

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Anita Romanowska

**PROJEKTOWANIE, SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE
PEPTYDOMIMETYKÓW ZAWIERAJĄCYCH SFUNKCJONALIZOWANE
RESZTY
KWASU L-2,3-DIAMINOPROPIONOWEGO**

Promotorzy:

dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG
dr hab. Agnieszka Piwkowska, prof. IMDiK

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej

Gdańsk 2022

Składam serdeczne podziękowania dr hab. Magdalenie Wysockiej, prof. UG za okazaną życzliwość, ogromne zaangażowanie, poświęcony czas oraz nieocenione wsparcie na każdym etapie mojej kariery naukowej.

Jednocześnie bardzo dziękuję dr hab. Agnieszce Piwkowskiej, prof. IMDiK za pomoc, cenne rady, a także za naukę prowadzenia hodowli komórkowej. Bez tej umiejętności powstanie niniejszej rozprawy byłoby niemożliwe.

Serdecznie dziękuję prof. Adamowi Lesnerowi za poświęcony czas na rozwiązywanie pojawiających się problemów, udzielone wskazówki merytoryczne oraz możliwość stałego rozwoju naukowego.

SPIS TREŚCI

SUMMARY	6
STRESZCZENIE	7
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	9
I. PRZEGLĄD LITERATUROWY:	11
1. Wprowadzenie	11
2. Błona komórkowa.....	12
2.1. Budowa oraz funkcja błony komórkowej	12
2.2. Związki transportowane przez błony komórkowe.....	13
2.3. Różnice w budowie błony cytoplazmatycznej komórek zdrowych i nowotworowych	15
3. Peptydy penetrujące błony komórkowe	17
3.1. Podział CPP	18
3.1.1. CPP kationowe	19
3.1.2. CPP amfipatyczne	20
3.1.3. CPP hydrofobowe.....	22
3.2. Mechanizmy penetracji błon komórkowych wykorzystywane przez CPP	22
3.2.1. Transport bezpośredni	23
3.2.2. Endocytoza	24
3.3. Sposób przyłączenia efektora do CPP	28
3.4. Zastosowanie CPP w badaniach	30
3.5. Peptydy penetrujące błony komórkowe zawierające liczne reszty argininy	32
4. Związki zawierające liczne ugrupowania guanidynowe	34
5. Związki zdolne do tworzenia oddziaływań z DNA.....	39
6. Związki posiadające zdolność do kondensacji DNA	44
7. Pochodzenie związków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3- diaminopropionowego	47
8. Wybrane metody analityczne wykorzystywane w pracy	50
8.1. Mikroskopia sił atomowych.....	50
8.1.1. Zasada działania	50
8.1.2. Tryby pracy AFM.....	51
8.1. Termoforeza w mikroskali	53
8.2.1. Zasada działania	53
8.3. Powierzchniowy rezonans plazmonowy.....	55
8.3.1. Zasada działania	56
II. CEL PRACY.....	59
III. METODOLOGIA PRZEPROWADZONYCH BADAŃ.....	72
1. Synteza chemiczna peptydomimetyków	72
1.1. Automatyczna synteza mikrofalowa	72
1.2. Synteza związków numer 1a, 2a, 3a	73
1.3. Synteza związków nieznakowanych fluorescencyjnie numer 4 – 11	74
1.3.1. Synteza manualna	75
A) Usuwanie osłony ivDde.....	75
B) Przyłączanie pochodnych do łańcuchów bocznych związku	76
C) Usuwanie osłony Fmoc z N-końca peptydomimetyków	77
D) Odłączanie peptydomimetyków od żywicy.....	77
1.4. Synteza związków numer 22 i 23	78
1.4.1. Synteza manualna	79
A) Przyłączenie biotyny do N-końca peptydomimetyku	79
1.5. Synteza związków znakowanych fluorescencyjnie numer 4a – 21a.....	79
1.5.1. Synteza manualna	81

A) Usuwanie osłony Mtt.....	81
B) Acylowanie pochodnych do łańcucha bocznego związków.....	81
<i>Procedura przekształcenia soli DCHA (dicykloheksyloamoniowej) do wolnego kwasu</i>	82
C) Przyłączanie fluoroforów do N-końca peptydomimetyków	84
2. Analiza MS MALDI-TOF utworzonych peptydomimetyków	86
3. Analiza UPLC zsyntezowanych związków	86
4. Badania biologiczne.....	87
4.1. Hodowla komórkowa.....	87
4.1.1. Test stosowany do oceny cytotoksyczność: MTT	87
4.1.2. Mikroskopia fluorescencyjna - ocena penetracji błon komórkowych przez peptydomimetyki	88
4.2. Ocena oddziaływań międzycząsteczkowych oraz badania biologiczne wykonane z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2 i MDA-MB-231	93
4.2.1. Test Cell Counting Kit-8 stosowany do oceny cytotoksyczności	93
4.2.2. Test oceny proliferacji komórek.....	93
4.2.3. Test oceny stabilności związków numer 8 , 10 oraz 11 w lizatach komórkowych	96
4.2.4. Cytometria przepływowa – badania dotyczące cyklu komórkowego	96
4.2.5. Inhibitory endocytozy.....	98
4.3. Żel poliakrylamidowy wykonany dla kompleksów utworzonych z DNA	99
4.4. Termoforeza w mikroskali (MST)	99
4.5. Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR)	100
4.6. Elektroforeza w żelu agarozowym.....	101
4.6.1. Tworzenie kompleksów pomiędzy peptydomimetykami, a plazmidowym DNA	101
4.7. Mikroskopia sił atomowych (AFM)	101
4.8. Transfekcja	102
4.9. Modelowanie teoretyczne - symulacje samoorganizacji atomów.....	103
4.10. Zastosowanie peptydomimetyków do wewnątrzkomórkowego transportu białek (badania z wykorzystaniem komórek piersi linii: HB2, MDA-MB-231, SK-Br-3 i T47D)	104
4.10.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych	104
A) Tworzenie kompleksów pomiędzy biotynylowanymi peptydomimetykami, a FAM-streptawidyną.....	104
4.10.2. Tworzenie kompleksu FAM-Streptawidyna z biotynylowanym peptydomimetykiem – inkubacja z liniami komórkowymi	105
4.10.3. Test oceny cytotoksyczności związków i ich kompleksów z FAM-streptawidyną i streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą	106
4.10.4. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych dla białek o charakterze zasadowym.....	107
A) Tworzenie kompleksów pomiędzy biotynylowanymi peptydomimetykami, a streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą	107
4.10.5. Tworzenie kompleksu streptawidyna- β -galaktozydaza z biotynylowanym peptydomimetykiem - inkubacja z liniami komórkowymi.....	108
A) Badanie aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy w lizatach komórkowych	109
B) Test na obecność β -galaktozydazy w liniach komórkowych.....	110
4.11. Badanie właściwości penetrujących peptydomimetyków wobec błon cytoplazmatycznych pozostałych linii komórkowych.....	111
4.11.1. Wpływ zsyntezowanych związków na proliferację komórek	112
4.11.2. Test na obecność kaspazy-3 w liniach komórkowych	112
IV. WYNIKI.....	114
1. Związki zsyntezowane w ramach rozprawy doktorskiej	114
2. Wyniki otrzymane z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2 i MDA-MB-231. 121	121

2.1. Cytotoksyczność peptydomimetyków względem linii komórkowych piersi HB2 oraz MDA-MB-231.....	121
2.2. Zdolności przenikania przez błonę komórkową zsyntezowanych peptydomimetyków.....	123
2.3. Wpływ peptydomimetyków na proliferację komórek linii HB2 i MDA-MB-231.....	130
2.4. Stabilność związków 8, 10 oraz 11 w lizatach komórkowych.....	132
2.5. Wpływ peptydomimetyków na przebieg cyklu komórkowego komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231.....	134
2.6. Mechanizmy wykorzystywane podczas przenikania związków przez błony biologiczne – zastosowanie inhibitorów endocytozy.....	136
3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym dla kompleksów utworzonych z DNA	139
4. Termoforeza w mikroskali (MST) – badanie oddziaływań peptydomimetyków z DNA	140
5. Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) – badanie oddziaływań peptydomimetyków z DNA.....	142
6. Elektroforeza w żelu agarozowym dla kompleksów utworzonych z plazmidowym DNA	145
7. Mikroskopia sił atomowych (AFM) – organizacja struktur utworzonych z plazmidowym DNA	146
8. Transfekcja za pośrednictwem peptydomimetyków	149
9. Wyniki uzyskane dzięki modelowaniu teoretycznemu.....	151
10. Wewnątrzkomórkowy transport białek za pośrednictwem peptydomimetyków (badania z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2, MDA-MB-231, SK-Br-3 i T47D).....	153
10.1. Zastosowanie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych celem potwierdzenia obecności kompleksów – biotynylowany peptydomimetyk : FAM-streptawidyną.....	153
10.2. Transport streptawidyny znakowanej fluorescencyjnie do wnętrza komórek przy użyciu peptydomimetyków	155
10.3. Zastosowanie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych dla białek o charakterze zasadowym celem potwierdzenia obecności kompleksów - biotynylowany peptydomimetyk : streptawidyno β -galaktozydaza.....	160
10.4. Ocena aktywności enzymatycznej β -gal w lizatach komórkowych komórek inkubowanych z kompleksem streptawidyna- β -gal : biotynylowany peptydomimetyk	162
10.4.1. Badanie obecności β -galaktozydazy we wnętrzu komórek.....	168
11. Zdolności przenikania przez błonę komórkową zsyntezowanych peptydomimetyków wobec pozostałych linii komórkowych	172
11.1. Cytotoksyczność peptydomimetyków względem badanych linii komórkowych	172
11.2. Ocena właściwości penetrujących związków wobec błon cytoplazmatycznych – obserwacje mikroskopowe	174
11.2.1. Linie komórkowe nowotworu piersi: SKBr3 i T47D.....	174
11.2.2. Linie komórkowe pęcherza moczowego.....	175
11.2.3. Linie komórkowe skóry	176
11.2.4. Podocyty szczurze	177
11.2.5. Makrofagi białaczki mysiej	177
11.3. Wpływ peptydomimetyków na proliferację komórek.....	179
11.4. Wpływ peptydomimetyków na aktywację kaspazy 3 w wybranych liniach komórkowych	180
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	183
VI. DOROBEK NAUKOWY	186
VII. LITERATURA CYTOWANA.....	188
WYKAZ RYSUNKÓW	198
WYKAZ TABEL	202

Summary

Cell penetrating peptides (CPPs) are short peptides containing 5 – 30 amino acids residues. CPPs are able to cross plasma membranes without disturbing its function, and even assist other biological molecules in translocation into cell.

The aim of this doctoral dissertation was synthesis and biological evaluation of novel class of cell penetrating peptidomimetics. A set of compounds containing various numbers of L-2,3-diaminopropionic acid (Dap) residues connected through the peptide bond was synthesized. Each β -amino group of Dap residue was coupled with oxa-acids functionalized with a guanidine, $-\text{NH}_2$ or $-\text{OH}$ moiety. Synthesized peptidomimetics were fluorescently labeled or contained free N-terminus.

Cytotoxicity tests confirmed that compounds at the concentration used in the cell experiments (10 μM) are not toxic. First, the ability to penetrate the cell membrane of each synthesized compound was investigated. Obtained peptidomimetics were incubated with breast cell lines: healthy – HB2, cancer – MDA-MB-231 for 24 hours and their uptake by the cell efficiency was evaluated under fluorescent microscope. Peptidomimetics consisting of six or eight guanidine moieties were able to effectively cross the cell membrane. In this process the crucial factor is the number of guanidine groups. Replacement of any guanidine group in peptidomimetics structure resulted in the shift of their biological activity. The exchange to amino group weakened their penetrating properties and the replacement to hydroxyl group resulted in complete activity loss. Most potent peptidomimetics were capable of locating themselves inside various cell lines of breast, skin, bladder, murine macrophage and rat podocytes. Mixed mechanism is used during penetration of biological membranes which is the combination of endocytosis and direct transport. Additionally, this group of compounds did not influence a cell cycle of above-mentioned cell lines.

In the next step, interaction between most potent peptidomimetics and nucleic acid were investigated by means of MST, SPR and electrophoresis. Tested compounds interact with ssDNA and dsDNA in micromolar range. The strength of this interaction correlates with the number of guanidine groups present in peptidomimetics sequence. Further the interaction of selected compounds with plasmid DNA was tested by AFM technique. The obtained results indicated that peptidomimetics with multiple guanidine moieties caused formation of large structures, which complexity depends on number of guanidine groups. In consequence such compounds were able to condensate DNA and diminish its charge and could mediate its transport to the cell.

What is more tested peptidomimetics can also mediate protein intracellular transport. It is effective for labelled inert protein and enzymatic active molecule.

Streszczenie

Peptydy penetrujące błony komórkowe (ang. *Cell penetrating peptides*, CPP) to krótkie związki zawierające w sekwencji od 5 do 30 reszt aminokwasowych. CPP posiadają zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne nie powodując zakłócenia ich funkcji, pośredniczą one również w wewnątrzkomórkowym transporcie innych związków biologicznie czynnych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza oraz badania biologiczne nowej klasy peptydomimetyków penetrujących błony komórkowe. Wykonano syntezę analogicznych związków zawierających w sekwencji reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego połączone wiązaniem peptydowym. Grupy β -aminowe każdej z reszt Dap zostały zmodyfikowane poprzez przyłączenie oksakwasów sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem guanidynowym, grupą aminową lub hydroksylową. Związki znakowane były fluorescencyjnie lub posiadały wolny N-koniec.

W pierwszym etapie przeprowadzono testy oceny cytotoksyczności, które potwierdziły, iż związki te, w stężeniu 10 μ M, nie są toksyczne wobec analizowanych linii komórkowych. Następnie zostały zbadane zdolności penetrujące zsyntezowanych peptydomimetyków wobec błon komórkowych. W tym celu związki poddano 24-godzinnej inkubacji z liniami komórkowymi piersi: zdrowymi – HB2 oraz nowotworowymi – MDA-MB-231. Wykonane obserwacje mikroskopowe potwierdziły, iż związki zawierające w sekwencji 6 lub 8 ugrupowań guanidynowych najefektywniej wnikają do wnętrza komórek. Ugrupowanie guanidynowe jest decydującym czynnikiem w przenoszeniu peptydomimetyków przez błony biologiczne. Zastąpienie ich resztą aminową $-\text{NH}_2$ powodowało znaczne zmniejszenie właściwości penetrujących, natomiast zamiana ich na reszty hydroksylowe $-\text{OH}$ skutkowała całkowitym zanikiem zdolności do przenikania przez błony cytoplazmatyczne. Peptydomimetyki najefektywniej penetrujące membrany biologiczne wnikają do wnętrza większości badanych linii komórkowych piersi, pęcherza moczowego, skóry, a także podocytów szczurzych oraz makrofagów białaczki mysiej. W tym celu stosują mieszany mechanizm penetracji błon biologicznych, wykorzystując endocytozę oraz transport bezpośredni. Dalsze badania biologiczne wykazały, że peptydomimetyki nie wpływają znacząco na przebieg cyklu komórkowego wyżej wymienionych linii komórkowych.

W kolejnym etapie zostały przeprowadzone badania wykorzystujące techniki elektroforetyczne, MST oraz SPR, które potwierdziły tworzenie się oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami zawierającymi ugrupowania guanidynowe, a jednoniciowym oraz dwuniciowym fragmentem DNA w zakresie mikromolowym. Siła tworzących się oddziaływań związana jest z ilością grup guanidynowych w sekwencji związków i rośnie wraz ze wzrostem ich liczby. Następnie sprawdzony został wpływ utworzonych peptydomimetyków na kondensację plazmidowego DNA przy użyciu techniki AFM. Uzyskane wyniki wskazują, iż związki zawierające w sekwencji liczne ugrupowania guanidynowe powodują powstawanie większych struktur, których złożoność rośnie wraz ze wzrostem liczby ugrupowań guanidynowych. W konsekwencji dochodzi do kondensacji plazmidowego DNA oraz do zmniejszenia wartości jego ładunku, w związku z czym zsyntezowane peptydomimetyki mogą pośredniczyć w transporcie DNA do wnętrza komórek.

Ponadto, zsyntezowane peptydomimetyki mogą być również mediatorem w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu białek. Dotyczy to zarówno znakowanych cząsteczek nieposiadających aktywności biologicznej, jak i tych wykazujących działanie enzymatyczne.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

Część literaturowa

- ABZ** – kwas 2-aminobenzoowy
- AFM** – mikroskopia sił atomowych
- ANB** – kwas 5-amino-2-nitrobenzoowy
- ATP** – adenzyno-5'-trifosforan
- BBB** – bariera krew – mózg
- CK-2** – kinaza serynowo-treoninowa
- CNT** – nanorurki węglowe
- CPD** – polidisulfidy penetrujące błony komórkowe
- CPP** – peptydy penetrujące błony komórkowe
- CXCR4** – receptor chemokin typu 4
- Dap** – kwas 2,3-diaminopropionowy
- Dox** – dokсорubicyna
- EGFR** – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
- EPR** – zwiększona retencja i przepuszczalność
- GAG** – glikoaminoglikany
- Gdm+** – kation guanidynowy
- GLUT** – transportery glukozy
- GNP** – nanocząstki złota
- GPNA** - peptydowy kwas nukleinowy zawierający ugrupowania guanidynowe
- GTP** – guanozyno-5'-trifosforan
- Hep** – heparyna
- HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności
- HNE** – ludzka elastaza neutrofilowa
- hNSP4** – neutrofilowa ludzka proteaza serynowa 4
- MD** – dynamika molekularna
- MDM2** – ligaza białkowa ubikwityny E3
- NLS** – sygnał lub sekwencja lokalizacji jądrowej
- ON** – oligonukleotydy
- PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących
- PDB** – baza danych o białkach
- PEG** – glikol polietylenowy
- PNA** – peptydowy kwas nukleinowy
- PR3** – proteinaza 3
- RU** – jednostki odpowiedzi
- RVG** – glikoproteiny wirusa wścieklizny
- SPM** – mikroskopia sił atomowych
- SPR** – powierzchniowy rezonans plazmonowy
- STM** – skaningowy mikroskop tunelowy
- TLR** – receptory toll podobne
- TRIC** – zmiana intensywności związana z temperaturą
- VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego

Część doświadczalna

AFC – 7-amino-4-trifluorometylokumaryna

APS – nadsiarczan amonu

Boc – osłona tert-butyloksykarbonylowa

BSA – surowicza albumina wołowa

Bt – biotyna

CCA – kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamnio]-1-propanosulfonian

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en

DCM – dichlorometan

DHB – kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy

DIC – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid

DIPEA – diizopropylloetyloamina

DMF – dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DTT – 1,4-ditiotreitol

EDT – etano-1,2-ditiol

EDTA – kwas wersenowy

EdU – 5-etynylo-2'-deoksyurydyna

FBS – płodowa surowica bydłęca

Fmoc – osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa

GO1 – kwas 5-guanidyno-3-oksapentanowy

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

HBTU – heksafluorofosforan-O-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy

HEPES – kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy

HO1 – kwas 5-hydroksy-3-oksapentanowy

HO2 – kwas 8-hydroksy-3,6-dioksaoktanowy

ivDde – 1-(4,4-dimetylo-2,6-dioksocykloheks-1-ylideno)izowaleryl

MES – kwas 2-(*N*-morfolino)etanosulfonowy

MTT – bromek (3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy

Mtt – osłona 4-metylotrytylowa

NMP – *N*-metylopirolidon

NP-40 – nonylofenoksylietoksyletanol

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

O1 – kwas 5-amino-3-oksapentanowy

O2 – kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy

Pbf – osłona 2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzofurano-5-sulfonowa

PBS – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami

TBTU – tetrafluoroboran-O-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetraetylouronianu

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina

TFA – kwas trifluoroctowy

WST-8 – sól sodowa 2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazoliowa

I. Przegląd literaturowy:

1. Wprowadzenie

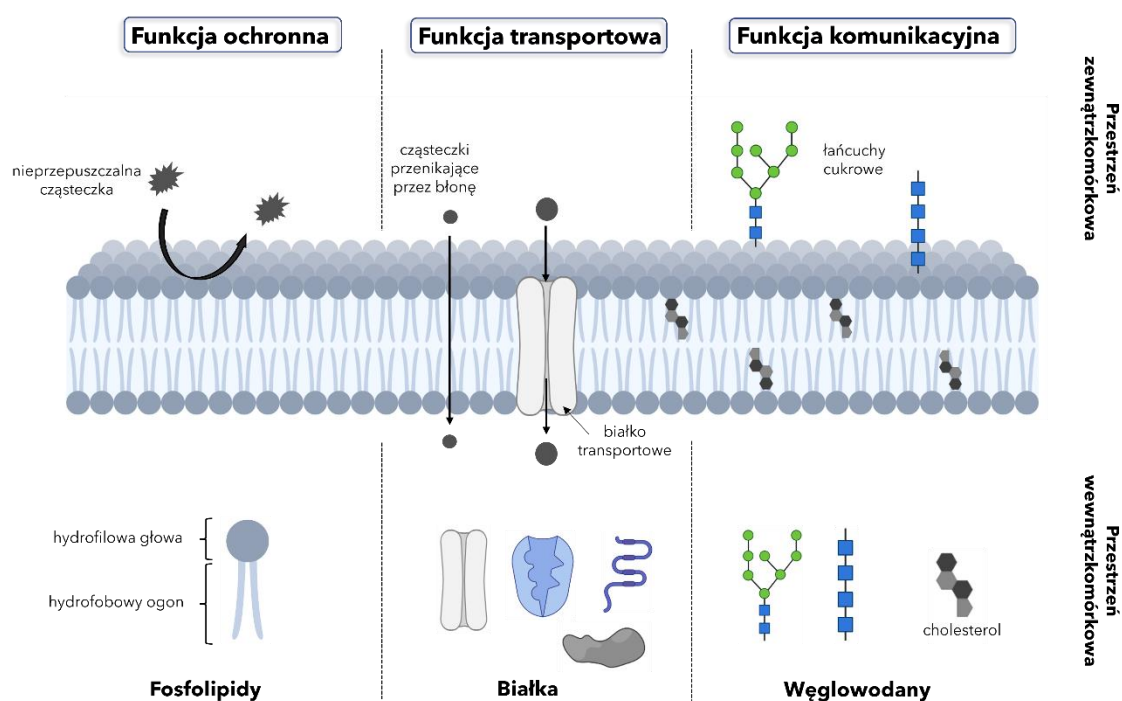
Nieustający rozwój cywilizacji przyczynia się do powstawania nowych chorób, na które medycyna poszukuje innowacyjnych rozwiązań. W wielu rodzajach terapii farmakologicznych coraz częściej wykorzystuje się związki wielkocząsteczkowe. Powodowane jest to ich zdolnością do rozpoznawania określonych struktur wewnątrzkomórkowych oraz włączania się do danych ścieżek metabolicznych, co wpływa na funkcje życiowe całej komórki. Białka oraz kwasy nukleinowe są związkami aktywnymi biologicznie, jednak ich użycie może być utrudnione zważywszy na ograniczoną przepuszczalność błony cytoplazmatycznej. Obecność tej hydrofobowej dwuwarstwy fosfolipidowej zapewnia komórce ochronę oraz umożliwia jej prawidłowe funkcjonowanie. Jest ona wysoce selektywną barierą utrudniającą transport środków terapeutycznych do cytoplazmy. W celu ułatwienia przenoszenia związków wielkocząsteczkowych do struktur wewnątrzkomórkowych, wykorzystywano między innymi wektory wirusowe. Jednakże ich stosowanie wiązało się z ryzykiem wbudowania wirusowego materiału genetycznego do genomu gospodarza. Najlepszy wektor do transportu leków to taki, który nie powoduje cytotoksyczności, nie ulega hydrolizie enzymatycznej, wspomaga zaś stabilność efektora we wnętrzu komórki oraz ułatwia jego specyficzną dystrybucję, a także nie niszczy i nie powoduje dezintegracji błony komórkowej [1, 2].

Biorąc pod uwagę ograniczenia w transporcie do wnętrza komórek związków wielkocząsteczkowych, które powodowane są selektywną przepuszczalnością błony cytoplazmatycznej, w ramach rozprawy doktorskiej dokonałam syntezy peptydomimetyków posiadających zdolność przechodzenia przez błony biologiczne. Zsyntezowane związki zaliczyć można do grupy peptydów penetrujących błony komórkowe (ang. *Cell penetrating peptides*, CPP). Przeprowadzenie licznych badań, umożliwiło wybór peptydomimetyków wnikających najefektywniej do wnętrza komórek zdrowych i nowotworowych, a także potwierdziło ich zdolność do wewnątrzkomórkowego transportu związków wielkocząsteczkowych. Opis oraz wyniki wykonanych eksperymentów przedstawiłam w niniejszej rozprawie doktorskiej.

2. Błona komórkowa

2.1. Budowa oraz funkcja błony komórkowej

Błona cytoplazmatyczna jest złożoną dwuwarstwą lipidowo-białkową, która oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego, odbiera sygnały pochodzące z otoczenia oraz uczestniczy w transporcie związków z i do wnętrza komórki (rys. 1). Membrana cytoplazmatyczna jest również środowiskiem, w którym występują węglowodany oraz złożone kompleksy białkowe o określonych funkcjach, są to między innymi enzymy, kanały białkowe, a także pompy (sodowo-potasowa, wapniowa i protonowa) [3 – 5].



Rysunek 1. Budowa błony komórkowej.

Rysunek wykonany na podstawie [6].

Złożona budowa błony cytoplazmatycznej sprawia, iż jest ona półprzepuszczalna, umożliwia ruch do wnętrza komórki określonym substancjom i jednocześnie ogranicza go innym. Transport związków chemicznych, cząsteczek oraz jonów do wnętrza komórki może odbywać się w sposób bierny lub aktywny (rys. 2). Ruch bierny substancji przez błonę cytoplazmatyczną nie wymaga udziału energii, najczęściej odbywa się w zależności od różnicy stężeń jonów pomiędzy przestrzenią

zewnątrzkomórkową, a środowiskiem wewnętrznym. Wyróżnia się tutaj osmozę, dyfuzję prostą oraz dyfuzję ułatwioną.

Transport aktywny dotyczy ruchu cząstek niezgodnie z gradientem stężeń, czyli z roztworu o niższym stężeniu do roztworu o wyższym. W tym przypadku niezbędny jest udział energii. Przenikanie związków do wnętrza komórki za pośrednictwem białek przENOŚNIKOWYCH dzieli się na pierwotne oraz wtórne. Natomiast transport aktywny związków wielkocząsteczkowych najczęściej odbywa się za pośrednictwem endocytozy (do wnętrza komórki) oraz egzocytozy (na zewnątrz komórki). Procesy endocytotyczne dzielą się dodatkowo na: fagocytozę, makropinocytozę, endocytozę zależną od klatryn oraz od kaweoli (szerzej opisane 3.2.2.) [7 – 9].

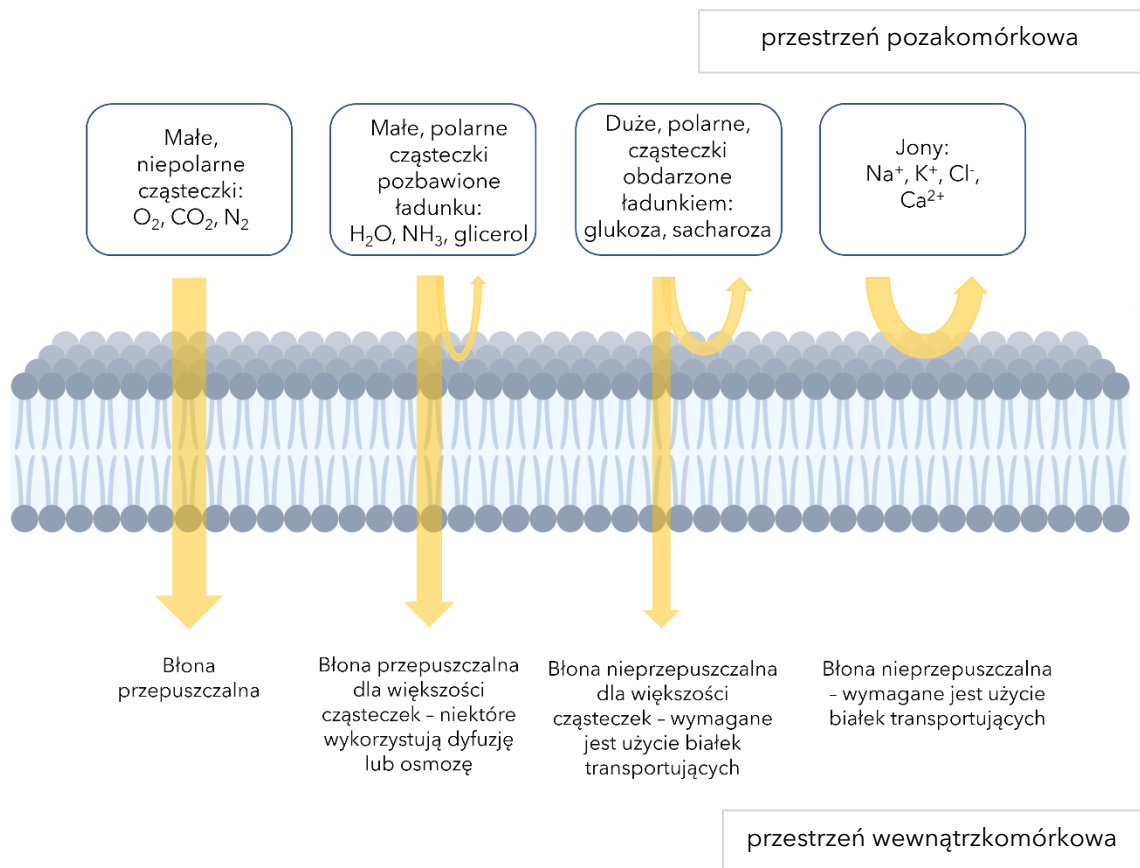


Rysunek 2. Schematyczny podział sposobów transportu związków przez błonę komórkową.

2.2. Związki transportowane przez błony komórkowe

Zdolność do swobodnej dyfuzji przez błonę komórkową posiadają małe cząsteczki, charakteryzujące się umiarkowaną polarnością. Stosunkowo szybko przenikają przez membranę cytoplazmatyczną gazy (O_2 , CO_2 , N_2) oraz niewielkie cząsteczki, takie jak etanol. Dwuwarstwa lipidowa jest praktycznie nieprzepuszczalna dla większych cząsteczek. W celu ułatwienia transportu tych związków przez błonę cytoplazmatyczną, komórki wykorzystują przENOŚNIKI BIAŁKOWE. Wyspecjalizowane kanały jonowe odpowiadają za przenoszenie określonych jonów, akwaporyny pozwalają między innymi na transport cząsteczek wody, w błonie obecne są również

transportery glukozy (ang. *glucose transporters*, GLUT), aminokwasów oraz wielu innych cząsteczek (rys. 3).



Rysunek 3. Selektywna przepuszczalność błony komórkowej.
Rysunek wykonany na podstawie [10].

Mechanizm dyfuzji biernej wykorzystywany jest tylko przez niewielką ilość peptydów. Niektóre modyfikacje ich sekwencji mogą przyczynić się do zwiększenia właściwości penetrujących membrany cytoplazmatyczne. Yang i Hinner analizując zdolność makrocyklicznego leku, jakim jest cyklosporyna A, do przenikania przez błonę komórkową, sugerują, iż cyklizacja oraz metylacja azotu pochodzącego z wiązania amidowego poprawia właściwości penetrujące związków [11 – 13].

Przykładem białek wydajnie przenikających przez błony komórkowe są toksyny białkowe. Związki te posiadają w swojej strukturze domenę odpowiedzialną za wiązanie się z białkami receptorowymi oraz za późniejszą translokację do cytoplazmy. Toksyny błonicy oraz węglika zdolne są do tworzenia porów w błonie

komórkowej, przez które następnie wnikają do jej wnętrza. Wirusy najczęściej przenikają przez błonę cytoplazmatyczną dwuetapowo, wiążą się początkowo z określonymi receptorami błonowymi, a kolejno zaś penetrują membranę cytoplazmatyczną wykorzystując mechanizm endocytozy.

Ze względu na złożoną budowę białek oraz ujemny ładunek kwasów nukleinowych, przenikanie obu tych związków przez błony komórkowe jest ograniczone. Jednakże zważywszy na ich duży potencjał terapeutyczny mogą być one przyłączone oraz transportowane przez szereg innych związków. Przykładem są liposomy, które zamykają przenoszone przez siebie cząstki lub cząsteczki we wnętrzu pęcherzyka. Wnikając do wnętrza komórki początkowo ulegają adsorpcji na powierzchni błony cytoplazmatycznej, a następnie zaś wchłaniane są do jej wnętrza w wyniku endocytozy. Najefektywniej do wnętrza komórki wnikają liposomy powstałe z lipidów kationowych oraz obojętnych. Inną z metod dostarczenia związków do wnętrza komórki jest zastosowanie nanocząstek złota (ang. *gold nanoparticle*, GNP). Sfunkcjonalizowane grupami aminowymi, wnikają do wnętrza komórki za pośrednictwem endocytozy. Zmodyfikowane przeciwciałami, są transportowane przez membranę cytoplazmatyczną za pomocą endocytozy zależnej od określonych receptorów. Nanocząstki mezoporowatej krzemionki ze względu na dużą powierzchnię oraz możliwość jej funkcjonalizacji również mogą być stosowane jako transportery związków do wnętrza komórki. Grupy aminowe lub guanidynowe na ich powierzchni powodują wnikanie do wnętrza komórki za pomocą endocytozy zależnej od klatryn lub kaweoli [11, 14, 15].

2.3 Różnice w budowie błony cytoplazmatycznej komórek zdrowych i nowotworowych

Komórki nowotworowe różnią się od zdrowych zarówno budową anatomiczną, jak i fizjologią. Dzięki temu możliwe jest opracowanie leków ukierunkowanych na działanie wyłącznie w jednostkach zmienionych chorobowo z jednoczesnym pominięciem komórek zdrowych. Najczęstszym celem terapeutycznym podczas

projektowania terapii przeciwnowotworowych jest DNA lub błona cytoplazmatyczna chorych komórek [16].

