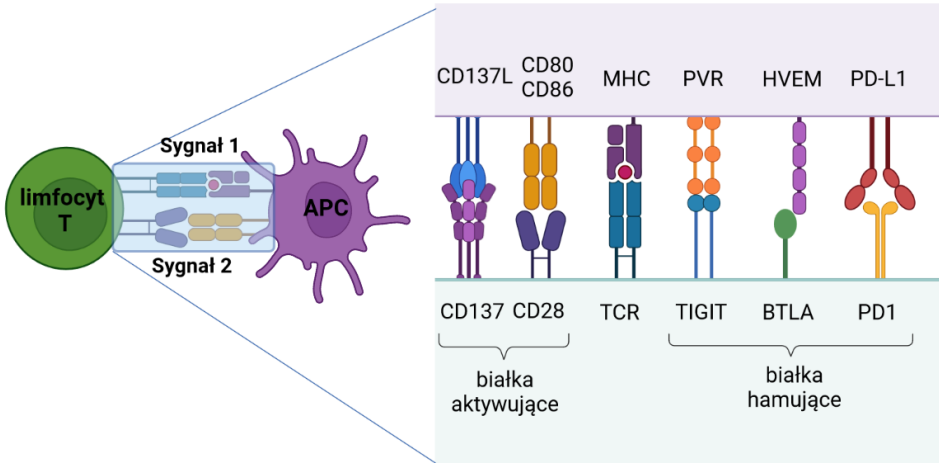
Nasze badania konstruktów hydrożelowych potwierdziły ich zdolność do tworzenia struktury β -kartki, a obrazowanie mikroskopowe uwidocznilo ich strukturę 3D [publikacja wysłana] [88]. Efekt pro-proliferacyjny wobec fibroblastów i keratynocytów utrzymywał się na wysokim poziomie. Wyniki badań *in vivo* pokazały, że w przypadku dwóch hydrożeli tj. RADA-GHK oraz RADA-KGHK następuje szybsze zamknięcie rany w porównaniu do kontroli. Analiza preparatów histologicznych pobranych ze skóry grzbietu myszy wykazała, że odbudowana skóra była zdecydowanie grubsza niż w przypadku zastosowania samego peptydu RADA16-I oraz posiadała prawidłową strukturę [publikacja wysłana] [88].

6. PEPTYDOWE INHIBITORY PUNKTÓW KONTROLNYCH UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Nowotwory stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonów na świecie i odpowiadają za śmierć około 10 milionów chorych rocznie. Szacuje się, że do 2040 roku zarówno liczba zgonów, jak i nowo diagnozowanych przypadków podwoi się [89]. Istnieje wiele strategii walki z chorobami nowotworowymi, do których zaliczyć można chirurgię, radioterapię czy chemioterapię, nie są one jednak skuteczne w leczeniu wszystkich typów raka. Odkrycie roli, jaką odgrywa układ immunologiczny w chorobach nowotworowych zapoczątkowało nową metodę leczenia, określaną jako immunoterapia. Jedną z jej strategii jest aktywacja układu odpornościowego poprzez blokowanie oddziaływania białek określanych jako punkty kontrolne układu immunologicznego. Tego typu podejście zaowocowało w 2018 roku przyznaniem Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny dla James'a P. Allison'a z USA i Tasuku Honjo z Japonii, za odkrycie terapii przeciwnowotworowej polegającej na hamowaniu negatywnej regulacji immunologicznej.

Punkty kontrolne układu immunologicznego są to pary receptor/ligand znajdujące się na powierzchni komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty T i komórki prezentujące antygen (APC; ang. antigen presenting cell). Odgrywają one kluczową rolę w aktywacji limfocytów T, do której potrzebne są dwa sygnały. Pierwszym z nich jest prezentacja antygeny limfocytom T przez główny układ zgodności tkankowej (MHC; ang. major histocompatibility complex) i jego związanie z receptorem komórek T (TCR; ang. T-cell receptor). Drugi sygnał powstaje po utworzeniu odpowiedniego kompleksu receptor/ligand (**Rysunek 9**) [90]. Pojęcie punktów kontrolnych nie odnosi się tylko do białek, które przekazują sygnał aktywujący limfocyty T. Istnieją pary receptor/ligand, które w wyniku związania się prowadzą do ich dezaktywacji [91]. Komórki nowotworowe wykorzystały sygnał hamujący limfocyty T do wypracowania mechani-

zmów pozwalających im uniknąć nadzoru układu immunologicznego. Zablokowanie punktów kontrolnych, które negatywnie regulują działanie układu odpornościowego, prowadzi do zaburzenia tolerancji wobec nowotworu i pobudzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej.



Rysunek 9. Punkty kontrolne - przykłady białek stymulujących oraz hamujących aktywację limfocytów T
Figure 9. Immune checkpoints – examples of immune system stimulatory and inhibitory complexes of T cells

W Katedrze Chemii Biomedycznej od 2012 roku zajmujemy się poszukiwaniem peptydowych inhibitorów punktów kontrolnych. Nasze badania skupiają się na kompleksach hamujących aktywację limfocytów T, takich jak CD160/HVEM, BTLA/HVEM, TNF/TNFR2, PD-1/PD-L1 oraz TIGIT/PVR. Peptydy projektujemy w oparciu o struktury krystaliczne kompleksów receptor/ligand. Otrzymane związki badamy pod kątem ich wiązania się z celem molekularnym oraz ich wpływu na formowanie się kompleksu receptor/ligand.

