



Badania fibrylizacji, stabilności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych samoorganizujących się peptydów przeciwdrobnoustrojowych zawierających krótkie sekwencje fibrylogenne

Milena Czeszejko | Uniwersytet Gdański
<https://orcid.org/0000-0003-3060-6364>

Kamil Klimkowski | Uniwersytet Gdański
<https://orcid.org/0000-0002-9199-7584>

Emilia Łowska | Uniwersytet Gdański
<https://orcid.org/0000-0002-5774-3644>

Streszczenie

Słowa kluczowe:
fibryle peptydowe,
peptydy
samoorganizujące
się, biomateriały,
peptydy przeciw-
drobnoustrojowe

Poszukiwanie skutecznych substancji przeciwdrobnoustrojowych to bardzo ważny i aktualny temat, jednocześnie stanowiący ogromne wyzwanie dla naukowców. Związane jest to przede wszystkim z lekoopornością bakterii na antybiotyki i brakiem skutecznych terapii w walce z nimi. Jedną z możliwości jest wykorzystanie peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (AMP). Swoją skuteczność zawdzięczają oddziaływaniu peptydów z błoną komórkową, jednak ograniczeniem w ich zastosowaniu jest relatywnie niska stabilność. Wśród metod, które prowadzą do zwiększenia trwałości tych związków, jest połączenie peptydów z nośnikami. Przykładem takiego nośnika mogą być fibryle peptydowe, czyli wysoce uporządkowane struktury o tendencji do samogrupowania. Wykorzystanie fibryli zapewnia jednorodność i stabilność związków, a także daje ogromne możliwości łatwego funkcjonalizowania bionośników. W naszych badaniach wykorzystaliśmy sekwencje fibrylogenne, tworzące motyw zamka sterycznego, i połączyliśmy je z fragmentem ludzkiej katelicyny (LL-37) – efektem tego było opracowanie nowych samoorganizujących się peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Wszystkie zaprojektowane związki zostały przez nas zsyntezowane, a następnie przebadane pod kątem sprawdzenia ich tendencji do tworzenia fibryli, wykorzystania ich jako nośniki, jak również sprawdzenia ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Przeprowadzone badania pozwoliły nam określić potencjał sekwencji fibrylogennych jako nośników, a także ich wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Research on the fibrilization, stability and antimicrobial activity of the new self-assembling antimicrobial peptides with short fibrillogenic sequences (Summary)

Keywords:
peptide fibrils,
self-assembly
peptides,
biomaterials,
antimicrobial
peptides

The search for effective antimicrobial active substances is a very important and current topic, but at the same time, it remains a big problem for modern medicine. This is caused by bacterial resistance to antibiotics, tumor's development and the lack of effective drugs for treatment. One possibility for a solution of these problems is that of peptides with antimicrobial activity (Antimicrobial peptides, AMPs). Their effectiveness is associated with the interaction between them and cell membranes. However, a significant challenge in their application is their relatively low stability. One of the methods that lead to increased stability is to combine bioactive peptides with scaffolds. An example of a scaffold is that of peptide fibrils, which are highly ordered structures that have a tendency to self-assembly, which ensures homogeneity and high stability. In addition, the scaffolds may be functionalized by different bioactive sequences. In our project, we connected fibrillogenic sequences, formed in a steric zipper, to antimicrobial sequences based on human cathelicidin (LL-37), which resulted in creation of new self-assembling antimicrobial peptides. We synthesized all peptides in the solid state using Fmoc-methodology. Many tests, such as to check the tendency to fibril formation as well as antimicrobial activity, were done. The conducted research allowed us to determine the potential of fibrillogenic sequences as carriers as well as their impact on antimicrobial activity.

Wstęp

Na świecie obserwuje się coraz więcej szczepów bakterii wykazujących oporność przeciw konwencjonalnym antybiotykom. Niegdyś uleczalne choroby bakteryjne dziś są coraz częstszą przyczyną śmierci. Z raportu *Tackling drug-resistant infections globally – final report and recommendations* opublikowanego w 2016 roku wynika, że już w 2050 roku przez infekcje wywołane lekoopornymi drobnoustrojami życie będzie tracić ok. 10 mln ludzi rocznie (O'Neill 2016). Analiza ta skłoniła naukowców do poszukiwań nowych alternatywnych terapii przeciwbakteryjnych.

Z ogromu wiedzy o naturalnych mechanizmach obrony immunologicznej roślin i zwierząt na szczególną uwagę zasługują związki peptydowe, zbudowane z naturalnych aminokwasów. Wśród nich bardzo ważną grupę stanowią peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptide*, AMP), które pomagają w walce z mikroorganizmami powodującymi infekcje. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane są przez niemal wszystkie żyjące organizmy, nawet takie, jak archeony czy protisty (Makowska i in. 2019: 65). Niezależnie od tego, z którego organizmu pochodzą, peptydy w organizmach żywych syntezowane są na dwa sposoby, poprzez rybosomalną translację mRNA oraz nierybosomalną syntezę peptydów w systemach bakteryjnych (Hancock, Chapple 1999: 43; Brogden 2005: 3; Mahlapuu i in. 2016: 6). Związki te zawierają od 2 do 50 reszt aminokwasowych (Mahlapuu i in. 2016: 6) i dzięki obecności reszt

argininy, lizyny czy histydyny posiadają wypadkowy ładunek w przedziale od +2 do +9 (Makowska i in. 2019: 65). Kationowy fragment odpowiedzialny jest za oddziaływanie z zewnętrzną częścią ujemnie naładowanej błony fosfolipidowej bakterii. Natomiast hydrofobowy fragment peptydów pozwala na wnikięcie do wnętrza błony. Taki mechanizm powoduje destabilizację błony biologicznej, prowadząc w efekcie do śmierci bakterii (Brogden 2005: 3). Na chwilę obecną naukowcy nie są w stanie określić jednego, dokładnego mechanizmu interakcji peptyd – błona komórkowa. Niemniej jednak przyjmuje się trzy najbardziej prawdopodobne modele, tj. model typu klepek beczki, model toroidalny i model dywanowy (Huang i in. 2010: 1; Henc i in. 2013: 7).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą również dezaktywować kwasy nukleinowe i białka cytoplazmatyczne, co prowadzi do zaburzenia podstawowych funkcji życiowych bakterii (Dürr i in. 2006: 1758). Patogeny, mając do czynienia z tak silnym, szybkim i niespecyficznym mechanizmem działania, znacznie wolniej nabierają lekooporności. Dodatkowymi atutami AMP są: biokompatybilność, praktyczny brak odpowiedzi układu immunologicznego, stosunkowo niewielka masa cząsteczkowa; często są to związki naturalne, które można relatywnie łatwo otrzymać również na drodze syntezy chemicznej. Tych kilka cech pokazuje, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą być bardzo dobrą alternatywą dla antybiotyków. Niestety, dużym problemem w ich zastosowaniu jest jednak fakt, iż bardzo szybko ulegają degradacji enzymatycznej w organizmie. Jednym z proponowanych rozwiązań jest strategia łączenia sekwencji przeciwdrobnoustrojowych z bardzo trwałymi sekwencjami fibrylogennymi, posiadającymi zdolność do samoorganizacji (Lombardi i in. 2019: 11).