Błona cytoplazmatyczna zdrowych komórek charakteryzuje się asymetrycznym rozmieszczeniem fosfolipidów w obu warstwach. W zewnętrznej warstwie przeważają fosfatydylocholina oraz sfingomielina, w wewnętrznej zaś występują głównie fosfolipidy aminowe, takie jak: fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloetanolamina. W przypadku komórek nowotworowych dochodzi do zaniku asymetrycznego rozkładu fosfolipidów w błonie. Fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna lokalizują się w zewnętrznej warstwie membrany (sprawia to, że zyskuje ona ładunek ujemny), dodatkowo dochodzi tutaj do spadku zawartości sfingomieliny. Zewnętrzna powierzchnia błony cytoplazmatycznej zdrowych komórek najczęściej charakteryzuje się obojętnym ładunkiem elektrycznym, nowotworowych zaś ujemnym. Z tego też powodu związki wnikające do wnętrza zdrowych komórek wykorzystują hydrofobowe oddziaływania z membraną cytoplazmatyczną, zaś w przypadku penetracji błon zmienionych chorobowo dominują oddziaływania elektrostatyczne. Płynność dwuwartstwowej lipidowej komórek nowotworowych uzależniona jest od rodzaju nowotworu, rak płuc oraz chłoniak wykazują zwiększoną płynność membrany cytoplazmatycznej. Natomiast komórki nowotworowe wątroby posiadają stosunkowo sztywną błonę ze względu na obecność w strukturze większej ilości cholesterolu oraz kwasów nasyconych. Zewnętrzna warstwa membrany cytoplazmatycznej komórek nowotworowych odznacza się większą ilością mikrokosmków w porównaniu do błony komórek zdrowych, co prowadzi do zwiększenia jej powierzchni, a także nieregularnego kształtu [16 – 20].

Komórki nowotworowe charakteryzują się rozregulowanym cyklem proliferacji. Ulegając szybkiemu namnażaniu potrzebują zwiększonej ilości syntezowanych kwasów tłuszczowych oraz lipidów wchodzących w skład błony komórkowej. Przestrzeń międzykomórkowa również ulega zmianie, środowisko guza charakteryzuje się chaotycznym unaczynieniem, przez co niektóre jego regiony są niedotlenione, przeważa tu glikoliza. W efekcie dochodzi do spadku pH panującego we wnętrzu komórki oraz w przestrzeni międzykomórkowej (z pH 7,4 na pH 6,2 – 6,9), środowisko kwasowe sprzyja inwazyjności nowotworu [16, 17, 21].

Zrozumienie budowy oraz fizjologii komórek danego typu nowotworu, umożliwia opracowanie ukierunkowanych na nie leków. Farmaceutyki peptydowe posiadają działanie przeciwnowotworowe, a ich znaczna ilość znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych. Przykładem takiego związku jest cykliczny peptyd – CIGB-300, będący inhibitorem kinazy serynowo-treoninowej CK2, której nadekspresja występuje w komórkach nowotworów piersi, czy macicy (I-II faza badań). W II fazie badań klinicznych znajduje się również szczepionka peptydowa LY6K-177, której podanie wywołuje odpowiedź immunologiczną prowadzącą do stabilizacji wzrostu lub działania przeciwnowotworowego wobec płaskonabłonkowego nowotworu głowy oraz szyi [17, 22, 23].

3. Peptydy penetrujące błony komórkowe

Bezpiecznym, a zarazem skutecznym sposobem transportu związków biologicznie czynnych do wnętrza komórki jest zastosowanie wektorów, jakimi są peptydy penetrujące błony komórkowe (ang. *Cell Penetrating Peptides*, CPPs). CPP to pokaźna klasa związków zawierających w swojej sekwencji od 5 do 30 reszt aminokwasowych, charakteryzujących się zdolnością przenikania przez błony biologiczne. Peptydy te mogą wnikać do wnętrza komórek samodzielnie lub mogą być przenośnikiem szerokiej gamy związków bioaktywnych, co ma ogromne znaczenie w rozwoju terapii lekowych opartych zarówno na mikro – jak i makrocząsteczkach. Do licznych zalet CPP zalicza się między innymi ich niewielki rozmiar, znikomą cytotoksyczność, stabilność w warunkach fizjologicznych, zdolność do penetracji błon różnorodnych linii komórkowych, a także efektywność w szybkim przenoszeniu zróżnicowanych wielkościami cząsteczek przez membrany biologiczne [24 – 27].

W ciągu ponad 30 lat od odkrycia białka TAT, w skład którego wchodzi peptyd TAT, będący pierwszym opisanym peptydem penetrującym błony komórkowe, zaprojektowano i zsyntezowano wiele związków zaliczanych do grupy CPP. Prowadzone są liczne badania wstępne oraz przedkliniczne dotyczące ich potencjalnego użycia w terapiach stosowanych podczas leczenia infekcji, stanów zapalnych oraz chorób nowotworowych. W bazie CPPsite 2.0 znajduje się około 1700

zbadanych peptydów z opisaną strukturą drugorzędową i trzeciorzędową wraz z przyłączanymi do nich efektorami (ang. *cargo*), które są w stanie przenosić je do wnętrza komórek. Większość z nich zbudowana jest z reszt L-aminokwasów (84%), tworzących sekwencję liniową (94%) oraz została zsyntezowana chemicznie (55%) [27].

3.1. Podział CPP

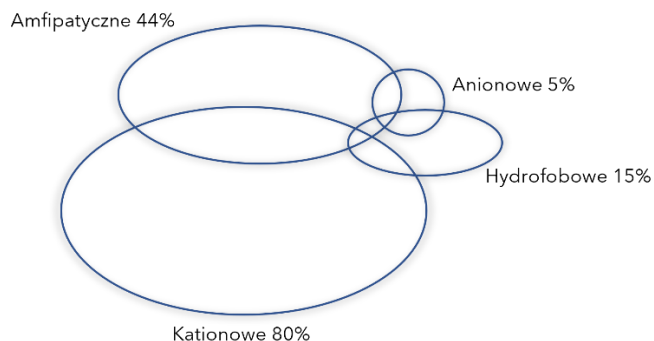
Ze względu na ilość oraz zróżnicowanie peptydów penetrujących błony komórkowe istnieje wiele różnych sposobów ich klasyfikacji (tab. 1).

Tabela 1. Sposoby klasyfikacji peptydów penetrujących błony komórkowe.
Tabela wykonana na podstawie [28].

1.	Sekwencje pochodzące z naturalnych białek	Syntetyczne
	penetratyna, Arf(1 - 22), Tat	poli-Arg, CADY, Pep-1
2.	Sklasyfikowane według właściwości fizykochemicznych	Sklasyfikowane według struktury
	<u>Amfipatyczne:</u> o strukturze liniowej: Pep-1, KLAKE drugorzędowe: MAP, pVEC <u>Kationowe:</u> penetratyna, Tat, poli-Arg <u>Hydrofobowe:</u> k-FGF, Pept-1 <u>Anionowe:</u> MAP12, SAP(E)	<u>Rozgałęzione:</u> NF51 <u>Zawierające fosforany:</u> NF1 <u>Tworzące nanokompleksy:</u> CADY, PepFect6
3.	Struktury wyznaczone teoretycznie	Struktury wyznaczone na podstawie dedukcji (metoda prób i błędów)
	Arf(1 - 22), Cyt c(77 - 101)	penetratyna, Tat
4.	Liniowa sekwencja	Cykliczne
	penetratyna, Tat, MAP, CADY	p53, Kalata B1
5.	Białkomimetyczne	Transportery efektorów
	Cyt c(77 - 101), M918	penetratyna, Tat, CADY, PepFect6
6.	Niespecyficzne	Ukierunkowane na określony cel
	penetratyna, Tat	YTA2, aCPP
7.	Wykorzystujące transport bezpośredni	Wykorzystujące endocytozę
	penetratyna, Tat, pVEC, CADY	GALA, pVEC, MPG
8.	Niepowodujące toksyczności	Antymikrobiotyczne
	większość CPP (w zależności od stężenia)	pVEC, Pep-1

aCPP – R9GPLGLAGE8	MPG – GALFLGFLGAAGSTMGA cysteamid
Arf(1 – 22) - MVRRLVTLRIRACGPPRRV	NF1 – stearyl-AGY(PO3)LLGKTNLKALAALAKKIL
CADY – Ac-GLWRALWRLRLSLWRLLWRA-Cya	NF51 - δ-(stearyl-AGYLLG)OINLKALAALAKKIL
Cyt c(77 – 101) – GTKMIFVGIKKKEERADLIKKA	p53 – cykliczny TSF*EYWYLL*
GALA – WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA	penetratyna – RQIKIWFQNRMRKWK
Kalata B1 – cykliczny CGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNLGPV	Pep-1 – Ac-KETWWETWWTEWSQPKKRKY-Cya
k-FGF – AAVLLPVLLAAP	PepFect6 – stearyl-AGYLLGK(εTMQ)INLKALAALAKKIL
KLAK – CGGGKLAKLAKLAKLAK	pVEC – LLILRRRIRKQAHASK
M918 – MVTVLFRRRLRIRACGPPRRV	SAP(E) – VELPPPVELPPPVELPPP
MAP – KLALKLALKALKALKLA	Tat – YGRKKRRQRRR
MAP12 – LKLTETLKELTKTLEL	YTA2 – YTAIAWVKAFIRKLK

Biorąc pod uwagę znaczną ilość danych literaturowych dotyczących tego tematu, w niniejszej rozprawie doktorskiej skupię się wyłącznie na jednej z najczęściej stosowanej klasyfikacji CPP. Dotyczy on podziału na podstawie właściwości fizykochemicznych, według którego dzieli się je na 3 główne klasy: kationowe, amfipatyczne oraz hydrofobowe. Jednakże poszczególne grupy związków mogą się wzajemnie nakładać. Dzieje się tak ze względu na obecność w sekwencji peptydów licznych reszt aminokwasowych, których właściwości fizykochemiczne łańcuchów bocznych zaliczyć można do co najmniej dwóch różnych klas (rys. 4) [28, 29].



Rysunek 4. Schemat obrazujący nakładanie się właściwości fizykochemicznych CPP. Rysunek wykonany na podstawie [28].

3.1.1. CPP kationowe

Zdecydowana większość peptydów penetrujących błony komórkowe należy do klasy kationowych CPP (około 80%). Są to związki zabudowane z reszt aminokwasowych zawierających w łańcuchu bocznym grupy funkcyjne naładowane dodatnio, takie jak arginina i lizyna. Charakteryzują się dużym powinowactwem

do błony komórkowej ze względu na występowanie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnimi grupami funkcyjnymi w strukturze peptydu, a ujemnie naładowanymi fosfolipidami oraz glikoproteinami na powierzchni membrany cytoplazmatycznej. Zarówno lizyna, jak i arginina są aminokwasami zasadowymi, lecz nie posiadają takiej samej zdolności do przenikania przez błony. Kluczowym czynnikiem wpływającym na właściwości penetrujące kationowych CPP jest liczba oraz lokalizacja w sekwencji ugrupowania guanidynowego wchodzącego w skład reszt argininy, które tworzy wiązania wodorowe z fosforanami oraz siarczanami błony cytoplazmatycznej. Najskuteczniej do wnętrza komórki wnikają związki zawierające od 6 do 12 reszt Arg. Badania wskazują, iż zamiana choć jednej reszty argininy na lizynę powoduje zmniejszenie właściwości penetrujących peptydu. Przykładem kationowych CPP jest powszechnie znany peptyd TAT (YGRKKRRQRRR), którego sekwencję wywiedziono z białka wirusa HIV. Szczególną grupę związków zaliczających się do CPP kationowych stanowią peptydy zawierające sygnał lub sekwencję lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence*, NLS). Związki te zawierają najczęściej od 7 do 20 reszt aminokwasowych, składają się z fragmentów bogatych w reszty argininy, lizyny lub proliny i mogą być transportowane do wnętrza jądra przez kompleks jądrowy [28 – 34].

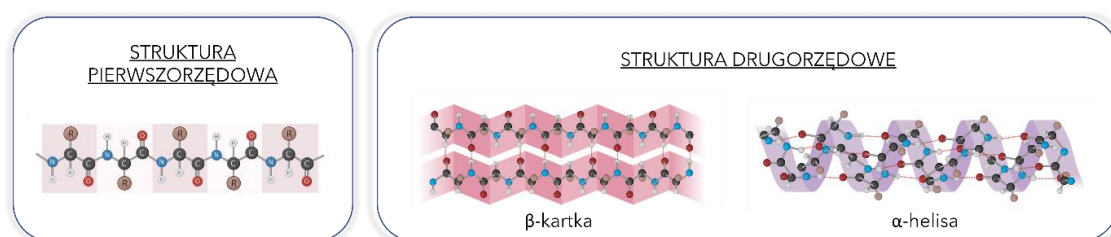
3.1.2. CPP amfipatyczne

Amfipatyczne CPP mogą być zbudowane zarówno z reszt aminokwasowych zawierających łańcuch boczny o charakterze polarnym, jak i niepolarnym. Tę klasę CPP można dodatkowo podzielić na kilka kategorii: peptydy amfipatyczne o strukturze liniowej (ang. *primary amphipathic CPP*), drugorzędowe (ang. *secondary amphipathic CPP*) α -helikalne oraz przyjmujące kształt β -kartki, a także bogate w reszty proliny (rys. 5). Zasadnicze znaczenie odgrywają tutaj peptydy amfipatyczne przyjmujące strukturę helis o hydrofobowych i hydrofilowych powierzchniach, umożliwiających przejście przez błonę komórkową przy neutralnym pH. Sekwencja aminokwasowa większości pierwszorzędowych amfipatycznych CPP zawiera fragment występujący w naturalnych białkach (np. pVEC, który jest 18 – aminokwasowym peptydem wywodzącym się z cząsteczki kadheryny występującej w śródbłonku naczyń w myszy). Innym rodzajem związków zaliczanych do tej klasy CPP są te, które powstają

w wyniku kowalencyjnych połączeń NLS z fragmentem peptydu zawierającym w sekwencji reszty hydrofobowe.

Amfipatyczne CPP o strukturze α -helisy stabilizowane są przez wiązania wodorowe, które tworzą się pomiędzy aminokwasami oddalonymi od siebie o 4 pozycje. Peptydy te mogą zawierać obszary hydrofilowe oraz hydrofobowe zlokalizowane po przeciwnych stronach helisy. Pierwsze z tych obszarów wykorzystywane są do interakcji z błoną komórkową, natomiast drugie odpowiadają za translokację związku. Peptydy o strukturze β -kartki również stabilizowane są przez wiązania wodorowe, jednak występują one pomiędzy grupą karbonylową aminokwasu jednego łańcucha oraz drugorzędową grupą aminową zlokalizowaną na drugim. W krótszych peptydach strukturę β -kartki uzyskuje się poprzez naprzemienne włączenie do sekwencji hydrofilowej oraz hydrofobowej reszty aminokwasowej. Badania wskazują, iż arkusze β -kartki obecne w strukturze peptydu VTS (DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPKPD) odgrywają kluczową rolę w jego zdolnościach penetrujących. Zamiana w sekwencji peptydu L-aminokwasów na D-aminokwasy skutkuje słabszą absorpcją związku na powierzchni błony komórkowej. Łańcuchy peptydowe zbudowane z D-aminokwasów niechętnie przyjmują strukturę β -kartki [29, 35 – 38].

AMFIPATYCZNE CPP



Rysunek 5. Podział amfipatycznych peptydów penetrujących błony komórkowe.

Rysunek wykonany na podstawie [39, 40].

3.1.3. CPP hydrofobowe

Najmniej liczną grupą są hydrofobowe CPP, które zawierają w sekwencji głównie niepolarne reszty aminokwasowe. Optymalna hydrofobowość ma decydującą rolę w wychwycie peptydu przez komórkę. Gdy jest ona nadmiernie wysoka, tworzą się zbyt silne oddziaływania hydrofobowe pomiędzy związkami, a białkami powierzchniowymi w błonie cytoplazmatycznej, które zawierają liczne ugrupowania aromatyczne, przez co może dochodzić do „zderzenia” z komórką i zahamowania zdolności transportujących peptydu. Przykładem należącym do tej grupy związków jest peptyd, którego sekwencja stanowi fragment czynnika wzrostu Kaposiego (AAVLLPVLLAAP) [1, 41, 42].

3.2. Mechanizmy penetracji błon komórkowych wykorzystywane przez CPP

Peptydy penetrujące błony biologiczne wnikają do wnętrza komórki wykorzystując zróżnicowane mechanizmy. To, który z nich wykorzystają zależy od właściwości fizykochemicznych CPP oraz przenoszonego przez nie efektora (ang. *cargo*), jego stężenia, rodzaju komórek, ale także od wielu innych czynników wpływających na przebieg eksperymentu. CPP kationowe oraz amfipatyczne powodują dezorganizację błony cytoplazmatycznej w środowisku wodnym, lecz tylko amfipatyczne mogą tworzyć α -helisy lub β -kartki oddziałujące z dwuwartwą lipidową zbudowaną z rejonów hydrofobowych i hydrofilowych. Peptydy zawierające liczne reszty argininy w sekwencji tworzą zaś oddziaływania wodorowe pomiędzy dodatnio naładowanym ugrupowaniem guanidynowym, a ujemnie naładowanymi resztami zawartymi w błonie cytoplazmatycznej, takimi jak między innymi glikozaminoglikany (GAG). Badania naukowe donoszą, iż w początkowym etapie, znajdujące się w błonie komórkowej proteoglikany siarczanu heparanu (ang. *heparan sulfate proteoglycan*) zaangażowane są w transport peptydu TAT do wnętrza komórki. Chiralność reszt aminokwasowych również ma znaczenie w wewnątrzkomórkowym transporcie związków, L-aminokwasy skuteczniej penetrują błony niż te z konfiguracją D, jednak obecność w sekwencji D-aminokwasów wpływa na stabilność peptydów, gdyż zmniejsza ich podatność na działanie enzymów. Jak wspomniano w rozdziale 2.2, CPP

mogą przenikać przez błonę komórkową wykorzystując jednocześnie różne mechanizmy. Wśród nich najczęściej obserwuje się zależną od energii endocytozę oraz od niej niezależny transport bezpośredni [27, 38, 43, 44].

3.2.1. Transport bezpośredni

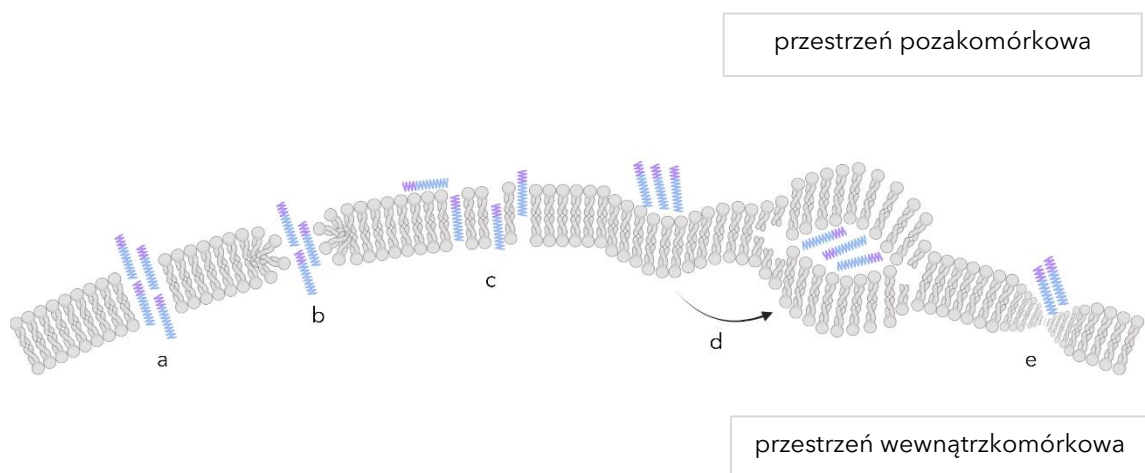
Transport bezpośredni odbywa się dzięki występowaniu oddziaływań pomiędzy łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych peptydów, a grupami wchodzącymi w skład błony komórkowej. Jest to pierwszy etap, po którym dochodzi do destabilizacji dwuwarstwy lipidowej. Reszty aminokwasowe wchodzące w skład kationowych CPP tworzą oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi glikozaminoglikanami i proteoglikanami będącymi na powierzchni błony cytoplazmatycznej. Natomiast hydrofobowe CPP mogą powodować zakłócenia w strukturze błony poprzez aktywację GTPas, co skutkuje przebudową sieci aktynowej oraz tworzeniem się lameliopodiów. Transport bezpośredni obejmuje głównie cztery mechanizmy: model dywanowy, pocienianie błony cytoplazmatycznej, tworzenie się porów oraz formowanie miceli (rys. 6) [1, 24].

Mechanizm tworzenia porów w błonie komórkowej może odbywać się poprzez formowanie porów toroidalnych lub beczkowatych. W przypadku tych pierwszych, przy wyższych stężeniach peptydów, łańcuchy układają się prostopadle do błony komórkowej, powoduje to uginanie się lipidów, a hydrofilowy region membrany zawija się do wnętrza poru, który otoczony jest peptydami wnikałymi do wnętrza komórki. W przypadku porów beczkowatych, CPP także układają się prostopadle do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej (peptyd ma kontakt z hydrofobową częścią membrany). Hydrofobowe części peptydów znajdują się blisko łańcuchów lipidowych, natomiast regiony hydrofilowe CPP tworzą centralny por.

W modelu dywanowym CPP tworzą oddziaływania elektrostatyczne z zewnętrzną warstwą błony. Związki układają się równoległe do membrany tworząc na jej powierzchni tak zwany „dywan”, hydrofobowa część peptydu jest odwracana przez hydrofobową część dwuwarstwy lipidowej. Skutkuje to rozrzedzeniem błony cytoplazmatycznej powodującym jej miejscową delokalizację oraz w konsekwencji

transportem związków do wnętrza komórki. Sposób wnikania związków do wnętrza komórki za pomocą mechanizmu wykorzystującego model pocienienia błony biologicznej również zapoczątkowany jest przez występowanie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi peptydu, a ujemnymi strukturami będącymi na powierzchni membrany. Następnie dochodzi do interakcji z fosfolipidami, które to prowadzą do zmniejszania grubości błony oraz transportem związków do wnętrza komórki.

Mechanizm formowania odwróconej miceli zakłada, iż początkowo dochodzi do wiązania się dodatnio naładowanych reszt CPP z ujemnymi fosfolipidami wchodzącymi w skład błony komórkowej. Peptyd gromadzi się na jej powierzchni powodując tworzenie pogłębiającej się w niej wklęsłości. Skutkuje to zamknięciem hydrofilowego peptydu w micelę, która przemieszcza się w głąb membrany. Następnie w wyniku interakcji ze składnikami wewnętrznej błony komórkowej micela jest odkształcana, zaś będący w jej wnętrzu związek zostaje uwolniony do cytoplazmy [24, 29, 45, 46].



Rysunek 6. Mechanizmy bezpośredniego transportu przez błony komórkowe wykorzystywane przez CPP, gdzie: a – tworzenie porów beczkowatych; b – pory toroidalne, c – mechanizm dywanowy, d – tworzenie odwróconej miceli, e – model pocienienia błony cytoplazmatycznej.

Rysunek wykonany na podstawie [46, 47].

3.2.2. Endocytoza

Większe cząsteczki częściej przenikają do wnętrza komórki wykorzystując endocytozę. W tym procesie materiał ze środowiska zewnętrznego jest otoczany przez

fragmenty błony cytoplazmatycznej, aż do momentu zamknięcia go w utworzonym pęcherzyku, który przemieszcza się w głąb cytoplazmy. Zespół takich pęcherzyków określa się mianem endosomów. Endosomy wczesne tworzą się tuż po rozpoczęciu endocytozy i zlokalizowane są przy plazmolemme, natomiast endosomy znajdujące się w głębi cytoplazmy, blisko jądra komórkowego określa się jako późne. W kolejnym etapie pęcherzyki są sortowane oraz transportowane do miejsc docelowych. Ze względu na sposób powstawania oraz wielkość pęcherzyków endocytarnych, a także rodzaj transportowanych cząstek, CPP najczęściej wykorzystują cztery dominujące szlaki endocytozy: makropinocytozę, endocytozę zależną od klatryn i endocytozę zależną od kaweolin, a także fagocytozę (rys. 7) [3, 46, 48].

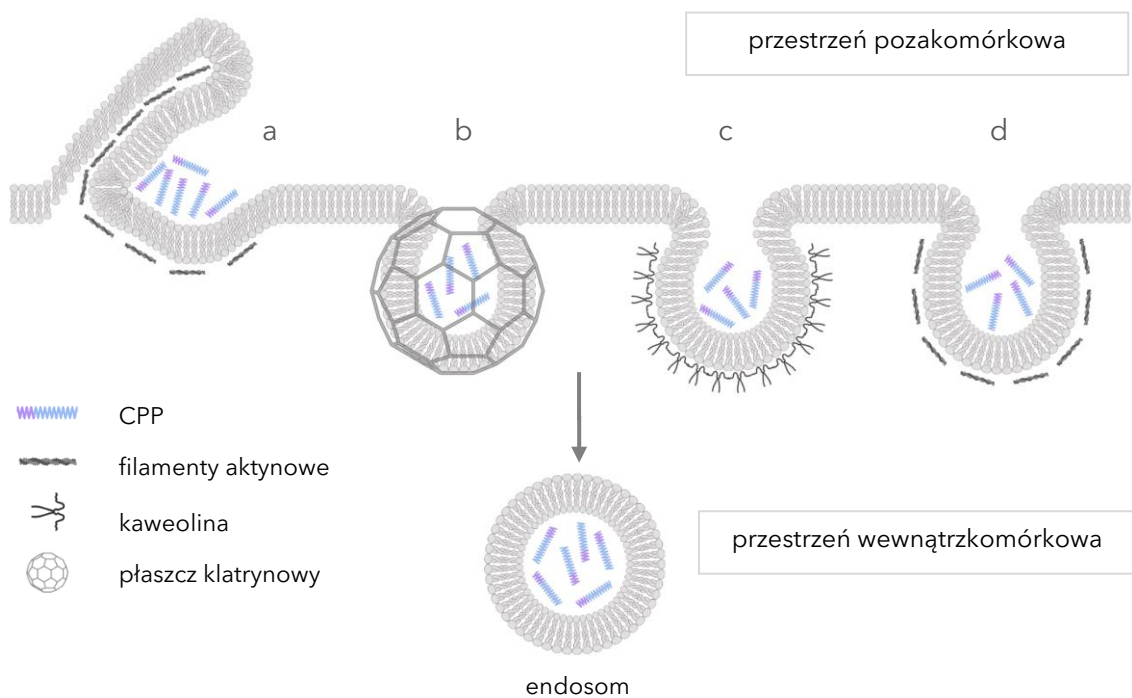
Makropinocytoza może zachodzić dzięki ruchliwości błony cytoplazmatycznej. Proces ten polega na wchłanianiu przez komórkę cząstek rozpuszczonych lub zawieszonych w otaczającym ją płynie. Transportowane związki początkowo oddziałują z proteoglikanami związanymi z błoną, co z kolei wpływa na aktywację białek z rodziny Rho zaangażowanych w kontrolę cytoszkieletu aktynowego. Cytoszkielet aktynowy pełni kluczową rolę w formowaniu pęcherzyków makropinocytarnych (ich średnica waha się od 100 nm do 1 μ m), które następnie wraz z zawartością wchłaniane są do komórki. Makropinocytozę można wywołać w warunkach laboratoryjnych, w tym celu stosuje się takie związki indukujące jak: peptydy, białka, sole nieorganiczne czy zasadowe aminokwasy. Mechanizm ten zależy od rodzaju użytej substancji, jej stężenia oraz pH roztworu. Powyższe czynniki zmieniają strukturę oraz właściwości membrany cytoplazmatycznej, co skutkuje zmianą jej przepuszczalności oraz formowania pęcherzyków pinocytarnych [3, 48 – 50].

Rodzajem endocytozy receptorowej jest endocytoza zależna od klatryn. Klatryna jest białkiem zbudowanym z łańcuchów ciężkich (180 kDa) oraz lekkich (33-35 kDa), jej podjednostki przyjmują kształt trójramiennej swastyki. W pierwszym etapie transportu dochodzi do związania się pobieranych substancji z receptorami błonowymi, które kumulują się w określonych fragmentach membrany cytoplazmatycznej. Następnie klatryna przyłącza się do dwuwarstwy fosfolipidowej od wewnętrznej strony powodując utworzenie się w niej zagłębienia. Kolejno dochodzi do usunięcia płaszcza klatrynowego z pęcherzyków, które wędrują dalej w głąb cytoplazmy aż do momentu

połączenia z wczesnymi endosomami. Częsteczki klatryny wracają pod powierzchnię błony komórkowej i mogą być użyte powtórnie. W tym wypadku proces endocytozy nie jest zależny od energii, natomiast jest ona wymagana podczas transportu pęcherzyków endocytarnych w głąb cytoplazmy [3, 48, 51, 52].

Kaweole są niewielkimi zagłębieniami o średnicy 50 nm, występującymi na powierzchni błony. Kluczowe znaczenie w ich powstawaniu ma białko kaweolina, która otacza wgłębienia od strony cytoplazmy. Endocytoza od niej zależna powiązana jest z przebudową cytoszkieletu aktynowego oraz działaniem GTP-azy. W tym etapie powstają niewielkie pęcherzyki, które następnie łączą się z wczesnym endosomem [53].

Fagocytoza przebiega głównie w wyspecjalizowanych komórkach, takich jak na przykład makrofagi. Aby doszło do tego procesu, wnikająca cząsteczka najpierw powinna zostać pokryta odpowiednimi przeciwciałami, które następnie wiążą się z receptorami błonowymi komórki. Kolejno, przy pomocy filamentów aktynowych dochodzi do ruchu membrany cytoplazmatycznej, skutkującego we wczesnym etapie zamknięciem transportowanej cząstki we wnętrzu fagocytu, który następnie przekształca się w endosom [3, 46].



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie szlaków endocytozy wykorzystywanych przez CPP do penetracji błon komórkowych, gdzie: a – makropinocytoza, b – endocytoza zależna od klatryny, c – endocytoza kaweolo-zależna, d – fagocytoza.

Rysunek wykonany na podstawie [46, 47].

Podczas transportu endosomalnego ważne jest, aby peptyd wraz z przenoszonym efektem dotarł do miejsca docelowego, w którym zdoła wykazać aktywność biologiczną. Wyzwaniem zatem jest jego ucieczka z endosomu lub z lizosomu w celu uniknięcia degradacji. Przedmiotem badań naukowców wciąż pozostaje opracowanie skutecznych metod pozwalających uchronić związek aktywny biologicznie przed rozkładem wewnątrz komórki. Zauważono jednak, iż oddziaływanie błony endosomu z dodatnio naładowanym CPP powoduje jej usztywnienie i szybszy rozpad. Skoniugowanie lub bezpośrednie przyłączenie do peptydu środków lizosomotropowych, takich jak np. chlorochina również przyczynia się do uwolnienia związku z wnętrza pęcherzyków, lecz może powodować zwiększoną cytotoksyczność. Obiecujące okazują się badania dotyczące wprowadzenia do sekwencji CPP reszt histydyny. Występujące we wnętrzu endosomu pKa jest zbliżone do pKa histydyny, co powoduje zmiany w ilości protonowanych grup w pierścieniu imidazolowym oraz wzrost ciśnienia osmotycznego, co skutkuje szybszym pęknięciem pęcherzyka. Innym przykładem są polimeryczne związki kationowe zawierające w strukturze drugorzędowe lub trzeciorzędowe grupy aminowe (ulegające protonacji), mogące wykorzystywać zjawisko „gąbki protonowej”. Podczas transportu protonów z cytoplazmy do wnętrza pęcherzyka endosomalnego, zawarte w nim związki dzięki właściwościom buforującym, ulegają protonowaniu. Powoduje to stały napływ protonów do endosomu, następuje obniżenie jego pH, a następnie dyfuzja jonów chlorkowych prowadzących do wzrostu ciśnienia osmotycznego, co w konsekwencji prowadzi do pęknięcia pęcherzyka i uwolnienia jego zawartości do cytoplazmy [1, 54 – 58].