Nasze badania nad punktami kontrolnymi rozpoczęliśmy od kompleksu BTLA/HVEM. Receptor inhibitor limfocytów T i B (BTLA) znajduje się na powierzchni limfocytów T i oddziałuje z ligandem białkiem wejścia wirusa opryszczki (HVEM) obecnym na powierzchni komórek nowotworowych. Tworzenie kompleksu BTLA/HVEM powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów T oraz produkcji przez nie cytokin. Projektowanie inhibitorów białka BTLA oparliśmy na strukturze krystalicznej kompleksu BTLA/HVEM (PDB: 2AW2). Zsyntetyzowaliśmy szereg peptydów, fragmentów białka HVEM, i przebadaliśmy je pod kątem wiązania z białkiem BTLA oraz ich zdolności do blokowania tworzenia kompleksu receptor-ligand. Uzyskane wyniki wskazują, że peptyd HVEM(14-39) oddziałuje 2,5 razy silniej z białkiem BTLA niż HVEM oraz hamuje tworzenie kompleksu w testach wykonanych na liniach

komórkowych. W swojej sekwencji peptyd HVEM(14-39) posiada cztery cysteiny tworzące dwa mostki disulfidowe, które pozwoliły nam na uzyskanie peptydu o strukturze podobnej do tej jaką ten fragment peptydu posiada w białku HVEM [92], [93]. Do projektowania inhibitorów kompleksu BTLA/HVEM wykorzystaliśmy również sekwencje aminokwasową wirusowego białka – glikoproteiny D (gD), które wiąże się z HVEM w tym samym miejscu co białko BTLA. Struktura krystaliczna kompleksu HVEM/gD (PDB: 1JMA) posłużyła nam do zaprojektowania szeregu peptydów, fragmentów gD, do których wprowadzone zostały dodatkowo wiązania disulfidowe stabilizujące strukturę. Najlepsze właściwości hamujące wykazywały dwa peptydy: gD(1-36)(K10C-T29C) oraz gD(1-36)(K10C-D30C) [94], [95]. Otrzymane przez nas związki są obecnie badane na komórkach pacjentów chorujących na czerniaka, we współpracy z Gdańskim Uniwersytem Medycznym. Podobne podejście stosujemy przy projektowaniu inhibitorów kompleksów PD-1/PD-L1, CD160/HVEM, TIGIT/PVR czy TNF/TNFR, a prowadzone do tej pory prace pozwoliły na otrzymanie kilku obiecujących związków.

Równoległe prowadzimy badania nad uzyskaniem struktur krystalicznych wspomnianych wyżej białek oraz ich kompleksów z zaprojektowanymi w Katedrze Chemii Biomedycznej inhibitorami peptydowymi. Nasze badania w tym zakresie polegają na opracowaniu i optymalizacji warunków ekspresji i oczyszczania wybranych białek, tak by uzyskiwane ilości pozwalały na przetestowanie kilkuset warunków krystalizacji. Podejmujemy równoległe próby uzyskania białek w kilku systemach ekspresyjnych: bakteryjnym [96], drożdżowym i ssaczym. Dla uzyskanych białek sprawdzamy aktywność biologiczną badając zdolność wiązania się do biologicznego partnera oraz zdolność wiązania peptydowego inhibitora.

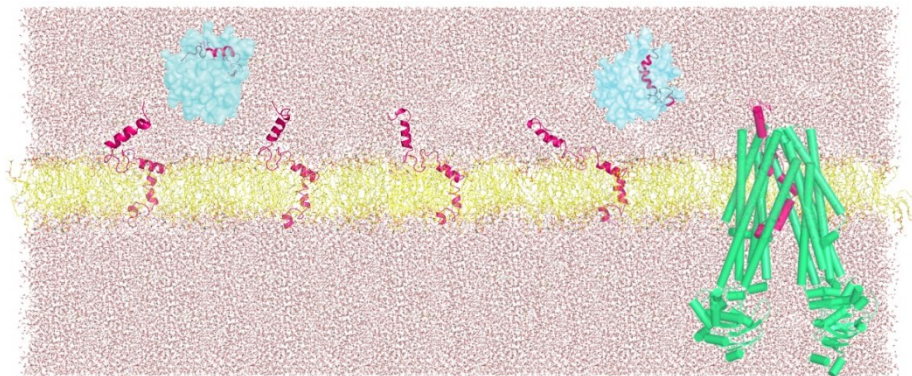
7. BADANIA KONFORMACYJNE HOMOLOGÓW GLIKOPROTEINY N HERPESWIRUSÓW

Herpeswirusy są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych patogenów zakażających człowieka oraz wywołujących liczne choroby u zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Często są to choroby o charakterze epidemicznym, stanowiące poważny problem ekonomiczny. Najlepszym sposobem aby zapobiec rozprzestrzenianiu się herpeswirusów są profilaktycznie szczepionki [97]. Jednak ze względu na rozwijającą się oporność herpeswirusów na obecnie stosowane leki, innym rozwiązaniem jest opracowanie nowych terapeutyków przeciwwirusowych. Obecnie dostępne leki to głównie analogi nukleotydów (acyklowir, gancyklowir, idoxurydyna, walacyklowir) [98], [99]. Opracowanie nowych leków jest możliwe dzięki dokładnemu poznaniu molekularnych mechanizmów działania herpeswirusów, które w toku ewolucji wykształciły różnorodne mechanizmy hamowania lub unikania wrodzonej oraz nabytej odpowiedzi immunologicznej zaatakowanego organizmu [100].

Do najbardziej charakterystycznych cech herpeswirusów wpływających na przebieg choroby należą zdolność do przebywania w organizmie gospodarza w stanie utajonym,

tw. latencji oraz zdolność do modulacji odpowiedzi immunologicznej. Odporność komórkowa, w której pośredniczą limfocyty T CD8+, jest podstawowym mechanizmem obronnym przed wieloma infekcjami wirusowymi. Odporność ta zależy od skutecznego rozpoznawania peptydów wirusowych prezentowanych przez cząsteczki MHC klasy I na powierzchni komórki. Herpeswirusy znalazły różne strategie zakłócania przetwarzania i prezentacji antygeny przez cząsteczki MHC I, których efektem jest obniżenie ekspresji cząsteczek MHC I na powierzchni komórki. Jednym z mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej jest inhibicja transportera związanego z przetwarzaniem antygeny TAP [101]. Fizjologiczną rolą TAP jest transport peptydów antygenowych z cytoplazmy do retikulum endoplazmatycznego w celu związania ich z białkami MHC I. Ligandami białka TAP są wirusowe glikoproteiny N (gN, UL49.5). Białka UL49.5 pochodzące z wirusów rodzaju Varicellovirus, w tym BoHV-1, PRV, EHV-1 i EHV4, EBV oraz HCMV zostały zidentyfikowane jako nowa klasa inhibitorów białka TAP. U wirusów tych białko UL49.5 dokonuje modulacji mechanizmu odpornościowego głównego układu zgodności tkankowej (MHC I) poprzez zahamowanie transportu peptydów patogenu, będąc w kompleksie transportera peptydów antygenowych (TAP) [100], [102]. W konsekwencji odpowiedź immunologiczna zaatakowanego organizmu zostaje upośledzona. Skutkiem tego jest rozprzestrzenianie się wirusa w sposób niekontrolowany w organizmie gospodarza.