Fibryle peptydowe posiadają unikatowe właściwości, takie jak: duża stabilność, wysokie uporządkowanie struktury, wytrzymałość zbliżona do wytrzymałości stali (Goldschmidt i in. 2010: 107; Smith i in. 2006: 103), dzięki którym możliwe jest wykorzystanie ich jako nośników dla substancji aktywnych. Za powyższe cechy fibryli odpowiedzialnych jest kilka czynników. Pierwszym z nich jest obecność specyficznych oddziaływań pomiędzy łańcuchami peptydowymi, wśród których kluczową rolę odgrywają oddziaływania niekowalencyjne: hydrofobowe, van der Waalsa, elektrostatyczne oraz wiązania jonowe. Pomimo że energia pojedynczych oddziaływań jest niewystarczająca do stworzenia i utrzymania trwałych struktur, to ich duża liczba powoduje, że ostatecznie tworzą stabilne struktury, czyli fibryle (Rajagopal i Schneider 2004: 14). Kluczową rolę odgrywa zaś sekwencja aminokwasowa, nie tylko ze względu na obecność poszczególnych reszt aminokwasowych, ale przede wszystkim ze względu na ich odpowiednią kolejność (Iłowska i in. 2022). Dzięki obecności naturalnych komponentów podobnie jak AMP charakteryzują się biokompatybilnością, niską toksycznością, nie wywołują odpowiedzi immunologicznej i mogą być swego rodzaju rezerwuarem substancji aktywnych. Ponadto dzięki wysokiej stabilności charakteryzują się większą odpornością na degradację enzymatyczną w krążeniu ogólnoustrojowym (Sawicka i in. 2021: 22; Chen i in. 2019: 11). Ich charakter pozwala

w kontrolowany sposób odłączać przyłączone do nich inne fragmenty peptydowe bądź aktywnie biologicznie cząstki, których skuteczność wykazywana jest dopiero po odłączeniu od fibryli. Dzięki zaś temu, że są one bardzo sztywne i stosunkowo łatwo można je otrzymywać, istnieje możliwość wykorzystania ich jako rusztowania (ang. *scaffold*) lub podłoża do hodowli komórek macierzystych. Fibryle amyloidowe tworzą bardzo cienki stelaż, podobny do biofilmu, na którym możliwe jest osadzenie, różnicowanie się i proliferacja komórek. Tak przygotowane rusztowanie, wraz z namnożonymi komórkami, może być aplikowane pacjentowi w celu uzupełnienia na przykład ubytków tkanki (Mankar i in. 2011: 2).

Wszystkie te właściwości fibryli, które warunkują ich tendencję do samoorganizacji, spowodowały, że znacząco zmienił się obraz postrzegania fibryli peptydowych. Nie są to tylko patogeny w chorobach neurodegeneracyjnych, ale są to związki, które mogą być nośnikami dla substancji aktywnych czy też mogą być wykorzystywane jako systemy dostarczania leków. Badania nad procesem samoorganizacji peptydów cieszą się obecnie dużym zainteresowaniem. Jako jedna z możliwości tworzenia nowych, bardziej stabilnych związków czy substancji o długoterminowym działaniu tworzy szansę wykorzystania związków samoorganizujących się w biomedycynie, nanotechnologii czy innych dziedzinach życia i nauki (Hosseinkhani, Hong i Yu 2013: 113; Wei i in. 2017: 46; Lee i in. 2019: 20).

Wykorzystanie fibryli peptydowych jako potencjalnych farmaceutyków o przedłużonym działaniu po raz pierwszy zostało zaproponowane przez szwajcarską grupę badaczy (Maji i in. 2008: 6). Wykorzystali oni gonadotropinę do zaprojektowania aktywnej biologicznie fibryli peptydowej jako jej analogu i zaproponowali wykorzystanie tego rozwiązania w leczeniu raka piersi, raka prostaty czy też jako środka antykoncepcyjnego. Przedstawione wyniki badań agregacyjnych, strukturalnych oraz zdolności uwalniania tych analogów pokazują, iż zaprojektowane sekwencje swój potencjał terapeutyczny wykazują dopiero w momencie uwolnienia części aktywnej farmaceutyku od pozostałej części fibryli (Maji i in. 2008: 6).

Inną drogą wykorzystywania potencjału samoorganizacji peptydów jest połączenie sekwencji fibrylogennej odpowiadającej za samoorganizację z sekwencjami wykazującymi aktywność biologiczną. Przykładem takiego rozwiązania jest połączenie sekwencji QIVAGV z sekwencją o działaniu proregeneracyjnym i specyficzną dla enzymu elastazy (Sawicka 2021: 22). Udowodniono, że otrzymana osiemnastaminokwasowa hybryda peptydowa ulega procesowi fibrylizacji, pomimo że sekwencja odpowiadająca za samoorganizację to zaledwie sześć aminokwasów (Sawicka i in. 2021: 22; Iłowska i in. 2022: 23). Jednocześnie związek ten wykazuje aktywność biologiczną nieodbiegającą od natywnego peptydu.

Innym przykładem wykorzystania fibryli jest połączenie fragmentu meltoiny o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych z fragmentem fibrylogennym $(QL)_6$ (Chen i in. 2019: 11). Zarówno połączenie kowalencyjne tych dwóch fragmentów peptydowych,

jak i dodatkowa inkubacja z samym fragmentem fibrylogennym warunkują samoorganizację, wysoką stabilność, zapewniając przy tym skuteczną aktywność przeciwdrobnoustrojową zaprojektowanej molekuly. Dodatkowo istotne są odpowiednie warunki, w których dochodzi do uwolnienia fragmentu aktywnego.

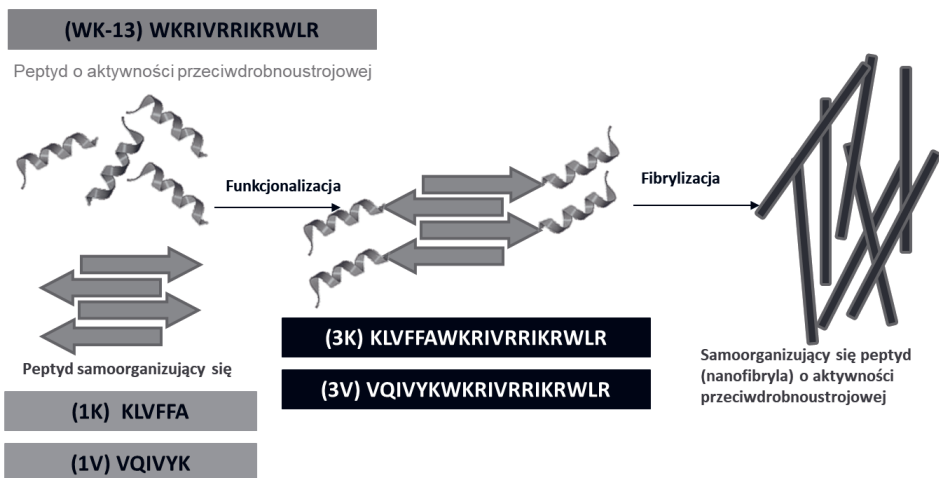
Kolejną grupą związków, które ulegają samoorganizacji, są hydrożele peptydowe, tworzące stabilne struktury nanorurek (Bolhassani 2011: 1816; Singh i in. 2019: 6). Hydrożele peptydowe to wyjątkowa grupa biomateriałów, których budowa oparta jest na oddziaływaniach elektrostatycznych oraz wodorowych pomiędzy łańcuchami grup bocznych w aminokwasach (Bolhassani 2011: 1816). Tworzą one materiały, które swoją strukturą przypominają tkanki lub macierze pozakomórkowe (Bolhassani 2011: 1816). Są one złożone z powtarzających się dodatkowo i ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych, które oddzielone są resztami hydrofobowymi (Marini i in. 2002: 2; Yang i Zhang 2006: 18). Związki te tworzą zorganizowaną i uporządkowaną strukturę – rusztowanie, które dalej może być stosowane jako nośnik substancji aktywnej. Stworzone w taki sposób struktury wykazują niezwykłą stabilność w szerokim zakresie temperatur, pH oraz czynników denaturujących (Zhang 2002: 20). Jednym z najlepiej przebadanych i poznanych peptydów, który tworzy hydrożele, jest komercyjnie dostępny peptyd RADA16-I (Ac-RADARADARADARADA-NH₂) (Kumada, Zhang 2010: 5; Chaberska i in. 2017: 71). Peptyd tworzy stabilną strukturę β-kartki w roztworach wodnych. Cechuje się wysoką ilością hydrofobowych oraz hydrofilowych reszt aminokwasowych, w wyniku czego tworzy wysoce uporządkowane struktury supramolekularne wykazujące stabilność zarówno na czynniki fizyczne, jak i chemiczne. Jonowe peptydy ulegające samoorganizacji można podzielić na kilka podtypów w zależności od sposobu ułożenia dodatkowo i ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych tworzących hydrofilową powierzchnię peptydu.