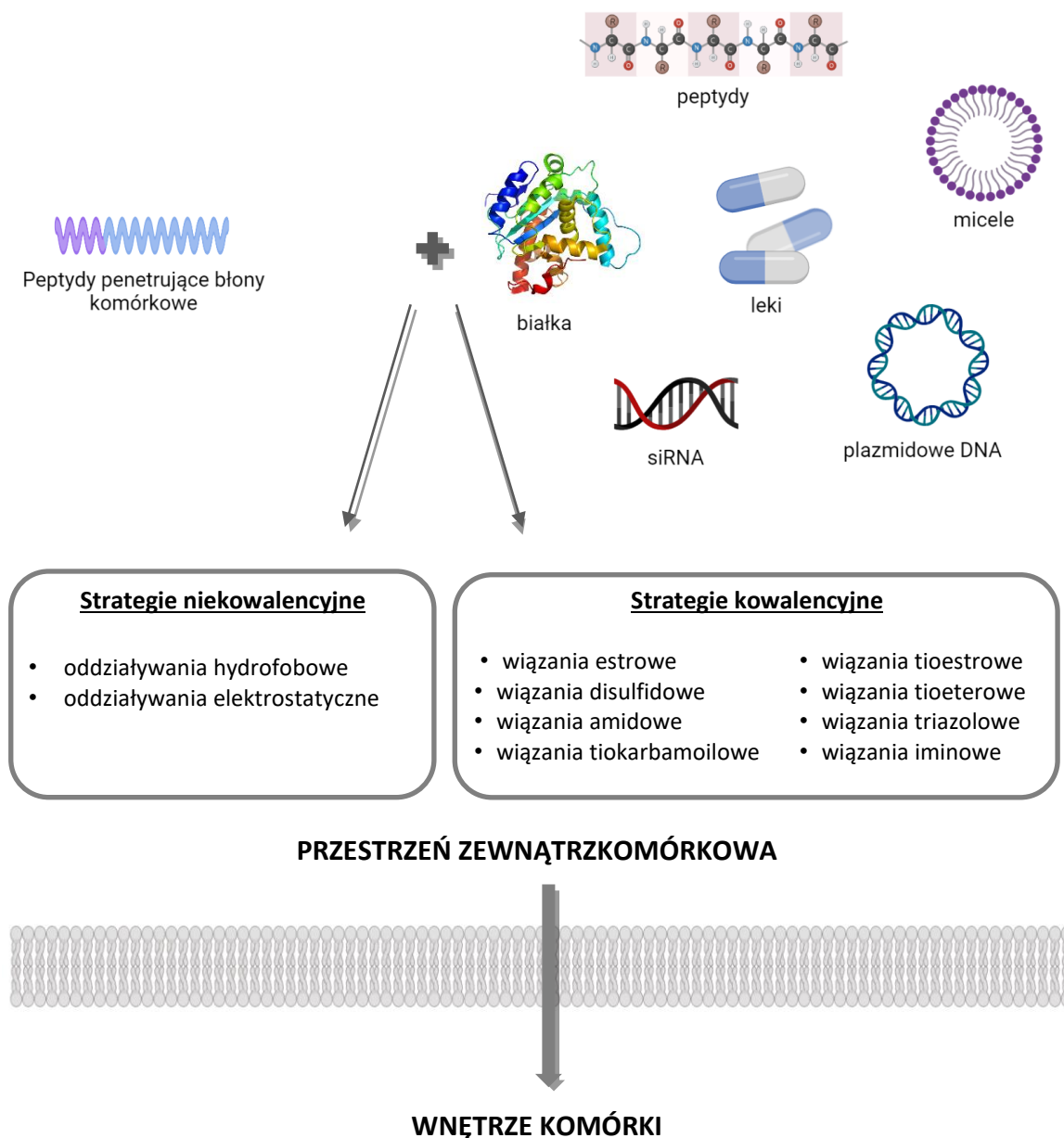
Stężenie związków ma wpływ na mechanizm, według którego przenikają one do wnętrza komórki. Przy wyższym stężeniu częściej preferowany jest transport bezpośredni, zaś przy niższym – endocytoza. Kationowe CPP ze względu na tworzenie oddziaływań z ujemnymi strukturami na powierzchni komórki (np. siarczan heparyny, kwas sialowy, fosfolipidy) przenikają przez błonę wykorzystując nie tylko transport bezpośredni, ale sprawnie ulegają też wchłonięciu poprzez endocytozę. Zespół badawczy Jiangkang Xu wskazuje, iż CPP bogate w reszty argininy (koniugat TAT-efektor) w celu penetracji komórek częściej wykorzystują mikropinocytozę, zaś

naukowcy z grupy Jieru Yang sugerują, iż ze względu na ich wysoce dodatni ładunek zazwyczaj ulegają one endocytozie zależnej od klatryn. Amfipatyczne CPP bogate w reszty Pro chętniej przenikają przez błonę wykorzystując endocytozę zależną od kaweolin. Maiolo i współpracownicy zbadali zdolność związków zaliczanych do CPP (R7, R7W) do przenikania przez błony cytoplazmatyczne komórek linii A431 i U2OS. Uzyskane przez nich wyniki wskazały, iż peptydy te podczas penetracji błon cytoplazmatycznych w większym stopniu wykorzystują mechanizm endocytotyczny wobec komórek linii A431 niż U2OS. Podsumowując, preferowany mechanizm penetracji stosowany przez konkretny peptyd, zależy od wielu czynników. Wyróżnić tutaj można: rodzaj linii komórkowej, stężenie związku oraz czas inkubacji z komórkami, a także przyłączony do CPP rodzaj efektora i typ przyłączenia. [1, 29, 38, 46, 59, 60].

3.3. Sposób przyłączenia efektora do CPP

Peptydy penetrujące błony biologiczne mogą być użyte jako skuteczne wektory transportujące różnego rodzaju związki do wnętrza komórek. Sposób połączenia CPP z przenoszonym przez siebie efektem może przebiegać w sposób kowalencyjny lub niekowalencyjny (rys. 8).

Metoda kowalencyjna polega na występowaniu pomiędzy nimi wiązań chemicznych – na przykład estrowych, tioestrowych czy disulfidowych. Na skuteczność i stabilność kompleksu wpływa rodzaj powstałego wiązania lub zastosowanego łącznika. Badania Kim i współpracowników wskazują, iż wychwyty komórkowy może być zwiększony w przypadku połączenia peptydu z efektem przez grupę tiolową lub disulfidową. Wiązanie kowalencyjne peptydów z obojętnymi indywidualami jest stosunkowo proste do wykonania oraz stabilne w warunkach transportu. Jednak może ono powodować zmianę aktywności biologicznej efektora, a nawet uniemożliwić jego uwolnienie z koniugatu po dotarciu do wnętrza komórki [26, 61 – 63].



Rysunek 8. Sposoby połączenia peptydów penetrujących błony komórkowe z transportowanymi związkami.

Rysunek wykonany na podstawie [64, 65].

Wiązanie niekwalencyjne polega na występowaniu oddziaływań elektrostatycznych lub hydrofobowych pomiędzy CPP, a efektem. Tak utworzony kompleks jest chroniony przed działaniem proteaz i nukleaz, co skutkuje wydłużeniem czasu jego półtrwania w komórce. Występowanie oddziaływań elektrostatycznych można zaobserwować pomiędzy kationowymi CPP, a ujemnie naładowanymi cząstkami przeniesionego ładunku, np. DNA. Istnieje możliwość modulowania wiązań niekwalencyjnych poprzez zmianę sekwencji aminokwasowej lub regulację warunków

środowiskowych. Jest to istotne, gdyż zmienione nowotworowo tkanki charakteryzują się występowaniem różnic w porównaniu do środowiska pomiędzy komórkami zdrowymi. Tę rozbieżność można wykorzystać do terapii nowotworowych z pominięciem tkanek chorobowo niezmienionych. Wykorzystanie niekwalencyjnych interakcji w badaniach może wiązać się z ryzykiem zwiększonej cytotoksyczności ze względu na większe stężenie peptydu wymagane często do utworzenia oddziaływania [16, 26, 62, 66].

3.4. Zastosowanie CPP w badaniach

Peptydy penetrujące błony komórkowe są w stanie transportować szeroką gamę związków do komórki, jednocześnie nie powodując jej uszkodzenia. Wykorzystywane są w badaniach terapeutycznych do przenoszenia leków oraz związków biologicznie czynnych. CPP mają szereg zastosowań w medycynie. Zdolne są do skutecznego transportu pokaźnej liczby związków do wielu narządów. Znaczącą rolę odgrywają również w dostarczaniu terapeutyków do mózgu, przekraczając przy tym barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), a także w terapiach genowych, gdzie pełnią funkcję transporterów kwasów nukleinowych [24].

Jak wspomniano wcześniej, w badaniach dotyczących terapii antynowotworowych wyzwaniem wciąż pozostaje opracowanie metod selektywnego transportu terapeutyków do tkanek zmienionych chorobowo z jednoczesnym pominięciem zdrowych. W celu ułatwienia selektywnego przenoszenia związków oraz poprawy skuteczności leczenia mogą zostać wykorzystane CPP. CPP zwiększają przenikalność do wnętrza komórki takich makrocząsteczek, jak między innymi polimery i liposomy, które to zamykając w swoim wnętrzu środki przeciwnowotworowe osłaniają je przed rozpadem oraz szybkim usuwaniem z komórek. W takiej postaci leki przeznaczone do walki z nowotworem docierają do miejsc chorobowych stosując efekt „zwiększonej przepuszczalności i retencji” (ang. *enhanced permeability and retention*, EPR). Polega to na występowaniu różnic anatomicznych pomiędzy tkanką zdrową, a nowotworową cechującą się często nieszczelnością naczyń oraz zmianą w funkcjonowaniu drenażu limfatycznego [45, 67].

Związkami posiadającymi zdolność rozpoznawania komórek nowotworowych są między innymi przeciwciała, które mogą wiązać się do określonych receptorów lub antygenów znajdujących się na powierzchni błony cytoplazmatycznej. Istnieje również możliwość przyłączenia związków terapeutycznych do immunoglobulin. Przykładem takiego zastosowania może być pochodząca z roślin toksyna białkowa – gelonina połączona z fragmentem TAT, które wiąże się z koniugatem heparyny (Hep) i z przeciwciałem monoklonalnym mysiego antygeny (anty-CEA mAb, T84.66) poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy peptydem TAT, a heparyną. Powyższy kompleks dodany do linii komórkowej z nadekspresją CEA, jaką jest LS174T (ludzkie komórki nowotworowe jelita grubego) uwalnia TAT-geloninę. Dodanie peptydu TAT do geloniny powodowało zwiększenie wychwytu komórkowego białka oraz wzrost jego cytotoxyczności wobec nowotworowej linii LS174T, natomiast połączenie z przeciwciałem umożliwiło transport efektora do miejsca docelowego [45, 68].

Snyder i współpracownicy poddali badaniom receptor chemokiny CXCR4 (CXCR4), który ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów, między innymi: prostaty, piersi i płuc. Połączyli oni ligand receptora CXCR4, DV3 (fragment peptydowy o sekwencji LGASWHRPDKG) z dwoma peptydami o właściwościach przeciw-nowotworowych: aktywującym p53 (DV3-TATp53C') oraz antagonistą kinazy 2 (DV3-TAT-RxL). Wyniki potwierdzają, iż obecność CPP skutkuje zwiększoną cytotoxycznością związków wobec komórek nowotworowych [69, 70].

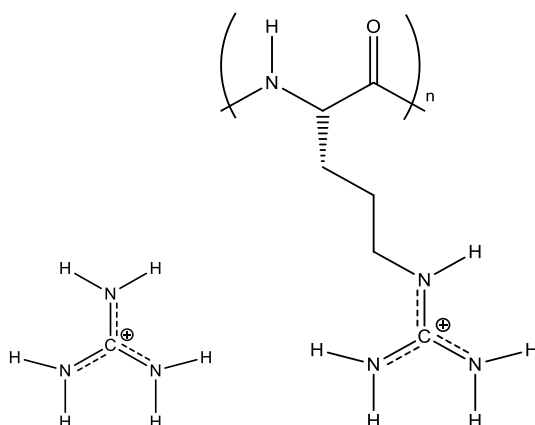
Badania naukowe dowodzą, iż skoniugowanie doksorubicyny (Dox) z peptydami penetrującymi błony komórkowe, jakimi są: TAT, penetratyna i maurokalcyna umożliwia uwrażliwienie komórek nowotworowych linii MDA-MB-231 i CHO na doksorubicynę. Kompleksy te wykazują działanie cytotoxyczne przy niższych stężeniach niż sama doksorubicyna, jest to związane nie tylko z większym jej nagromadzeniem w komórkach, ale także z dodatkową aktywacją szlaków apoptycznych inicjowanych w mitochondriach [71, 72].

Poza tym, iż CPP mogą być stosowane jako transportery związków do wnętrza komórek, mogą wykazywać również działanie przeciwdrobnoustrojowe lub przeciwgrzybicze. Peptydy te charakteryzują się zbliżonym do posiadanych przez środki

bakteriobójcze rozmiarem oraz dodatnim ładunkiem, który wpływa na tworzenie oddziaływań z ujemnie naładowanymi strukturami wchodzącymi w skład błony. Jest to związane z występowaniem w sekwencji CPP reszt argininy, które zawierają ugrupowania guanidynowe wzmacniające ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Badano działanie antybakteryjne peptydu TAT (48 – 60) o sekwencji GRKKRRQRRRPPQ oraz TAT (47 – 58) – YGRKKRRQRRRP wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Związki te wykazywały toksyczne działanie wobec badanych szczepów przy stężeniach odpowiednio: 2 – 8 μM oraz 5 – 20 μM . Udowodniono również, iż związek zawierający w sekwencji TAT (G3R6TAT skoniugowany z cholesterolem) działa hamująco na wzrost hodowli szczepów wyizolowanych z *Cryptococcus neoformans* [24, 73, 74].

3.5. Peptydy penetrujące błony komórkowe zawierające liczne reszty argininy

CPP bogate w reszty argininy należą do grupy peptydów kationowych. Zasadniczą rolę w skutecznym przenoszeniu tych związków przez błony komórkowe odgrywają łańcuchy boczne zakończone ugrupowaniem guanidynowym, które ułatwia wiązanie z ujemnie naładowanymi strukturami na powierzchni komórki. Kation guanidynowy (Gdm^+) składa się z 3 grup aminowych połączonych z centralnie ulokowanym atomem węgla, zaliczany jest do płaskich, Y-sprzężonych struktur quasi-aromatycznych (rys. 9). W wodzie jego wartość pK_a równa się 13,6, przez co ulega protonowaniu w większości środowisk biologicznych. Kation ten pełni funkcję donora w trakcie tworzenia wiązania wodorowego, oddziałuje z wodą poprzez grupy aminowych, podczas gdy jego centrum pozostaje hydrofobowe, co czyni go cząsteczką amfifilową [29, 76–78].



Rysunek 9. Struktury chemiczne obrazujące kation guanidynowy oraz arginę w łańcuchu poliargininowym.

Rysunek wykonany na podstawie [76].

Vazdar oraz współpracownicy w swojej pracy udowodnili, iż pomimo występowania oddziaływań elektrostatycznych, w wodzie dodatnio naładowane kationy guanidynowe obecne w resztach argininy nie odpychają się wzajemnie, w przeciwieństwie do związków polilizynowych. Gdm^+ występujące w peptydach poliargininowych łączą się ze sobą tworząc w ten sposób pary jonowe, a następnie agregaty na powierzchni błon biologicznych, z którymi oddziałują. Uważa się, iż interakcja ta nie jest zbyt silna i dlatego potrzeba 6-12 reszt argininy w cząsteczce, by spowodować znaczne nagromadzenie się peptydu na powierzchni błony komórkowej, a następnie zainicjować proces jego internalizacji [76, 79].

Ilość ugrupowań guanidynowych w peptydzie nie pozostaje bez znaczenia, przeprowadzono badania, w których testowano wpływ różnej długości łańcucha (R4 - R16) związków poliargininowych na ich zdolności penetrujące wobec linii komórek mysich makrofagów (RAW264.7). Zaobserwowano, iż peptydy zawierające 4 reszty Arg w znikomym stopniu przenikały przez błonę biologiczną, natomiast najskuteczniej w komórkach, a nawet w ich jądrach lokalizowały się związki R6 oraz R8. Następnie stopień internalizacji malał wraz ze wzrostem długości łańcucha. Natomiast Morishita i współpracownicy badali wpływ niekwalencyjnie powiązanej insuliny z izomerami D i L poliargininy o określonej długości łańcucha (R6, R8, R10) na wchłanianie insuliny w jelitach cienkich u szczurów. Zaobserwowano wzrost jej wchłaniania w jelitach przy użyciu każdego z powyższych peptydów w porównaniu do nieskoniugowanej insuliny,

najskuteczniej zaś działał koniugat z D-R8. Oligomery L i D – argininy z podobną efektywnością wnikają do komórek, lecz ich zdolności zwiększające wchłanianie przez śluzówkę znacznie się różniły na korzyść tych o konfiguracji D. Spowodowane może być to tym, iż peptydy zawierające w swojej sekwencji reszty aminokwasowe w formie L są mniej stabilne proteolitycznie i mogą być szybciej degradowane przez enzymy proteolityczne aktywne w jelitach. Zastąpienie zatem reszt naturalnie występującej L-argininy resztami D-argininy powoduje większą odporność proteolityczną peptydu [2, 29, 80, 81].

4. Związki zawierające liczne ugrupowania guanidynowe

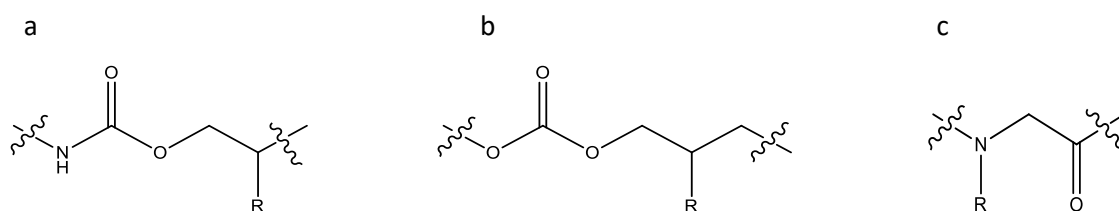
Zrozumienie, w jaki sposób ugrupowanie guanidynowe wpływa na właściwości penetrujące CPP pozwoliło naukowcom na zaprojektowanie nowych oraz modyfikację już istniejących peptydów, aby zoptymalizować ich przenikanie przez membrany biologiczne. Kolejne badania wykazały, iż związki niebędące peptydami, lecz posiadające w swojej strukturze grupy guanidynowe również zdolne są do przekraczania błon cytoplazmatycznych [38].

Do takich związków zalicza się między innymi oligokarbaminiany, które są syntetycznymi biopolimerami zbudowanymi z innych indywiduów niż aminokwasy (rys. 10a). Schultz i współpracownicy wykazali odporność tego rodzaju struktur na degradację proteolityczną. W 2002 roku związki te zostały zgłoszone jako nowa klasa cząsteczkowych transporterów, tzw. oligokarbaminiany guanidynylowane. Grupa naukowa Wendera w pracach opisuje serię oligokarbaminianów, których grupy karbaminianowe połączone są szkieletem etylenowym z przyłączonym łańcuchem bocznym zakończonym ugrupowaniem guanidynowym. Wyniki wskazują, iż 9-merowy oligokarbaminian guanidynowy wnika do wnętrza komórek szybciej niż analogiczny do niego polimer (D-Arg)₉ i peptyd TAT (49-57). Ta grupa związków charakteryzuje się także zdolnością do przenikania przez barierę skórną, która jest znacznie trudniejszą przeszkodą do pokonania niż błona cytoplazmatyczna. Wykonano doświadczenie, w którym wykazano, iż sama biotyna nie posiada właściwości penetrujących warstwę

naskórka myszy w przeciwieństwie do skoniugowanego z nią oligokarbaminianu guanidynowego. Wyniki zobrazowano przy użyciu znakowanej streptawidyny, której fluorescencję oglądano pod mikroskopem. Powyższa właściwość umożliwia lepsze wchłanianie transportowanych związków mających zastosowanie w dyscyplinach dermatologicznych [82, 83].

Kolejną grupą związków proponowaną przez zespół Wendera są oligowęglany guanidynowe, gdzie poliguanidyny zostały połączone wiązaniem węglanowym (rys. 10b) [84].

Peptoidy są polimerami peptydomimetycznymi, których łańcuchy boczne w przeciwieństwie do aminokwasów nie są przyłączone do węgla α , lecz do amidowego atomu azotu (rys. 10c). Z tego też powodu nie przyjmują one struktur drugorzędowych. Cechują się większą elastycznością niż peptydy, gdyż pozbawione są wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy $-\text{CO}$ i $\text{HN}-$. Wender i współpracownicy w kolejnej pracy opisali serię związków poliguanidynowych, które pozbawione są centrów stereogenicznych w łańcuchu głównym, a łańcuchy boczne, jakimi są oligomery argininy zostały przyłączone w pozycji 1, 4 – szkieletu głównego. Tak otrzymane peptoidy zdolne są do penetracji komórek, przy czym nie ulegają degradacji enzymatycznej, a ich większa elastyczność prowadzi do szybszego ich wchłaniania [38, 85, 86].

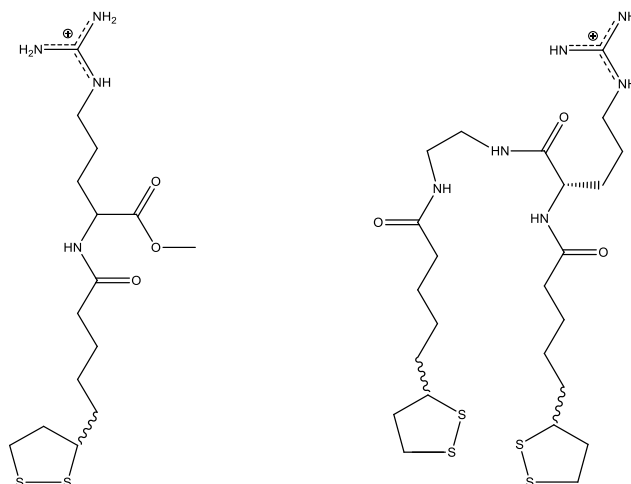


Rysunek 10. Struktury przedstawiające: a – oligokarbaminiany, b – oligowęglany, c – oligopeptoidy.
R – łańcuch boczny.

Rysunek wykonany na podstawie [83–85].

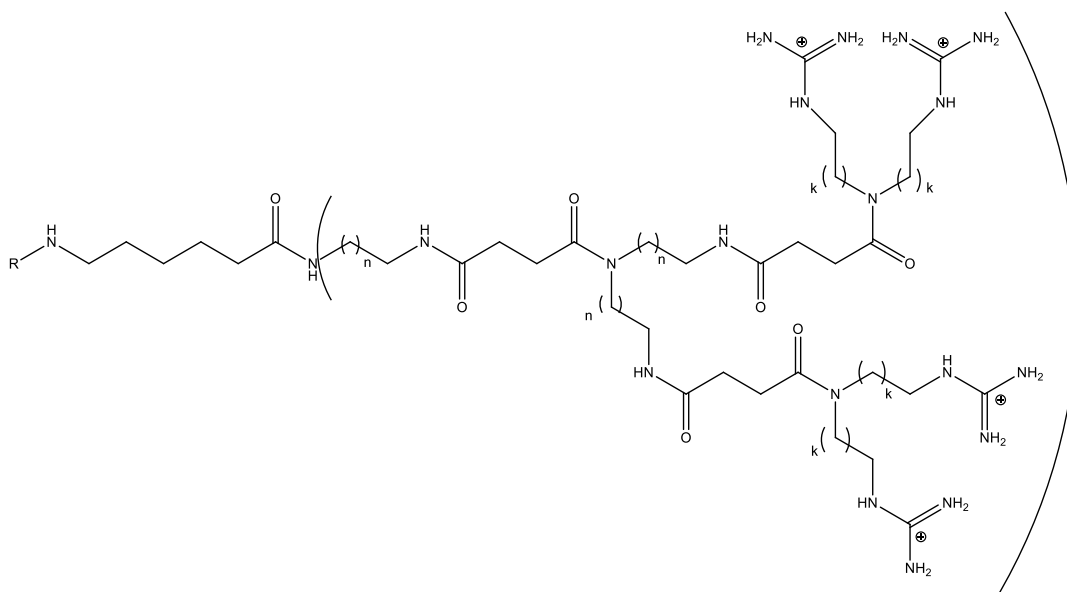
Polidisulfidy penetrujące błony komórkowe (CPD, ang. *cell-penetrating polydisulfides*) to związki bogate w grupy guanidynowe, których szkielet peptydowy został zamieniony przez polidisulfid. Biorą one udział w kowalencyjnych

oddziaływaniach z powierzchnią dwuwarstwy biologicznej, które umożliwiają ich transport do wnętrza komórki. Związki przedstawione na rysunku 11 ulegają redukcyjnej depolimeryzacji przez glutation i nie pozostają zablokowane w endosomach. Podczas internalizacji błona komórkowa nie ulega uszkodzeniu niezależnie od przenoszonego przez nie efektora [38, 87].



Rysunek 11. Struktury przykładowych polidisulfidów penetrujących błony komórkowe zawierających ugrupowania guanidynowe.
Rysunek wykonany na podstawie [38].

W badaniach dotyczących transportu związków do wnętrza komórki tworzy się również struktury dendrymeryczne bogate w ugrupowania guanidynowe. Dendrymery są sferycznymi cząsteczkami podobnymi do polimerów i cechują się symetryczną budową. Składają się z różnych podjednostek tworzących jedną, większą molekułę. Wender i współpracownicy zsyntezowali serię takich związków i badali ich skuteczność w przenikaniu przez błony biologiczne komórek linii Jurkat. Eksperymenty wykazały, iż mimo, że ilość grup guanidynowych odgrywa kluczową rolę w internalizacji, to szkielet również nie pozostaje bez znaczenia. Najskuteczniej wnikały transportery heksylo-heksylowe ($n=k=5$) oraz heksylo-propylowe ($n=5, k=2$) (rys. 12) [85, 88].

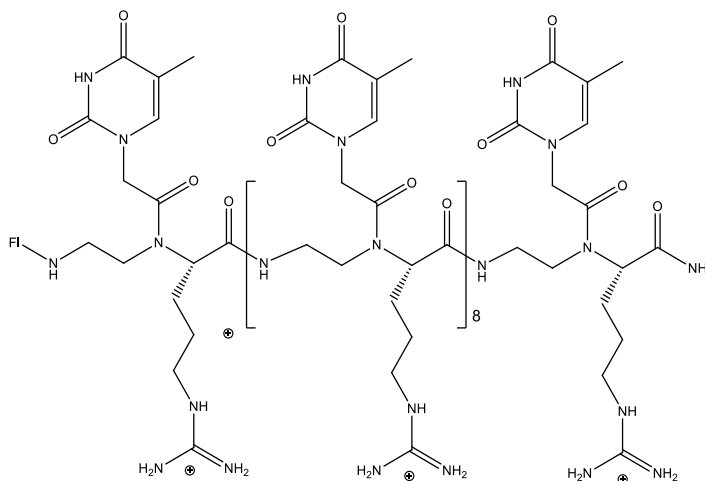


Rysunek 12. Struktura dendrymerycznego związku zawierającego liczne ugrupowania guanidynowe.

Rysunek wykonany na podstawie [85].

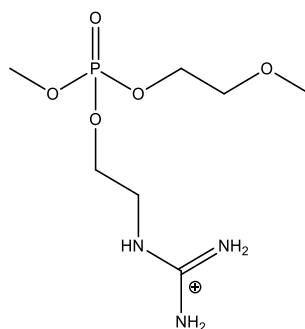
Innowacyjnym podejściem jest przyłączenie grup guanidynowych do oligonukleotydów (ON) – pochodnych kwasów nukleinowych. Dzieje się to poprzez insercję reszt argininy do łańcucha kwasu nukleinowego. Taka modyfikacja może przyczynić się do zwiększenia rozpuszczalności oligonukleotydów (Gnd protonowane w większym zakresie pH ze względu na znaczną zasadowość) oraz poprawić ich wchłanianie przez błonę komórkową. Badania prowadzone przez zespół Ly dowodzą, iż przyłączenie 9 reszt Arg do oligonukleotydu powoduje podobną skuteczność do 9-meru peptydu TAT w przenikaniu przez membranę biologiczną komórek linii Sao-2 oraz HCT116 (wykorzystano mikroskopię konfokalną). Grupa badawcza dokonała syntezy peptydowego kwasu nukleinowego (ang. *Peptide nucleic acid*, PNA), będącego syntetycznym analogiem DNA oraz RNA, w którym szkielet cukrowo-fosforowy zastąpiono jednostkami *N*-(2-aminoetylo)glicyny. Związek ten ulega hybrydyzacji z komplementarną nicią DNA i RNA, tworząc stabilną termicznie oraz proteolitycznie strukturę, która jednak jest słabo wchłaniana przez komórki. Naukowcy z zespołu Ly w następnym kroku postanowili dokonać modyfikacji utworzonego analogu poprzez przyłączenie do niego ugrupowań guanidynowych. Zmiana ta zwiększyła właściwości penetrujące błony cytoplazmatyczne oraz poprawiła rozpuszczalność powstałego w ten sposób GPNA (rys. 13). Kolejną ciekawą właściwością jest to, iż fragmenty kwasów

nukleinowych oddzielone resztami argininy wykazują podobne cechy do tych pozbawionych insercji, guanidynonukleotydy wciąż podlegają zasadom komplementarności nici DNA [85, 89, 90].



Rysunek 13. Wzór strukturalny peptydowego kwasu nukleinowego zawierającego ugrupowania guanidynowe (GPNA). Fl – fluoresceina.
Rysunek wykonany na podstawie [85].

Kolejną klasą transporterów molekularnych są oligofosfoestry bogate w ugrupowania guanidynowe (rys. 14). Syntetyczne polifosforany mogą być wykorzystywane jako biomateriały, a także jako mimetyki DNA. Proces syntezy oligofosfoestrów może składać się z jednoetapowej reakcji polimeryzacji organokatalitycznej z otwarciem pierścienia fosfolanu heksylo-guanidyniowego (jako inicjator zastosowano ugrupowanie dansylowe lub tiolowe). Wychwyt komórkowy w przypadku leków skoniugowanych z guanidynowymi oligofosfoestrami zależy od długości ich łańcucha, najefektywniejszą penetrację zauważono przy 10 jednostkach monomeru. Według doniesień zespołu naukowego Paula A. Wender, przenośniki te są skuteczniejsze niż wcześniej zbadane przez nich układy oligoargininowe oraz oligowęglanowe. Ze względu na wysokie właściwości penetrujące oligofosfoestrów guanidynowych oraz stabilność hydrolityczną naukowcy wciąż prowadzą badania, które umożliwiłyby ich zastosowanie w medycynie [91].

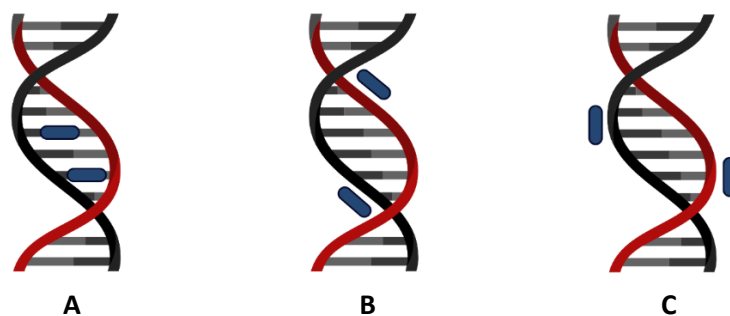


Rysunek 14. Struktura ogólna oligofosfoestru zawierającego ugrupowania guanidynowe. Rysunek wykonany na podstawie [91].

5. Związki zdolne do tworzenia oddziaływań z DNA

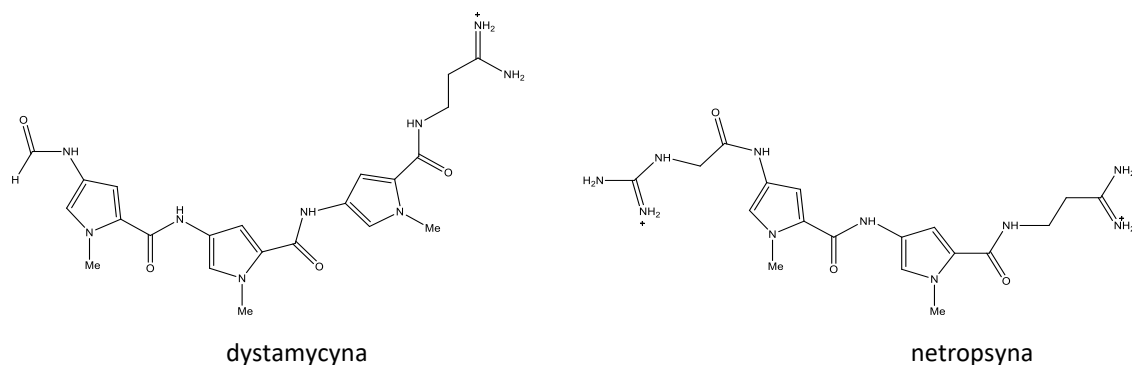
DNA stanowi podstawę materiału genetycznego wszystkich organizmów. Odgrywa ważną rolę w procesach biologicznych, gdyż dostarcza informacji niezbędnych do syntezy białek oraz enzymów, a także kontroluje budowę i funkcjonowanie całej komórki. Badanie oddziaływania leków z DNA odgrywa zasadniczą rolę podczas projektowania oraz syntezy nowych farmaceutyków. Środki te poprzez interakcję z DNA ingerują również w wiele procesów zachodzących wewnątrz komórki, hamując tym samym jej wzrost lub uniemożliwiając podziały [92–95].

Właściwości fizykochemiczne cząsteczek wpływają na siły międzycząsteczkowe i ich zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi. Interakcje pomiędzy związkami, a DNA zachodzą najczęściej według 2 głównych typów, które dodatkowo stabilizują utworzony kompleks: kowalencyjnie i niekowalencyjnie, te drugie dzielą się dodatkowo na oddziaływania elektrostatyczne, wiązanie się do mniejszego i większego rowka oraz wiązanie interkalacyjne (rys. 15). Oddziaływania elektrostatyczne tworzą się pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi, a dodatnimi grupami występującymi w badanych związkach. Wiązania wodorowe oraz oddziaływania van der Waalsa umożliwiają przyłączanie się niewielkich cząstek do rowków w strukturze DNA. Interkalacja zachodzi najczęściej poprzez wiązanie się związków pomiędzy parami zasad kwasów nukleinowych [92].



Rysunek 15. Oddziaływania związków z DNA, A – interkalacja, B – wiązanie do rowków, C – oddziaływania elektrostatyczne.
Rysunek wykonany na podstawie [96].

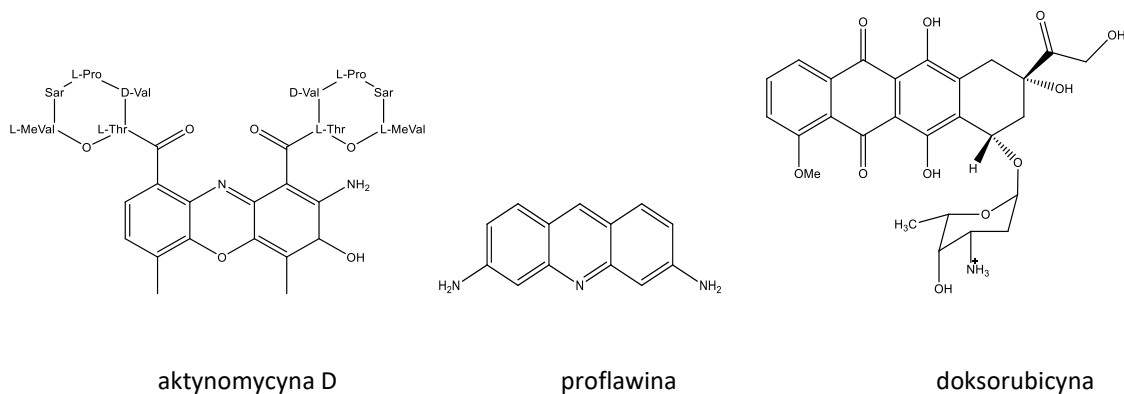
Cząsteczki mogą wiązać się do DNA w następstwie reakcji chemicznych, które skutkują alkilowaniem kwasów nukleinowych lub mogą prowadzić do rozszczepienia DNA. Niewielkie cząsteczki posiadają zdolność wiązania się do rowków DNA. Takie związki zbudowane są najczęściej z licznych heterocyklicznych lub aromatycznych pierścieni węglowodorowych charakteryzujących się możliwością rotacji, która umożliwia dopasowanie się cząsteczki do wgłębień w helisie DNA. Najbardziej pożądanym kształtem, jaki są w stanie utworzyć związki, jest półksiężyc uzupełniający wnękę powstałą przez skręt helisy. Leki takie, jak netropsyna, berenil, dystamycyna oraz mitramycyna są najczęstszymi, które wiążą się do mniejszego rowka DNA. Netropsyna oraz dystamycyna to naturalne związki posiadające w swoim składzie grupy amidowe oraz pierścienie *N*-metylopirolowe (rys. 16). Łączenie do mniejszej bruzdy DNA odbywa się dzięki możliwości tworzenia wiązań wodorowych oraz oddziaływań van der Waalsa, kompleks dodatkowo stabilizowany jest przez oddziaływania elektrostatyczne tworzące się między ujemnymi resztami fosforanowymi DNA, a dodatnio naładowanym końcem leku. Obie powyższe cząsteczki wiążą się selektywnie do regionów DNA zawierających pary A – T. Występowanie zawady sterycznej przy guaninie powoduje, iż łączenie się leku do regionów zawierających komplementarne pary zasad G – C jest niemożliwe [93, 97].