Herpeswirusy HSV-1, EBV, HCMV oraz CPXV012 posiadają również gen *UL49.5*, jednak białko, będące produktem tego genu, nie wpływa na transport wirusowych peptydów z udziałem kompleksu TAP [101]. W większości przypadków przestrzenne struktury eksperymentalne białek UL49.5 nie są znane. Jednak zbadanie struktury białka UL49.5 jest niezbędne do określenia mechanizmu jego działania, a w przyszłości może przyczynić się do projektowania nowych leków przeciwwirusowych. W ramach kilkuletnich badań udało się określić strukturę przestrzenną białka UL49.5 pochodzącego z wirusa BoHV-1 oraz jego analogów. Białko UL49.5 (BoHV-1) to małe białko błonowe typu I (96 reszt aminokwasowych, 9 kDa w BoHV-1), którego struktura przestrzenna tworzona jest przez trzy regiony α -helikalne. Pierwsza α -helisa 1 (D2-G20) jest zlokalizowana w domenie światła ER, natomiast kolejne dwa fragmenty znajdują się w domenie transmembranowej (helisa 2: V40-M46 i helisa 3: V49-F58). Ciągłość helisy domeny transbłonowej jest przerwana przez zwrot β w regionie M46-V49. Helisy 2 i 3 domeny transbłonowej są ułożone pod kątem około 110° i razem ze strukturą skreću tworzą motyw helisa-zgięcie-helisa (**Rysunek 10**) [103]. Struktura przestrzenna białka UL49.5 wirusa BoHV-1 posiada charakterystyczne dwa zwroty β w domenie luminalnej ER, w regionach V26-P27-L28-S29 i E30-P31-P32-Q33. Oba zwroty β angażują reszty Pro31 i 32, które mogą być ważne dla specyficznego fałdowania UL49.5 i interakcji między UL49.5 i TAP, a w konsekwencji hamowania transportu peptydów [103]. Co ciekawe, Pro27 i Pro30/Pro32 są konserwatywne wśród homologów UL49.5 hamujących TAP [104].



Rysunek 10. Struktura przestrzenna fragmentów białka UL49.5 wirusa BoHV-1 w środowisku miceli DPC (kolor błękitny) oraz struktura białka UL49.5 (kolor czerwony) umieszczona w dwuwarstwie lipidowej POPC (kolor żółty) oraz w kompleksie z białkiem TAP (kolor zielony) [103]

Figure 10. The spatial structure of the UL49.5 protein fragments of the BoHV-1 virus in the DPC micelle (light blue) and the structure of the UL49.5 protein (red) located in the POPC lipid bilayer (yellow) in the complex with the TAP protein (green) [103]

Z danych literaturowych wiadomo, że *N*-końcowy fragment białka UL49.5 wirusa BoHV-1 oddziałuje z pętlami kompleksu TAP, podczas gdy jego *C*-końcowy fragment stymuluje proteosomalną degradację TAP [100]. Wcześniejsze badania wykazały, że niektóre reszty aminokwasowe białka UL49.5, w szczególności motyw R⁹RE¹¹, zlokalizowany w *N*-końcowym fragmencie UL49.5, są kluczowymi wyznacznikami jego funkcji [105]. Natywny fragment *N*-końcowy białka UL49.5 tworzy strukturę α -helisy we fragmencie R9-A19 [103]. Nasze badania konformacyjne i biologiczne obejmujące modyfikacje domeny *N*-końcowej w regionie RRE mające na celu destabilizację lub stabilizację i wydłużenie struktury helikalnej wykazały, że wprowadzone zmiany strukturalne nie wpłynęły na inhibujące właściwości białka [106]. Obecnie pracujemy nad ustaleniem struktury przestrzennej białka UL49.5 z innych wirusów, celem poznania wszystkich elementów strukturalnych odpowiedzialnych za jego aktywność biologiczną.

8. GLIKANY I GLIKOKONIUGATY POCHODZENIA NATURALNEGO

Glikany (oligosacharydy lub polisacharydy) oraz glikokoniugaty (połączenia oligosacharydów lub polisacharydów z peptydami, białkami, lipidami i innymi molekułami) odgrywają ogromne znaczenie w funkcjonowaniu żywych organizmów, które w pewnym stopniu może być porównywane do roli jaką spełniają białka i kwasy nukleinowe. Monosacharydy, będące podstawowymi elementami strukturalnymi glikanów, stanowią szczególnie rodzaj biologicznego alfabetu. Podobną funkcję w kwasach nukleinowych i białkach spełniają odpowiednio nukleotydy i aminokwasy. Jednak monosacharydy, w odróżnieniu od nukleotydów i aminokwasów, wykazują zdecydowanie większą, a w zasadzie nieograniczoną zdolność kodującą. Przekłada się to

na ogromną liczbę glikanów i glikokoniugatów, które teoretycznie mogą być i praktycznie są syntezowane przez organizmy żywe [107]. W naszej grupie badawczej zajmujemy się glikanami i glikokoniugatami będącymi zewnętrznymi elementami ścian komórkowych bakterii, zwłaszcza bakterii powodujących choroby ludzi, zwierząt i roślin oraz glikanami wyizolowanymi z grzybów podstawkowych.