Przykłady pozytywnego wykorzystania zarówno fibryli peptydowych, jak i hydrożeli, które poniekąd wykazują podobieństwo do fibryli, skłoniły nas do poszukiwania nowych, stabilnych sekwencji fibrylogennych, które moglibyśmy wykorzystać jako nośniki dla peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Zaprojektowaliśmy sekwencje, które następnie połączyliśmy z peptydem przeciwdrobnoustrojowym, dokładnie z fragmentem ludzkiej katelicydyny LL-37 (fragment WK13) (Wang 2008: 283; Wang i in. 2019), w celu zwiększenia jej stabilności, nie tracąc przy tym potencjału przeciwdrobnoustrojowego. W kolejnym etapie przeprowadziliśmy testy agregacyjne z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego z tioflawiną T (ThT) oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Sprawdziliśmy też stabilność otrzymanych peptydów w osoczu oraz wykonaliśmy testy biologiczne weryfikujące ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

1. Wyniki

1.1. Projektowanie i synteza peptydów

Celem naszego projektu było zaprojektowanie i otrzymanie sekwencji fibrylogennych, posiadających silne właściwości agregacyjne, oraz sekwencji hybrydowych, będących połączeniem wspomnianych fragmentów z peptydem przeciwdrobnoustrojowym (rys. 1). Wszystkie sekwencje peptydowe przedstawione zostały w tabeli 1. Pierwszy z zaproponowanych przez nas fragmentów fibrylogennych: 1K o sekwencji $^{16}\text{KLVFFA}^{21}$ jest fragmentem peptydu β -amyloidowego, który tworzy motyw zamka sterycznego i posiada silną tendencję do tworzenia fibryli (Nelson i in. 2005: 435). Drugi z zaproponowanych przez nas fragmentów, o nazwie 1V, jest sekwencją pochodzącą z białka Tau i również tworzy ten sam motyw strukturalny charakteryzujący się silną tendencją do fibrylizacji (Perez i in. 2007: 103). Kolejny krok badań polegał na otrzymaniu hybryd peptydowych, czyli połączenia peptydu 1K i 1V z sekwencją WK13 (tab. 1), będącą zmodyfikowanym analogiem fragmentu ludzkiej katelicyny (LL-37) $^{17}\text{WKRIVQRIKDFLR}^{29}$ (Wang i in. 2019: 283) – nowe hybrydowe peptydy nazwaliśmy odpowiednio 3K oraz 3V. Zaproponowane związki otrzymano drogą syntezy na nośniku stałym, zgodnie z metodologią chemii Fmoc. Dla wszystkich pięciu peptydów w celu ich charakterystyki wykonane zostały analizy z wykorzystaniem chromatografii cieczowej oraz spektrometrii mas.



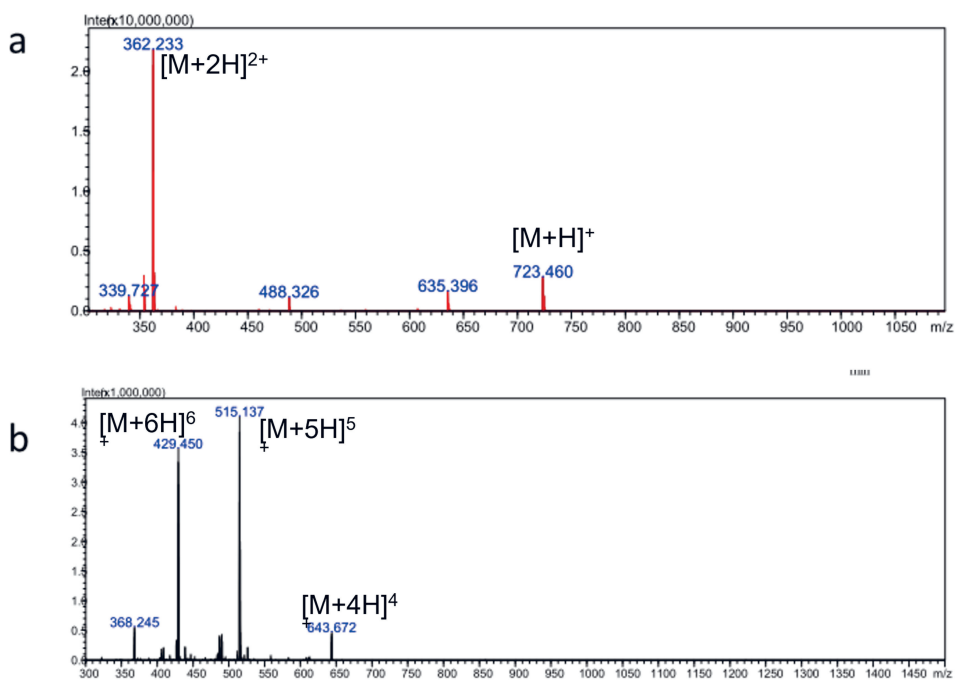
Rysunek 1. Schemat powstawania samoorganizujących się peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Źródło: Opracowanie własne.

Tabela 1. Sekwencje zaprojektowanych i otrzymanych peptydów

Nazwa peptydu	Sekwencja aminokwasowa	Masa molowa obliczona	Masa molowa – eksperymentalna (rysunek 2, 3)
1K	KLVFFA-NH ₂	722,929	723,460
3K	KLVFFAWKRIVRRRIKRWLR-NH ₂	2571,253	2570,688
1V	VQIVYK-NH ₂	747,936	748,490
3V	VQIVYKWKRIVRRRIKRWLR-NH ₂	2596,103	2595,771
WK13	WKRIVRRRIKRWLR-NH ₂	1865,355	1865,291

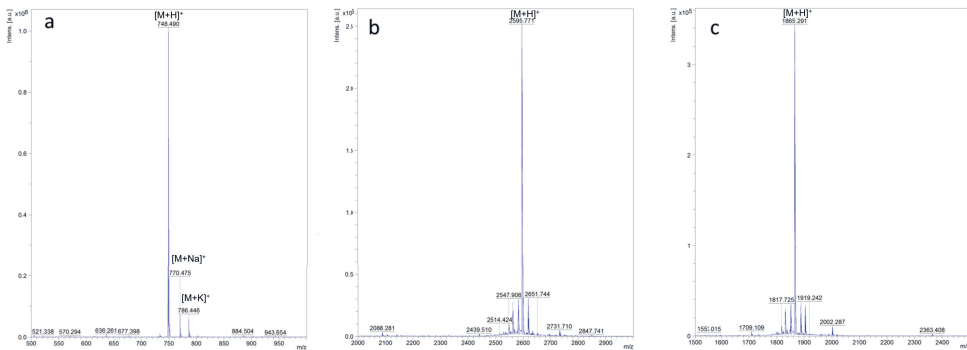
Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 2. Widma mas dla peptydów

a) 1K oraz b) 3K zarejestrowane techniką LCMS ESI IT ToF

Źródło: Opracowanie własne.