Rysunek 16. Wzory strukturalne związków wiążących się do mniejszego rowka DNA – dystamycyny oraz netropsyny.

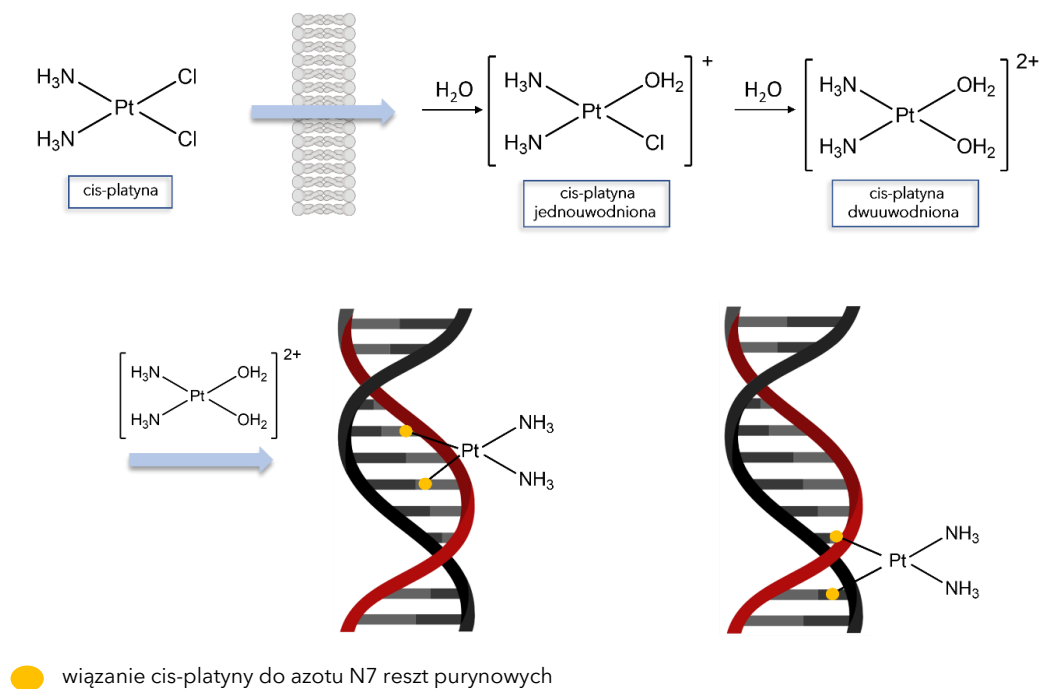
Rysunek wykonany na podstawie [93].

Do interkalacji dochodzi najczęściej wtedy, kiedy cząsteczka aromatyczna o płaskiej strukturze wnika pomiędzy pary zasad w podwójnej helisie tworząc oddziaływania niekowalencyjne. Interkalatory nie rozrywają wiązań wodorowych pomiędzy zasadami, przez co nie wpływają na ich komplementarność. Do stabilizacji kompleksu związek – DNA przyczyniają się oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe, wiązania wodorowe oraz siły przeniesienia ładunku. Zjawisko interkalacji powoduje zaburzenia struktury DNA, dochodzi do modyfikacji kąta skręcenia helisy i odległości pomiędzy komplementarnymi zasadami. Interkalatory oddziałując z DNA wpływają na działanie topoizomerazy zapobiegając tym samym replikacji oraz transkrypcji. Tak utworzony kompleks często jest śmiertelny dla proliferujących komórek. Do tej grupy związków zalicza się pochodne akrydyny, takie jak: akryflawina, aminakryna oraz proflawina (rys. 17), których reszty aminokwasowe oddziałują elektrostatycznie z grupami fosforanowymi DNA, a układ pierścieni aromatycznych rozpoczyna interkalację. Aktynomycyna (rys. 17) zaliczana jest do polipeptydowych antybiotyków, jej działanie polega na hamowaniu syntezy DNA oraz RNA. Dzieje się to poprzez utworzenie wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych peptydu z mniejszym rowkiem DNA, a także poprzez interkalację do podwójnej nici pierścienia fenoksazonu. Kolejnym związkiem, który interkaluje pomiędzy pary zasad w kwasach nukleinowych oraz hamuje wzrost komórek poprzez blokowanie topoizomerazy II jest dokсорubicyna (rys. 17). Zalicza się ją do antracyklin stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych [93, 97 – 100].



Rysunek 17. Wzory strukturalne związków oddziałujących z DNA.
Rysunek wykonany na podstawie [93].

Metale i związki metali również mogą oddziaływać z DNA. Atomy lub jony metali zdolne są do selektywnego wiązania się do kwasów nukleinowych oraz innych struktur biologicznych. Kompleks metal – DNA może tworzyć się poprzez połączenie odwracalne (niekowalencyjne) oraz nieodwracalne (kowalencyjne). Podczas wiązań koordynacyjnych centrum metalu wiąże atomy azotu w zasadach nukleinowych lub atomy tlenu w szkielecie cukrowo – fosforanowym. Przykładem związku wiążącego się kowalencyjnie do kwasów nukleinowych jest cisplatyna (cis-diaminadichloroplatyna (II)), która znalazła zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych, wyróżnia się szczególną skutecznością wobec nowotworów jajnika, pęcherza moczowego oraz szyjki macicy. Obojętna cząsteczka cisplatyny w warunkach biologicznych jest hydrolizowana do bardziej reaktywnych form: $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ i $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Oddziałuje ona z licznymi strukturami wewnątrzkomórkowymi, lecz głównym jej celem terapeutycznym jest DNA (rys. 18). Dodatni ładunek koordynacyjnej cząsteczki zwiększa do niego powinowactwo. Utworzenie adduktów cisplatyna – DNA możliwe jest poprzez powstanie wiązań koordynacyjnych z wolną parą elektronową pochodzącą od azotu N7 reszt purynowych. Cisplatyna łączy się z parami zasad będącymi w obrębie jednej nici DNA lub w dwóch różnych tworząc w ten sposób wiązania krzyżowe. W wyniku interakcji tego związku dochodzi do zaburzenia struktury DNA, co prowadzi do zahamowania syntezy oraz replikacji kwasów nukleinowych [94, 101 – [104].



Rysunek 18. Aktywacja cis-platyny oraz jej włączanie pomiędzy zasady azotowe wewnątrz nici DNA. Rysunek wykonany na podstawie [103, 105].

Przykładem kolejnego związku oddziałującego z DNA jest kwercetyna, zaliczana do grupy flawonoidów. Tę interakcję w swojej pracy opisali Chen i współpracownicy, którzy do badań wykorzystali DNA pochodzące z grasicy cielęcej. Przeprowadzone przez nich eksperymenty dowodzą, iż kwercetyna oddziałuje z kwasami nukleinowymi poprzez przyciąganie elektrostatyczne oraz przyłączanie się do rowków DNA, głównie tworząc wiązania wodorowe z tyminą [96].

Co oczywiste, kwasy nukleinowe oddziałują również z licznymi białkami. Jedne z pierwszych takich struktur zaobserwowanych podczas badań krystalograficznych dotyczą interakcji pomiędzy DNA, a białkiem aktywatora katabolicznego (ang. *catabolite activator protein*, CAP). W bazie danych PDB (ang. *Protein Data Bank*) aktualnie istnieje około czterech tysięcy zarejestrowanych i zbadanych struktur białek oddziałujących z DNA. Interakcje te można podzielić na specyficzne, gdzie określone fragmenty białka (ang. *sequence-specific*) oddziałują z konkretnymi elementami wchodzącymi w skład kwasów nukleinowych oraz niespecyficzne, cechujące się brakiem sprecyzowanego miejsca wiązania (ang. *non-sequence-specific manner*). Podczas tworzenia się wiązania specyficznego dochodzi do zmian nie tylko w strukturze DNA, ale także w strukturze oddziałującego z nim białka. Te dwa wielkocząsteczkowe

związki w celu utworzenia interakcji, muszą przyjąć odpowiednią konformację. Po wzajemnym dopasowaniu kompleks uzyskuje stabilność dzięki osiągnięciu optymalnego poziomu energetycznego. Proces wzajemnego rozpoznawania miejsca wiązania białko – DNA jest dość złożony. Po rozpoznaniu przez białko odpowiedniej sekwencji w DNA tworzą się wiązania wodorowe, a także oddziaływania elektrostatyczne oraz van der Waalsa utrzymujące powstały kompleks [106 – 108].

Białka, jakimi są czynniki transkrypcyjne łączą się z określoną sekwencją kwasów nukleinowych poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe występujące pomiędzy łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych oraz grupami funkcyjnymi zasad azotowych nukleotydów. Do tworzenia oddziaływań z DNA białka wykorzystują szeroką gamę motywów strukturalnych, z tego względu wiązania te zostały podzielone na ponad 70 różnych kategorii. Białkami tworzącymi niespecyficzne połączenia z DNA oraz posiadającymi wiele domen wiążących są białka histonowe. W skład ich sekwencji wchodzi liczne reszty aminokwasowe zawierające w łańcuchu bocznym grupy funkcyjne naładowane dodatnio, takie jak arginina i lizyna, przez co tworzą oddziaływania elektrostatyczne z kwasami nukleinowymi, skutkujące kondensacją DNA [107, 109 – 111].

6. Związki posiadające zdolność do kondensacji DNA

W ciągu ostatnich lat rośnie zainteresowanie stosowaniem terapii genowych w leczeniu lub zapobieganiu różnych chorób. Polega ona na wprowadzeniu materiału genetycznego w postaci DNA lub RNA do wnętrza komórek i tkanek w celu osiągnięcia określonego efektu terapeutycznego. Kwasy nukleinowe w swojej strukturze zawierają liczne grupy z ładunkiem ujemnym, przez co ich przenikalność przez błony komórkowe jest ograniczona. Z tego też powodu w celu ich wewnątrzkomórkowej dystrybucji stosuje się różnego rodzaju wektory. W badaniach wykorzystywane są naturalne przenośniki, jakimi są między innymi wirusy, które ze względu na przebieg ich cyklu życiowego pozwalają na wprowadzenie oraz uwolnienie materiału genetycznego. Jednak zważywszy na immunogenność, ograniczenia w produkcji na większą skalę oraz bezpieczeństwo zastosowania wektorów wirusowych, naukowcy wciąż poszukują

lepszich rozwiązań. Potencjalnymi nośnikami DNA w terapiach genowych mogą być związki, takie jak: nanocząstki, peptydy, białka oraz lipidy. Opisane wyżej przenośniki powinny cechować się niską cytotoksycznością, zdolnością do przenikania przez błony biologiczne, muszą zapewnić transport DNA oraz jego stabilną ekspresję. Transportery te są bezpieczniejsze niż ich odpowiedniki wirusowe i z tego powodu podlegają ciągłej optymalizacji [112 – 116].

Związki transportujące powinny powodować upakowanie helikalnej struktury DNA w zwarte, uporządkowane układy umożliwiające jej przeniesienie. Szczególnie ważną grupą związków umożliwiających kondensację kwasów nukleinowych poprzez oddziaływania elektrostatyczne z ujemnymi grupami fosforanowymi są dodatnio naładowane peptydy kationowe. Związki te umożliwiają upakowanie DNA do struktur o zmiennym kształcie toroidalnym, sferycznym lub innym, zależnym od jej wielkości. Peptydy kationowe poprzez swoje właściwości penetrujące błony biologiczne pozwalają również na transport kwasów nukleinowych do wnętrza komórki oraz ekspresję genów jądrowych. Peptydy posiadające zdolność do kondensacji kwasów nukleinowych zapobiegają ich degradacji przez nukleazy cytozolowe oraz przedłużają czas ich półtrwania. Naukowcy z zespołu badawczego Zhou podają, iż do kondensacji DNA dochodzi wtedy, gdy około 90% ujemnie naładowanych reszt jest neutralizowanych przez cząsteczki o ładunku dodatnim +3 lub większym [113, 117 – 120].

Poli-L-lizyny są jednymi z częściej stosowanych związków kondensujących i przenoszących DNA. W latach 80-tych były pierwszym wektorem niewirusowym stosowanym w badaniach dotyczących terapii genowych. Liczba monomerów lizyny w takim białku wynosi od 90 do 450, jest ono biodegradowalne, dzięki czemu polimer może być stosowany *in vivo*. Dłuższy łańcuch polipeptydowy zawiera większy sumaryczny ładunek dodatni i jest zdolny do silniejszego wiązania z DNA, ale ulega też dłuższemu rozkładowi proteolitycznemu, co sprawia, że jest bardziej toksyczny dla komórek. Aby zmniejszyć efekt cytotoksyczności stosuje się łączenie peptydu z glikolem polietylenowym (PEG) lub grupami imidazolowymi zaś w celu zwiększenia wychwytu receptorowego przyłącza się określone ligandy [118, 121].

Alternatywą mogą okazać się również związki bogate w reszty argininy. Najczęściej stosowanym jest białko TAT wirusa HIV oraz penetratyna, która dzięki obecności reszt lizyny i argininy w swojej sekwencji powoduje kondensację DNA oraz wnika do wnętrza komórek. Kumar i współpracownicy utworzyli chimeryczny peptyd składający się z 9 reszt arginin połączonych z glikoproteiną wirusa wścieklizny (RVG). Tak powstały związek był w stanie wiązać oraz transdukować siRNA do komórek neuronalnych, kondensując RNA oraz eksponując ładunek dodatni na zewnątrz w celu przekroczenia bariery krew – mózg [122].

Czynnikami powodującymi kondensację kwasów nukleinowych są także amfifilowe lipidy kationowe. Ich struktura jest zbliżona do występujących naturalnie fosfolipidów, gdyż w swojej budowie zawierają zarówno regiony hydrofilowe, jak i hydrofobowe. Związki te poprzez tworzenie oddziaływań w roztworach wodnych ulegają samoorganizacji przyjmując takie struktury, jak między innymi micelle i liposomy, co ułatwia kondensację DNA. Lipidy charakteryzują się znikomą cytotoxycznością oraz łatwością w otrzymywaniu, jednak ich zastosowanie do wewnątrzkomórkowego transportu kwasów nukleinowych jest ograniczone z powodu niskiej stabilności w roztworach biologicznych [120, 123].

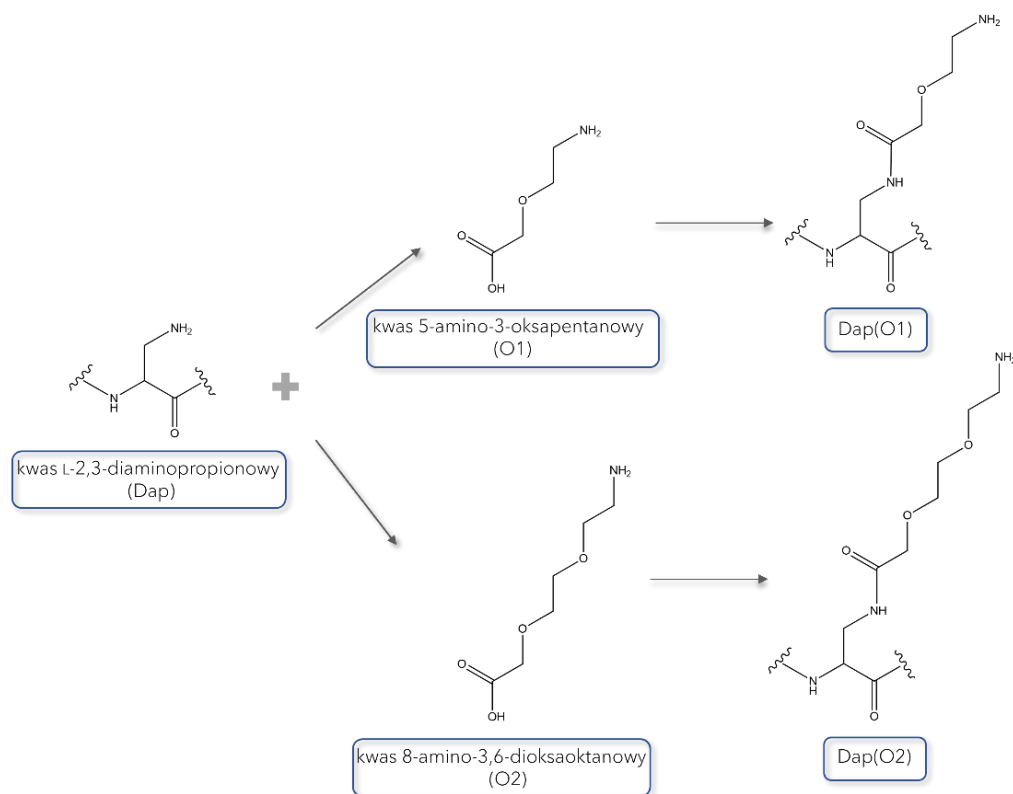
Kolejną grupą związków posiadających właściwości kondensujące DNA są polimery kationowe oraz dendrymery. Pierwsze z nich charakteryzują się dodatnim ładunkiem cząsteczki, zdolnością selektywnego transportu związków do miejsca docelowego oraz ochroną DNA przed działaniem enzymów hydrolitycznych. Przykładem tego typu związków jest polietyloimina, która jest dobrym środkiem kondensującym oraz posiada zdolność do penetracji błon cytoplazmatycznych, jednakże ograniczeniem w jej stosowaniu jest toksyczny wpływ na komórki powodowany jej słabą biodegradowalnością. Zastępstwem dla polietyloiminy może być zastosowanie polimerów cyklodekstranowych oraz chitozanu. Ze względu na dodatni ładunek, zdolność do transportowania DNA posiadają również dendrymery. Są to związki organiczne charakteryzujące się rozgałęzioną strukturą przypominającą kształtem kulę. Zbudowane są one z centralnego rdzenia, do którego promieniście przyłączone są łańcuchy boczne posiadające na końcu określone grupy funkcyjne [120, 124].

Nanocząstki złota są grupą związków kondensujących oraz transportujących DNA, która wyróżnia się tym, że jest bierna chemicznie, w skutek czego we wnętrzu komórek jest stabilna oraz nie powoduje cytotoksyczności. Powierzchnię nanocząstek złota można modyfikować poprzez przyłączenie do nich określonych grup funkcyjnych. W przypadku kondensacji oraz transportu DNA najskuteczniej związki te działają, gdy ich powierzchnia pokryta jest grupami o ładunku dodatnim. Wtedy też kondensują DNA w podobny sposób, jak pozostałe czynniki kationowe (na przykład lipidy). Niewielki rozmiar nanocząstek umożliwia im penetrację błon cytoplazmatycznych [127].

Ostatnią opisywaną przez mnie grupą cząsteczek, które upakowują DNA są nanorurki węglowe (ang. *carbon nanotubes*, CNT), będące odmianą alotropową węgla i zbudowane są ze zwiniętych arkuszy grafenu. CNT są obojętne chemicznie i dlatego aby doszło do kondensacji kwasów nukleinowych należy przyłączyć do ich powierzchni określone grupy funkcyjne. Może się to odbywać kowalencyjnie (poprzez 1,3-dipolarną cykloaddycję) lub niekowalencyjnie. Funkcjonalizowane nanorurki węglowe mogą być wykorzystywane jako środki transfekujące [120].

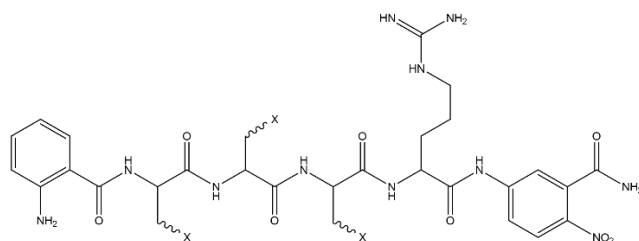
7. Pochodzenie związków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego

W 2016 roku nasza grupa badawcza opublikowała pracę przedstawiającą syntezę nowej klasy peptydomimetyków składających się z reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego (Dap), których grupy aminowe zostały podstawione szeregiem funkcjonalizowanych oksakwasów (PEG) (rys. 19). Przeprowadzono syntezę biblioteki zawierającej wspomniane wyżej zmodyfikowane reszty w pozycjach P2 - P4 peptydomimetyku, podczas gdy w pozycji P1 znajdowała się reszta argininy. Dodatkowo biblioteka zawierała na N-końcu sekwencji donor fluorescencji, jakim jest kwas 2-aminobenzoesowy (ABZ), a na C-końcu akceptor – kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy (ANB). Występowanie w sekwencji zsyntezowanej biblioteki (ABZ-X₄-X₃-X₂-Arg-ANB-NH₂) dwóch powyższych grup umożliwiło jednoczesne monitorowanie absorpcji i fluorescencji [125].

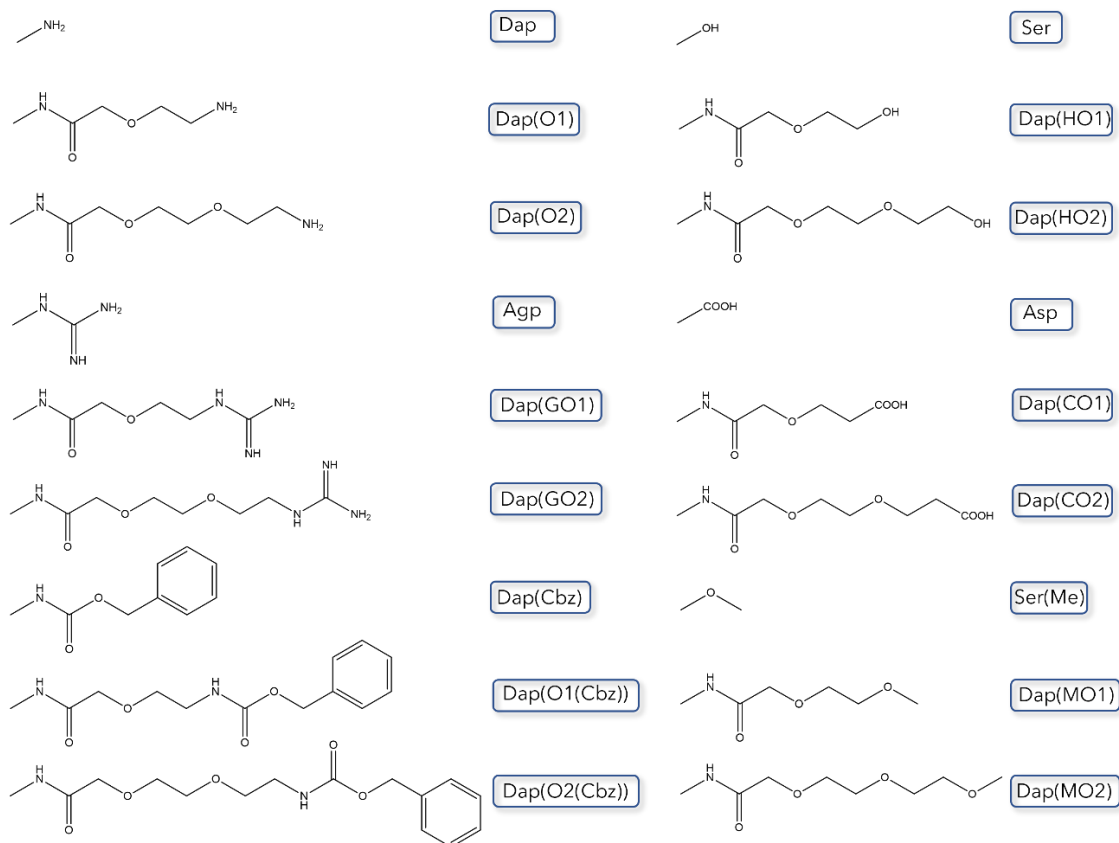


Rysunek 19. Nomenklatura sfunkcjonalizowanych reszt kwasu Dap.
Rysunek wykonany na podstawie [125].

Związki wchodzące w skład biblioteki cechują się zmienną długością oraz zróżnicowanym charakterem chemicznym łańcuchów bocznych w określonych pozycjach. Spowodowane jest to obecnością następujących grup przyłączonych do funkcjonalizowanych pochodnych PEG, takich jak: aminowe, guanidynowe, karboksylowe, metoksyłowe, hydroksylowe oraz benzyloksykarbonyłowe (rys. 20). Poprzez dodatek reszt PEG, powstałe peptydomimetyki wyróżniają się lepszą rozpuszczalnością w wodzie. Wyżej opisana biblioteka, w skład której wchodziło około 6000 związków została zsyntezowana metodą chemii kombinatorycznej mieszania i dzielenia (ang. *mix and split*) z zastosowaniem chemii Fmoc na nośniku stałym. Selekcja substratu najwydajniej ulegającego hydrolizie wobec hNSP4 (neutrofilowa, ludzka proteaza serynowa 4) przeprowadzona została metodą iteracyjną w roztworze i przyczyniła się do otrzymania peptydomimetyku jakim jest ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH₂. Powyższa proteaza podobnie jak, HNE (ludzka elastaza neutrofilowa), katepsyna G oraz PR3 uwalniana jest do przestrzeni międzykomórkowych w wyniku aktywacji neutrofilii [125, 126].



gdzie X:



Rysunek 20. Przegląd biblioteki oraz jej komponentów.
Rysunek wykonany na podstawie [125].

Dodatkowo, w roku 2020 wyselekcjonowaliśmy z biblioteki peptydowej najefektywniej hydrolizowany przez proteasom 20S substrat o sekwencji: ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(GO1)-Dap(O2(Cbz))-Arg-ANB-NH₂. Podwyższona aktywność enzymu została zaobserwowana podczas występowania chorób reumatoidalnych, czy nowotworów złośliwych. Zsyntezowany związek może mieć zastosowanie w diagnostyce nowotworów, gdyż dzięki niemu wykryliśmy aktywność proteasomu 20S w próbkach moczu pacjentów cierpiących na nowotwór pęcherza moczowego [126].

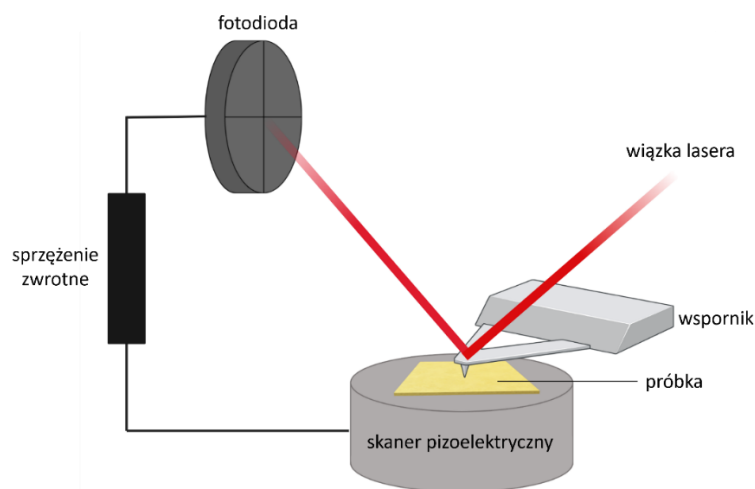
8. Wybrane metody analityczne wykorzystywane w pracy

8.1. **Mikroskopia sił atomowych**

Mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM) zalicza się do rodzaju mikroskopii ze skanującą sondą (SPM, ang. *scanning probe microscopy*). Technika ta służy do trójwymiarowego obrazowania powierzchni próbki w skali atomowej. Zasada jej funkcjonowania oparta jest na mechanice kwantowej oraz efekcie pizoelektrycznym, analizowaną wartością jest natężenie prądu tunelowego płynącego pomiędzy powierzchnią badanego materiału, a ostrzem sondy pomiarowej. Pierwszy mikroskop sił atomowych został skonstruowany w 1986 roku, a w 1989 stał się dostępny komercyjnie. Pozwalał on również, w przeciwieństwie do skaningowego mikroskopu tunelowego (STM), na badanie materiałów izoelektrycznych. Pomiar z wykorzystaniem AFM można prowadzić w powietrzu, w fazie gazowej, ciekłej oraz w próżni. Jest to istotne w przypadku badań układów biologicznych, które często wymagają środowiska wodnego oraz temperatury zbliżonej do fizjologicznej [127 – 131].

8.1.1. Zasada działania

W mikroskopii sił atomowych badanie dotyczy ugięcia wspornika, na której znajduje się ostrze pomiarowe. Dzieje się to na skutek sił oddziaływań występujących pomiędzy atomami sondy, a atomami wchodzącymi w skład powierzchni analizowanej próbki, będącymi miarą odległości między nimi. Wiązka lasera służąca do pomiaru wygięcia dźwigni skupiona jest na tylnej stronie wspornika. Sprawia to, iż odbite światło trafia do fotodiody, która wykrywa zmiany w położeniu wiązki. Następnie sygnały będące skutkiem wygięcia dźwigni ulegają przekształceniu na impulsy elektryczne, które kolejno są modyfikowane i przesyłane do komputera w celu wytworzenia obrazu próbki (rys. 21) [128 – 130, 132, 133].



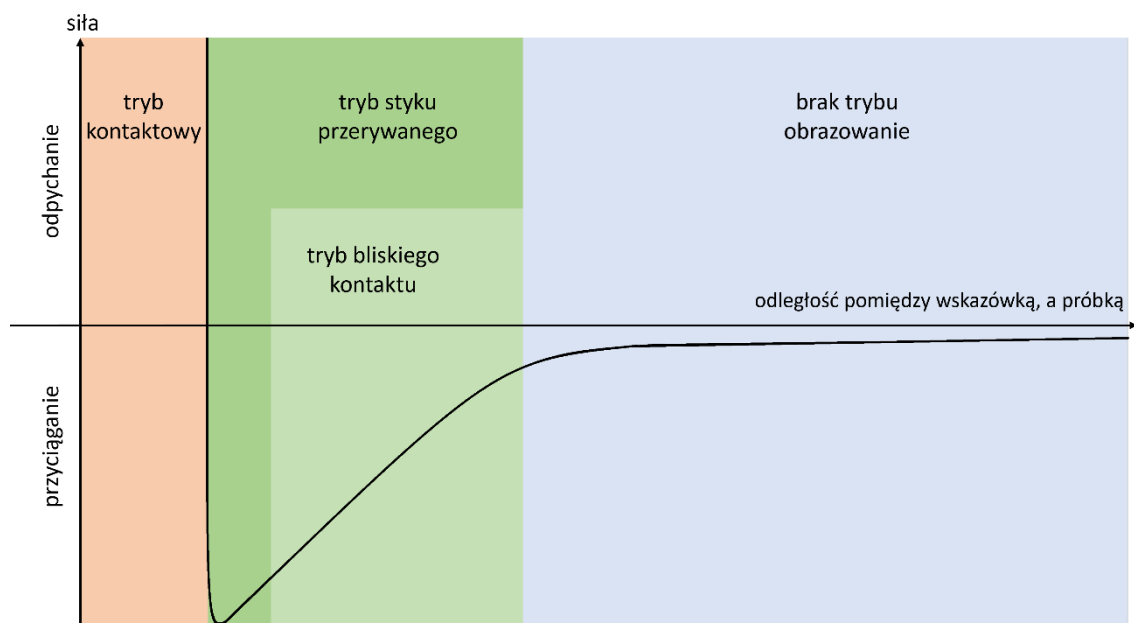
Rysunek 21. Schematyczne przedstawienie zasady działania mikroskopii sił atomowych.
Rysunek wykonany na podstawie [133].

Mechanizm działania AFM opiera się na działaniu siły między ostrzem, a powierzchnią próbki, która zmienia się wraz z dzielącą ich odległością. Interakcje te są zgodne z potencjałem Lennarda – Jonesa, który w tym wypadku jest sumą oddziaływań pomiędzy atomami na powierzchni testowanego materiału, a ostrzem pomiarowym. Gdy sonda znajduje się w dużej odległości od powierzchni próbki, wówczas nie dochodzi do powstania interakcji. Natomiast jeżeli ostrze pomiarowe jest blisko powierzchni badanego materiału wtedy działają siły przyciągania, jakimi są np. van der Waalsa. Zaś jeżeli zbliży się ono do próbki jeszcze bardziej to dominować będą siły odpychające wynikające z nakładania się orbitali [128 – 130, 133].

8.1.2. Tryby pracy AFM

Mikroskop sił atomowych może pracować w kilku trybach. Jednym z nich jest tryb kontaktowy, w którym sonda jest w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią badanej próbki. Ze względu na bliskie odległości atomów wchodzących w skład ostrza pomiarowego i atomów badanej próbki działają tutaj siły odpychania (rys. 22). Zaletą trybu kontaktowego, ze względu na bezustanne stykanie się sondy z próbką, jest uzyskanie wyników o wysokiej rozdzielczości. Jednak z tego samego powodu istnieje też prawdopodobieństwo uszkodzenia powierzchni badanej próbki [133, 134].

Aby zminimalizować kontakt ostrza z próbką wprowadzone zostały tryby pracy oparte na drganiach dźwigni, określane jako dynamiczne. W tym wypadku wspornik działa z częstotliwością rezonansową lub jej bliską. Ostrze pomiarowe wprowadzone jest w drgania, nie styka się stale z powierzchnią próbki, co przekłada się na zmniejszenie siły bocznej podczas skanowania. Siła działająca pomiędzy sondą, a powierzchnią badanego materiału wpływa na częstotliwość oscylacji wspornika. Zmiany te rejestruje układ kontroli sprzężenia zwrotnego, który następnie zaangażowany jest w ich korekcję. Ze względu na wartość odchylenia w ruchach dźwigni, tryb pracy oscylacyjnej może się jeszcze dzielić dodatkowo na dwa typy. W pierwszym z nich, będącym „trybem bliskiego kontaktu” (określanym również jako bezkontaktowy), ustawiona wartość amplitudy jest stosunkowo mała i wynosi maksymalnie 20 nm, a praca odbywa się w reżimie sił przyciągania. Ten tryb AFM cechuje się mniejszym ryzykiem uszkodzenia badanej próbki niż w przypadku pracy kontaktowej. Drugim typem jest „tryb styku przerywanego”, gdzie amplituda ruchu dźwigni wynosić może do 100 nm. Oscylujący wspornik przechodzi przez 3 rodzaje sił, mogą się tutaj tworzyć takie oddziaływania z powierzchnią próbki, jak: odpychające, przyciągające oraz zaniedbywalne [133 – 135].