Znajomość struktury chemicznej glikanów i glikokoniugatów ściany komórkowej bakterii jest niezbędna do poznania mechanizmów oddziaływania bakterii ze środowiskiem. W przypadku bakterii patogennych do poznania mechanizmów oddziaływania z gospodarzem, niezwykle ważnych podczas procesu wywoływania infekcji, ale także bardzo istotnych z punktu widzenia zapobiegania infekcjom oraz ich zwalczania. Natomiast znajomość struktury chemicznej glikanów wyizolowanych z grzybów jest niezbędna do wyjaśnienia ich właściwości prozdrowotnych dla człowieka.

Do określenia struktury chemicznej glikanów wykorzystuje się techniki chromatograficzne i spektroskopowe (m.in. magnetyczny rezonans jądrowy, spektrometria mas) oraz metody chemiczne (m.in. analiza cukrowa, analiza metylacyjna).

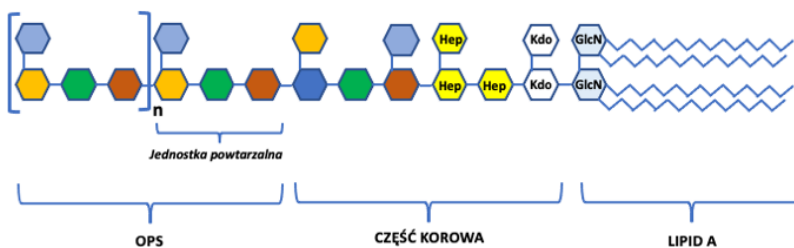
Wyznaczenie struktury chemicznej polisacharydów wymaga:

- zidentyfikowania monosacharydów i określenia ich liczby w powtarzającej się jednostce,
- ustalenia miejsce podstawienia poszczególnych monosacharydów,
- określenia wielkości pierścieni cukrowych (furanozy lub piranozy),
- ustalenia konfiguracji anomerycznych atomów węgla (α lub β),
- przyporządkowania monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego (D lub L),
- określenia sekwencji monosacharydów w powtarzającej się jednostce,
- zidentyfikowania obecności niecukrowych podstawników, ich liczby i miejsc przyłączenia.

8.1. BAKTERIE GRAM-UJEMNE

Ściany komórkowe wszystkich bakterii Gram-ujemnych mają bardzo zbliżoną budowę niezależnie od tego, czy są to bakterie patogenne względem człowieka, zwierząt lub roślin, czy całkowicie niepatogenne. Podstawowym elementem budowy ściany komórkowej, elementem najbardziej wyeksponowanym (najczęściej), jest lipopolisacharyd (LPS). LPS patogennych bakterii jest istotnym czynnikiem chorobotwórczym, wykazującym zróżnicowaną toksyczność, uzależnioną od struktury chemicznej. LPS jest zbudowany z lipidu A (endotoksyczny fragment), części korowej (reguluje toksyczność lipidu A) oraz wykazującego właściwości antygenowe O-swoistego polisacharydu (OPS) (**Rysunek 11**).

Ponadto niektóre bakterie mogą tworzyć polisacharydową otoczkę wokół komórki, która może być zbudowana z polisacharydów kapsularnych (CPS) lub egzopolisacharydów (EPS).



Rysunek 11. Schemat budowy lipopolisacharydu

Figure 11. Schematic presentation of the lipopolysaccharide structure

Badania strukturalne OPS-ów prowadziliśmy m.in. dla szczepów będących patogenami roślinnymi: *Pectobacterium parmentieri* [108], *Pectobacterium aquaticum* [109], *Dickeya aquatica* IFB0154 [110] i *Dickeya solani* [111], szczepów bakterii będących patogenami ludzkimi: *Cronobacter sakazakii* 767 [112], *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 12 [113], *Salmonella Abortusequi* (O4) [114], *Franconibacter helveticus* LMG23732^T [115], a także szczepów bakterii wyizolowanych z ryzofery roślin uprawnych: *Ochrobactrum rhizosphaerae* PR17^T [116]. Badania strukturalne przeprowadziliśmy również m.in. dla oligosacharydów części korowej bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 [117], lipidu A bakterii *Oligotropha carboxidovorans* [118], egzopolisacharydu bakterii *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* [119] i polisacharydu kapsularnego bakterii *Acinetobacter lwoffii* F78 [120].

8.2. BAKTERIE GRAM-DODATNIE

Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich wyraźnie różni się od ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. W jej zewnętrznej części można wyróżnić dwa charakterystyczne glikokoniugaty: kwas lipotejchojowy (LTA) i kwas tejchojowy (WTA). Ponadto na powierzchni bakterii Gram-dodatnich, podobnie jak u bakterii Gram-ujemnych, może znajdować się CPS lub EPS, tworząc tzw. biofilm.

Badania strukturalne przeprowadziliśmy m.in. dla kwasów tejchojowych wyizolowanych ze szczepów *Enterococcus faecalis* strain 12030 [121] i *Enterococcus faecium* strain U0317 [122] oraz kwasów lipotejchojowych ze szczepu *Enterococcus faecalis* strain 12030 [123].

8.3. GRZYBY PODSTAWKOWE

Polisacharydy wyizolowane z grzybów są ważną klasą substancji bioaktywnych, wykazujących właściwości lecznicze, silnie stymulujących układ immunologiczny człowieka. Badania strukturalne przeprowadziliśmy m.in. dla polisacharydów wyizolowanych z grzybów *Sparassis crispa* [124] i *Cantharellus cibarius* [125].

W większości przypadków prowadzonym badaniom strukturalnym towarzyszą badania biologiczne mające na celu wyjaśnienie mechanizmów oddziaływań patogen-gospodarz (bakteria/człowiek/zwierzę/roślina) oraz mechanizmów biosyntezy wyizolowanych glikokoniugatów.