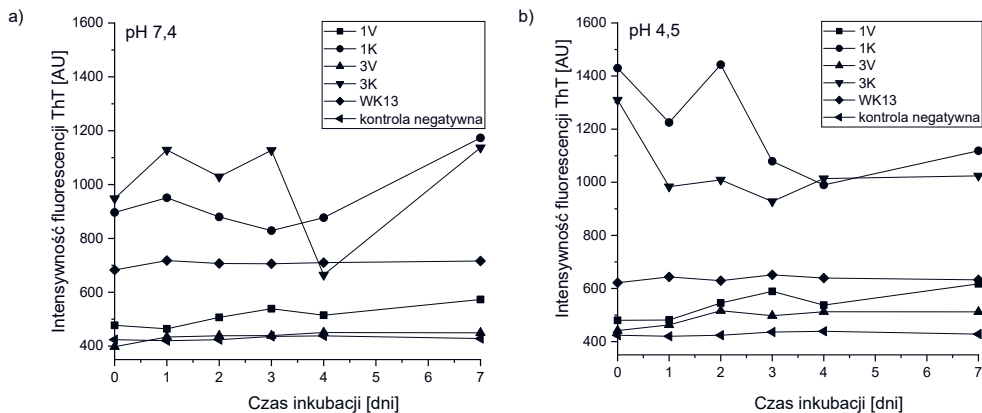


Rysunek 3. Widma mas dla peptydów a) 1V; b) 3V oraz c) WK13 zarejestrowane techniką MALDI TOF

Źródło: Opracowanie własne.

1.2. Testy kolorymetryczne z tioflawiną T

W celu sprawdzenia, czy zaprojektowane związki tworzą fibryle peptydowe w pierwszej kolejności wykonano podstawowe testy kolorymetryczne z tioflawiną T. Barwnik ten w połączeniu z fibrylami, a dokładnie strukturami β , tworzy kompleks, który posiada charakterystyczne pasmo emisji przy około 482 nm (Xue i in. 2017: 4). Wszystkie związki inkubowano przez siedem dni w dwóch różnych buforach: a) PBS o pH 7,4 oraz b) octanie amonu pH 4,5. Następnie mieszaniny analizowano w obecności tioflawiny T. Następnie przeprowadzono proces fibrylizacji, monitorując jego przebieg testem kolorymetrycznym. W teście tym jako barwnik wykorzystuje się Tioflawiny T, natomiast kontrola procesu przebiega na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji barwnika. Na rysunku 4 przedstawiono zależność intensywności fluorescencji tioflawiny T od czasu inkubacji dla wszystkich pięciu peptydów. W pH obojętnym najsilniej fibrylizują peptydy 1K, czyli peptyd zawierający sekwencję KLVFFA, oraz jego analog 3K, będący połączeniem sekwencji KLVFFA z sekwencją przeciwdrobnoustrojową. Natomiast drugi z zaprojektowanych związków (1V) oraz jego analog praktycznie nie tworzą fibryli. Podobna sytuacja występuje w środowisku kwaśnym, przy czym wartości intensywności fluorescencji ThT są nieco wyższe, co sugeruje większą ilość fibryli lub ich większe uporządkowanie. W pH kwaśnym obserwujemy również spadek wartości w siódmym dniu inkubacji, co wynika z wytrącania się fibryli z inkubowanych roztworów.

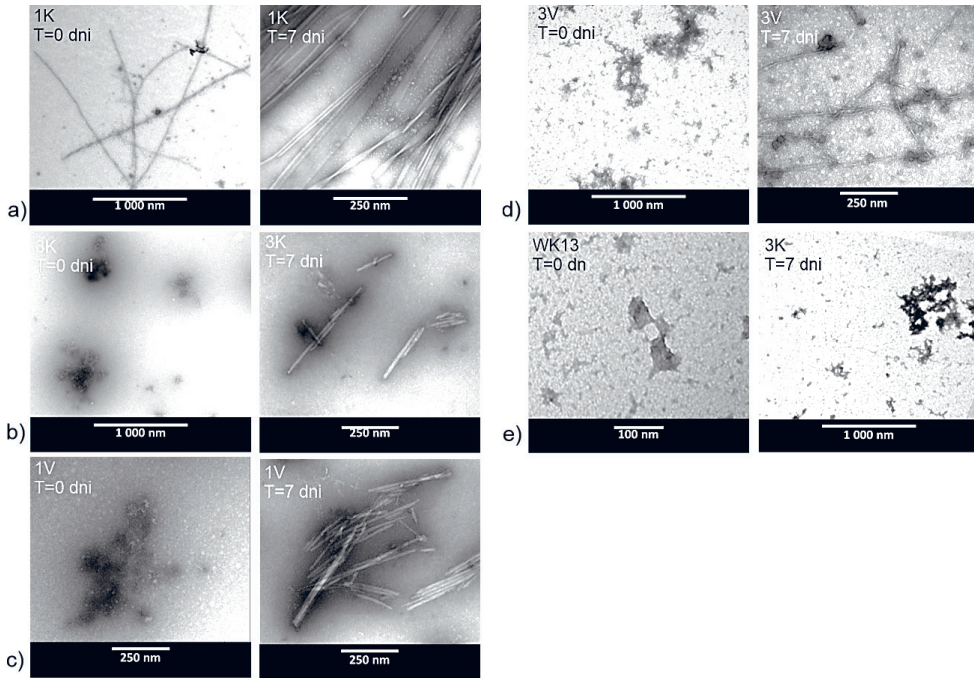


Rysunek 4. Wykres zależności intensywności fluorescencji kompleksu peptyd-tioflawina T od czasu inkubacji względem kontroli, w pH a) 7,4, b) 4,5

Źródło: Opracowanie własne.

1.3. Badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Drugą metodą wykorzystaną do sprawdzenia, czy zaprojektowane związki tworzą uporządkowane struktury fibrylarne była transmisyjna mikroskopia elektronowa. Na rysunku 5 przedstawiono uzyskane obrazy mikroskopowe dla wszystkich pięciu peptydów bezpośrednio po rozpuszczeniu (dzień „0”) oraz po siedmiodniowej inkubacji. Dla peptydu 1K już bezpośrednio po rozpuszczeniu obserwujemy powstawanie cienkich fibryli o średnicy 25 nm, dalsza inkubacja prowadzi do utworzenia większej ilości fibryli. Są one poskręcane lub połączone (posklejane) ze sobą, a dodatkowo są zdecydowanie dłuższe. Peptyd 3K tworzy fibryle, niemniej nie obserwujemy ich bezpośrednio po rozpuszczeniu a dopiero po upływie siedmiu dni inkubacji. Podobnie zachowują się dwa pozostałe peptydy, czyli 1V oraz analog 3V. Przy czym pierwszy z nich tworzy bardzo nieregularne, posklejane ze sobą, krótkie fibryle o średnicy 17 nm. Natomiast ilość fibryli obserwowanych na zdjęciu zarejestrowanym dla peptydu 3V jest niewielka, a utworzone fibryle są bardzo cienkie (średnica 11 nm) i długie do ok. 480 nm. Dla peptydu WK13 nie obserwujemy praktycznie żadnych uporządkowanych struktur. Zaciemnienia na obrazach TEM są najprawdopodobniej pozostałością octanu uranylu wykorzystywanego do wybarwienia próbek.