Rysunek 22. Schematyczne przedstawienie oddziałujących sił oraz odległości pomiędzy sondą pomiarową, a próbką w zależności od trybu pracy.

Rysunek wykonany na podstawie [133].

Mikroskopia sił atomowych ze względu na duże możliwości analityczne jest coraz częściej wykorzystywana w badaniach biologicznych oraz biofizycznych. Stosowana jest w celu uzyskania informacji o morfologii białek, kwasach nukleinowych, budowie błon oraz organelli komórkowych. Umożliwia obrazowanie molekularne takich struktur, jak np.: DNA, RNA, chromosomy, włókna kolagenu oraz wiele innych. Może być także narzędziem do analizowania aktywności enzymatycznej. Ten rodzaj mikroskopii umożliwia analizę oddziaływań międzycząsteczkowych, takich jak między innymi: białko – białko, białko – ligand, DNA – peptyd, a także receptorów wchodzących w interakcję z określonymi przeciwciałami, hormonami i innymi cząsteczkami. Badanie topografii oraz właściwości mechanicznych danego materiału umożliwia zastosowanie mikroskopii sił atomowych w analizie nanostruktur polimerowych oraz metalicznych wykorzystywanych w medycynie regeneracyjnej i w strukturach wszczepialnych [129, 136, 137].

8.1. Termoforeza w mikroskali

Termoforeza w mikroskali (ang. *microscale thermophoresis*, MST) jest techniką służącą do ilościowego badania oddziaływań między dwiema molekułami na podstawie zmian w sygnale fluorescencji. Metoda ta opiera się na zjawisku termoforezy, która jest procesem termodynamicznym polegającym na przemieszczaniu się cząstek w gradiencie temperatur, najczęściej z regionu cieplejszego do chłodniejszego. Po raz pierwszy w cieczech została ona zaobserwowana w 1856 roku przez niemieckiego naukowca Carla Ludwiga, zaś w badaniach wykorzystano ją w 1897 roku [138].

8.2.1. Zasada działania

Technika MST do charakterystyki wiązania wykorzystuje zmiany fluorescencji, zatem jedna z dwóch badanych cząsteczek musi być znakowana fluorescencyjnie. Podczas pomiaru w próbce przez laser IR, generowany jest miejscowy gradient temperatur, który powoduje ukierunkowany ruch cząsteczek. Na ruch ten wpływają między innymi takie właściwości, jak: ładunek, wielkość molekuł, konformacja oraz

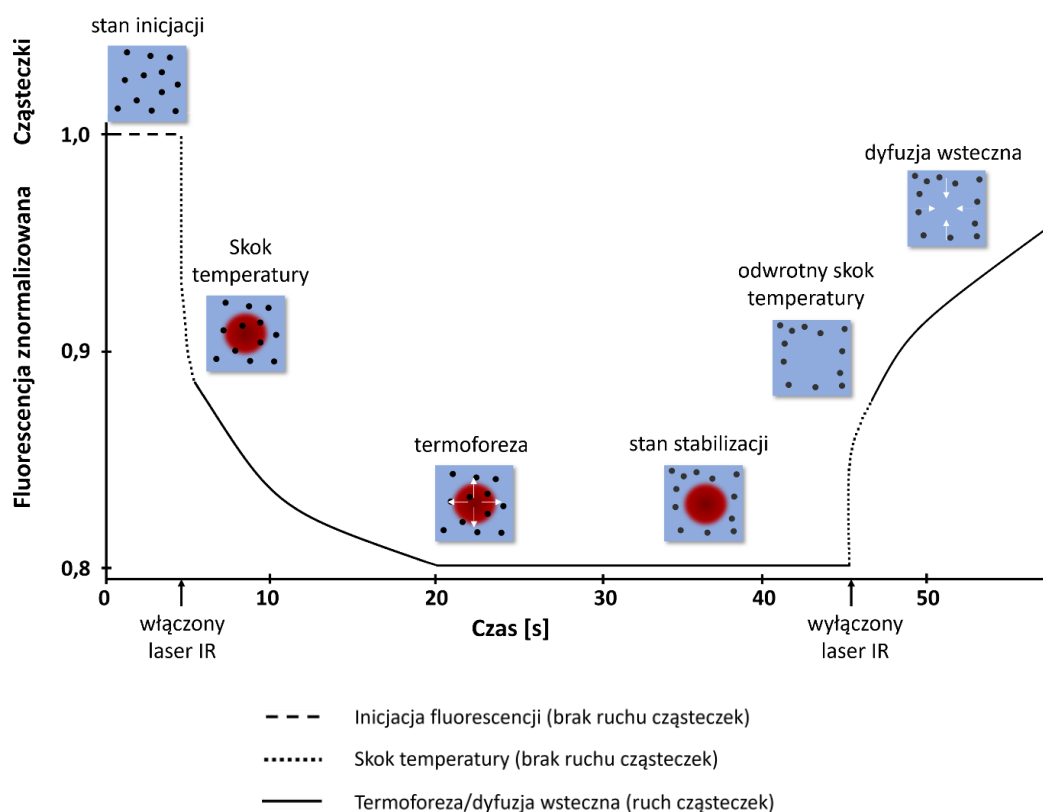
powłoka hydratacyjna. W praktyce chociaż jeden z wymienionych powyżej parametrów ulega modyfikacji podczas wiązania się cząsteczki z ligandem, co w rezultacie powoduje zmienną fluorescencję przed i po związaniu [138, 139].

Sygnał MST zależy od dwóch efektów, które zmieniają się pod wpływem wiązania liganda do znakowanej cząsteczki. Pierwszym z nich jest TRIC (ang. *Temperature Related Intensity Change*), gdzie intensywność fluorescencji zależy od temperatury, zaś drugim czynnikiem jest zjawisko termoforezy.

Eksperymenty MST mogą być wykonywane przy różnych intensywnościach, a warunkuje to moc lasera IR. Sygnał, który powstaje podczas skanowania kapilar ulega zmianie zgodnie z ruchem cząstek generowanym przez zmianę temperatury. Gdy zaczyna się pomiar, laser IR jest wyłączony, a cząsteczki zawieszona w roztworze rozmieszczone są równomiernie, przez co początkowo fluorescencja jest stała, ten stan określa się mianem inicjacji i trwa 3 sekundy. Kolejno dochodzi do uruchomienia lasera, który precyzyjnie ogrzewa konkretny obszar w badanej kapilarze, po kilku sekundach dochodzi do skoku temperatury powodującego zwiększone wygaszanie fluorofora, a przez to nagły spadek fluorescencji. W następnym etapie dochodzi do termoforezy, skutkującej przemieszczaniem się cząstek z dala od ogrzewanego miejsca, prowadzi to do powolnego spadku fluorescencji, który mierzony jest przez około 30 sekund i kończy się stanem stabilizacji. Kolejno po wyłączeniu grzania, roztwór ulega ochłodzeniu, obserwuje się odwrócony skok temperatury. Podczas dyfuzji wstecznej cząsteczki wracają do położenia początkowego, co powoduje wzrost sygnału fluorescencji (rys. 23) [138 – 141].

Wyniki analizowane są na podstawie stosunku między fluorescencją po określonym czasie pomiaru oraz fluorescencją przed aktywacją lasera IR. Warunki pracy w MST mogą być zbliżone do tych występujących naturalnie, pomiary wykonywane są bez unieruchomienia cząstek, zaś dowolność w stosowanych buforach umożliwia użycie surowicy, lizatów komórkowych oraz wielu innych. Ponadto metoda cechuje się prostotą w przygotowaniu próbek oraz niewielkim zużyciem reagentów, to jest 4 μ l na próbkę przy jej stężeniu określanym w nM. Najczęściej wykorzystywana jest do badania interakcji oraz wyznaczania stałych powinowactwa białko – białko,

białko – ligand, ale może być też wykorzystywana do określenia oddziaływań z DNA oraz wielu innych [138, 140, 141].



Rysunek 23. Schematyczne przedstawienie typowego sygnału otrzymywanego podczas skanowania pojedynczej kapilary.

Rysunek wykonany na podstawie [138].

8.3. Powierzchniowy rezonans plazmonowy

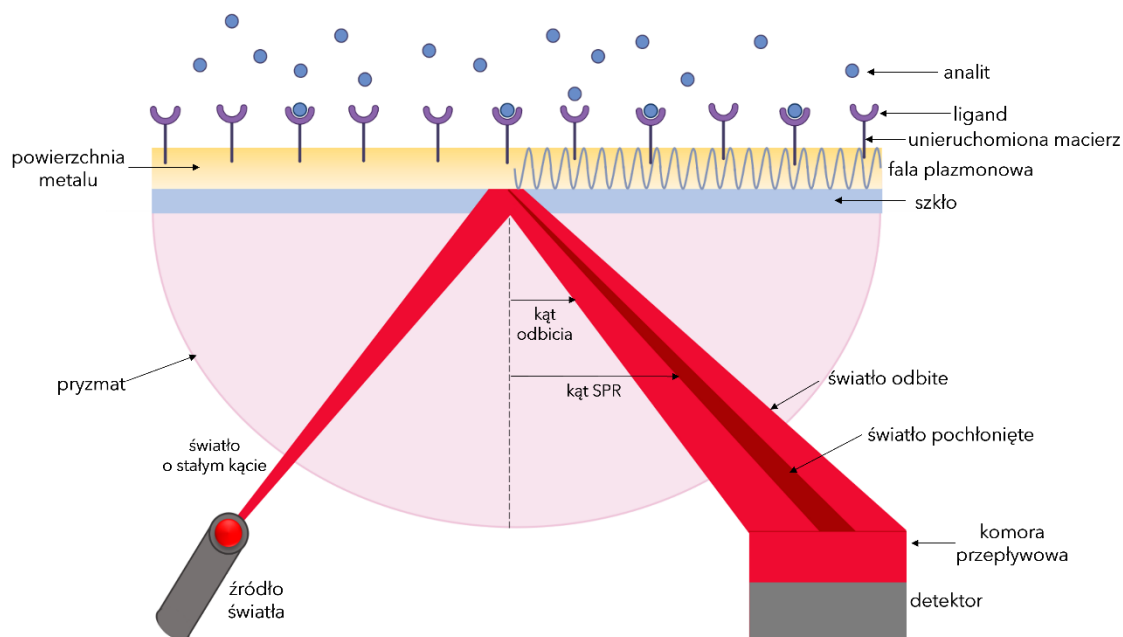
Powierzchniowy rezonans plazmonowy (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) jest metodą służącą do badania oddziaływań międzycząsteczkowych. Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością oraz pomiarem w czasie rzeczywistym [142, 143].

Metoda SPR pozwala na pomiar kinetyki oraz termodynamiki oddziaływań występujących między cząsteczkami, wykorzystując przy tym niewielkie ilości badanych materiałów bez konieczności stosowania znaczników fluorescencyjnych. Jednak wymagany jest element (ligand), który zostaje unieruchomiony na powierzchni sensora, a jego funkcją jest wyłapywanie cząsteczek analitu. Imobilizacja molekuł na powierzchni sensora SPR może odbywać się poprzez: oddziaływania hydrofobowe

oraz elektrostatyczne, wiązania kowalencyjne oraz tworzenie specyficznych interakcji [142 – 144].

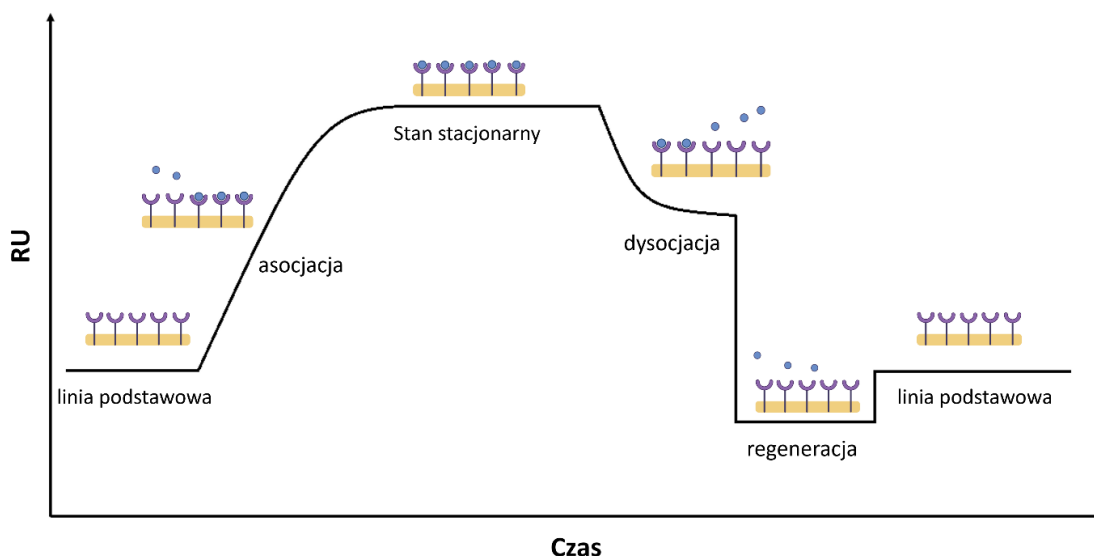
8.3.1. Zasada działania

Pomiary wykorzystujące metodę SPR rozpoczynają się, gdy fotony z wiązki padającego pod określonym kątem światła spolaryzowanego uderzają w metalową powierzchnię, wykonaną najczęściej ze złota (ze względu na wysoką stabilność chemiczną), która ulokowana jest na szklanej płytce. W tych warunkach część energii świetlnej przenika przez metalową powłokę i oddziałuje z elektronami w warstwie powierzchniowej, wprowadzając je w ruch w wyniku wzbudzenia. Gdy wiązka światła pada pod większym kątem niż krytyczny kąt odbicia, pęd fotonów zmierzających do płytki odpowiada pędowi plazmonów powierzchniowych, powodując przeniesienie energii oraz zachodzenie SPR, zamiast całkowitego odbicia światła. Aby mogło dojść do zjawiska rezonansu plazmonów energia pochodząca z fotonów wiązki padającego na powierzchnię metalu światła powinna być równa energii drgań oscylacyjnych plazmonów. Plazmony rozchodzą się równoległe do powierzchni metalu i tworzą pole elektryczne w obszarze do około 300 nm od granicy dzielącej powierzchnię metalu i roztwór próbki. Większość urządzeń SPR wykorzystuje konfigurację, w której fala świetlna przechodzi przez pryzmat o wysokim współczynniku załamania światła i wywołuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia. Odbite od powierzchni metalu światło, z powodu efektu rezonansu plazmonowego, charakteryzuje się spadkiem intensywności pod określonym kątem i jest mierzone przez fotodetektor (rys. 24) [142, 143, 145].



Rysunek 24. Zasada działania powierzchniowego rezonansu plazmonowego.
Rysunek wykonany na podstawie [146].

Eksperymenty przeprowadzane z wykorzystaniem techniki SPR rozpoczynają się od unieruchomienia liganda na powierzchni sensora, a pozostałe miejsca wiązania są odpowiednio blokowane. Następnie wstrzykiwany jest bufor regeneracyjny, który powoduje utworzenie odnośnikowej linii bazowej (rys. 25). Następnie przez powierzchnię przepływa roztwór zawierający analit, jego wiązanie się z ligandem powoduje wzrost sygnału, który następnie, gdy dochodzi do równoczesnej asocjacji oraz dysocjacji przepływającej molekuly, przechodzi w linię prostą. Maksymalna odpowiedź dla wiązania określana jest jako RU_{max} , określa się ją na podstawie wysycenia miejsc wiążących unieruchomionej cząstki. Na koniec następuje odłączenie analitu od ligandu poprzez ponowny przepływ buforu początkowego, co przedstawione jest na wykresie jako spadek sygnału do momentu osiągnięcia wartości referencyjnej. Po całkowitym zregenerowaniu powierzchni sensora możliwe jest nastrzyknięcie kolejnej próbki zawierającej inne stężenie badanego analitu, co powtórnie generuje sensogram. Seria sensogramów umożliwia określenie kinetyki wiązania oraz stałej równowagi [143, 147, 148].



Rysunek 25. Sensogram będący wynikiem pojedynczego eksperymentu SPR.
Rysunek na podstawie [149].

Technika SPR nie wymaga konieczności stosowania fluorescencyjnych znaczników, cechuje się wysoką czułością pomiarów oraz minimalnym zużyciem badanych materiałów. Istotne jest to, iż pomiary kinetyczne wykonywane są w czasie rzeczywistym. Metoda powierzchniowego rezonansu plazmonowego wykorzystywana jest do analizy powinowactwa różnych cząstek, między innymi takich jak: antygen – przeciwciało, ligand – receptor, substrat – enzym. Metodę SPR stosuje się także do wykrywania markerów nowotworowych (m. in. nowotwór piersi, jajnika, trzustki) oraz chorób o podłożu kardiologicznym i neurologicznym. SPR wykorzystuje się jako badanie uzupełniające do potwierdzenia zmian konformacyjnych [143, 150 – 152].

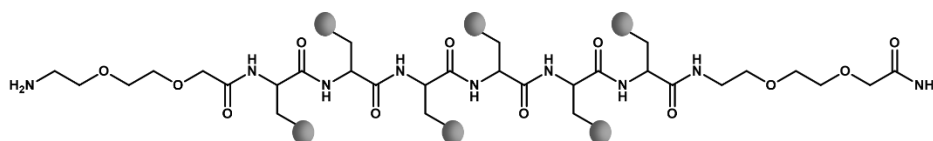
II. Cel pracy

Głównym celem mojej rozprawy doktorskiej było projektowanie oraz synteza nowej klasy peptydomimetyków zdolnej do penetracji błon komórkowych. Związki te zbudowane zostały z reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego lub D-2,3-diaminopropionowego (Dap) połączonych wiązaniem peptydowym. Grupy aminowe w pozycji 3 Dap zmodyfikowałam poprzez przyłączenie określonego oksakwasu zawierającego ugrupowania guanidynowe, aminowe lub hydroksylowe (tab. 2). Znakowanie peptydomimetyków 5/6-karboksyfluoresceiną lub 5/6-karboksytetrametylorodaminą umożliwiło przeprowadzenie badań biologicznych. Na tej podstawie wyodrębniłam następujące cele szczegółowe:

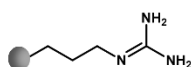
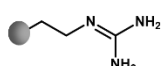
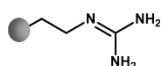
1. Wpływ charakteru chemicznego peptydomimetyków na penetrację błon komórkowych.

Poddałam ocenie zdolności do migracji* przez błonę komórkową szereg peptydów i peptydomimetyków składających się z sześciu reszt lub bloków budulcowych w cząsteczce. Otrzymałam 18 związków zmodyfikowanych w łańcuchu bocznym (rys. 26). Każdy z nich na N-końcu zawierał fluorofor. Wszystkie związki inkubowałam z liniami komórkowymi zdrowymi oraz nowotworowymi.

* Przed wykonywaniem badań biologicznych, peptydomimetyki poddałam ocenie cytotoksyczności wobec linii komórkowych w hodowlach *in vitro*.



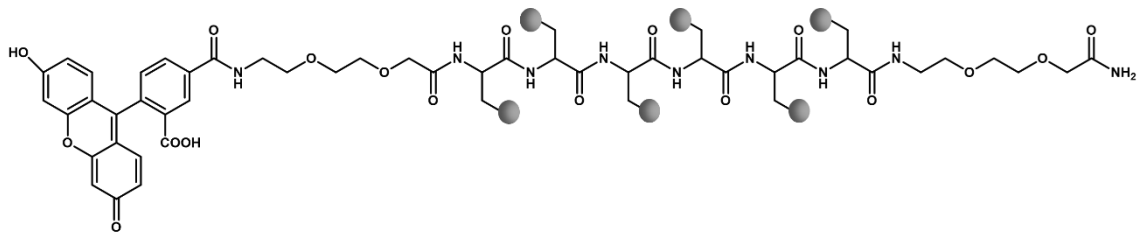
gdzie:



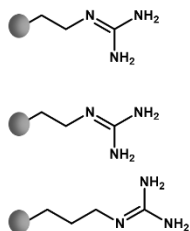
Związek 1 O2Oc-(Arg)₆-O2Oc-NH₂

Związek 2 O2Oc-(D-arg)₆-O2Oc-NH₂

Związek 3 O2Oc-(Har)₆-O2Oc-NH₂



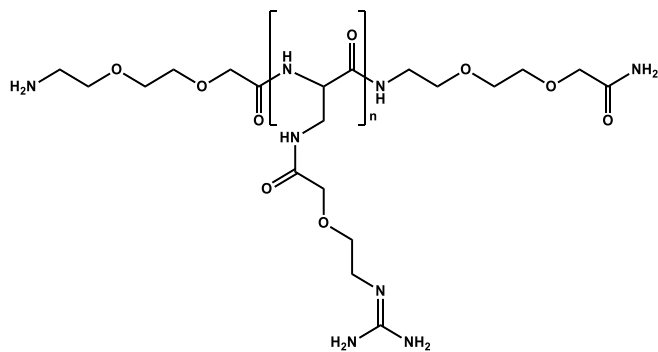
gdzie:



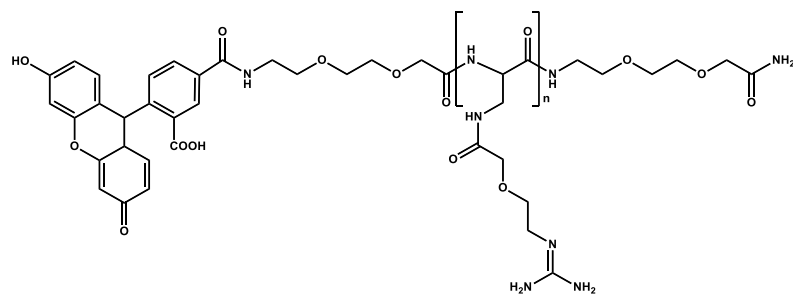
Związek 1a 5/6-FAM-O2Oc-(Arg)₆-O2Oc-NH₂

Związek 2a 5/6-FAM-O2Oc-(D-arg)₆-O2Oc-NH₂

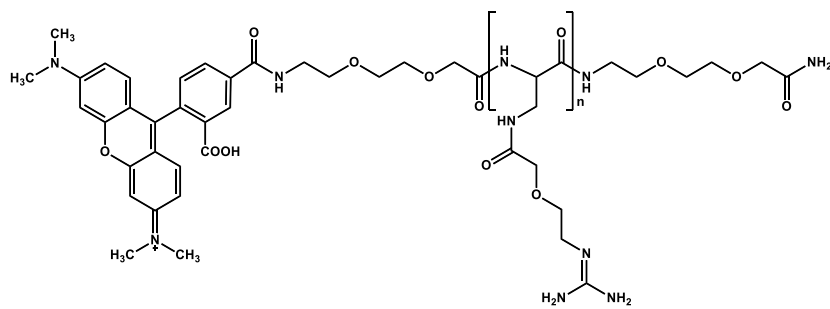
Związek 3a 5/6-FAM-O2Oc-(Har)₆-O2Oc-NH₂



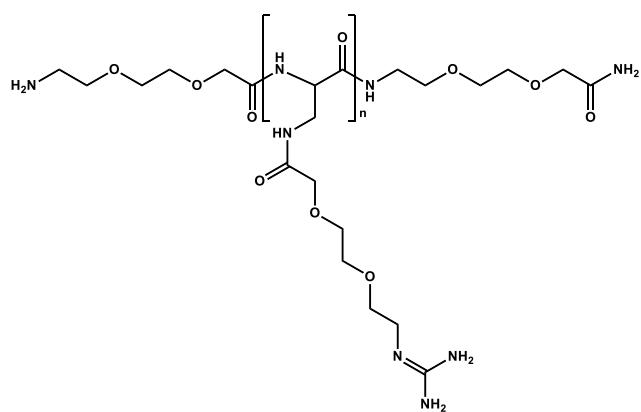
Związek 4 n = 6 O2Oc-[Dap(GO1)]₆-O2Oc-NH₂



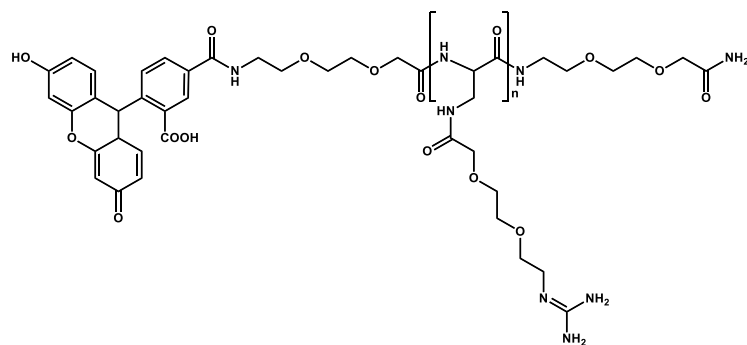
Związek 4a n = 6 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)]₆-O2Oc-NH₂



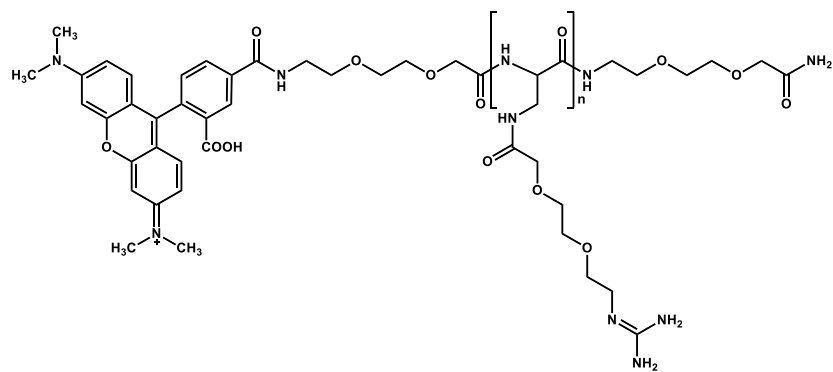
Związek 4b n = 6 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)]₆-O2Oc-NH₂



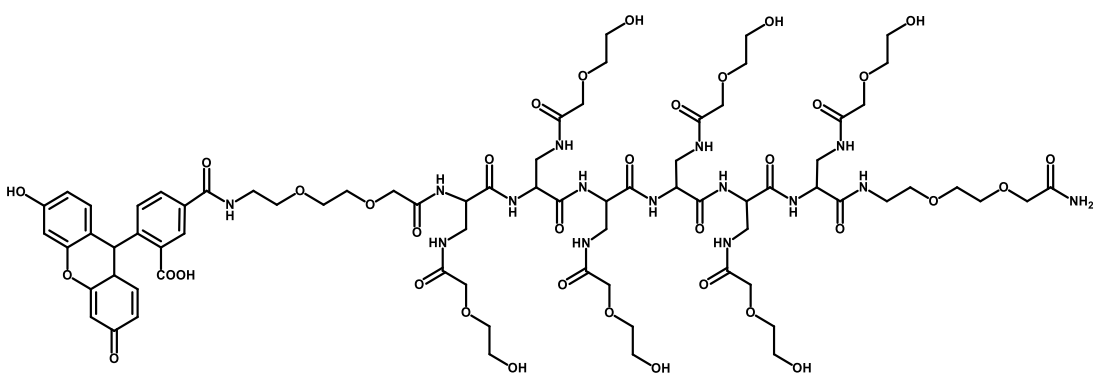
Związek 10 n = 6 O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂



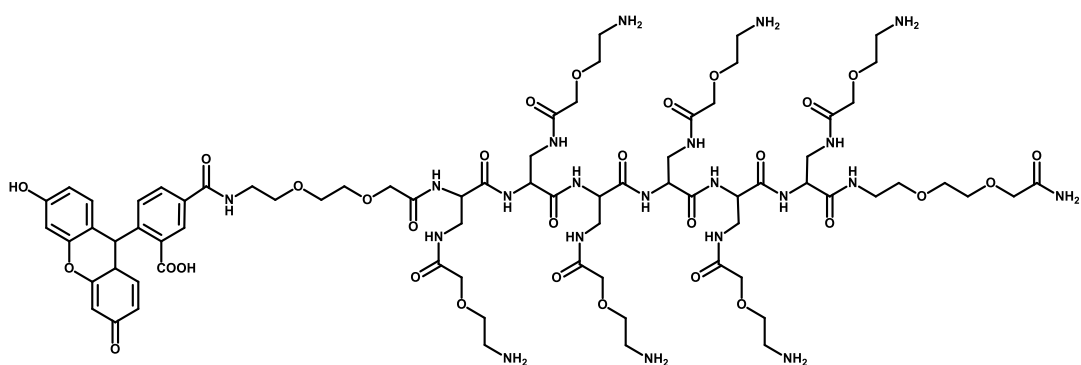
Związek 10a n = 6 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂



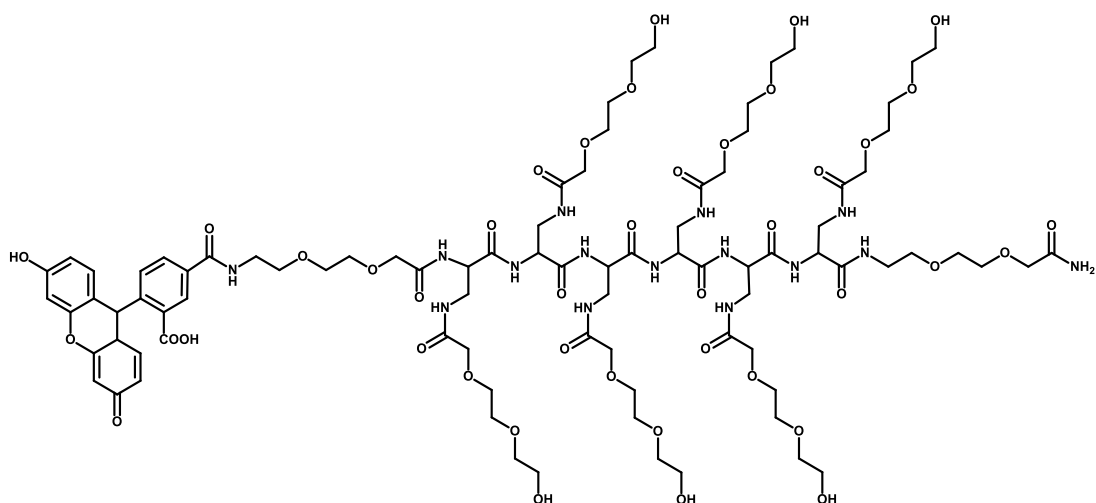
Związek 10b $n = 6$ 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂



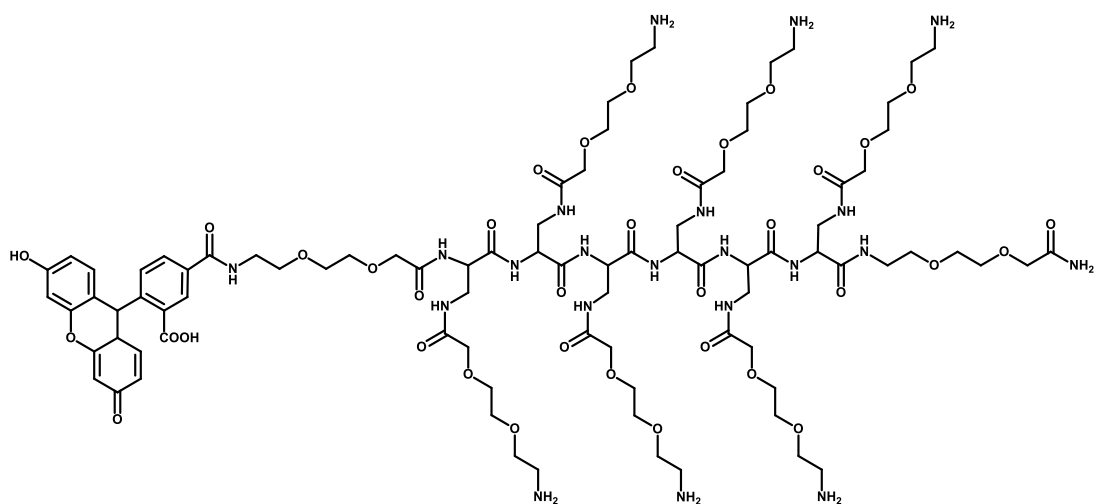
Związek 12a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO1)]₆-O2Oc-NH₂



Związek 13a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O1)]₆-O2Oc-NH₂



Związek 14a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO2)]₆-O2Oc-NH₂



Związek 15a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O2)]₆-O2Oc-NH₂

Rysunek 26. Wzory strukturalne zsyntezowanych związków numer 1 – 4b, 10 – 10b, 12a – 15a*.

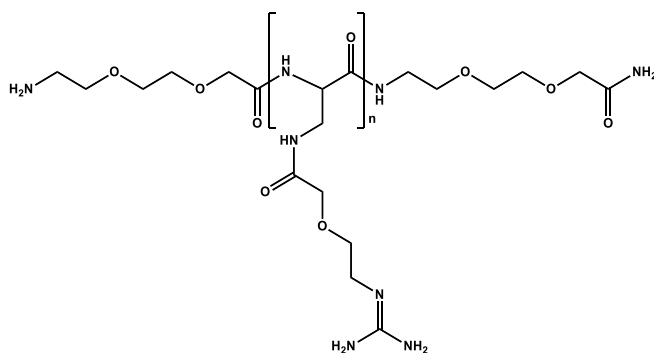
2. Próba określenia mechanizmu penetracji błon biologicznych przez peptydomimetyki.