UWAGI KOŃCOWE

Badania prowadzone w Katedrze Chemii Biomedycznej charakteryzują się interdyscyplinarnością, zarówno w zakresie różnych tematów badawczych, jak i różnych technik badawczych. Cechą wspólną tych badań jest próba znalezienia rozwiązania problemów związanych z chorobami cywilizacyjnymi XXI wieku. Warto również zaznaczyć, że wszystkie badania prowadzone są przez dynamiczny i zgrany zespół pracowników, doktorantów i studentów.

PODZIĘKOWANIE

Działalność Katedry Chemii Biomedycznej jest obecnie finansowana przez granty: OPUS nr UMO-2016/21/B/NZ1/02823 (A. Sz.), NCN OPUS nr 2021/41/B/NZ7/03312 (S. RM.), NCN OPUS nr 2019/35/B/NZ5/01555 (S. RM.), NCN OPUS nr 2019/33/B/NZ7/00112 (E. J.), NCN SONATA nr 2017/26/D/ST5/00919 (M. S.); NCN SONATA nr 2016/21/D/NZ1/02777 (M. O.), NCN HARMONIA nr 2018/30/M/ST4/00039, NCN PRELUDIUM BIS nr 2020/39/O/NZ7/00430 (S. RM.), NCN PRELUDIUM BIS nr 2019/35/O/NZ7/00227 (E. J.), NCN MINIATURA 5 nr 2021/05/X/NZ7/00289 (I. B.), NCBR TECHMATSTRATEG nr 406384/7/NCBR/2019 (S. RM.), NCBR TECHMATSTRATEG nr 410747/11/NCBR/2019 (S. RM.), Fundacja Naukowa Polpharma nr 1/XVIII/19 (S. RM.), POWER nr WND-POWR.03.02.00-00-I059/16 (Z. K.).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Guzow, E. Mulkiewicz, M. Obuchowski, W. Wicz, *Amino Acids*, 2021, **53**, 1257
- [2] K. Guzow, M. Obuchowski, W. Wicz, 2017, PL226349
- [3] M. Wierzbicka, I. Bylińska, A. Sikorski, C. Czaplowski, W. Wicz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 2251
- [4] M. Wierzbicka, I. Bylińska, C. Czaplowski, W. Wicz, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 29294
- [5] M. Szyszkowska, I. Bylińska, W. Wicz, J. *Photochem. Photobiol. A*, 2018, **358**, 236
- [6] M. Szyszkowska, I. Bylińska, W. Wicz, J. *Photochem. Photobiol. A*, 2017, **348**, 47
- [7] M. Szyszkowska, I. Bylińska, W. Wicz, J. *Photochem. Photobiol. A*, 2016, **326**, 76
- [8] I. Bylińska, M. Wierzbicka, C. Czaplowski, W. Wicz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 45
- [9] I. Bylińska, M. Szabelski, W. Wicz, *Chem. Phys. Chem.*, 2021, **22**, 410
- [10] I. Bylińska, M. Wierzbicka, C. Czaplowski, W. Wicz, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 48783
- [11] I. Bylińska, K. Guzow, J. Wójcik, W. Wicz, J. *Photochem. Photobiol. A*, 2018, **364**, 679

- [12] M. Zi, Y. Xu, *Immunol. Lett.*, 2018, **196**, 80
- [13] L. Björck, A. Grubb, L. Kjellén, *J. Virol.*, 1990, **64**, 941
- [14] F. Kasprzykowski, C. Schalen, R. Kasprzykowska, B. Jastrzębska, A. Grubb, *APMIS*, 2000, **108**, 473
- [15] A. Jasir, F. Kasprzykowski, R. Kasprzykowska, V. Lindström, C. Schalen, A. Grubb, *APMIS*, 2003, **111**, 1004
- [16] M. Dzierżyńska, E. Sikorska, A. Pogorzelska, E. Mulkiewicz, J. Sawicka, D. Wyrzykowski, I. Małuch, A. Grubb, F. Kasprzykowski, S. Rodziewicz-Motowidło, *Protein Pept. Lett.*, 2019, **26**, 423
- [17] M. Pikuła, M. Smużyńska, A. Krzystyniak, M. Zieliński, P. Langa, M. Deptuła, A. Schumacher, J. Łata, M. Cichorek, A. Grubb, P. Trzaskowski, F. Kasprzykowski, S. Rodziewicz-Motowidło, *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, **25**, 1431
- [18] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalen, F. Kasprzykowski, R. Kasprzykowska, 2012, US7691805B2
- [19] A. Grubb, A. Jasir, C. Schalen, F. Kasprzykowski, R. Kasprzykowska, 2010, US8097582B2
- [20] A. Surguchev, A. Surguchov, *Brain Res. Bull.*, 2010, **81**, 12
- [21] F. Chiti, C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, **86**, 27
- [22] F. U. Hartl, *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, **86**, 21
- [23] A. Palsdottir, A. O. Snorraddottir, L. Thorsteinsson, *Brain Pathol.*, 2006, **16**, 55
- [24] K. Beyer, J. I. Lao, M. Gómez, N. Riutort, P. Latorre, J. L. Mate, A. Ariza, *Neurosci Lett*, 2001, **315**, 17
- [25] J. Sundelöf, J. Sundström, O. Hansson, M. Eriksdotter-Jönhagen, V. Giedraitis, A. Larsson, M. Degerman-Gunnarsson, M. Ingelsson, L. Minthon, K. Blennow, L. Kilander, H. Basun, L. Lannfelt, *J. Alzheimers Dis.*, 2010, **21**, 471
- [26] A. Tizon, E. M. Ribe, W. Mi, C. M. Troy, E. Levy, *J. Alzheimers Dis.*, 2010, **19**, 885
- [27] A. Grubb, *Adv. Clin. Chem.*, 2000, **35**, 63
- [28] M. Mussap, M. Plebani, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2004, **41**, 467
- [29] P. Jurczak, P. Groves, A. Szymanska, S. Rodziewicz-Motowidło, *FEBS Lett.*, 2016, **590**, 4192
- [30] M. Alvares-Fernandes, M. Abrahamson, *Human Stefins and Cystatins*, Nova Biomedical Books, New York, 2006
- [31] Y. Xu, Y. Ding, X. Li, X. Wu, *Immunol. Cell. Biol.*, 2015, **93**, 442
- [32] S. Gauthier, G. Kaur, W. Mi, B. Tizon, E. Levy, *Front. Biosci. (Schol Ed)*, 2011, **3**, 541
- [33] W. Mi, M. Pawlik, M. Sastre, S. S. Jung, D. S. Radvinsky, A. M. Klein, J. Sommer, S. D. Schmidt, R. A. Nixon, P. M. Mathews, E. Levy, *Nat. Genet.*, 2007, **39**, 1440
- [34] M. Bjarnadottir, C. Nilsson, V. Lindström, A. Westman, P. Davidsson, F. Thormodsson, H. Blöndal, G. Gudmundsson, A. Grubb, *Amyloid*, 2001, **8**, 1
- [35] R. Janowski, M. Kozak, E. Jankowska, Z. Grzonka, A. Grubb, M. Abrahamson, M. Jaskolski, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, **8**, 316
- [36] A. Japelj, J. P. Waltho, R. Jerala, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004, **54**, 500
- [37] R. A. Staniforth, S. Giannini, L. D. Higgins, M. J. Conroy, A. M. Hounslow, R. Jerala, C. J. Craven, J. P. Waltho, *EMBO J.*, 2001, **20**, 4774
- [38] A. M. Gronenborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2009, **19**, 39
- [39] P. C. A. van der Wel, *Prion*, 2012, **6**, 211
- [40] E. Zerovnik, V. Stoka, A. Mirtic, G. Guncar, J. Grdadolnik, R. A. Staniforth, D. Turk, V. Turk, *FEBS J.*, 2011, **278**, 2263
- [41] M. Nilsson, X. Wang, S. Rodziewicz-Motowidło, R. Janowski, V. Lindström, P. Onnerfjord, G. Westermark, Z. Grzonka, M. Jaskolski, A. Grubb, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 24236
- [42] The PyMOL Molecular Graphic System, Version 2.0, Schrödinger LCC.