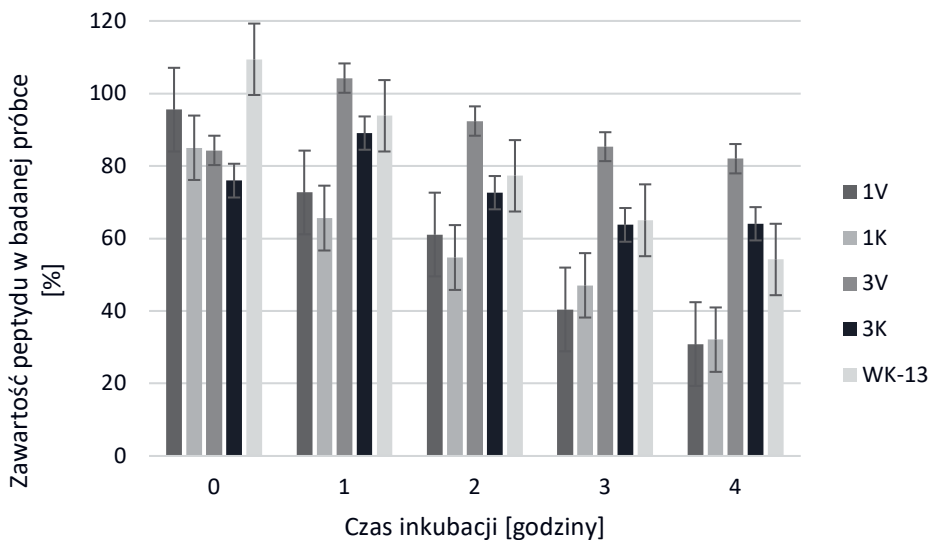
Rysunek 5. Obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego zarejestrowane dla: a) peptydu 1K, b) 3K, c) 1V, d) 3V oraz e) WK13 w pH 7,4 w dniu „0” (początek inkubacji) – lewa strona, po 7 dniach inkubacji – prawa strona

Źródło: Opracowanie własne.

1.4. Testy stabilności peptydów w ludzkim osoczu

W kolejnym etapie badań sprawdzono stabilność wszystkich związków, aby zweryfikować, czy połączenie sekwencji przeciwdrobnoustrojowej z fibrylogenną zwiększy stabilność tej pierwszej. W tym celu peptydy rozpuszczono w wodzie, a następnie dodano 25% roztwór ludzkiego osocza i inkubowano w ciągu 4 godzin w temperaturze 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie próbki analizowano za pomocą RP-UFLC (ang. Reverse Phase – Ultra Fast Liquid Chromatography). Z uzyskanych rezultatów (rys. 6) wynika, iż zawartość procentowa peptydów stanowiących fragment fibrylogenny (1K oraz 1V) wynosi około 30% w stosunku do kontroli. Procentowy spadek zawartości tych peptydów w badanych próbkach może wynikać nie tylko z degradacji enzymatycznej, ale również z oddziaływań peptydów z białkami osocza bądź ich precypitacji. Niemniej bez dodatkowych badań (np. chromatografia powinowactwa) nie mamy co do tego całkowitej pewności. Zdecydowanie większą stabilnością charakteryzują się potencjalne peptydy samoorganizujące się, czyli 3V oraz 3K, a nawet peptyd przeciwdrobnoustrojowy WK13. Przy czym stężenie tego

ostatniego zmniejsza się niemal o połowę w stosunku do kontroli (rys. 6). Połączenie sekwencji WK13 z fragmentami posiadającymi tendencję do tworzenia fibryli wpływa zatem na zwiększenie stabilności i mniejszą podatność na degradację enzymatyczną.



Rysunek 6. Wykres stabilności peptydów pokazujący zależność pomiędzy zawartością procentową peptydów w badanych próbkach od czasu oddziaływania z ludzkim osoczem, kolejno dla 1V, 1K, 3V, 3K oraz WK13 w trakcie czterogodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C

Źródło: Opracowanie własne.

1.5. Analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej

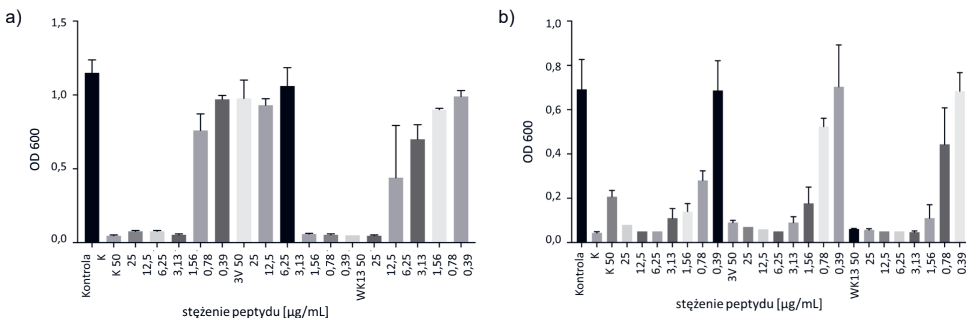
W celu sprawdzenia potencjału przeciwdrobnoustrojowego wykonano analizę aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla wszystkich peptydów. W tym celu wyznaczono wartość minimalnego stężenia hamującego (ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC) w stosunku do szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* z zastosowaniem procedury zalecanej przez Clinical Laboratory Standards Institute. Peptydy rozpuszczono w wodzie w zakresie stężeń od 50 do 0,39 µg/mL, stosując odpowiednie rozcieńczenia, a następnie dodawano do 96-dołkowej płytki wysianej odpowiednimi bakteriami. Wyniki analiz przedstawione zostały w tabeli 2. Z uzyskanych danych wynika, iż peptydy 1K oraz 1V nie powodują zahamowania wzrostu ilości obu szczepów bakterii. Natomiast zarówno peptyd 3K, jak i 3V posiadają takie właściwości przy stężeniu odpowiednio 12,5 µg/mL dla szczepu *E.coli* oraz 6,25 µg/ml dla *S.aureus*. Sama sekwencja przeciwdrobnoustrojowa – peptyd WK13 – powoduje zahamowanie wzrostu *E.coli* przy stężeniu 6,25 µg/mL a *S.aureus* 3,13 µg/mL.

Tabela 2. Analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla peptydów 1K, 3K, 1V, 3V WK13

Nr	Peptyd	MIC [µg/mL]	
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
1	1K	>50	>50
2	3K	12,5	6,25
3	1V	>50	>50
4	3V	12,5	6,25
5	WK13	6,25	3,13

Źródło: Opracowanie własne.

Na rysunku 7 przedstawiono dokładne badania MIC w zależności od stężenia dla peptydów wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową, czyli peptydów: 3K, 3V oraz WK13 w stosunku do szczepu *E. coli* (rys. 7a) oraz *S. aureus* (rys. 7b) w czasie 24-godzinnej inkubacji.



Rysunek 7. Minimalne stężenie inhibicji dla (a) peptydów 3V oraz WK13 względem *E.coli*; (b) peptydów 3K, 3V oraz WK13 względem *S.aureus*

Źródło: Opracowanie własne.

2. Dyskusja

Wszystkie pięć zaprojektowanych peptydów poddano procesowi fazylizacji, który miał na celu utworzenie przez każdy ze związków fibryli peptydowych. Kontrola procesu za pomocą testu kolorymetrycznego z ThT pokazała jednak, że nie wszystkie peptydy tworzyły fibryle. W zależności od pH środowiska reakcji proces zachodził z różną wydajnością. W warunkach zbliżonych do fizjologicznych (pH 7,4) oraz w buforze PBS o pH 4,5 tylko peptydy 1K i 3K tworzyły silne kompleksy z ThT, co potwierdzają również obrazy mikroskopowe (rys. 6.). Obserwujemy na nich fibryle

peptydowe już bezpośrednio po rozpuszczeniu w przypadku 1K oraz po 7 dniach inkubacji dla peptydu 3K. Z kolei pozostałe peptydy według testu z Tioflawiną T nie tworzą stabilnych fibryli peptydowych. Obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego pokazują jednak, że w przypadku peptydu 1V oraz 3V dochodzi do utworzenia fibryli peptydowych. Rozbieżność pomiędzy wynikami najprawdopodobniej wynika z faktu, iż do testów z ThT użyto głównie supernatantu z nad wytrąconych fibryli, natomiast druga z wykorzystanych technik daje nam pełniejszy obraz tego, co znajduje się w całej mieszaninie. Obniżenie pH środowiska spowodowało, iż proces fibrylizacji w przypadku peptydów 1K oraz 3K zachodził szybciej i z lepszą wydajnością, co sugerują wyższe wartości intensywności fluorescencji ThT. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi, które pokazują, że istotnie kwaśne środowisko sprzyja procesowi zarówno agregacji, jak i fibrylizacji. Jest to również czynnik wykorzystywany podczas projektowania nośników, ponieważ zmiana pH środowiska nie tylko może wpływać na szybkość i trwałość fibryli, ale również od niego zależy proces uwalniania substancji aktywnej (Cao i in. 2017: 7; Pranantyo i in. 2019: 20; Carratalá i in. 2020: 44).