Podjęłam próbę określenia mechanizmu wykorzystywanego podczas wnikania peptydomimetyków do wnętrza komórek. W tym celu zastosowałam 3 inhibitory endocytozy: cytochalazynę D – hamującą makropinocytozę, chlorpromazynę – będącą inhibitorem endocytozy klatryno – zależnej oraz metylo-β-cyklodekstrynę blokującą

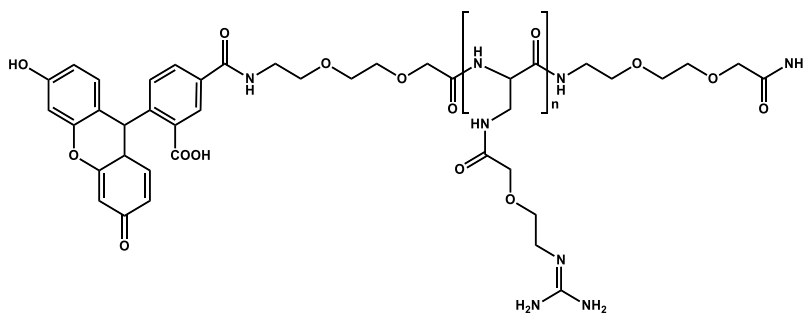
endocytozę kaweolo – zależną. Badania prowadziłam na dwóch liniach komórkowych piersi: zdrowych – HB2 oraz zmienionych nowotworowo – MDA-MB-231.

3. Ocena wpływu liczby ugrupowań guanidynowych w łańcuchu bocznym cząsteczki na penetrację błon komórkowych.

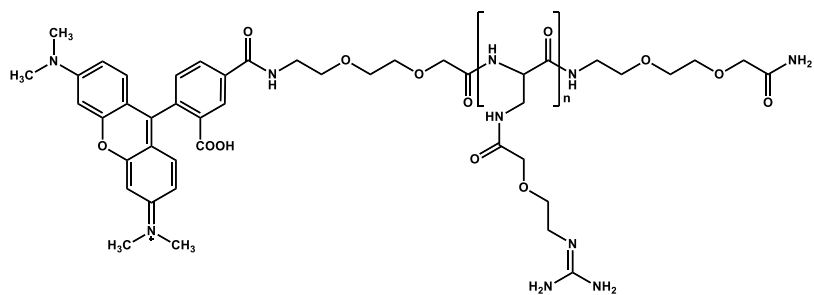
Otrzymałam 14 związków różniących się ilością bloków budulcowych w cząsteczce, których wzór ogólny przedstawiłam na rysunku 27. Dla każdego z nich zsyntezowałam analog znakowany fluorescencyjnie na *N*-końcowej grupie aminowej. Związki te poddałam ocenie stopnia wnikania do komórek zdrowych – HB2 oraz zmienionych nowotworowo – MDA-MB-231.



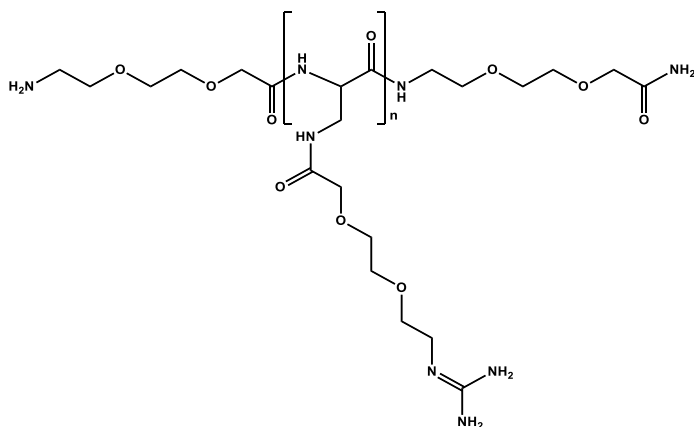
Związek 5 n = 8 O₂Oc-[Dap(GO1)]₈-O₂Oc-NH₂



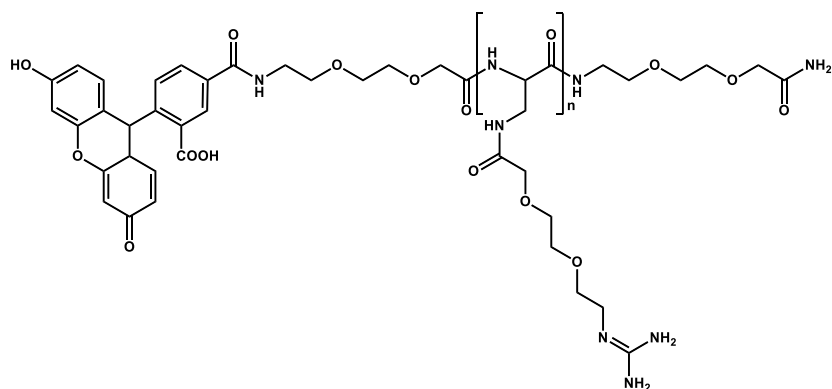
Związek 5a n = 8 5/6-FAM-O₂Oc-[Dap(GO1)]₆-O₂Oc-NH₂



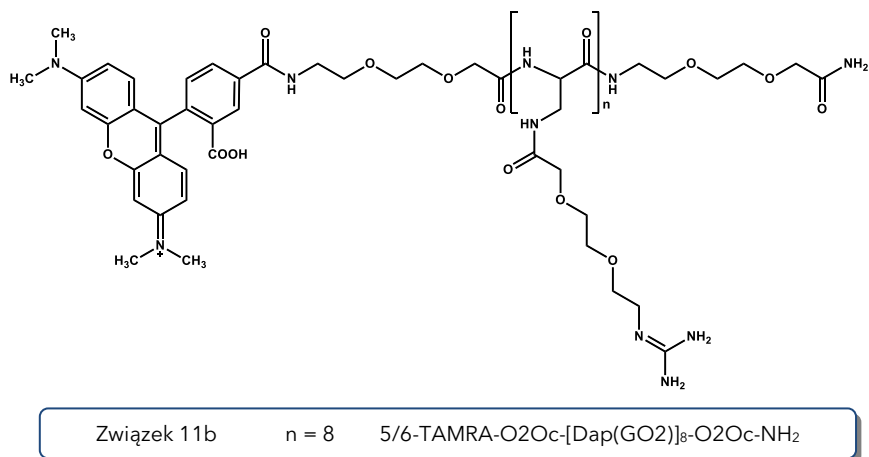
Związek 5b n = 8 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)]₈-O2Oc-NH₂



Związek 6	n = 2	O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂
Związek 7	n = 3	O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂
Związek 8	n = 4	O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
Związek 9	n = 5	O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂
Związek 11	n = 8	O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂



Związek 6a	n = 2	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂
Związek 7a	n = 3	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂
Związek 8a	n = 4	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
Związek 9a	n = 5	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂
Związek 11a	n = 8	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂



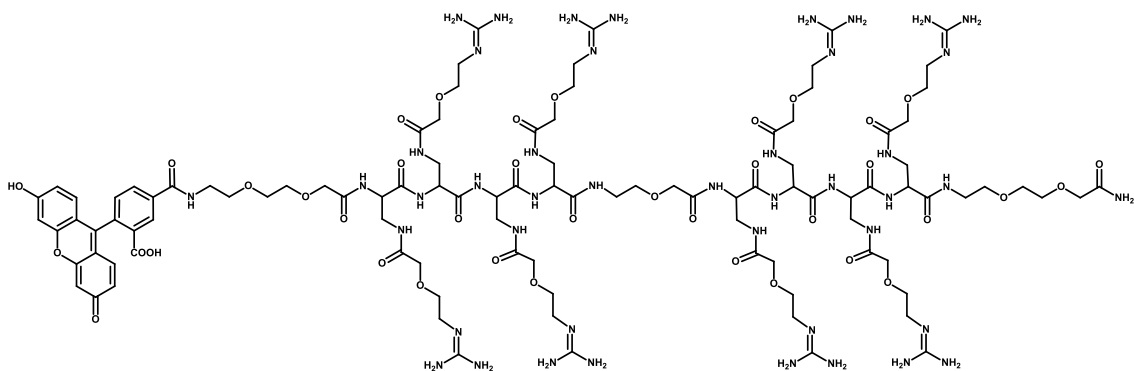
Rysunek 27. Wzory strukturalne zszyntezowanych peptydomimetyków numer 5 – 5b, 6 – 9a, 11a, 11b*.

4. Zbadanie wpływu zszyntezowanych związków na przebieg oraz regulację cyklu komórkowego.

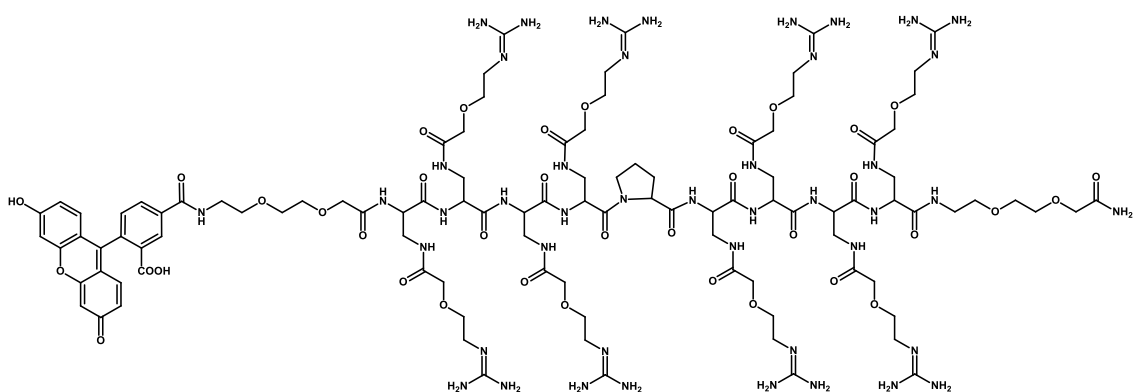
Poddałam ocenie wpływ związków zawierających 4, 6 oraz 8 grup guanidynowych w sekwencji (numer 8, 10, 11) na przebieg, a także regulację cyklu komórkowego linii HB2 i MDA-MB-231. W ramach tego zadania posłużyłam się metodą cytometrii przepływowej.

5. Ocena właściwości penetrujących związków zawierających w łańcuchu głównym peptydomimetyków reszt powodujących zmianę jego ułożenia w przestrzeni.

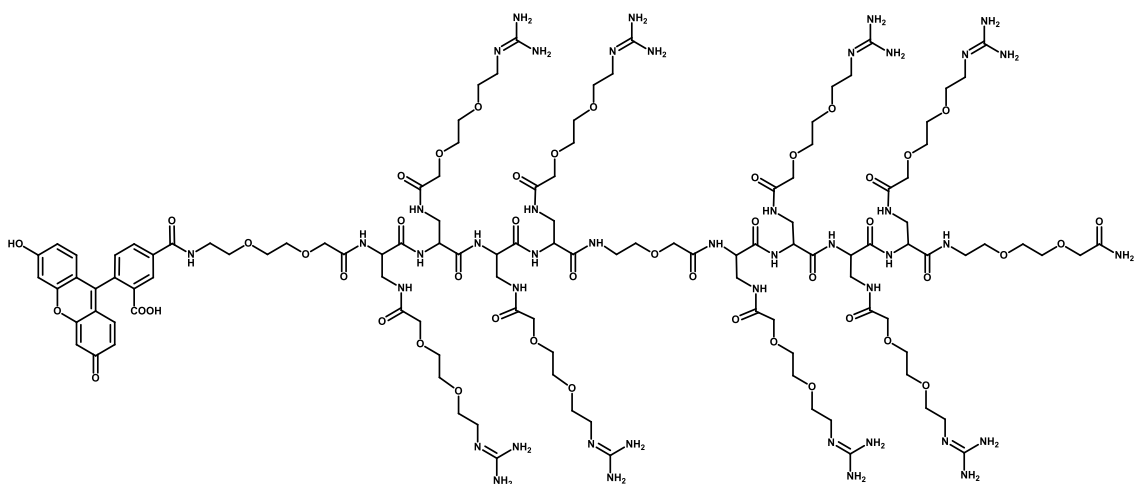
Otrzymałam związki zbudowane z 8 reszt Dap zmodyfikowanych glikolem polietylenowym zawierającym ugrupowania guanidynowe. Ponadto zszyntezowałam peptydomimetyki zmodyfikowane w 7 pozycji przez reszty O1Pen lub Pro (rys. 28). Dodatkowo otrzymałam analog związku nr 11 zawierający kwas D-2,3-diaminopropionowy w cząsteczce. Następnie zbadałam zdolność uzyskanych związków do przenikania przez błonę komórkową.



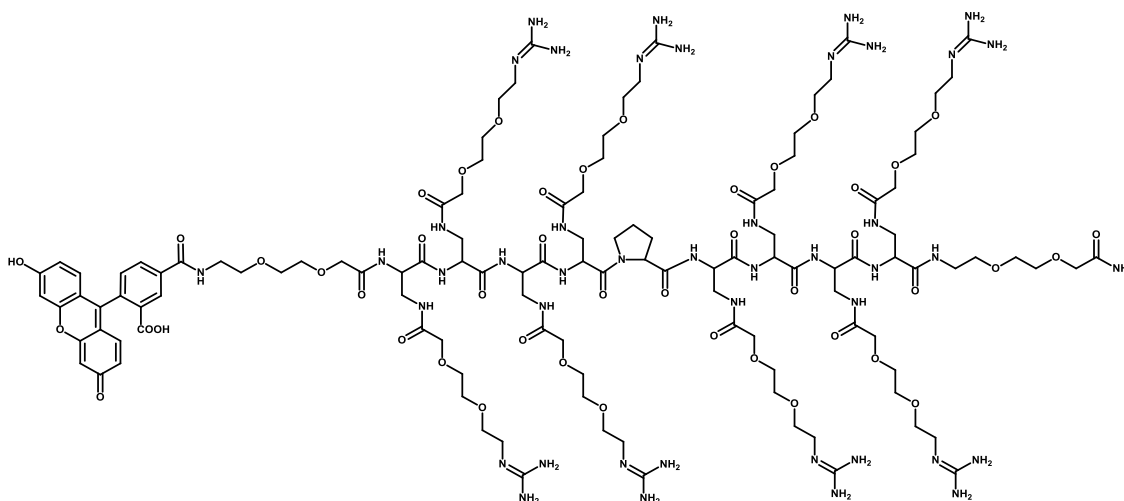
Związek 16a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)]₄-O1Pen-[Dap(GO1)]₄-O2Oc-NH₂



Związek 17a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)]₄-Pro-[Dap(GO1)]₄-O2Oc-NH₂



Związek 18a 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₄-O1Pen-[Dap(GO2)]₄-O2Oc-NH₂



Związek 19a

5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₄-Pro-[Dap(GO2)]₄-O2Oc-NH₂

Rysunek 28. Wzory strukturalne peptydomimetyków **16a – 19a** *.

6. Ocena oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami, a DNA.

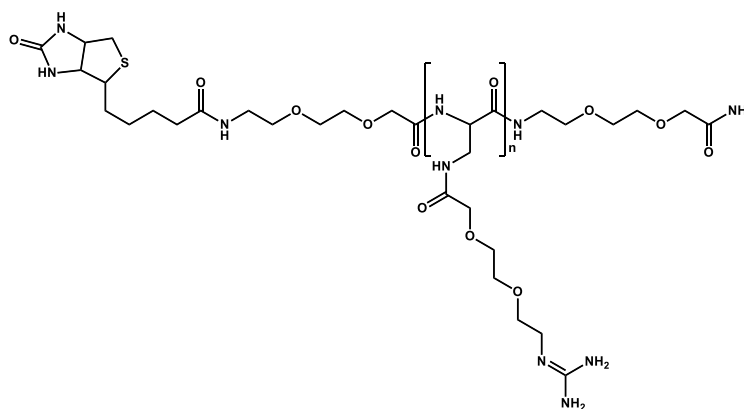
Zweryfikowałam za pomocą szeregu metod możliwość tworzenia kompleksu peptydomimetyk : liniowe DNA.

7. Zastosowanie zsyntezowanych związków jako czynników transfekcyjnych

Poddałam ocenie zdolność peptydomimetyków do wprowadzania materiału genetycznego do wybranych linii komórkowych piersi (HB2 i MDA-MB-231). Sprawdziłam efektywność tworzenia kompleksu związek : plazmidowe DNA oraz wydajność ich transfekcji.

8. Wykorzystanie peptydomimetyków jako mediatorów transportujących białka do wnętrza komórek.

W ramach tego zadania zostały zsyntezowane związki zawierające odpowiednio sześć oraz osiem grup guanidynowych w sekwencji. Na *N*-końcu każdego z nich dołączono biotynę (rys. 29). Otrzymane związki poddałam inkubacji z dwiema formami streptawidyny: (I) FAM-streptawidyna, (II) streptawidyna skoniugowana z β -galaktozydazą, w celu utworzenia niekowalencyjnych kompleksów i oceny ich przenikalności przez błonę komórkową. Ponadto określiłam wewnątrzkomórkową aktywność β -galaktozydazy.



Związek 22	n = 6	Bt-O ₂ Oc-[Dap(GO ₂)] ₆ -O ₂ Oc-NH ₂
Związek 23	n = 8	Bt-O ₂ Oc-[Dap(GO ₂)] ₈ -O ₂ Oc-NH ₂

Rysunek 29. Wzory strukturalne związków numer **22, 23** *.

*	Dap	<i>kwaa L-2,3-diaminopropionowy</i>
	O1	<i>kwaa 5-amino-3-oksapentanowy</i>
	O2	<i>kwaa 8-amino-3,6-dioksaoktanowy</i>
	GO1	<i>kwaa 5-guanidyno-3-oksapentanowy</i>
	GO2	<i>kwaa 8-guanidyno-3,6-dioksaoktanowy</i>
	HO1	<i>kwaa 5-hydrokxy-3-oksapentanowy</i>
	HO2	<i>kwaa 8-hydrokxy-3,6-dioksaoktanowy</i>
	5/6-FAM	<i>5/6-karboksyfluoresceina</i>
	5/6-TAMRA	<i>5/6-karboksytetrametylorodamina</i>

9. Zbadanie wpływu wybranych peptydomimetyków na cytotoksyczność i właściwości penetrujące wobec linii komórkowych skóry, pęcherza moczowego, makrofagów mysich oraz komórek pierwotnych.

Przetestowałam zdolność otrzymanych związków do przenikania przez błony cytoplazmatyczne wybranych linii komórkowych skóry, pęcherza moczowego, makrofagów mysich, a także komórek pierwotnych (podocyty szczurze). Określiłam stopień przeżywalności powyższych linii komórkowych w obecności wybranych związków.

Tabela 2. Sekwencje zsyntezowanych peptydomimetyków.

Nr	Sekwencja
1	O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂
1a*	5/6-FAM-O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂
2	O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂
2a*	5/6-FAM-O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂
3	O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂
3a*	5/6-FAM-O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂
4	O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂
4a*	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂
4b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂
5	O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂
5a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂
5b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂
6	O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂
6a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂
7	O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂
7a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂
8	O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
8a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
9	O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂
9a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂
10	O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
10a*	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
10b*	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
11	O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂
11a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂
11b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂
12a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂
13a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O1)] ₆ -O2Oc-NH ₂
14	O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
14a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
15	O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
15a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
16a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂
17a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -Pro-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂
18a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
19a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -Pro-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂
20a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]
21a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]
22*	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂
23*	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂

24	5/6-FAM
25	5/6-TAMRA

Wszystkie zsyntezowane peptydomimetyki w swojej sekwencji zawierają kwas 2,3-diaminopropionowy w konfiguracji L, jedynie związki nr 20a oraz 21a zbudowane są z izomeru o konfiguracji D.

- * Związki o numerach 1a, 2a, 3a, 4a, 10a, i 10b zostały przeze mnie zsyntezowane w ramach pracy magisterskiej realizowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG.
- ♣ Związki numer 22 oraz 23 zostały zsyntezowane pod moją opieką przez mgr Aleksandrę Gnatek w ramach pracy magisterskiej realizowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, opiekunem naukowym pracy była dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG.

5/6-FAM – przed sekwencją oznacza, iż związek jest znakowany fluoresceiną

5/6-TAMRA – przed sekwencją oznacza, iż związek jest znakowany tamrą

Bt – przed sekwencją oznacza, iż związek na N-końcu zawiera przyłączoną cząsteczkę biotyny

III. Metodologia przeprowadzonych badań

1. Synteza chemiczna peptydomimetyków

Związki przedstawione w niniejszej rozprawie zsyntezowałam metodą chemii Fmoc/tBu na nośniku stałym. W tym celu użyłam żywicy amidowej TentaGel S Ram cechującej się maksymalnym osadzeniem na poziomie 0,24 mmola/g oraz wielkością ziaren równą 90 μm (Rapp Polymer, Tubingen, Niemcy).

1.1 Automatyczna synteza mikrofalowa

Proces syntezy związków przebiegał dwuetapowo. Łańcuch główny peptydomimetyków zsyntezowałam z wykorzystaniem automatycznego syntezatora mikrofalowego LibertyBlue firmy CEM (Matthews, Nowy Jork, Stany Zjednoczone). Syntezę wykonałam w skali 0,1 mmola (użyłam 0,417g żywicy). Tabele numer 3 i 4 przedstawiają warunki stosowane podczas sprzęgania oraz używane odczynniki. W kolejnym etapie syntezę wykonywałam manualnie wprowadzając modyfikacje w obrębie łańcuchów bocznych peptydomimetyków. W tym celu jako reaktory do syntezy zastosowałam strzykawki polipropylenowe z umieszczonym wewnątrz filtrem.

Tabela 3. Warunki sprzęgania stosowane podczas standardowego cyklu syntezy prowadzonej w skali 0,1 mmola.

Objętość naczynka reakcyjnego	30 ml
Objętość odczynnika deprotekcijnego	3 ml
Warunki deprotekcji	65 sekund (90° C)
Płukanie po deprotekcji	2 ml + 2 ml + 3 ml
Objętość pochodnej aminokwasowej lub PEGylowanej	2,5 ml
Objętość aktywatora	1 ml
Objętość zasady	0,5 ml
Całkowita objętość mieszaniny sprzęgającej	4 ml
Metoda sprzęgania	4 min (90° C)
Płukanie po sprzęganiu	2 ml + 2 ml + 3 ml

Tabela 4. Reagenty stosowane podczas automatycznej syntezy mikrofalowej.

Rozpuszczalnik	DMF
Mieszanina deprotekcyjna	20 % piperidyna w DMF
Stężenie pochodnych aminokwasowych i PEGylowanych	0,2 M w DMF
Aktywator	0,5 M DIC w DMF
Zasada	1,0 M oxyma w DMF

DMF – dimetyloformamid

DIC – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid

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

1.2 Synteza związków numer 1a, 2a, 3a

Syntezy związków 1a, 2a oraz 3a wykonałam w roku 2018, w ramach pracy magisterskiej pod tytułem: „Projektowanie i synteza peptydów i peptydomimetyków potencjalnie penetrujących błonę komórkową”, której promotorem była dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG. Natomiast analogiczne związki nieznakowane fluorescencyjnie (1 – 3) zsyntezowałam w ramach wykonywania niniejszej rozprawy doktorskiej. Syntezy peptydomimetyków 1 – 3a przeprowadziłam przy użyciu automatycznego syntezyatora mikrofalowego. W tym celu wykorzystałam poniższe pochodne aminokwasowe (wszystkie pochodne stosowane do syntezy peptydomimetyków opisanych w rozprawie doktorskiej zostały zakupione w firmie Iris Biotech GmbH (Niemcy)):

- Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
- Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH
- Fmoc-L-Har(Pbf)-OH
- Fmoc-O2Oc-OH

O2Oc-OH – kwas 5-amino-3-oksapentanowy

W przypadku związków **1a**, **2a**, **3a** do wolnego *N*-końca przyłączyłam znacznik fluorescencyjny – fluoresceinę (5/6-FAM) (opis procedury przedstawiłam w punkcie 1. 5. 1. C). Ostatecznie zsyntezowane peptydomimetyki poddałam procedurze odłączenia od żywicy, postępując według instrukcji opisanej w punkcie 1. 3. 1. D.

Fmoc – osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa

Pbf – osłona 2,2,4,6,7-pentametylodihydrobenzfurano-5-sulfonowa

1.3. Synteza związków nieznakowanych fluorescencyjnie numer 4 – 11

Syntezy związków **4 – 11** wykonałam z użyciem kwasu L-2,3-diaminopropionowego, którego grupa -NH₂ w pozycji 3 chroniona była osłoną ivDde.

Do przeprowadzenia syntezy automatycznej wykorzystywałam dwie poniższe pochodne aminokwasowe:

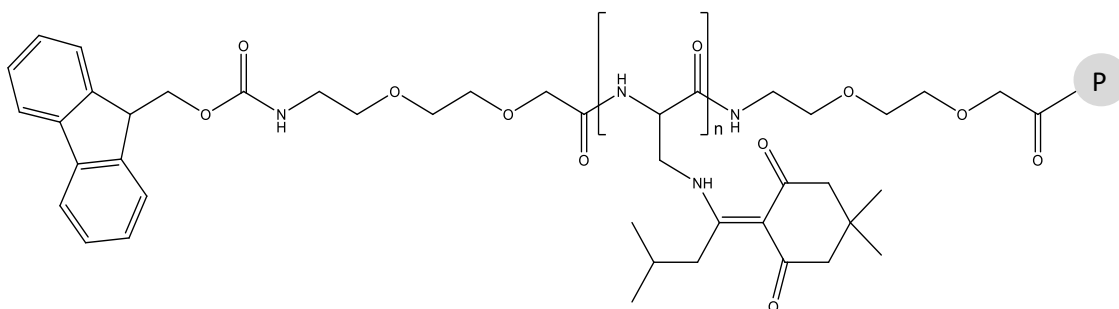
- Fmoc-O₂Oc-OH
- Fmoc-L-Dap(ivDde)-OH.

ivDde - 1-(4,4-dimetylo-2,6-dioksocycloheks-1-ylideno)izowaleryl

W pierwszym etapie syntezy otrzymałam związki przedstawione na rysunku 30 o wzorze ogólnym: Fmoc-O₂Oc-[Dap(ivDde)]_n-O₂Oc-P (tab. 5), które następnie poddałam modyfikacji metodą manualną w celu otrzymania związków numer: **4 – 11**.

Tabela 5. Liczba reszt L-Dap(ivDde) (n) zawartych w sekwencji peptydomimetyku.

Numer związku	n Fmoc-L-Dap(ivDde)
4, 10	6
5, 11	8
6	2
7	3
8	4
9	5



Rysunek 30. Ogólny wzór związków otrzymywanych w wyniku syntezy automatycznej, gdzie: n – ilość reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego z osłoną ivDde, P – linker przyłączony do żywicy.

1.3.1. Synteza manualna

A) *Usuwanie osłony ivDde*

Pierwszą czynnością, wykonaną po przeprowadzeniu syntezy automatycznej było umieszczenie peptydydożywicy w strzykawkach polipropylenowych, a następnie usunięcie osłony ivDde z łańcuchów bocznych powyższego związku. W tym celu użyłam:

- 2 % roztwór uwodnionej hydrazyny (N_2H_4 50-60%, Sigma Aldrich, numer katalogowy 225819) w DMF

Zawartość każdej ze strzykawek przemywałam powyższą mieszaniną poprzez delikatne 15 minutowe wytrząsanie (Laboratory shaker type 358A, Elpin Plus, Polska), po którym żywicę przemyłam chlorkiem metylenu (DCM). Czynności te powtórzyłam 6-krotnie. Po usunięciu osłony ivDde zawartość strzykawek przemyłam według następującego cyklu płukań:

- 3 × DMF
- 3 × izopropanol
- 3 × DCM.

Reakcję deprotekcji osłony ivDde potwierdziłam przeprowadzając test Kaisera oraz test chloranilowy (tab. 6).

Tabela 6. Warunki przebiegu testu Kaisera oraz chloranilowego.

Warunki testu	Test Kaisera	Test chloranilowy
Wymagane odczynniki	- 50 μ l 80% fenolu w etanolu - 50 μ l KCN w H_2O /pirydyna - 50 μ l 6% ninhydryny w etanolu	- 100 μ l acetaldehydu - 50 μ l chloranilu w toluenie
Temperatura reakcji	100°C	pokojowa
Czas reakcji	7 minut	7 minut
Barwa żywicy przy osadzonych grupach - NH_2	bezbarwna	bezbarwna
Barwa żywicy przy nieosadzonych grupach - NH_2	granatowa	zielona

B) Przyłączanie pochodnych do łańcuchów bocznych związku

Po usunięciu osłony ivDde z grup aminowych łańcuchów bocznych reszt Dap przystąpiłam do przyłączenia do nich poniższych pochodnych:

- Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (w pracy będę stosowała skrót GO1)
- Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (w pracy będę stosowała skrót GO2).

Warunki przyłączania pochodnych do każdego ze związków przedstawiłam w tabeli numer 7. Pomiedzy poszczególnymi acylowaniami peptydylożywicę przemyłam według poniższego cyklu płukań:

- 3 × DMF
- 3 × izopropanol
- 3 × DCM,

skuteczność przyłączania pochodnych GO1 i GO2 do wolnych grup aminowych bocznych łańcuchów reszt Dap potwierdziłam stosując test chloranilowy oraz test Kaisera.

Tabela 7. Warunki przyłączania pochodnych: Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (GO2) , Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (GO1).

Warunki reakcji	Związek		
	4, 5	6, 7, 8	9, 10, 11
I reakcja sprzęgania	1,5* × GO1 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA		1,5* × GO2 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA
II reakcja sprzęgania	1,5 × GO1 1,5 × HBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA		1,5 × GO2 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA
III reakcja sprzęgania	3 × GO1 1,5 × DIC		3 × GO2 1,5 × DIC
IV reakcja sprzęgania	2 × GO1 1 × DIC	-	2 × GO2 1 × DIC
Czas trwania reakcji	24h		
Rozpuszczalniki	NMP/DMF/DCM (1:1:1, v/v/v) + Triton X-100		

* nadmiar odczynnika w stosunku do osadzenia używanej żywicy

Boc – osłona tert-butylotykarbonylowa

TBTU – tetrafluoroboran-O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraetylouronianu

DIPEA – diizopropylotykloamina

HBTU – heksafluorofosforan-O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametylouroniowy

DCM – dichlorometan

NMP – N-metylopirolidon

C) Usuwanie osłony Fmoc z N-końca peptydomimetyków

W kolejnym etapie, po przyłączeniu pochodnych GO1 i GO2 do bocznych grup aminowych związków, usunęłam osłony Fmoc z ich N-końca. W tym celu przygotowałam następującą mieszaninę ściągającą:

- 2 % DBU
- 2,3 % piperydyna
- 6 % Triton X-100 w NMP.

Peptydyłożywicę umieszczoną w strzykawkach przemywałam powyższym roztworem przez 15 minut, po czym zawartość reaktorów płukałam DMF. Czynności te powtórzyłam 6-krotnie. Skuteczność metody odłączania grupy Fmoc sprawdzałam poprzez wykonanie testu Kaisera oraz chloranilowego.

D) Odłączanie peptydomimetyków od żywicy

Po przeprowadzonej syntezie przystąpiłam do etapu odzepienia utworzonych związków od nośnika stałego z jednoczesnym usunięciem osłon z bocznych grup aminokwasowych. Każdą peptydyłożywicę przeniosłam do kolb okrągłodennych, dodałam mieszaninę ściągającą i umieściłam na mieszadle magnetycznym. Reakcję prowadziłam przez 4 godziny. Na 1 g żywicy przygotowałam roztwór zawierający:

- TFA (82,5 % v/v)
- fenol (5 % v/v)
- H₂O (5 % v/v)
- tioanizol (5 % v/v)
- EDT (2,5 % v/v)

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en

TFA – kwas trifluoroctowy

EDT – etano-1,2-ditiol

W dalszym etapie zawartość kolb przeniosłam na lejek Schotta i pod zmniejszonym ciśnieniem oddzieliłam żywicę od odczepionego peptydomimetyku, następnie peptydylożywicę przemyłam 1 ml TFA. Do roztworu zawierającego związek dodałam 15 ml schłodzonego eteru dietylowego. Wytrącone peptydomimetyki przeniosłam do wirówki (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Niemcy) i wirowałam przez 15 minut przy 6000 RPM, a następnie rozpuściłam w wodzie i zliofilizowałam. Związki poddawane badaniom biologicznym dodatkowo liofilizowałam rozpuszczając je w roztworze HCl o $C = 10^{-3}$ M.

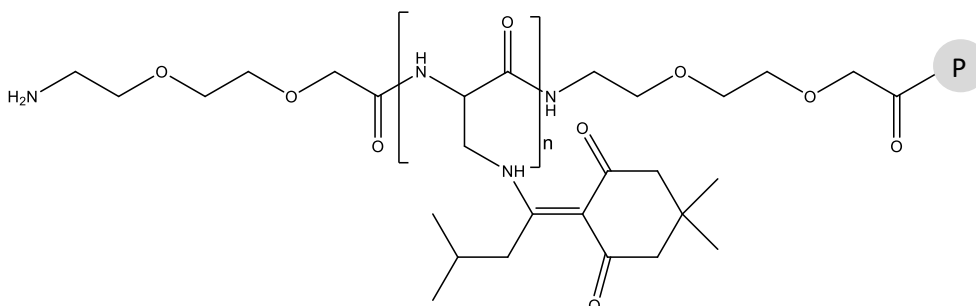
1.4. Synteza związków numer 22 i 23

Związki numer 22 oraz 23 zostały zsyntezowane pod moją opieką przez mgr Aleksandrę Gnatek w ramach pracowni magisterskiej realizowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, opiekunem naukowym pracy była dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG.

Syntezę automatyczną wykonano z wykorzystaniem dwóch poniższych pochodnych aminokwasowych:

- Fmoc-O2Oc-OH
- Fmoc-L-Dap(ivDde)-OH.

W pierwszym etapie syntezy otrzymane zostały związki przedstawione na rysunku 31 o wzorze ogólnym: O2Oc-[Dap(ivDde)]_n-O2Oc-P (gdzie n = 6 dla peptydomimetyku numer **22**, n = 8 dla peptydomimetyku numer **23**), które w kolejnym etapie modyfikowane był metodą manualną.



Rysunek 31. Ogólny wzór związków otrzymanych w wyniku syntezy automatycznej, gdzie: n – ilość reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego z osłoną ivDde (n=6 dla związku 22, n=8 dla związku 23), P – linker przyłączony do żywicy.

1.4.1 Synteza manualna

A) *Przyłączenie biotyny do N-końca peptydomimetyku*

Po umieszczeniu peptydyżywicy w polipropylenowych reaktorach przystąpiono do procedury przyłączenia biotyny do wolnego N-końca peptydomimetyku. Użyto pochodnej powyższej witaminy B7 w postaci estru N-hydroksysukcynimidowego:

- Biotyna-NHS.