- [43] A. Szymańska, A. Radulska, P. Czaplewska, A. Grubb, Z. Grzonka, S. Rodziewicz-Motowidło, *Acta Biochim. Pol.*, 2009, **56**, 455
- [44] M. Orlikowska, E. Jankowska, R. Kołodziejczyk, M. Jaskólski, A. Szymańska, *J. Struct. Biol.*, 2011, **173**, 406
- [45] M. Maszota-Zieleniak, P. Jurczak, M. Orlikowska, I. Zhukov, D. Borek, Z. Otwinowski, P. Skowron, Z. Pietralik, M. Kozak, A. Szymańska, *S. Rodziewicz-Motowidło, FEBS J.*, 2019, **287**, 361
- [46] M. Orlikowska, A. Szymańska, D. Borek, Z. Otwinowski, P. Skowron, E. Jankowska, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2013, **69**, 577
- [47] R. Janowski, M. Kozak, M. Abrahamson, A. Grubb, M. Jaskolski, *Proteins*, 2005, **61**, 570
- [48] R. Janowski, M. Abrahamson, A. Grubb, M. Jaskolski, *J. Mol. Biol.*, 2004, **341**, 151
- [49] M. Calero, M. Pawlik, C. Soto, E. M. Castaño, E. M. Sigurdsson, a Kumar, G. Gallo, B. Frangione, E. Levy, *J. Neurochem.*, 2001, **77**, 628
- [50] A. Szymańska, E. Jankowska, M. Orlikowska, I. Behrendt, P. Czaplewska, S. Rodziewicz-Motowidło, *Front. Mol. Neurosci.*, 2012, **5**, 82
- [51] M. Orlikowska, E. Jankowska, D. Borek, Z. Otwinowski, A. Szymańska, E. Orlikowska, E. Jankowska, D. Borek, Z. Otwinowski, A. Szymanska, M. Orlikowska, E. Jankowska, D. Borek, Z. Otwinowski, A. Szymańska, *J. Pept. Sci.*, 2010, **16**, 111
- [52] A. N. Salgado, R. J. Radford, F. A. Tezcan, *Acc. Chem. Res.*, 2010, **43**, 661
- [53] S. S. Leal, H. M. Botelho, C. M. Gomes, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2253
- [54] K. Acevedo, S. Masaldan, C. M. Opazo, A. I. Bush, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2019, **24**, 1141
- [55] A. E. Cicero, G. Mostile, R. Vasta, V. Rapisarda, S. S. Signorelli, M. Ferrante, M. Zappia, A. Nicoletti, *Environ. Res.*, 2017, **159**, 82
- [56] A. Szymańska, A. Marciniak, E. Krzyżak, J. Brasuń, *J. Coord. Chem.*, 2019, **72**, 1592
- [57] A. Marciniak, A. Lewińska, D. Wyrzykowski, J. Żygowska, P. Czaplewska, E. Sikorska, A. Szymańska, J. Brasuń, *Polyhedron*, 2020, **192**, 1
- [58] E. Zerovnik, K. Škerget, M. Tusek-Znidaric, C. Loeschner, M. W. Brazier, D. R. Brown, E. Žerovnik, K. Škerget, M. Tušek-Žnidarič, C. Loeschner, M. W. Brazier, D. R. Brown, *FEBS J.*, 2006, **273**, 4250
- [59] R. Paramore, G. J. Morgan, P. J. Davis, C.-A. Sharma, A. Hounslow, A. Taler-Verčič, E. Zerovnik, J. P. Waltho, M. J. Cliff, R. Staniforth, *Front. Mol. Neurosci.*, 2012, **5**, 94
- [60] S. M. Butterfield, H. A. Lashuel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 5628
- [61] P. Jurczak, E. Sikorska, P. Czaplewska, S. Rodziewicz-Motowidło, I. Zhukov, A. Szymanska, *Membranes*, 2021, **11**, 17
- [62] P. Jurczak, K. Szutkowski, S. Lach, S. Jurga, P. Czaplewska, A. Szymanska, I. Zhukov, *Membranes*, 2021, **11**, 13
- [63] K. J. A. Davies, *Biochimie*, 2001, **83**, 301
- [64] A. Shang, A. Taylor, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, **51**, 5
- [65] E. Jankowska, J. Stoj, P. Karpowicz, P. Osmulski, M. Gaczynska, *Curr. Pharm. Des.*, 2012, **19**, 1010
- [66] N. Dehvari, T. Mahmud, J. Persson, T. Bengtsson, C. Graff, B. Winblad, A. Rönnbäck, H. Behbahani, *Neurochem. Int.*, 2012, **60**, 533
- [67] I. Saez, D. Vilchez, *Curr. Genom.*, 2014, **15**, 38
- [68] N. Chondrogiani, M. A. Vasilopoulou, M. Kapetanou, E. S. Gonos, w *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*, Elsevier, 2019, 92
- [69] A. M. Smith, S. C. Chang, S. Park, D. Finley, Y. Cheng, A. L. Goldberg, *Mol. Cell*, 2007, **27**, 731
- [70] J. Rabl, D. M. Smith, Y. Yu, S. C. Chang, A. L. Goldberg, Y. Cheng, *Mol. Cell*, 2008, **30**, 360