Równolegle wykonywaliśmy testy agregacyjne, ThT oraz mikroskopowe dla samej sekwencji aktywnej. Z otrzymanych danych wynika, że niezmodyfikowana sekwencja WK13 praktycznie nie wykazuje właściwości fibrylogennych.

Oprócz potencjału fibrylogennego istotnym aspektem była odporność zaprojektowanych peptydów na degradację proteolityczną. Wykonane testy stabilności w ludzkim osoczu okazały się nieco zaskakujące. Fibryle peptydowe, czyli w tym przypadku peptydy 1K oraz 1V, powinny być bardzo stabilne i praktycznie nie ulegać degradacji, niemniej jednak podczas inkubacji z osoczem to dla nich obserwuje się największy spadek ilościowy w stosunku do kontroli. Może to być efektem asocjacji i oddziaływania z białkami osocza oraz silnej precypitacji tych związków. Odpowiedzią na tę hipotezę byłoby wykonanie testów powinowactwa, co jest planem dalszych badań. Niemniej Sawicka i in. (2021) pokazują, że dla krótkiego fragmentu fibrylogennego QAGIVV również obserwowano spadek stężenia w badaniach stabilności, a dodatkowo przeprowadzone testy powinowactwa pokazały, iż fibryle rzeczywiście oddziałują z białkami osocza i dochodzi do silnej precypitacji (Sawicka i in. 2021: 22). Przyglądając się stabilności pozostałych analogów, możemy zauważyć, że WK13 charakteryzuje się niewielką stabilnością (rys. 4), niemniej w połączeniu z sekwencjami fibrylogennymi (analog 3K oraz 3V) uzyskujemy znaczący wzrost stabilności w ludzkim osoczu (Wang 2008: 283). Uzyskany wynik jest bardzo istotny w kontekście aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Przeprowadzone badania pokazują bowiem, że nowe hybrydowe związki prowadzą do zahamowania wzrostu bakterii podobnie jak peptyd natywny. Minimalne stężenie inhibicji jest nieco wyższe i mieści się w zakresie stężeń 12,5–50 µg/mL, jednak aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest zasadniczo zachowana. Dla porównania wartości MIC dla cyklicznego peptydu bogatego w reszty lizyny (K) oraz leucyny (L) i potwierdzonej skuteczności hemolitycznej

znajduje się w wyższym przedziale stężeń (40–75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ale przeciwko aż 20 szczepom *A. baumannii* (Huang i in. 2012: 33; Chen i in. 2021: 12).

3. Podsumowanie

Dzięki przedstawionym badaniom udało nam się ustalić, że rzeczywiście krótkie, zaledwie sześćoaminokwasowe peptydy o odpowiednio dobranej i zweryfikowanej sekwencji aminokwasowej mogą determinować właściwości zdecydowanie dłuższych związków peptydowych. Są one na tyle znaczące, stabilne i trwałe, iż warunkują utrzymanie właściwości fibrylogennych ze związkami przeciwdrobnoustrojowymi. Szczególnie jeden z zaproponowanych przez nas analogów zasługuje na szczególną uwagę. Mianowicie sekwencja KLVFFA, czyli peptyd 1K, który ma silną tendencję do tworzenia fibryli, a tym samym determinuje właściwości fibrylogenne peptydu 3K. Trwałe fibryle warunkują poprawę stabilności i zwiększoną odporność na degradację enzymatyczną w stosunku do pojedynczego peptydu przeciwdrobnoustrojowego, jakim jest fragment ludzkiej katelicyny – WK13. Nasze badania wykazały, iż zaprojektowany związek 3K, który posiada jednocześnie zdolność do samoorganizacji, mimo modyfikacji nie traci zasadniczo aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

4. Metody

4.1. Synteza peptydów

Synteza została przeprowadzona przy użyciu automatycznego syntezyzatora mikrofalowego Initiator+ Alastra (Biotage®) z przepływem ciągłym na nośniku stałym i użyciu w tym celu żywicy TentaGel S RAM (Rapp Polymere) o stopniu sadzenia 0,25 mmol/g żywicy. Fmoc chronione aminokwasy użyte do syntezy zostały zakupione z firmy GL Biochem. Do reakcji sprzęgania aminokwasy rozpuszczono do stężenia 0,5 mol/dm³ w DMF (*N,N*-dimetyloformamid, POCH), a jako odczynników sprzęgających użyto 1,0 M roztwór OxymaPure (AmBeed) oraz 0,5 M roztwór DIC (*N,N'*-Diizopropylkarbodiimid, Sigma Aldrich) w DMF. Do deprotekcji wykorzystano 20% roztwór piperydiny w DMF, natomiast do przemywania peptydyżywicy podczas kolejnych etapów syntezy użyto DMF, a w finalnym etapie również DCM (chlorek metylenu, EUROCHEM BGD Sp. z o.o.). Odszczepianie peptydów od nośnika stałego wykonano z jednoczesnym usunięciem osłon w łańcuchach bocznych poszczególnych aminokwasów. Procedura została wykonana z założeniem, że na zdjęcie peptydu z 1 g żywicy potrzebne jest 10 mL roztworu ściągającego. W tym celu przygotowano łącznie 16 mL roztworu o podanym składzie: 88% TFA (kwas trifluorooctowy, Sigma Aldrich) + 2% TIPSI (triizopropyllosilan, Sigma Aldrich) + 5% fenol (Sigma Aldrich) + 5% woda (v:v:v). Ponieważ peptydy 3V, 3K oraz WK13, posiadał w swoim składzie kilka reszt arginin, proces odszczepienia peptydu od żywicy prowadziliśmy

przez 4,5 godziny. Dla 1V oraz 1K proces ten trwał 2 godziny. Następnie roztwór TFA odparowano, strącono zimnym eterem dietylowym i zliofilizowano. Oczyszczenie przeprowadzono z wykorzystaniem preparatywnego systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w fazach odwróconych (RP-HPLC, Shimadzu) na kolumnie Kromasil C8 100 Å o wymiarach 250 mm × 16 mm, wielkość ziarna 5 μm, przy przepływie 10 mL/min. i detekcji przy długości fali $\lambda = 226$ nm. Rozdział chromatograficzny prowadzono w liniowym gradiencie, dobranym w zależności od charakteru peptydu. Fazę ruchomą stanowił układ rozpuszczalników: A = 0,1% TFA w wodzie (v:v) i B = 80% ACN w wodzie z 0,1% TFA (v:v). Następnie peptydy scharakteryzowano, wykorzystując RP-HPLC (Shimadzu) z kolumną analityczną Jupiter 4 μm Proteo 90 Å o wymiarach 250 × 4,6 mm (Phenomenex) w gradiencie 5-100% układu B przy przepływie 1 ml/min oraz długości fali 223 nm oraz spektrometrii mas (LC-MS) ESI IT ToF (Shimadzu) na kolumnie Kromasil C8, 5 μm 100 Å o wymiarach 1 mm × 250 mm (Phenomenex), przy długości fali 223 nm w gradiencie 3-100% układu B przy przepływie 1 mL/min w czasie 30 min lub MALDI-TOF/TOF Autoflex[®]maX (Bruker).