Stosunek molowy reagentów w odniesieniu do osadzenia żywicy wynosił: DIPEA : Biotyna-NHS – 3 : 1,5. Reakcję sprzęgania przeprowadzono w roztworze NMP z dodatkiem Tritonu X-100. Czas trwania to 24 godziny, po czym peptydyżywicę przemywano 3 × DMF, 3 × izopropanolem oraz 3 × DCM. Powyższą procedurę powtórzono 3-krotnie, aż uzyskano negatywny wynik testów chloranilowego i Kaisera. Następnie wykonano usunięcie osłon ivDde z łańcuchów bocznych peptydomimetyku, kolejno przystąpiono do przyłączenia pochodnej Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc, a w końcowym etapie do odszczepienia związku z żywicy z jednoczesnym ściągnięciem osłon bocznych. Powyższe kroki wykonano według opisu przedstawionego odpowiednio w punktach: 1. 3. 1. A - C.

1.5 **Synteza związków znakowanych fluorescencyjnie numer 4a – 21a**

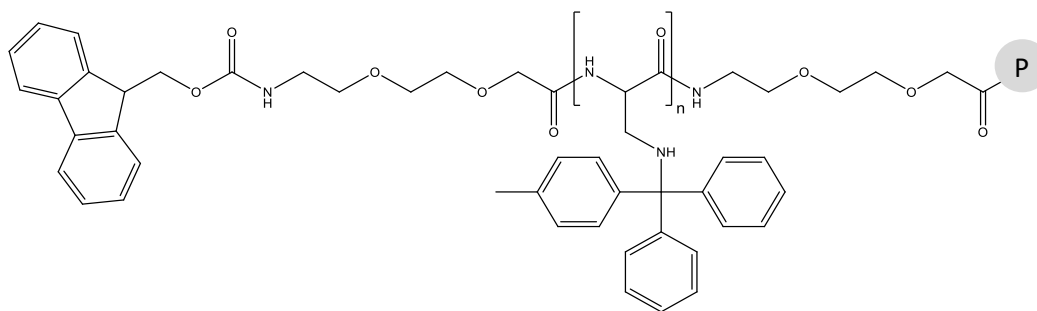
Syntezy związków **4a – 21a** wykonałam z użyciem kwasu L-2,3-diaminopropionowego, którego grupa -NH₂ z pozycji 3 chroniona była osłoną Mtt.

Do przeprowadzenia syntezy automatycznej wykorzystałam dwie poniższe pochodne aminokwasowe:

- Fmoc-O2Oc-OH
- Fmoc-L-Dap(Mtt)-OH.

W pierwszym etapie syntezy otrzymałam związki o wzorze ogólnym: Fmoc-O2Oc-(Dap(Mtt))_n-O2Oc-P (rys. 32). W tabeli 8 przedstawiłam liczbę monomerów reszt Dap(Mtt) występujących w sekwencji poszczególnych związków.

Mtt – osłona 4-metylotrytylowa



Rysunek 32. Ogólny wzór związków, gdzie: n – zmienna ilość reszt kwasu L- lub D-2,3-diaminopropionowego z osłoną Mtt, P – linker przyłączony do żywicy.

Tabela 8. Liczba reszt Dap(Mtt) zawartych w sekwencji peptydomimetyków.

Numer związku	n Fmoc-L-Dap(Mtt)
6a	2
7a	3
8a	4
9a	5
4a, 4b, 10a, 10b, 12a, 13a, 14, 14a, 15, 15a	6
11a, 11b, 5a, 5b	8
16a, 17a, 18a, 19a	4 - 4
Numer związku	n Fmoc-D-Dap(Mtt)
20a, 21a	8

Pochodne aminokwasowe zastosowane do syntezy związków **16a – 21a** przedstawiłam w tabeli nr 9.

Tabela 9. Pochodne użyte podczas syntezy automatycznej związków numer **16a – 21a**.

Numer związku	Pochodne
16a, 18a	<ul style="list-style-type: none"> Fmoc-O₂Oc-OH Fmoc-L-Dap(Mtt)-OH Fmoc-O₁Pen-OH
17a, 19a	<ul style="list-style-type: none"> Fmoc-O₂Oc-OH Fmoc-L-Dap(Mtt)-OH Fmoc-Pro-OH
20a, 21a	<ul style="list-style-type: none"> Fmoc-O₂Oc-OH Fmoc-D-Dap(Mtt)-OH

1.5.1 Synteza manualna

A) *Usuwanie osłony Mtt*

Żywicę z osadzonymi peptydomimetykami przeniosłam do strzykawek polipropylenowych oraz przystąpiłam do usunięcia osłony Mtt. W tym celu przygotowałam:

- 1 % roztwór TFA w DCM zawierający 2 % EDT.

Zawartość każdej ze strzykawek przemywałam powyższą mieszaniną poprzez delikatne 15 minutowe wytrząsanie, po którym żywicę przepłukałam chlorkiem metylenu (DCM). Czynności te powtórzyłam 15-krotnie. Po usunięciu osłony Mtt zawartość strzykawek przemyłam według następującego cyklu:

- 3 × DMF
- 3 × izopropanol
- 3 × DCM.

Obecność wolnych grup aminowych w sekwencji peptydomimetyków potwierdziłam przeprowadzając testy Kaisera oraz chloranilowy. Dodatkowo wykonałam również próbę z TFA*. Odłączenie osłony Mtt w warunkach kwaśnych pozostawia grupy aminowe w formie kationu - NH_3^+ . Aby pozbawić je ładunku dodatniego i przekształcić do postaci - NH_2 , żywicę w reaktorach przemyłam 3-krotnie poniższą mieszaniną;

- 1 % roztwór DIPEA w DMF.

Każde przemywanie trwało 15 minut. Po tym etapie znów wykonałam standardowy cykl płukań (3 × DMF, 3 × izopropanol, 3 × DCM).

** Karbokation 4-metylotritylowy w obecności stężonego kwasu trifluoroctowego powoduje żółte zabarwienie roztworu oraz pomarańczowy kolor ziaren żywicy, do których jest przyłączony. Brak zabarwienia roztworu oraz ziaren żywicy świadczy o całkowitej deprotekcji osłony Mtt.*

B) *Acylowanie pochodnych do łańcucha bocznego związków*

Po usunięciu osłony Mtt z grup aminowych łańcuchów bocznych reszt Dap przystąpiłam do ich osadzania wykorzystując poniższe pochodne:

- Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (GO1)
- Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (GO2).
- Boc-O1Pen-OH*DCHA (w pracy będę stosowała skrót O1) #
- Boc-O2Oc-OH*DCHA (w pracy będę stosowała skrót O2) #
- Kwas 5-hydroksy-3-oksapentanowy (w pracy będę stosowała skrót HO1)
- Kwas 8-hydroksy-3,6-dioksaoktanowy (w pracy będę stosowała skrót HO2)

Pochodne użyte do syntezy związków numer **13a**, **15**, **15a** występowały w postaci soli DCHA, przed zastosowaniem ich w reakcji sprzęgania, konieczne było ich przekształcenie do formy wolnego kwasu.

Procedura przekształcenia soli DCHA (dicykloheksyloamoniowej) do wolnego kwasu

1. 1 gram pochodnej przenieśliśmy do kolby okrągłodennej, rozpuściłem w 50 ml schłodzonego (do - 20°C) octanu etylu.
2. Powoli dodawałem 10 ml schłodzonego 10 % H₃PO₄ mieszając do momentu całkowitego rozpuszczenia się soli i do wytworzenia się dwóch oddzielnych warstw w mieszaninie (pH dolnej, wodnej warstwy powinno wynosić 2-3).
3. Zawartość kolby przenieśliśmy do rozdzielacza, usunęliśmy warstwę wodną, organiczną zaś przemyliśmy 120 ml 10 % H₃PO₄.
4. Ponownie usunęliśmy warstwę wodną, a organiczną przemyliśmy 3-krotnie 120 ml solanki.
5. Pozostały w rozdzielaczu roztwór odparowałem z użyciem wyparki próżniowej do osiągnięcia gęstego oleju. Pochodną uzyskaną w tej formie wykorzystałem do acylowania.

Warunki przyłączania pochodnych do poszczególnych związków przedstawiłem w tabelach numer 10 i 11.

Pomiędzy każdym sprzęganiem stosowałem standardowy cykl płukań peptydylożywicy:

- 3 × DMF
- 3 × izopropanol
- 3 × DCM.

Reakcję sprzęgania monitorowałem za pomocą testu Kaisera oraz chloranilowego. Usuwanie osłony Fmoc z *N*-końca peptydomimetyków opisałem w punkcie 1.3.1. C.

Tabela 10. Warunki przyłączania pochodnych Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (GO2) oraz Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (GO1).

Warunki reakcji	Związek		
	4a, 4b, 5a, 5b	6a, 7a, 8a	9a, 10a, 10b, 11a, 11b, 16a, 17a, 18a, 19a, 20a, 21a
I reakcja sprzęgania	1,5* × GO1 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA		1,5* × GO2 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA
II reakcja sprzęgania	1,5 × GO1 1,5 × HBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA		1,5 × GO2 1,5 × HBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA
III reakcja sprzęgania	3 × GO1 1,5 × DIC		3 × GO2 1,5 × DIC
IV reakcja sprzęgania	2 × GO1 1 × DIC	-	2 × GO2 1 × DIC
Czas trwania reakcji	24h		
Rozpuszczalniki	NMP/DMF/DCM (1:1:1, v/v/v) + Triton X-100		

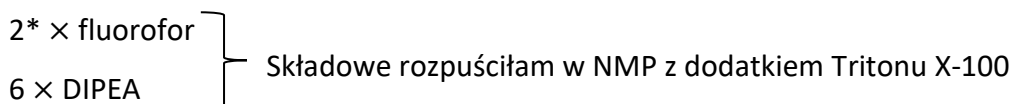
Tabela 11. Warunki przyłączania pochodnych Boc-O1Pen (O1), Boc-O2Oc-OH (O2), kwasu 5-hydroksy-3-oksapentanowego (HO1) oraz kwasu 8-hydroksy-3,6-dioksaoktanowego (HO2).

Warunki reakcji	Związek			
	12a	13a	14, 14a	15, 15a
I reakcja sprzęgania	1,5* × HO1 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA	3* × O1 1,5 × DIC	1,5* × HO2 1,5 × TBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA	3* × O2 1,5 × DIC
II reakcja sprzęgania	1,5 × HO1 1,5 × HBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA	3 × O1 1,5 × DIC	1,5 × HO2 1,5 × HBTU 1,5 × OXYMA 3 × DIPEA	3 × O2 1,5 × DIC
III reakcja sprzęgania	3 × HO1 1,5 × DIC	3 × O1 1,5 × DIC	3 × HO1 1,5 × DIC	3 × O2 1,5 × DIC
IV reakcja sprzęgania	2 × HO1 1 × DIC	2 × O1 1 × DIC	2 × HO1 1 × DIC	2 × O2 1 × DIC
Czas trwania reakcji	24h			
Rozpuszczalniki	NMP/DMF/DCM (v/v/v) + TRITON X-100			

* nadmiar odczynnika w stosunku do osadzenia używanej żywicy.

C) Przyłączanie fluoroforów do N-końca peptydomimetyków

Dalszym krokiem syntezy manualnej było przyłączenie do wolnego N-końca peptydomimetyków pochodnych fluorescencyjnych (tab. 12). Wykorzystałam estry N-hydroksysukcynimidowe 5/6-karboksyfluoresceiny (5/6-FAM-NHS) oraz 5/6-karboksytetrametylorodaminy (5/6-TAMRA-NHS) (rys. 33). Przyłączenie każdego z nich wykonałam w analogiczny sposób, przygotowując poniższą mieszaninę sprzęgającą:

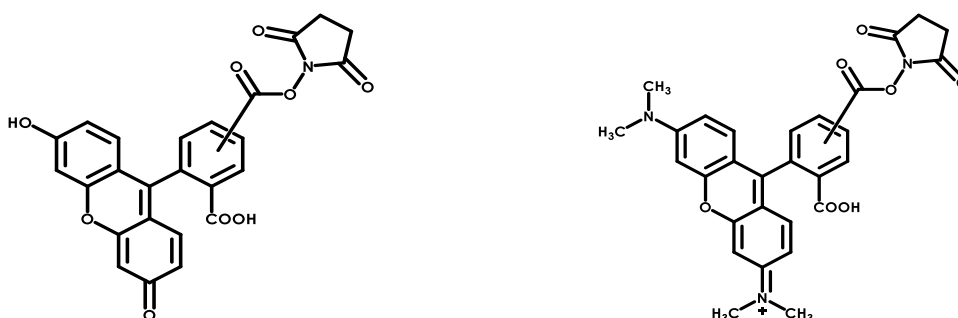


* nadmiar odczynnika w stosunku do osadzenia używanej żywicy

Reakcję sprzęgania prowadziłam przez 24 godziny chroniąc peptydyżywicę przed dostępem światła. Po tym czasie zawartość reaktorów płukałam standardowym cyklem płukań (3 × DMF, 3 × izopropanol, 3 × DCM). Wykonane testy Kaisera i chloranilowy potwierdziły brak wolnych grup aminowych.

Tabela 12. Pochodne fluorescencyjne przyłączone do peptydomimetyków.

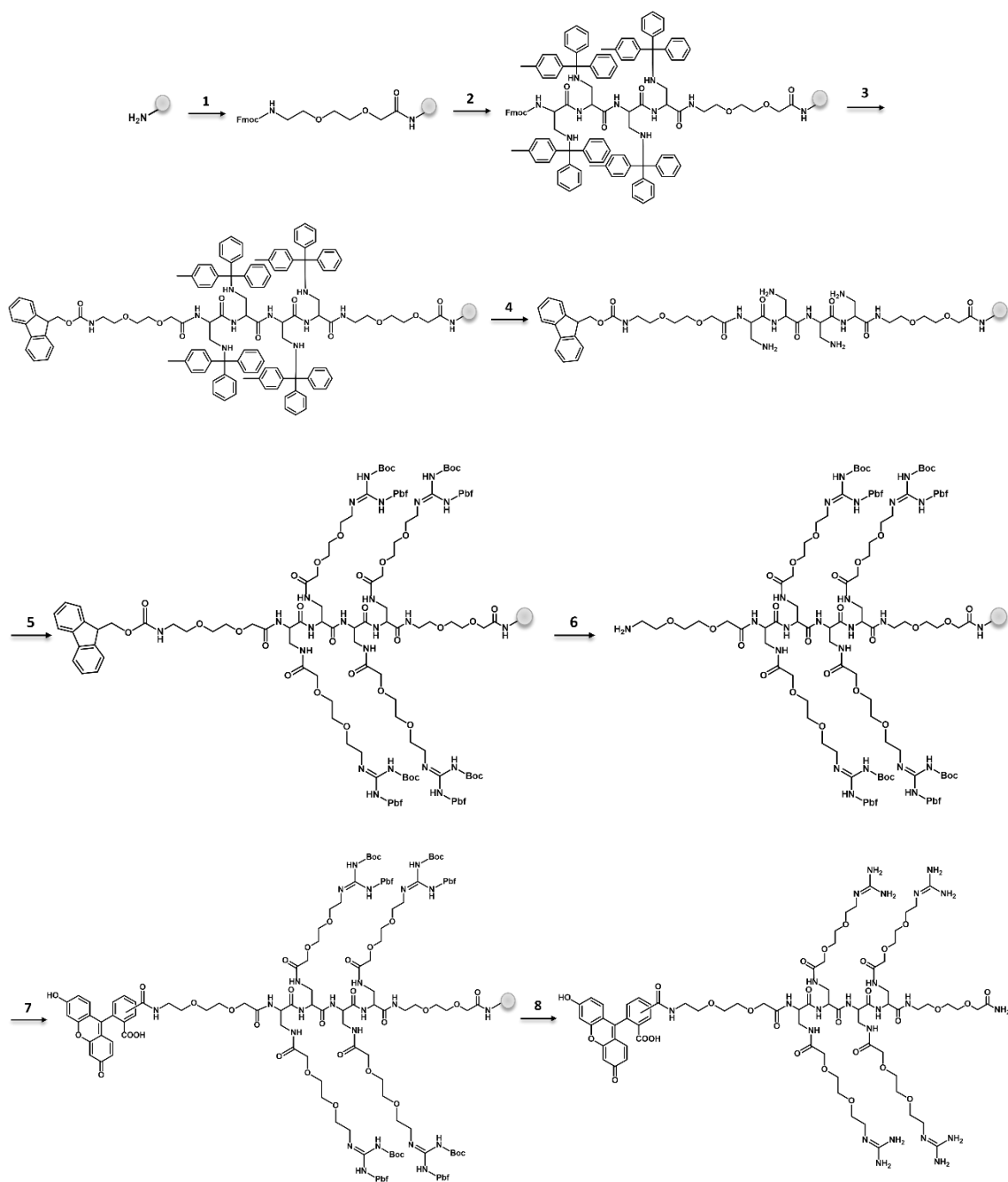
Peptydomimetyk	Pochodna fluorescencyjna
1a - 21a	5/6-FAM-NHS
4b, 5b, 10b, 11b	5/6-TAMRA-NHS



Rysunek 33. Wzory strukturalne stosowanych pochodnych fluorescencyjnych, od lewej: 5/6-FAM-NHS; 5/6-TAMRA-NHS.

Usuwanie peptydomimetyków z żywicy opisałam w punkcie 1.3.1. C.

Poniższy rysunek przedstawia schemat przebiegu syntezy na przykładzie związku numer **8a** (rys. 34).



Ziarno żywicy TentaGel S Ram

1. 1M OXYMA + 0,5M DIC + 0,2M O2Oc
2. a) 20% piperdydna w DMF
b) 1M OXYMA + 0,5M DIC + 0,2M L-Dap(Mtt)
(punkty a) i b) wykonane 4-krotnie)
3. a) 20% piperdydna w DMF
b) 1M OXYMA + 0,5M DIC + 0,2M O2Oc
4. 1% TFA + 2% EDT w DCM
(przemycanie wykonane 15-krotnie)
5. a) 1,5 × GO2 + 1,5 × TBU + 1,5 × OXYMA + 3 × DIPEA
b) 1,5 × GO2 + 1,5 × HBTU + 1,5 × OXYMA + 3 × DIPEA
c) 3 × GO2 + 1,5 × DIC
6. 2% DBU + 2,3% piperdydna + 6% TRITON X-100 w DMF
7. 2 × 5/6-FAM + 6 × DIPEA
8. 82,5% TFA + 5% fenol + 5% H₂O + 5% tianizol + 2,5 % EDT

Punkty 1, 2, 3 – synteza automatyczna
Punkty 4, 5, 6, 7, 8 – synteza manualna

Rysunek 34. Schemat syntezy peptydomimetyku numer 8a.

2. Analiza MS MALDI-TOF utworzonych peptydomimetyków

Masy cząsteczkowe zsyntezowanych związków zostały potwierdzone poprzez analizę widm mas przy użyciu spektrometru typu Autoflex MAX, Brüker, Niemcy wykorzystującego technikę laserowej jonizacji próbki MALDI – TOF. Pomiary były prowadzone z zastosowaniem jako matrycy CCA (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy) lub DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy).

3. Analiza UPLC zsyntezowanych związków

Peptydomimetyki poddałam analizie metodą ultrasprawną chromatografię cieczową (*ang. ultra performance liquid chromatography, UPLC*) przy użyciu chromatografu Nexera X2 LC-30AD, firmy Shimadzu (Japonia). Rozdziału dokonałam na kolumnie Phenomenex (150 × 2,1 mm) o wielkości ziaren 1,7 μ m (Peptide XB-C18) oraz z zastosowaniem parametrów podanych w tabeli numer 13.

Tabela 13. Parametry stosowane podczas analizy UPLC.

Układ rozpuszczalników	(A) - 0,1% TFA w H ₂ O (B) - 80 % acetonitryl w (A)
Metoda	Liniowy gradient 3 - 50 % B, w czasie 20 minut
Szybkość przepływu	0,3 ml/min

4. Badania biologiczne

4.1. **Hodowla komórkowa**

Prawie wszystkie linie komórkowe inkubowałam w 37 °C oraz w atmosferze 5 % CO₂. Wyjątkowo hodowla linii CRL-2169 wymagała zmniejszonej zawartości dwutlenku węgla, co znaczy, iż jego stężenie było takie samo, jak w powietrzu. Sterylne warunki pracy zapewniło mi użycie komory laminarnej Maxi Safe 2020 II klasy bezpieczeństwa mikrobiologicznego firmy Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, Stany Zjednoczone). W celu przechowywania linii komórkowych były one mrożone w odpowiedniej pożywce z dodatkiem 5 % DMSO lub w roztworze FBS zawierającym 5 % DMSO. Krioprobówki z zawiesiną komórkową umieszczałam na 24 godziny w zamrażarce, gdzie temperatura wynosiła – 80 °C, następnie zaś przechowywałam je w ciekłym azocie. Rozcieńczenia trypsyny wykonywałam w sterylnym PBS.

4.1.1. Test stosowany do oceny cytotoksyczność: MTT

Toksyczność otrzymanych związków wobec badanych linii komórkowych analizowałam przy użyciu testu MTT. W pierwszym etapie wysiałam odpowiednie ilości komórek (tab. 14) na przezroczyste płytki 96-dołkowe w 200 µl pełnowartościowej pożywki i pozostawiałam na 48 godzin w inkubatorze. Po tym czasie usuwałam medium, studzienki przemywałam PBS oraz dodawałam do nich ponownie pełnowartościową pożywkę (100 µl) zawierającą określone stężenie związków, a następnie pozostawiałam na kolejne 24 godziny. Komórki pozbawione dodatku badanych peptydomimetyków/kompleksów w medium stanowiły próbę kontrolną.

Po 24-godzinnej inkubacji pożywkę wraz z zawartymi w niej związkami usuwałam ze studzienek płytki, przemywałam roztworem PBS oraz dodawałam do nich 225 µl świeżego medium z dodatkiem 25 µl MTT (bromek (3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy), c = 5 mg/ml przygotowany w buforze PBS). Tak przygotowane płytki umieszczałam w inkubatorze na 4 godziny, następnie usuwałam roztwór z komórek, a wytrącone kryształy formazanu rozpuszczałam w 150 µl DMSO przez około 15 godzin chroniąc płytkę przed światłem. Analizę wyników przeprowadzałam

wykonywając pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm oraz 690 nm z wykorzystaniem czytnika płytek SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Niemcy).

4.1.2. Mikroskopia fluorescencyjna - ocena penetracji błon komórkowych przez peptydomimetyki

W celu oceny zdolności przechodzenia przez błonę komórkową zsyntezowanych peptydomimetyków, wszystkie badane linie komórkowe wysiewałam w ilościach podanych w tabeli numer 15 na płytce 24-dołkowej w 0,5 ml pełnowartościowej pożywki i inkubowałam przez 48 godzin. Po tym czasie usunęłam medium i przemywałam komórki roztworem PBS. Następnie dodałam do nich 0,5 ml nowej pożywki zawierającej badane peptydomimetyki o stężeniu końcowym 10 μ M. Inkubację ze związkami prowadziłam odpowiednio przez 2 lub 24 godziny. Po tym czasie usuwałam pożywkę, a komórki przemywałam 3-krotnie PBS oraz dodawałam do nich 0,5 ml pożywki pozbawionej czerwieni fenolowej - Gibco FluoroBrite. Stopień penetracji peptydomimetyków przez błonę komórkową był oceniany przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX51 (Olympus, Tokio, Japonia) przy użyciu odpowiednich filtrów: dla fluoresceiny ($\lambda_{wz} = 497$ nm/ $\lambda_{em} = 514$ nm) oraz dla tamry ($\lambda_{wz} = 558$ nm/ $\lambda_{em} = 575$ nm). Komórki obrazowano również pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Ti-e z modułem konfokalno-superrozdzielczym RCM (Tokio, Japonia). Następnie wykonałam lizę komórek stosując 0,5 M wodny roztwór NaOH, w celu zbadania wewnątrzkomórkowej intensywności fluorescencji pochodzącej od poszczególnych peptydomimetyków. Pomiar intensywności fluorescencji wykonałam przy długości fali wzbudzenia oraz emisji odpowiednio dla tamry oraz fluoresceiny.

Wszystkie opisane poniżej odczynniki zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich (Missouri, Stany Zjednoczone) oraz służyły do hodowli komórkowej (w nawiasach umieszczone zostały ich numery katalogowe).

Pożywki do hodowli komórkowych:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, DMEM (D6429)
- RPMI – 1640 Medium (R8758)
- L – 15 medium (Leibovitz) (L1518)
- McCoy's 5a medium (M9309)
- GIBCO FluoroBrite, DMEM firmy ThermoFisher (A1896701)

* Każda pożywka dodatkowo suplementowana była FBS (10%) oraz antybiotykami (5%).

Inne:

- Antybiotyki – penicylina (100 jednostek) i streptomycyna (100 µg/ml) (P4333)
- Trypsyna – EDTA roztwór (C_p trypsyna = 0,5%, C_p EDTA = 0,2%) (59418C)
- Płodowa surowica bydlęca (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (F7524)
- Roztwór soli fizjologicznej zbuforowany fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) (D8537)
- Ludzka insulina (I9278)
- Hydrokortyzon, c = 10 mg/ml etanolu (H0888)
- Akutaza (A6964)

* FBS – przed suplementacją pożywki poddany był dezaktywacji poprzez umieszczenie go w łaźni wodnej o temperaturze 56° C na 30 minut.

Zestawienie wykorzystywanych linii komórkowych (tab. 14, 15):

Komórki piersi:

- HB2 – ludzkie komórki nabłonkowe piersi (*ang. human breast epithelial cells*)
- MDA-MB-231 – komórki nabłonkowe ludzkiego nowotworu piersi, gruczolakorak piersi (*ang. human breast cancer epithelial cells*)
- SKBr3 – ludzkie komórki nowotworu piersi (*ang. human breast cancer cell line*)
- T47D – komórki nabłonkowe ludzkiego nowotworu piersi (*ang. human breast epithelial cells*)

Komórki skóry:

- HDFa – ludzkie pierwotne fibroblasty skórne (*ang. human primary dermal fibroblast*)
- HaCaT – keratynocyty ludzkie (*ang. human epidermal keratinocyte line*)
- MEL-CLS-2 – ludzkie komórki czerniaka (*ang. human melanoma cell line*)
- MEWO – ludzkie komórki czerniaka (*ang. human melanoma cell line*)
- HS-695T – ludzkie komórki czerniaka amelanotycznego (*ang. human amelanotic melanoma cell line*)

Komórki pęcherza moczowego:

- CRL-2169 – ludzkie komórki nowotworowe nabłonka pęcherza moczowego, przerzutowe (*ang. human epithelial urinary bladder cell line, transitional*)
- CRL-1749 - ludzkie komórki nowotworowe nabłonka pęcherza moczowego, przerzutowe (*ang. human epithelial urinary bladder cell line, transitional*)
- CRL-1472 - ludzkie komórki nowotworowe nabłonka pęcherza moczowego, III stopień (*ang. human epithelial urinary bladder cell line, III grade*)
- RT4 – ludzkie komórki nowotworowe nabłonka pęcherza moczowego, nawracający guz brodawkowaty pęcherza moczowego (*ang. human epithelial urinary bladder cell line, recurring papillary tumor*)
- HTB-9 – ludzkie komórki nowotworowe nabłonka pęcherza moczowego, II stopień (*ang. human epithelial urinary bladder cell line, II grade*)

Inne:

- RAW 264.7 – makrofagi białaczki mysiej (*ang. murine leukemia macrophage cell line*)
- Podocyty szczurze – (*ang. rat podocytes*)

Tabela 14. Podstawowe informacje dotyczące wykorzystywanych linii komórkowych/komórek pierwotnych.

Linia komórkowa	Pożywka	Trypsynizacja	Pasaż [#]	Pochodzenie	Wirowanie ^{***}
HB2	DMEM *	0,25% trypsyna	35	MERCK	5 min, 200 × G
MDA-MB-231	DMEM	akutaza ^{###}	48	ATCC	5 min, 200 × G
SKBr3	DMEM		39	CLS	3 min, 300 × G
T47D	DMEM		45	CLS	5 min, 300 × G
HDFa	DMEM	0,25% trypsyna	13	CLS	3 min, 150 × G
HaCaT	DMEM	0,25% trypsyna	31	CLS	3 min, 300 × G
MEL-CLS-2	DMEM	akutaza	30	CLS	5 min, 300 × G
MEWO	DMEM		28	CLS	5 min, 300 × G
HS-695T	DMEM		48	CLS	5 min, 300 × G
CRL-2169	Leibovitz's	0,25% trypsyna	57	ATCC	3 min, 300 × G
CRL-1749	DMEM		62	ATCC	3 min, 300 × G
CRL-1472	DMEM		43	ATCC	3 min, 300 × G
RT4	McCoy's 5a **		57	ECACC	3 min, 300 × G
HTB-4	McCoy's 5a		182	ATCC	3 min, 300 × G
HTB-9	RPMI 1640		51	ATCC	3 min, 300 × G
RAW 264.7	RPMI 1640	akutaza	36	CLS	3 min, 300 × G
Podocyty szczurze	RPMI 1640	0,25% trypsyna	-	##	8 min, 1000 × G

* Hodowla linii HB2 wymaga dodatkowej suplementacji pożywki DMEM 5 µg/ml hydrokortyzonem oraz 10 µg/ml insuliny.

** Hodowla linii RT4 wymaga dodatkowej suplementacji pożywki McCoy's 2 mM glutaminą.

*** Wirówka typu 5702 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy).

Numer pasaży zakupionych linii komórkowych.

Komórki wyizolowane przez dr hab. Agnieszkę Piwkowską, prof. IMDiK.

Akutaza zawiera enzymy proteolityczne i kolagenolityczne do odklejania komórek od podłoża.

- MERCK (Hamburg, Niemcy)
- CLS – Cell Lines Service GmbH (Eppenheim, Niemcy)

- ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, Anglia)
- ATCC - American Type Culture Collection (Manassas, Wirginia, Stany Zjednoczone)

Tabela 15. Ilości komórek wysiewanych na określone naczynka hodowlane.

Linia komórkowa	Naczynko hodowlane (75 cm²)*	Płytko 24-dółkowa (2 cm²)*	Płytko 96-dółkowa (0,32 cm²)*
HB2	4 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁴	5 × 10 ³
MDA-MB-231	7 × 10 ⁵	4 × 10 ⁴	7 × 10 ³
SKBr3	7 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	8 × 10 ³
T47D	1 × 10 ⁶	4 × 10 ⁴	1,3 × 10 ⁴
HDFa	3,5 × 10 ⁵	9 × 10 ³	3 × 10 ³
HaCaT	7 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	7 × 10 ³
MEL-CLS-2	7,5 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	6 × 10 ³
MEWO	8,5 × 10 ⁵	4 × 10 ⁴	8 × 10 ³
HS-695T	1 × 10 ⁶	4,5 × 10 ⁴	9 × 10 ³
CRL-2169	7 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	5 × 10 ³
CRL-1749	7 × 10 ⁵	3 × 10 ⁴	7 × 10 ³
CRL-1472	1 × 10 ⁶	3,5 × 10 ⁴	8 × 10 ³
RT4	7,5 × 10 ⁶	4 × 10 ⁴	7 × 10 ³
HTB-4	5,5 × 10 ⁵	1,5 × 10 ⁴	5 × 10 ³
HTB-9	5 × 10 ⁵	1,8 × 10 ⁴	5,5 × 10 ³
RAW 264.7	7 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	7 × 10 ³
Podocyty szczurze	1 × 10 ⁶	3,5 × 10 ⁴	-

* Powierzchnia hodowlana

Wszystkie komórki zostały wysiane według danych zawartych w tabeli, chyba że w tekście podano inaczej.

4.2. Ocena oddziaływań międzycząsteczkowych oraz badania biologiczne wykonane z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2 i MDA-MB-231

4.2.1. Test Cell Counting Kit-8 stosowany do oceny cytotoksyczności

Toksyczność otrzymanych związków wobec badanych linii komórkowych analizowałam również przy użyciu testu Cell Counting Kit-8 (CCK8) firmy Sigma Aldrich. Podstawową cechą odróżniającą go od testu MTT jest to, iż powstający w wyniku bioredukcji barwnik formazanowy jest rozpuszczalny w wodzie i nie jest toksyczny wobec komórek. W pierwszym etapie wysiałam odpowiednie ilości komórek (tab. 14) na przezroczyste płytki 96-dołkowe w 200 μ l pełnowartościowej pożywki i pozostawiałam na 48 godzin w inkubatorze. Po tym czasie usuwałam medium, studzienki przemywałam PBS oraz dodawałam do nich ponownie pełnowartościową pożywkę (100 μ l) zawierającą określone stężenie związków, a następnie pozostawiałam na 24 godziny. Komórki pozbawione dodatku badanych peptydomimetyków w medium stanowiły próbę kontrolną. Po upływie określonego czasu inkubacji, do 100 μ l pożywki zawierającej określone stężenie badanych związków, dodałam 10 μ l soli WST-8 ($c = 0,7$ mM) (sól sodowa 2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H- tetrazoliowa) i pozostawiłam w inkubatorze na 4 godziny. Następnie wykonałam pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm (czytnik płytek SPECTROstar Nano).