- [71] T. G. Gillette, B. Kumar, D. Thompson, C. A. Slaughter, G. N. DeMartino, *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 31813
- [72] Y. Yu, D. M. Smith, H. M. Kim, V. Rodriguez, A. L. Goldberg, Y. Cheng, *EMBO J.*, 2010, **29**, 692
- [73] M. Gizińska, J. Witkowska, P. Karpowicz, R. Rostankowski, E. S. Chocron, A. M. Pickering, P. Osmulski, M. Gaczynska, E. Jankowska, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**, 359
- [74] A. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**, 101
- [75] R. Kaye, C. A. Lasagna-Reeves, *J. Alzheimers Dis.*, 2013, **33** (2013), S67
- [76] T. A. Thibaut, R. T. Anderson, D. M. Smith, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1
- [77] J. Witkowska, M. Gizińska, P. Grudnik, P. Golik, P. Karpowicz, A. Giełdoń, G. Dubin, E. Jankowska, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1
- [78] A. J. C. Edwards-Gayle, I. W. Hamley, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 5867
- [79] M. Sunde, C. Blake, *Adv. Protein Chem.*, 1997, **50**, 123
- [80] J. Sawicka, E. Iłowska, M. Deptuła, P. Sosnowski, P. Sass, K. Czerwicz, K. Chmielewska, A. Szymańska, Z. Pietralik-Molińska, M. Kozak, P. Sachadyn, M. Pikuła, S. Rodziewicz-Motowidło, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 3818
- [81] L. Pickart, J. M. Vasquez-Soltero, A. Margolina, *BioMed Res. Int.*, 2015, 648108
- [82] M. R. Ahmed, S. H. Basha, D. Gopinath, R. Muthusamy, R. Jayakumar, *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 2005, **10**, 17
- [83] J. Sawicka, M. Dzierżyńska, A. Wardowska, M. Deptuła, P. Rogujski, P. Sosnowski, N. Filipowicz, A. Mieczkowska, P. Sass, A. Pawlik, A. Hać, A. Schumacher, M. Gucwa, N. Karska, J. Kamińska, R. Platek, J. Mazuryk, J. Zieliński, K. Kondej, P. Młynarz, P. Mucha, P. Skowron, L. Janus, A. Herman-Antosiewicz, P. Sachadyn, A. Czupryn, A. Piotrowski, M. Pikuła, S. Rodziewicz-Motowidło, *Molecules*, 2020, **25**, 2884
- [84] S. Rodziewicz-Motowidło, M. Dzierżyńska, J. Sawicka, P. Skowron, and P. Mucha, 2021, PL237242
- [85] J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, A. J. Grodzinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2002, **99**, 9996
- [86] R. G. Ellis-Behnke, Y. X. Liang, S. W. You, D. K. C. Tay, S. Zhang, K. F. So, G. E. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2006, **103**, 5054
- [87] R. G. Ellis-Behnke, Y. X. Liang, D. K. C. Tay, P. W. F. Kau, G. E. Schneider, S. Zhang, W. Wu, K. F. So, *Nanomedicine*, 2006, **2**, 207
- [88] S. Rodziewicz-Motowidło, J. Sawicka, M. Dzierżyńska, P. Skowron, P. Mucha, E. Iłowska, P. Karpowicz, F. Kasprzykowski, 2021, PL237001
- [89] Cancer, (available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).
- [90] J. Gołąb, M. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa, *Immunologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2014
- [91] M. Piotrowska, M. Spodzieja, K. Kuncewicz, S. Rodziewicz-Motowidło, and M. Orlikowska, *Eur. J. Med. Chem.*, **224**, 113694
- [92] M. Spodzieja, S. Lach, J. Iwaszkiewicz, V. Cesson, K. Kalejta, D. Olive, O. Michielin, D. E. Speiser, V. Zoete, L. Derré, S. Rodziewicz-Motowidło, *PLoS ONE*, 2017, **12**, 1
- [93] M. Spodzieja, K. Kuncewicz, A. Sieradzan, A. Karczyńska, J. Iwaszkiewicz, V. Cesson, K. Węgrzyn, I. Zhukov, M. Maszota-Zieleniak, O. Michielin, D. E. Speiser, V. Zoete, L. Derré, S. Rodziewicz-Motowidło, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 636
- [94] K. Kuncewicz, C. Battin, A. Sieradzan, A. Karczyńska, M. Orlikowska, A. Wardowska, M. Pikuła, P. Steinberger, S. Rodziewicz-Motowidło, M. Spodzieja, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1
- [95] K. Kuncewicz, C. Battin, K. Węgrzyn, A. Sieradzan, A. Wardowska, E. Sikorska, I. Giedrojc, P. Smardz, M. Pikuła, P. Steinberger, S. Rodziewicz-Motowidło, M. Spodzieja, *Bioorg. Chem.*, 2022, **122**, 105748