4.2. Fibrylizacja peptydów

Wszystkie peptydy rozpuszczono w probówkach typu Eppendorf w roztworach: PBS pH 7,4 lub octanie amonu o pH 4,5 w zależności od eksperymentu do stężenia 1,0 mg/mL. Następnie peptydy inkubowano w temperaturze 37°C z ciągłym wytrząsaniem.

4.3. Test fluorescencji z Tioflawiny T

Z roztworów peptydów inkubowanych w warunkach podanych w punkcie 4.2 po upływie 0, 1, 2, 3, 4 oraz 7 dni inkubacji pobierano po 20 μL i dodano 10 μL 1,6 mM ThT w wodzie oraz 80 μL PBS pH 7,4 lub 80 μL octanu amonu pH 4,5 w zależności od warunków fibrylizacji. 96-dołkową płytkę (Costar 96 Flat Black[®]) inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C, a następnie poddawano pomiarowi intensywności fluorescencji ThT w czytniku płytek Infinite 200 Pro firmy TECAN[®], wykorzystując pasmo wzbudzenia przy 420 nm i emisji w zakresie od 455 do 599 nm. Maksimum emisji przy 480 nm. Inkubacje wykonano trzykrotnie, a prezentowane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z przeprowadzonych pomiarów.

4.4. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Próbki peptydów (1 μL) o stężeniu 1 mg/ml pobranych bezpośrednio po rozpuszczeniu w roztworze PBS o pH 7,4 (T = 0 dni) oraz po 7 dniach inkubacji (T = 7 dni) nałożono na siatkę celulozową (FCU300Cu, Microshop), a następnie wybarwiono 1,5% (v/v) wodnym roztworem octanu uranylu i analizowano w aparacie TECNAI

SPIRIT BIO TWIN FEI przy 120 kV. Zdjęcia zostały zarejestrowane na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej.

4.5. Test stabilności peptydów w ludzkim osoczu

Testy stabilności peptydów wykonano za pomocą dwóch procedur: a) z wykorzystaniem 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) i b) mieszaniny 6 M mocznika w kwasie mrówkowym i wodzie jako odczynników strącających. Procedurę a) wykorzystano dla peptydów 1V i 1K, procedurę b) dla 3V, 3K oraz WK13. Wszystkie peptydy rozpuszczono w wodzie do stężenia 0,625 mg/mL, a następnie dodano 300 μ L 25% serum i inkubowano w termomikserze Thermomixer comfort (Eppendorf) w temperaturze 37°C z jednoczesnym wytrząsaniem (400 RPM). Po upływie 0, 1, 2, 3, 4 godzin inkubacji pobierano po 100 μ L inkubowanego peptydu, dodając:

- a) 25 μ L 15% roztworu TCA, tak aby stężenie końcowe peptydów wynosiło 0,3125 μ L/mL;
- b) 25 μ L mieszaniny 6 M mocznika/kwasu mrówkowego/wody (70:20:8 v:v:v).

Pobierane próbki następnie pozostawiano na 10 min w lodzie i wirowano przy użyciu wirówki BECKMAN COULTER (Microfuge[®]) przy obrotach wynoszących 14 000 RPM w czasie 10 min. Kolejno pobrano 80 μ L supernatantu i analizowano przy użyciu RP-UFLC (Shimadzu) na kolumnie Jupiter 4 μ , 90 Å o wymiarach 150 mm \times 2 mm w gradiencie 1-80% układu B w 20 min dla peptydów 1V, 1K oraz 1-50% układu B w 20 min dla 3V, 3K, WK13 z detekcją przy $\lambda = 223$ nm. Jako kontrolę stanowiły roztwory peptydów w wodzie bez dodatku osocza. Inkubację wykonano trzykrotnie, a prezentowane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z przeprowadzonych pomiarów. Wyniki przedstawiono jako zależność procentowej zawartości badanych związków od czasu inkubacji.

4.6. Minimalne stężenie inhibicyjne

Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków (peptydów) przeprowadzono, opierając się na metodzie seryjnych rozcieńczeń z wykorzystaniem sterylnych płytek 96-dołkowych. Badania przeprowadzono dla wybranych referencyjnych szczepów bakterii *Escherichia coli* PCM 2057 oraz *Staphylococcus aureus* PCM 2054. Do badań zastosowano pożywkę Mueller-Hinton. Wpływ peptydów w stężeniach od 0,78 do 100 μ g/ml na mikroorganizmy analizowano po 24 godzinach inkubacji związków w temperaturze 37°C z zawiesiną bakterii (10^5 CFU/ml; ang. *colony forming units*, CFU). Ilościową ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych przeprowadzono, wykonując pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Perkin Elmer. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano hodowlę bakteryjną bez dodatku peptydów, z kolei niezaszczepioną pożywkę wykorzystano jako kontrolę negatywną. Wszystkie pomiary wykonano co najmniej trzykrotnie.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową przedstawiono jako minimalne stężenie hamujące w 100% widoczny rozwój mikroorganizmów (MIC).

Bibliografia

- Bolhassani A., 2011, *Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer*, „Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer”, Vol. 1816.
- Brogden K.A., 2005, *Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?*, „Nature Reviews Microbiology”, Vol. 3.
- Cao J., Zhang Y., Shan Y., Wang J., Liu F., Liu H., Xing G., Lei J., Zhou J., 2017, *A pH-dependent Antibacterial Peptide Release Nano-system Blocks Tumor Growth in vivo without Toxicity*, „Scientific Reports”, Vol. 7.
- Carratalá J.V., Serna N., Villaverde A., Vazquez E., Ferrer-Miralles N., 2020, *Nanostructured antimicrobial peptides: The last push towards clinics*, „Biotechnology Advances”, Vol. 44.
- Chaberska A., Rosiak P., Kamiński Z.J., Kolesińska B., 2017, *Rusztowania scaffolds stosowane w medycynie Regeneracyjnej*, „Wiadomości Chemiczne”, Vol. 71.
- Chen S.P., Chen E.H-L., Yang S.Y., Kuo P.S., Yang T.C., Hsieh M.Y., Lee K.T., Lin C.H., 2021, *A Systematic Study of the Stability, Safety, and Efficacy of the de novo Designed Antimicrobial Peptide PepD2 and Its Modified Derivatives Against Acinetobacter baumannii*, „Frontiers in Microbiology”, Vol. 12.
- Chen W., Yang S., Li S., Lang J.C., Mao C., Kroll P., Tang L., Dong H., 2019, *Self-Assembled Peptide Nanofibers Display Natural Antimicrobial Peptides to Selectively Kill Bacteria without Compromising Cytocompatibility*, „ACS Applied Materials and Interfaces”, Vol. 11.
- Dürr U.H.N., Sudheendra U., Ramamoorthy A., 2006, *LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides*, „Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes”, Vol. 1758.
- Fjell C.D. Hiss J., Hancock R., Schneider G., 2012, *Designing antimicrobial peptides: form follows function*, „Nature Reviews Drug Discovery”, Vol. 11.
- Goldschmidt L., Teng P., Riek R., Eisenberg D., 2010, *Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid like fibrils*, „PNAS USA”, Vol. 107.
- Gonçalves S., Silva P., Felício M., de Medeiros L., Kurtenbach E., Santos N., 2017, *Psd1 effects on Candida albicans planktonic cells and biofilms*, „Frontiers in Cellular and Infection Microbiology”, Vol. 7.
- Hancock R.E.W. i Chapple D.S., 1999, *Peptide Antibiotics*, „Antimicrobial Agents and Chemotherapy”, Vol. 43 (6).
- Henc I., Bryl E., 2013, *Chemokiny jako ważne mediatory stanu zapalnego*, „Forum Medycyny Rodzinnej”, Vol. 7.
- Hosseinkhani H., Hong P.D., Yu D.-S., 2013, *Self-Assembled Proteins and Peptides for Regenerative Medicine*, „Chemical Reviews”, Vol. 113.
- Huang Y., Wiradharma N., Xu K., Ji Z., Bi S., Li L., Yang Y.Y., Fan W., 2012, *Cationic amphiphilic alpha-helical peptides for the treatment of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infection*, „Biomaterials”, Vol. 33.
- Huang Y., Huang J., Chen Y., 2010, *Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function*, „Protein and Cell”, Vol. 1.
- Iłowska E., Barciszewski J., Jaskólski M., Moliński A., Kozak M., Szymańska A., 2022, *Identification of a Steric Zipper Motif in the Amyloidogenic Core of Human Cystatin C and Its Use for the Design of Self-Assembling Peptides*, „International Journal of Molecular Sciences”, Vol. 23.

- Kumada Y., Zhang S., 2010, *Significant type I and type III collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3d peptide scaffolds without extra growth factors*, „PLOS ONE”, Vol. 5.
- Lee S., Trinh T.H.T., Yoo M., Shin J., Lee H., Kim J., Hwang E., Lim Y.B., Ryou C., 2019, *Self-assembling peptides and their application in the treatment of diseases*, „International Journal of Molecular Sciences”, Vol. 20.
- Mahlapuu M., Hakansson J., Ringstad L., Bjorn C., 2016, *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents*, „Frontiers in Cellular and Infection Microbiology”, Vol. 6.
- Maji S.K., Schubert D., Rivier C., Lee S., Rivier J., Riek R., 2008, *Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs*, „PLOS Biology”, Vol. 6.
- Makowska M., Prahł A., Małuch I., 2019, *Charakterystyka peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz wpływ modyfikacji chemicznych na modulowanie ich aktywności biologicznej*, „Postępy Biochemii”, Vol. 65.
- Magana M., Pushpanathan M., Santos A.L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., Giulianotti M.A., Apidianakis Y., Bradfute S., Ferguson A.L., Cherkasov A., Seleem M.N., Pinilla C., Fuente-Nunez C., Lazaridis T., Dai T., Houghten R.A., Hancock R.W., Tegos G.P., 2020, *The value of antimicrobial peptides in the age of resistance*, „The Lancet Infectious Diseases”, Vol. 20.
- Mankar S., Anoop A., Sen S., Maji S., 2011, *Nanomaterials: amyloids reflect their brighter side*, „Nano Reviews”, Vol. 2.
- Marini D.M., Hwang W., Lauffenburger D.A., Zhang S., Kamm R.D., 2002, *Left-Handed Helical Ribbon Intermediates in the Self-Assembly of a β -Sheet Peptide*, „Nano Letters”, Vol. 2.
- Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Madsen A., Riekel C., Grothe R., Eisenberg D., 2005, *Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils*, „Nature”, Vol. 435.
- O'Neill J., 2016, *Tackling drug – resistant infections globally: final report and recommendations*, „Review on Antimicrobial Resistance”, May.
- Perez M., Santa-María I., Tortosa E., Cuadros R., Valle M.D., Hernández F., Moreno F.J., Avila J., 2007, *The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation*, „Journal of Neurochemistry”, Vol. 103.
- Pranantyo D., Liu P., Zhong W., Kang E.T., Chan-Park M.B., 2019, *Antimicrobial Peptide-Reduced Gold Nanoclusters with Charge Reversal Moieties for Bacterial Targeting and Imaging*, „Biomacromolecules”, Vol. 20.
- Rajagopal K., Schneider J.P., 2004, *Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications*, „Current Opinion in Structural Biology”, Vol. 14.
- Sawicka J., Iłowska E., Deptuła M., Sosnowski P., Sass P., Czerwiec K., Chmielewska K., Szymańska A., Pietralik-Molińska Z., Kozak M., Sachadyn P., Piikuła M., Rodzewicz-Motowidło S., 2021, *Functionalized peptide fibrils as a scaffold for active substances in wound healing*, „International Journal of Molecular Sciences”, Vol. 22.
- Singh A., Bhattacharya R., Shakeel A., Sharma A.K., Jeevanandham S., Kumar A., Chattopadhyay O.S., Bohidar H.B., Ghosh S., Chakrabarti S., Rajput S.K., Mukherjee M., 2019, *Hydrogel nanotubes with ice helices as exotic nanostructures for diabetic wound healing*, „Materials Horizons”, Vol. 6.
- Smith J.F., Knowles T., Dobson C., Macphee C., Weland M., 2006, *Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils*, „PNAS”, Vol. 103 (43).
- Wang G., 2008, *Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles*, „The Journal of Biological Chemistry”, Vol. 283.
- Wang G., Narayana J.L., Mishra B., Zhang Y., Wang F., Wang C., Zarena D., Lushnikova T., Wang X., 2019, *Design of antimicrobial peptides: Progress made with human cathelicidin LL-37*, „Advances in Experimental Medicine and Biology”, Vol. 1117.

Wei G., Su Z., Reynolds N.P., Arosio P., Hamley I.W., Gazitf E., Mezzenga R., 2017, *Self-assembling peptide and protein amyloids: From structure to tailored function in nanotechnology*, „Chemical Society Reviews”, Vol. 46.

Xue C., Lin T.Y., Chang D., Guo, Z. 2017, *Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation*, „Royal Society Open Science”, Vol. 4(1).

Yan S.J., Zhan S., 2006, *Self-assembling Behavior of Designer Lipid-like Peptides*, „Supramolecular Chemistry”, Vol. 18.

Zhang S., 2002, *Emerging biological materials through molecular self-assembly*, „Biotechnology Advances”, Vol. 20.

Biogramy

Milena Czeszejko – absolwentka studiów magisterskich Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (Analityka i Diagnostyka). Swoje badania z zakresu chemii peptydów prezentowała na międzynarodowej konferencji „Scientific-professional conference on Environmental protection” w Splicie. Jej zainteresowania naukowe to chemia organiczna oraz farmakologia.

Kamil Klimkowski – absolwent studiów magisterskich Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, jego zainteresowania naukowe skupione są wokół chemicznych syntez peptydów, ich analiz oraz możliwości wykorzystania w medycynie. Autor kilku wystąpień ustnych oraz prezentacji posterowych z dziedziny chemii organicznej.

Emilia Howska – doktor inżynier, adiunkt w Katedrze Chemii Organicznej na wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Absolwentka wydziału Chemii UG (kierunek Chemia) oraz Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (kierunek Technologia Chemiczna). Kierownik grantu PRELUDIUM, beneficjentka wielu grantów dedykowanych młodym naukowcom. Interesuje się chemią peptydów, w szczególności peptydowymi, fibrylogennymi systemami dostarczania leków, medycyną regeneracyjną oraz chorobami neurodegeneracyjnymi.

Milena Czeszejko – a graduate of the Master’s studies at the Faculty of Chemistry at the University of Gdańsk (Analytics and Diagnostics). She presented her research in the field of peptide chemistry at the international conference „Scientific-professional conference on Environmental protection” in Split. Her scientific interests include organic chemistry and pharmacology.

Kamil Klimkowski – a graduate of the Master’s studies at the Faculty of Chemistry at the University of Gdańsk. His research interests are focused on chemical syntheses of peptides, their analyzes and the possibilities of their use in medicine. Author of several oral and poster presentations in the field of organic chemistry.

Emilia Howska – PhD in engineering; an assistant professor at the Department of Organic Chemistry at the Faculty of Chemistry UG. MSc Graduate from the Faculty of Chemistry UG (majoring in Chemistry) and the Faculty of Chemistry, the Gdansk University of Technology (majoring in Chemical Technology). Principal Investigator and leader of the PRELUDIUM project, beneficiary of many grants dedicated to young scientists. She is interested in peptide chemistry, especially in peptide-based fibrillogenic drug delivery systems, regenerative medicine and neurodegenerative diseases.