- [96] M. Szymczak, S. Ziętkiewicz, K. Kunczewicz, S. Rodziewicz-Motowidło, M. Orlikowska, *Protein Expr. Purif.*, 2019, **164**, 105450
- [97] M. C. Verweij, D. Horst, B. D. Griffin, R. D. Luteijn, A. J. Davison, M. E. Ressing, E. J. H. J. Wiertz, *PLoS Pathog.*, 2015, **11**, 1
- [98] Ł. M. Dzieciatkowski T., Rola A., Majewska A., Solarska M., *Post. Mikrobiol.*, 2007, **46**, 211
- [99] B.-S. K. Lipińska A.D., *Post. Mikrobiol.*, 2010, **49**, 199
- [100] A. Horst, M. C. Verweij, A. J. Davison, M. E. Ressing, E. J. H. J. Wiertz, *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, **23**, 96
- [101] A. D. Lipińska, D. Koppers-Lalic, M. Rychłowski, P. Admiraal, F. a M. Rijsewijk, K. Bieńkowska-Szewczyk, E. J. H. J. Wiertz, *J. Virol.*, 2006, **80**, 5822
- [102] M. C. Verweij, A. D. Lipińska, D. Koppers-Lalic, W. F. van Leeuwen, J. I. Cohen, P. R. Kinchington, I. Messaoudi, K. Bieńkowska-Szewczyk, M. E. Ressing, F. A. M. Rijsewijk, E. J. H. J. Wiertz, *J. Virol.*, 2011, **85**, 2351
- [103] N. Karska, M. Graul, E. Sikorska, I. Zhukov, M. J. Ślusarz, F. Kasprzykowski, A. D. Lipińska, S. Rodziewicz-Motowidło, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2019, **1861**, 926
- [104] M. C. Verweij, A. D. Lipińska, D. Koppers-Lalic, E. Quinten, J. Funke, H. C. van Leeuwen, K. Bieńkowska-Szewczyk, J. Koch, M. E. Ressing, E. J. H. J. Wiertz, *Mol. Immunol.*, 2011, **48**, 2038
- [105] A. Wei, Y. Wang, S. I. Chowdhury, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e25742
- [106] N. Karska, M. Graul, E. Sikorska, M. J. Ślusarz, I. Zhukov, F. Kasprzykowski, A. Kubiś, A. D. Lipińska, S. Rodziewicz-Motowidło, *Chem. Biodivers.*, 2021, **18**, e2000883.
- [107] O. Holst, A. P. Moran, P. J. Brennan, *Microbial Glycobiology*, Elsevier Inc., 2010, 1
- [108] K. Ossowska, A. Motyka-Pomagruk, N. Kaczyńska, A. Kowalczyk, W. Śledz, E. Łojkowska, Z. Kaczyński, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 2077
- [109] W. Babinska, A. Motyka-Pomagruk, W. Śledz, A. Kowalczyk, Z. Kaczyński, E. Łojkowska, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, **18**, 5041
- [110] A. Kowalczyk, N. Szpakowska, W. Sledz, A. Motyka-Pomagruk, K. Ossowska, E. Łojkowska, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2020, **497**, 108135
- [111] K. Ossowska, M. Czerwicka, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, M. Golanowska, G. Condemine, E. Łojkowska, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2017, **445**, 40
- [112] M. Czerwicka, S. J. Forsythe, A. Bychowska, H. Dziadziuszko, D. Kunikowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 908
- [113] K. Marszewska, M. Czerwicka, S. J. Forsythe, K. Ossowska, H. Dziadziuszko, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2015, **407**, 55
- [114] Z. Kaczyński, J. Gajdus, H. Dziadziuszko, P. Stepnowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **50**, 679
- [115] S. Szulta, M. Czerwicka, S. J. Forsythe, K. Ossowska, H. Dziadziuszko, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2016, **431**, 39
- [116] N. Szpakowska, A. Kowalczyk, S. Jafra, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2020, **497**, 108136
- [117] Z. Kaczyński, S. Braun, B. Lindner, K. Niehaus, O. Holst, *J. Endotoxin Res.*, 2007, **13**, 101
- [118] A. Choma, K. Zamłyńska, A. Mazur, A. Pastuszka, Z. Kaczyński, I. Komaniecka, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 7991
- [119] Z. Kaczynski, G. Karapetyan, A. Evidente, N. S. Iacobellis, O. Holst, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 285
- [120] A. Hanuszkiewicz, Z. Kaczyński, B. Lindner, T. Goldmann, E. Vollmer, J. Debarry, H. Heine, O. Holst, *European J. Org. Chem.*, 2008, 6183
- [121] A. Theilacker, O. Holst, B. Lindner, J. Huebner, Z. Kaczyński, *Carbohydrate Research*, 2012, **354**, 106

- [122] A. Bychowska, C. Theilacker, M. Czerwicka, K. Marszewska, J. Huebner, O. Holst, P. Stepnowski, Z. Kaczyński, *Carbohydr. Res.*, 2011, **346**, 2816
- [123] A. Theilacker, Z. Kaczynski, A. Kropec, F. Fabretti, T. Sange, O. Holst, J. Huebner, *Infect. Immun.*, 2006, **74**, 5703
- [124] N. Nowacka-Jechalke, R. Nowak, M. K. Lemieszek, W. Rzeski, U. Gawlik-Dziki, N. Szpakowska, Z. Kaczyński, *Nutrients*, 2021, **13**, 161
- [125] N. Nowacka-Jechalke, R. Nowak, M. Juda, A. Malm, M. Lemieszek, W. Rzeski, Z. Kaczyński, *Food Chem.*, 2018, **268**, 355

Praca wpłynęła do Redakcji 28 maja 2022 r.