4.2.2. Test oceny proliferacji komórek

Test oceny proliferacji komórek wykonywałam na płytkach 48-dołkowych. Komórki poddane badaniom wysiewałam w pełnowartościowej pożywce w ilości: HB2 – $1,5 \times 10^4$, MDA-MB-231 – $2,5 \times 10^4$ oraz umieściłam w inkubatorze na 24 godziny. Po tym czasie wymieniłam medium na pozbawione dodatku FBS (w celu synchronizacji cyklu komórkowego do fazy G₀), a następnie płytki przeniosłam do inkubatora na kolejne 24 godziny. W kolejnym etapie do każdego dołka dodałam 300 μ l pełnowartościowej pożywki zawierającej określone stężenie badanych związków (1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M) oraz 30 μ l odczynnika EdU ($C = 0,1$ mM) (tab. 17)

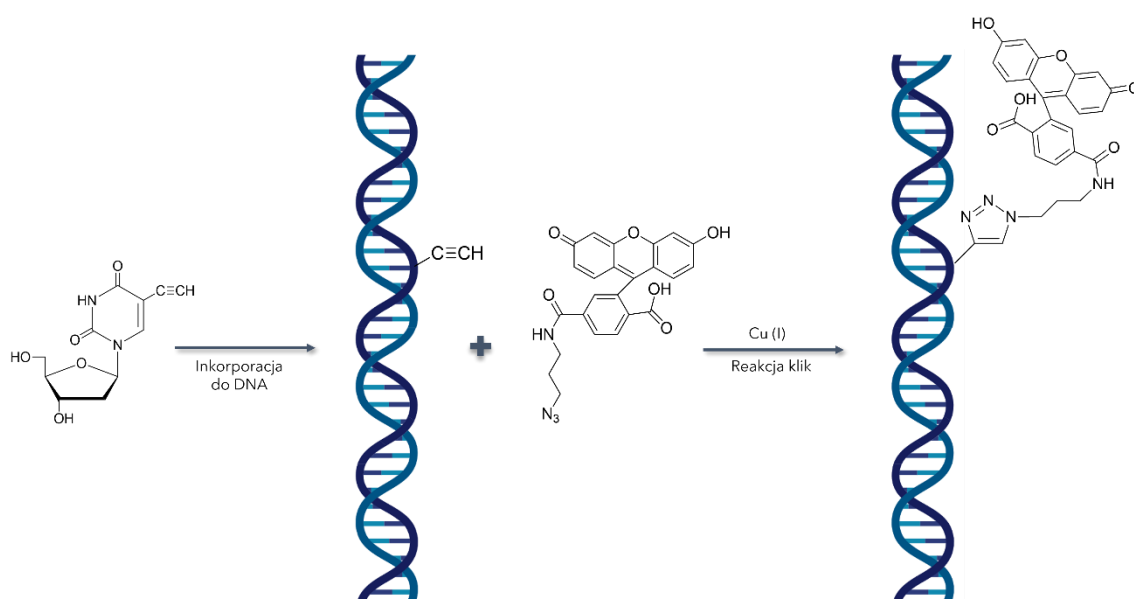
i poddałam inkubacji. Po 24 godzinach usunęłam medium ze wszystkich studni i dodałam do nich 150 µl 3,7 % roztworu formaldehydu w PBS na 15 minut (skutkuje to utwaleniem komórek adherentnych), następnie go usunęłam i dodałam 150 µl 0,5 % TRITONU w PBS na kolejny kwadrans (dochodzi do permabilizacji błon cytoplazmatycznych). Po tym czasie komórki przemyłam 2% roztworem BSA w PBS, po czym dodałam do nich 150 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład podałam w tabeli numer 16 i pozostawiłam w temperaturze pokojowej na 25 minut. Następnie komórki przemyłam 2-krotnie 2% BSA w PBS i obserwowałam je pod mikroskopem fluorescencyjnym. Następnie wykonałam lizę stosując 0,5 M wodny roztwór NaOH. Pomiar intensywności fluorescencji wykonałam przy długości fali wzbudzenia oraz emisji odpowiednio 495 nm i 519 nm.

EdU jest analogiem nukleozydu jakim jest tymidyna. Podczas replikacji DNA komórek, z którymi jest inkubowany, ulega inkorporacji do cząsteczek powstającego kwasu nukleinowego. Następnie dochodzi do katalizowanej jonami miedzi reakcji cykloaddycji azydkowo-alkilowej (reakcja klik) pomiędzy cząsteczką azydku znakowaną fluorescencyjnie, a analogiem nukleozydowym – EdU (rys. 35). W ten sposób znakowane jest tylko nowo zsyntezowane DNA, którego co najmniej jedna nić zawiera modyfikowany nukleotyd [153].

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Odczynnik	Objętość [μl]
Tris-HCl	117
CuSO ₄	3
6-azydo-FAM	0,75
Kwas L-askorbinowy	30

* *EdU (5-etynylo-2'-deoksyurydyna) – 10 mM w H₂O i DMSO (1:1, v/v), przed dodaniem rozcieńczony w pożywce do stężenia 0,1 mM*
 * *Tris-HCl – 100mM w H₂O pH 8,5*
 * *CuSO₄ – 100 mM w H₂O*
 * *6-azydo-FAM – 4 mM w DMSO*
 * *Kwas L-askorbinowy – 110 mM w H₂O*



Rysunek 35. Przebieg reakcji inkorporacji EdU.
 Rysunek wykonany na podstawie [153].

4.2.3. Test oceny stabilności związków numer 8, 10 oraz 11 w lizatach komórkowych

Badania dotyczące stabilności peptydomimetyków w lizatach komórkowych zostały przeprowadzone przez mgr Katarzynę Adrych w ramach pracowni dyplomowej realizowanej na Wydziale Chemii pod opieką dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG. Doświadczenie zostało przeprowadzone na lizatach linii komórkowych piersi: HB2 oraz MDA-MB-231, które hodowane były przez 96 godzin w naczynkach o powierzchni 25 cm². Komórki po osiągnięciu 90 % konfluencji zostały przemyte roztworem PBS, kolejno dodano do nich na 20 minut 300 µl buforu lizującego (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl oraz 0,5 % NP-40) schłodzonego do 4°C, a następnie poddano wirowaniu (14000 RPM, 10 min). Stabilność związków numer 8, 10 i 11 określono przy użyciu chromatografii UPLC przy zastosowaniu metody 3 – 50 % B w czasie 25 minut, gdzie przepływ wynosił 0,3 ml/min. Ze względu na odmienne środowisko panujące wewnątrz komórki (pH ≈ 7) oraz w lizosomach (pH ≈ 4-5), podczas przygotowania materiału do analizy wykorzystano dwa bufor: 1 – 50 mM Tris/HCl o pH 7,6 oraz 50 mM MES o pH 5,5. Próbkę nanoszoną na kolumnę składały się z 150 µl określonego buforu, 150 µl lizatu oraz 20 µl peptydomimetyku (c = 1 mg/ml). W celu potwierdzenia aktywności proteolitycznej uzyskanych lizatów komórkowych zbadano ich wpływ na hydrolizę wiązań peptydowych w sekwencji białka - znakowanej fluorescencyjnie (FAM) kazeiny. Na jeden dołek płytki 96-dołkowej dodano 100 µl buforu (50 mM Tris/HCl, pH 7,62 lub MES o pH 5,5), 100 µl lizatu oraz 30 µl FAM-kazeiny (c = 5 mg/ml H₂O). Przyrost intensywności fluorescencji mierzono za pomocą czytnika mikropłytek FLUOstar Omega firmy BMG LABTECH (Niemcy).

NP-40 – nonylofenoksypolietoksyletanol

MES – kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy

4.2.4. Cytometria przepływowa – badania dotyczące cyklu komórkowego

W celu określenia wpływu peptydomimetyków 8a, 10a oraz 11a na przebieg cyklu komórkowego linii HB2 i MDA-MB-231, komórki wysiałam na płytkę 6 – dołkową w ilości:

- MDA-MB-231 – $2,1 \times 10^4$ /cm²

- HB2 – $1,0 \times 10^4 / \text{cm}^2$

w 2 ml pożywki i pozostawiłam do 48 – godzinnej inkubacji. Po tym czasie usunęłam medium i dodałam świeże wraz z dodatkiem badanych związków numer **8a**, **10a** oraz **11a**, których stężenie w dołku wynosiło 10 μM . Ponadto użyłam również następujące inhibitory: paklitaksel (powodujący zatrzymanie komórek w fazie G2/M) oraz afidokolina (powodująca zahamowanie komórek w fazie G0/G1), których stężenia końcowe wynosiły odpowiednio 100 nM oraz 10 μM . Próba kontrolna zawierała komórki pozbawione dodatku peptydomimetyków oraz inhibitorów. Po 24 godzinach inkubacji usunęłam pożywkę z nad komórek, przemyłam je roztworem PBS, a następnie postępowalam według poniższego opisu:

1. Komórki odszczepiłam od podłoża z wykorzystaniem akutazy, zwirowałam, a kolejno znów przemyłam PBS i powtórnie poddałam wirowaniu.
2. W kolejnym etapie przeprowadziłam procedurę utrwalania komórek. W tym celu zawieszono w 150 μl roztworu PBS komórki kroplami dodałam do 500 μl 70 % etanolu i chłodziłam je przez 3 godziny w 4°C.
3. Komórki ponownie zwirowałam, usunęłam supernatant, następnie znów zawiesiłam je w roztworze PBS i poddałam kolejnemu wirowaniu usuwając następnie roztwór.
4. Następnie komórki zawiesiłam w 200 μl odczynnika GUAVA (Guava Cell Cycle Reagent, (Merck Milipore, Darmstadt, Germany)). Mieszaninę przenieśliśmy do nowych 1,5 ml probówek firmy Eppendorf i pozostawiłam w ciemnym miejscu na 30 minut.
5. Próbkę badaną przeanalizowała dr Magdalena Zdrowowicz-Żamojć z Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, z wykorzystaniem cytometru przepływowego (Guava easyCyte 12, Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy). Celem eliminacji agregatów oraz resztek komórkowych, komórki bramkowane na kropkowym wykresie dwuwymiarowym (zawartość DNA vs FSC (Forward Scatter)) w funkcji zawartości DNA w próbce. Poszczególne fazy cyklu komórkowego analizowane były za pomocą oprogramowania InCyte 3.1.

4.2.5. Inhibitory endocytozy

W celu określenia mechanizmu wykorzystywanego przez zsyntezowane peptydomimetyki do penetracji błon biologicznych komórki inkubowałam w 0,5 ml pełnowartościowej pożywki w 37 °C przez noc. Następnie zamieniłam medium na świeże, które pozbawione było FBS i pozostawiłam na kolejne 24 godziny. Kolejno w zależności od celu eksperymentu postępowałam według poniższego opisu.

- Doświadczenie umożliwiające ocenę, czy peptydomimetyki podczas penetracji błon komórkowych wykorzystują mechanizm zależny od energii.

W pierwszym etapie dodałam do komórek świeżą pożywkę z dodatkiem związku nr **4b**, którego stężenie końcowe wynosiło 10 µM. Przygotowane płytki następnie pozostawiłam na 2 godziny w 4°C w celu oceny mechanizmu penetracji (zależność od energii). Następnie każdy z dołków przemyłam 3-krotnie schłodzonym do 4°C roztworem PBS. Kolejno dodałam do komórek pożywkę FluoroBrite (0,5 ml / dołek) i poddałam obserwacjom mikroskopowym (rozdział 4.1.2).

- Badanie mechanizmów endocytotycznych wykorzystywanych przez zsyntezowane peptydomimetyki podczas penetracji błon komórkowych.

Po upływie 24h inkubacji komórek w medium pozbawionym FBS dodałam do komórek świeżą pożywkę zawierającą określone inhibitory endocytozy: cytochalazynę D, chloropromazynę (ich stężenie końcowe wynosiło: 1, 2, 5, 10, 20, 30 µM) oraz metylo-β-cyklodekstrynę (stężenie końcowe wynosiło: 1; 2,5; 5; 7,5 mM). Po 30 minutach inkubacji komórek z inhibitorami dodawałam związek nr **4b** i pozostawiałam je w 37 °C na 2 godziny. Próba kontrolna przygotowywana była w analogiczny sposób i zawierała peptydomimetyki bez dodatku inhibitorów. Następnie przeprowadzałam procedurę opisaną w punkcie nr 4.1.2. Mikroskopia fluorescencyjna – ocena penetracji peptydomimetyków, umożliwiającą wizualną ocenę wnikania związków do wnętrza komórek w obecności oraz bez inhibitorów. W kolejnym etapie komórki poddałam lizie wykorzystując w tym celu 0,5 M NaOH (500 µl/dołek). Następnie wykonywałam pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od TAMRY osadzonej na N-końcu peptydomimetyku, której długości fal wzbudzenia oraz emisji wynosiły odpowiednio: 558 nm oraz 575 nm.

4.3. Żel poliakrylamidowy wykonany dla kompleksów utworzonych z DNA

Zdolność do tworzenia kompleksów pomiędzy zsyntezowanymi peptydomimetykami, a DNA zbadalam za pomocą testu przesunięcia ruchliwości elektroforetycznej. Wykorzystałam fragment podwójnej nici DNA (dsDNA) zawierającej 76 par zasad* (oligo.pl, Polska), który następnie inkubowałam ze związkami numer **1, 2, 3, 8, 10, 14** i **15** w dwóch stosunkach N/P (dodatni ładunek peptydomimetyku zlokalizowany na atomach azotu/ujemny ładunek DNA zlokalizowany na grupach fosforanowych) – 0,2:1 oraz 1,5:1 i pozostawiłam do 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do każdego z utworzonych kompleksów dodałam 2 µl buforu ładującego (50 % glicerol w buforze TBE (1,08 % Tris, 0,55 % kwasu borowego, 0,37 % EDTA) z dodatkiem 0,005 % błękitu bromofenolowego) otrzymując łącznie objętość 10 µl. Tak przygotowane próbki nanosiłam na 8 % żel poliakrylamidowy (tab. 17) zawierający dodatek barwnika fluorescencyjnego – Midori Green (abo, Gdańsk, Polska) umożliwiającego rejestrację migracji DNA za pomocą zestawu do detekcji żeli Fusion FX-7. Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze TBE zawierającym 1,08 % Tris, 0,55 % kwasu borowego, 0,37 % EDTA wykorzystując stałe napięcie prądu 70 V.

* *fragment sekwencji kodującej β-aktynę (Homo sapiens)*

Tabela 17. Skład 8 % żelu poliakrylamidowego.

Woda	6,4 ml
30 % roztwór akrylamidu/bisakrylamidu	3,2 ml
Bufor TBE*	2,4 ml
10 % APS (w H ₂ O)	200 µl
TEMED	10 µl
Midori Green	5 µl

* *Bufor TBE składa się z: 5,4 % Tris, 2,75 % kwasu borowego, 1,85 % EDTA.*

4.4. Termoforeza w mikroskali (MST)

W celu wyznaczenia stałej powinowactwa zsyntezowanych peptydomimetyków do kwasów nukleinowych wykorzystałam związki zawierające w sekwencji fluorofor

na *N*-końcu (peptydomimetyki numer: **1a**, **4a**, **8a**, **10a**, **11a** oraz **16a – 21a**). Do badań użyłam fragment pojedynczej nici DNA (ssDNA) zawierającej 76 nukleotydów, a także odcinek podwójnej nici DNA (dsDNA) zbudowanej z 76 par zasad nukleotydowych, zarówno ssDNA jak i dsDNA zostało zsyntezowane komercyjnie (oligo.pl, Polska). Doświadczenie rozpoczęłam od przygotowania 16-krotnej serii rozcieńczeń DNA, którego początkowe stężenie wynosiło 400 μ M i w każdej kolejnej próbce malało 2-krotnie w stosunku do poprzedniej (stała wiązania mierzona była wobec rosnącego stężenia wynoszącego 6,1 nM – 200 μ M). Wszystkie rozcieńczenia wykonałam w buforze EDDBS, który zawierał: 25 mM Tris-HCl pH 8, 4 % (w/v) sacharozy, 4 mM DTT oraz 80 μ g/ml BSA. Do 10 μ l roztworu liganda dodałam po 10 μ l znakowanych peptydomimetyków, osiągając w ten sposób 0,437 μ M stężenie związków. Następnie próbki inkubowałam przez godzinę w 32 °C, po czym wirowałam przy 14000 RPM (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburg, Niemcy) przez 10 min, a następnie umieściłam je w kapilarach pomiarowych. Jako próbę kontrolną zastosowałam znacznik 5/6-FAM. W kolejnym kroku, współpracując z dr Katarzyną Węgrzyn z Zakładu Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed, wykonałam pomiary przy użyciu urządzenia Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy), które skanowało kapilary w 25 °C (20% LED, medium MST power). Dla każdego związku wykonałam 3 niezależne pomiary. Oprogramowanie MO Affinity Analysis zostało wykorzystane przez dr Katarzynę Węgrzyn do opracowania wyników.

4.5. Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR)

Pomiary z wykorzystaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego zostały wykonane dla związków numer **1a – 4a**, **6a**, **8a**, **10a**, **14a** oraz **15a**, przez dr Katarzynę Węgrzyn z Zakładu Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed z wykorzystaniem sprzętu Biacore T200 (GE Healthcare, Warszawa, Polska). Powierzchnia sensora została pokryta streptawidyną (GE Healthcare, Warszawa, Polska), zaś rolę unieruchomionego liganda we wszystkich pomiarach pełniło 5'-biotynylowane ssDNA zawierające 76 nukleotydów lub zbudowane z 76 par zasad dsDNA. Wykorzystane oligonukleotydy zostały zakupione

w firmie oligo.pl (Polska). Ligandy unieruchomiono na powierzchni czujnika osiągając wartość ~ 50 RU lub ~ 100 RU. Pomiary przeprowadzono w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, jako bufor zastosowano HBS-EP (150 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7,4, 3 mM EDTA oraz 0,05 % surfaktant P20). W trakcie pomiaru szybkość przepływu buforu wynosiła $15\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$, zaś w trakcie badań kinetycznych $30\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$. Otrzymane dane zostały poddane analizie dzięki zastosowaniu oprogramowania Biacore T200 (GE, Warszawa, Polska), wyniki zaś przedstawiono w formie sensogramów uzyskanych po odjęciu sygnału pochodzącego od tła z referencyjnej kuwety przepływowej, a także z doświadczenia kontrolnego z nastryknięciem buforu.

4.6. Elektroforeza w żelu agarozowym

4.6.1. Tworzenie kompleksów pomiędzy peptydomimetykami, a plazmidowym DNA

Wykonałam również eksperyment pozwalający ocenić możliwość tworzenia się kompleksów peptydomimetyków z plazmidowym DNA. Wykorzystałam plazmid p_{maxGFP} (Lonza, Szwajcaria) zbudowany z 3486 par zasad, który poddałam 30 minutowej inkubacji ze związkami numer **8**, **10** oraz **11** w czterech różnych stosunkach N/P (dodatni ładunek peptydomimetyku zlokalizowany na atomie azotu/ujemny ładunek plazmidu zlokalizowany na grupach fosforanowych): 0,2:1; 1:1; 1,5:1 i 3:1. Po tym czasie dodałam do próbek $4\text{ }\mu\text{l}$ buforu obciążającego $6\times$ (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) uzyskując łącznie $20\text{ }\mu\text{l}$ mieszaniny, którą kolejno nanosiłam na 0,7 % żel agarozowy zawierający dodatek barwnika fluorescencyjnego, jakim jest Midori Green, dzięki któremu zaobserwować można migrację plazmidowego DNA za pomocą zestawu do detekcji żeli Fusion FX-7. Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze TBE zawierającym 1,08 % Tris, 0,55 % kwasu borowego, 0,37 % EDTA wykorzystując stałe napięcie prądu 70 V.

4.7. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

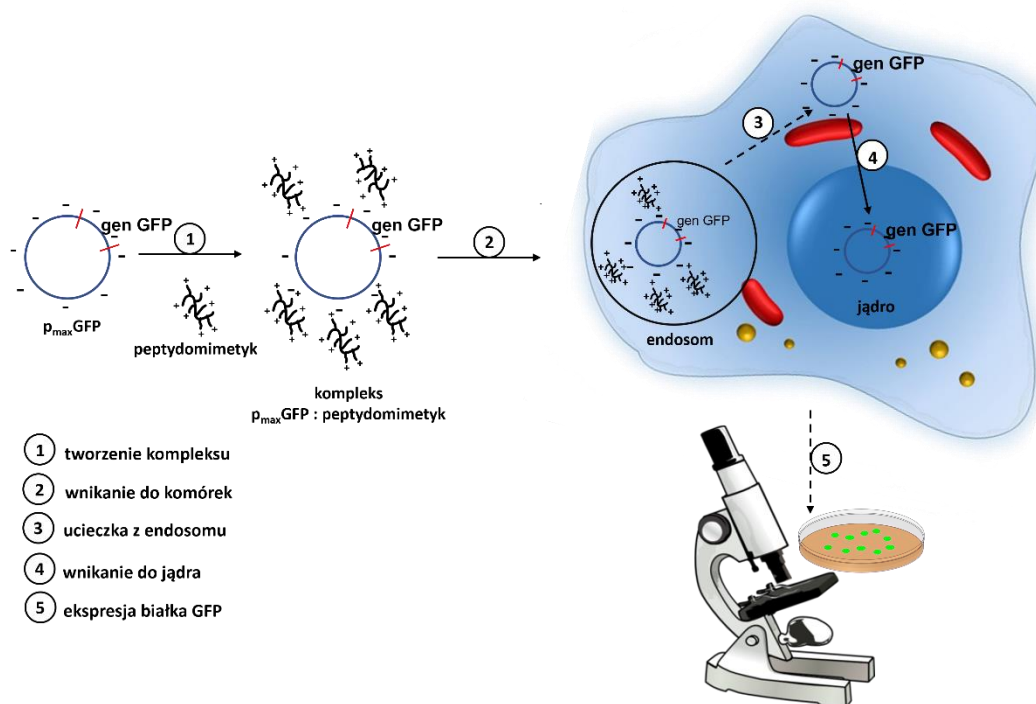
Pomiary z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych przeprowadzone zostały przez dr Katarzynę Bury z Zakładu Biologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. W celu utworzenia kompleksów użyto peptydomimetyki

8a, 10a i 11a oraz plazmid p_{max}GFP w stosunkach N/P – 0,2 : 1. Próbkę przygotowano w 8 mM MgCl₂ w temperaturze pokojowej. Do obrazowania kompleksu utworzonego pomiędzy DNA, a peptydomimetykami zastosowano mikroskop sił atomowych BioScope Resolve AFM (Bruker, Bremen, Niemcy) wyposażony w sondę ScanAsyst-Fluid+. Sensor wysokości sygnału umożliwił wyświetlenie obrazu związków przy użyciu oprogramowania NanoScope Analysis v1.9 (Bruker, Bremen, Niemcy).

4.8. Transfekcja

Na podstawie wyników otrzymanych z zastosowaniem techniki AFM dowodzących, że peptydomimetyki wiążą się z DNA na trzy różne sposoby, postanowiłam przetestować potencjał związków **8, 10 i 11** jako środków transfekcyjnych do wprowadzenia plazmidu p_{max}GFP. W celu określenia odpowiedniej ilości peptydomimetyku tworzącego kompleks z plazmidem na podstawie oddziaływań elektrostatycznych, wykorzystałam stosunek ilości dodatnio naładowanych ugrupowań guanidynowych zsyntezowanych związków do liczby ujemnie naładowanych reszt fosforanowych plazmidu. W swoich badaniach wykorzystałam peptydomimetyk i plazmid w proporcjach ładunku odpowiednio (N/P): 1,5:1 oraz 3:1. Tworzenie kompleksu transfekcyjnego polegało na zmieszaniu składowych w środowisku wodnym oraz ich 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Jako próbę kontrolną zastosowałam komercyjny odczynnik do transfekcji ViaFect firmy Promega (Walldorf, Niemcy). Eksperyment rozpoczęłam od wysiania komórek HB2 oraz MDA-MB-231 na płytce 96-dółkowej w 0,5 ml pełnowartościowej pożywki. Po dobie inkubacji, gdy konfluencja wynosiła 60 – 70%, komórki przemyłam 3-krotnie pożywką pozbawioną FBS oraz antybiotyków. Następnie do każdego dołka dodałam 90 µl pożywki bez suplementów lecz z dodatkiem 4 mM CaCl₂ oraz 10 µl kompleksu transfekcyjnego (zawierającego 200 ng DNA) i pozostawiłam do 5-godzinnej inkubacji. Dodatkowo do komórek dodawałam sam plazmid, którego zawartość w studni wynosiła 200 ng. Po tym czasie pożywkę wymieniłam na medium pełnowartościowe i płytkę z komórkami umieściłam w inkubatorze. Rezultaty transfekcji obserwowałam pod mikroskopem fluorescencyjnym po kolejnych 24, 48 oraz 72 godzinach. Ponadto

komórki po 5-godzinnej inkubacji z utworzonymi kompleksami transfekującymi poddałam testowi MTT na cytotoksyczność (procedura opisana w punkcie 4.2.3). Rysunek 36 obrazuje schematycznie przedstawiony proces transfekcji.



Rysunek 36. Schemat przebiegu procesu transfekcji.

4.9. Modelowanie teoretyczne - symulacje samoorganizacji atomów

Oddziaływania związków numer **8** i **11** z DNA zostały zbadane przez dr hab. Emilię Sikorską, prof. UG, pracującą w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii UG, z wykorzystaniem pełnoatomowych symulacji dynamiką molekularną (MD) w pakiecie AMBER 16 [154]. Niestandardowe reszty wymodelowano za pomocą modułu XLEAP z pakietu AMBER 16. Zgodnie z zaleceniami protokołu RESP [155], ładunki punktowe zostały zoptymalizowane poprzez dopasowanie ich do molekularnego potencjału elektrostatycznego ab initio (baza funkcyjna 6-31G*, program GAMESS 2013) [156] dla dwóch różnych konformacji, a następnie uśrednione. Układy startowe do symulacji zawierały losowo rozmieszczone cztery cząsteczki podwójnej helisy DNA o sekwencji 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTCCG-3' w formie B, bez dodatku i z dodatkiem ośmiu cząsteczek związku **8** lub czterech cząsteczek związku **11**.

W układach zawierających peptydomimetyki stosunek ładunku peptydomimetyku do DNA wynosił 0,2 : 1. Każdy z układów był solwatowany oraz neutralizowany przez dodatek jonów sodu i chloru. Stężenie wolnych jonów soli wynosiło w przybliżeniu 100 mM. Symulacje dynamiką molekularną (315-475 ns) zostały przeprowadzone w temperaturze 300 K, pod ciśnieniem 1 Bar z izotropową regulacją ciśnienia i krokiem czasowym 2 fs. Temperatura i ciśnienie utrzymywane były na zadanym poziomie z wykorzystaniem odpowiednio termostatu Langevina oraz barostatu Berendsena. Symulacje prowadzono w okresowych warunków brzegowych. Energie oddziaływań elektrostatycznych szacowano z wykorzystaniem metody sumowania Ewalda (PME). Promień odcięcia dla oddziaływań niewiążących wynosił 10 Å. Algorytm SHAKE został wykorzystany do ograniczenia długości wiązań chemicznych, w które zaangażowane były atomy wodoru. Analizę przeprowadzono za pomocą modułu CPPTRAJ z pakietu AmberTool v16 (San Francisco, CA, USA). Proces agregacji został zbadany z wykorzystaniem standardowych narzędzi pakietu GROMACS 2019.4 (Groningen, Holandia) [157]. Do wizualizacji struktur wykorzystano oprogramowanie UCSF Chimera v1.15 (San Francisco, CA, USA) [158].

4.10. Zastosowanie peptydomimetyków do wewnątrzkomórkowego transportu białek (badania z wykorzystaniem komórek piersi linii: HB2, MDA-MB-231, SK-Br-3 i T47D)

4.10.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych

A) Tworzenie kompleksów pomiędzy biotynylowanymi peptydomimetykami, a FAM-streptawidyną

Wiedząc, iż biotyna tworzy niespecyficzne oddziaływania ze streptawidyną, postanowiłam utworzyć kompleksy pomiędzy peptydomimetykami numer **22** i **23**, a FAM-streptawidyną (Sigma Aldrich, Niemcy). W celu utworzenia kompleksu, znakowane fluorescencyjnie białko poddałam godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej z biotynylowanym związkiem (numer **22** i **23**) lub ze związkiem nieznakowanym fluorescencyjnie (numer **10** i **11**). Kompleksy tworzyłam w stosunku molowym FAM-streptawidyna : peptydomimetyk równym: 1:1, 1:2 oraz 1:4. Następnie obecność utworzonych kompleksów lub ich brak potwierdziłam, wykonując

elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych wykorzystując żel NativePAGE 4 - 16%, Bis-Tris, 1,0 mm, (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Tak przygotowane próbki nanosiłam do studzienek żelu, a stężenie białka w studni wynosiło 0,1 µg lub 0,2 µg. Kontrolą była ścieżka z samą FAM-Strp, której zawartość w studni również wynosiła 0,1 µg lub 0,2 µg. W przypadku studni zawierających wyłącznie peptydomimetyki na ścieżkę nanosiłam taką samą ilość związku, jaka zawarta była w kompleksie utworzonym w stosunkach molowych 1 : 4.

- Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze: 50 mM BisTris, 50 mM Trycyna, pH 6,8
- Bufor ładujący próbki: 200 mM BisTris, 6 N HCl, 200 mM NaCl, 40 % w/v glicerol, 0,004 % błękit bromofenolowy, pH 7,2
- Bufor katodowy: 10 ml 0,4 % Coomassie G-250 w H₂O oraz 190 ml buforu elektroforetycznego o pH 6,8.

Rozdział elektroforetyczny prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu 150 V. Następnie żel odbarwiałam w 100 ml mieszaniny zawierającej 40 % MeOH oraz 10 % CH₃COOH w wodzie i wstawiłam go do reaktora mikrofalowego na 45 sekund (950-1100 W). Następnie żel w powyższym roztworze umieściłam na 30 minut na wytrząsarce orbitalnej (Laboratory shaker type 358A, Elpin Plus, Polska). Czynności te wykonałam 2-krotnie. Migrację białka wizualizowałam za pomocą zestawu do detekcji żeli Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Francja).

4.10.2. Tworzenie kompleksu FAM-Streptawidyna z biotynylowanym peptydomimetykiem – inkubacja z liniami komórkowymi

Kompleksy FAM-streptawidyna z biotynylowanym peptydomimetykiem (związki numer **22** i **23**) lub z peptydomimetykiem posiadającym wolny N-koniec – **10**, **11** (kontrola) utworzyłam w stosunkach molowych: FAM-streptawidyna : peptydomimetyk 1:2 lub 1:4.

Wszystkie linie komórkowe wysiałam na płytce 24-dołkowej w ilości: HB2 – $1,5 \times 10^4$, MDA-MB-231 - 4×10^4 , SK-Br-3 - 4×10^4 , T47D - 5×10^4 i inkubowałam w 0,5 ml pełnowartościowej pożywki przez 24 godziny. Po tym czasie komórki 3-krotnie przemywałam roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS), następnie do każdego dołka dodałam 0,5 ml świeżej pożywki z dodatkiem utworzonego kompleksu, gdzie stężenie peptydomimetyku w studni wynosiło $10 \mu\text{M}$ w przypadku kompleksu 1:2 oraz $20 \mu\text{M}$ w przypadku kompleksu 1:4. Dodatkowo, komórki wszystkich zastosowanych linii inkubowałam z samą FAM-streptawidyną (2h, 4h i 24h). Po określonym czasie inkubacji (2h, 4h, 24h) komórki 3-krotnie przemywałam roztworem PBS, kolejno zaś do każdego dołka dodałam 0,5 ml pożywki pozbawionej czerwieni fenolowej (FluoroBrite DMEM). Wnikanie kompleksów do wnętrza komórek zostało zbadane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Ti-e z modułem konfokalno-superrozdzielczym RCM (Tokio, Japonia).

4.10.3. Test oceny cytotoksyczności związków i ich kompleksów z FAM-streptawidyną i streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą

W celu określenia cytotoksyczności kompleksów FAM-streptawidyna : peptydomimetyk wybrane linie komórkowe wysiałam w ilości podanej w tabeli numer 16 na płytce 96-dołkowej i inkubowałam w $100 \mu\text{l}$ pełnowartościowej pożywki przez 48 godzin. Następnie wymieniłam medium na świeże ($100 \mu\text{l}$), zawierające odpowiednie stężenia badanych związków:

- **10, 11** oraz **22, 23** – końcowe stężenie związku wynosiło: 1, 5, 10, 20, 50, $100 \mu\text{M}$;
- Kompleksy FAM-streptawidyna : **22 / 23** oraz mieszanina FAM-streptawidyna : **10 / 11** w stosunku molowym 1:2 i 1:4 – stężenie końcowe: 1, 10, 20, $30 \mu\text{M}$ (stężenie kompleksu obliczyłam na podstawie stężenia peptydomimetyku w dołku);
- Kompleksy streptawidyna- β -galaktozydaza : **22 / 23** oraz mieszanina streptawidyna- β -galaktozydaza : **10 / 11** w stosunku molowym 1:2 i 1:4 -

stężenie końcowe: 1, 10, 20, 30 μM (stężenie kompleksu obliczyłam na podstawie stężenia peptydomimetyku w dołku);

a następnie inkubowałam przez 24 godziny. Komórki pozbawione dodatku badanych związków posłużyły za próbę kontrolną. Po tym czasie usunęłam medium z komórek i postępowalam zgodnie z wcześniej opisaną procedurą dotyczącą wykonywania testu MTT.

4.10.4. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych dla białek o charakterze zasadowym

A) Tworzenie kompleksów pomiędzy biotynylowanymi peptydomimetykami, a streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą

Tworzenie kompleksu Streptawidyna- β -galaktozydaza z peptydomimetykiem biotynylowanym (związki **22** i **23**) lub peptydomimetykiem z wolnym *N*-końcem (związki **10** i **11**) wykonałam w w stosunkach molowych: 1:1; 1:2; 1:4. Próbkę inkubowałam przez godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie nanosiłam do żel tak, by stężenie białka wynosiło 7,5 μg na ścieżkę. Aby potwierdzić skuteczność tworzenia kompleksów wykorzystałam elektroforezę natywną dla białek o charakterze zasadowym.

- Bufor do żelu zagęszczającego: 0,22 M CH_3COOH , pH 5,0
- Bufor do żelu rozdzielającego: 0,075 M CH_3COOH , pH 4,0
- Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze: 0,355 % β -alanina, pH 4,0
- Próbkę obciążałam buforem ładującym, w skład którego wchodzi: 50 % glicerol w buforze zagęszczającym (0,22 M CH_3COOH , pH 5,0) z dodatkiem 0,005 % fioletu krystalicznego
- Skład żelu zagęszczającego oraz rozdzielającego podałam w tabeli 18.

Podczas prowadzenia elektroforezy zastosowałam odwróconą polaryzację komory. Początkowo rozdział prowadziłam przy stałym natężeniu prądu równym 5mA (żel zagęszczający), a następnie 20 mA i prowadziłam do momentu elucji z żelu

rozdzielającego prążka odpowiadającego zabarwieniu fioletu krystalicznego. Po tym czasie białka obrazowałam w roztworze BlueSafe (nzytech, Lizbona, Portugalia), a następnie wykonywałam zdjęcia za pomocą systemu do dokumentacji elektroforegramów Fusion FX-7.

Tabela 18. Skład 4 % żelu zagęszczającego oraz 8 % żelu rozdzielającego.

Żel zagęszczający 4 %	
Woda	1,48 ml
0,22 M CH ₃ COOH pH 5,0	250 µl
30 % roztwór akrylamidu/bisakrylamidu	266 µl
10 % APS (w H ₂ O)	20 µl
TEMED	4 µl
Żel rozdzielający 8 %	
Woda	2,42 ml
0,075 M CH ₃ COOH o pH 4,0	500 µl
30 % roztwór akrylamidu/bisakrylamidu	1,07 ml
10 % APS (w H ₂ O)	40 µl
TEMED	8 µl

TEMED - *N,N,N',N'*-Tetrametyloetylenodiamina

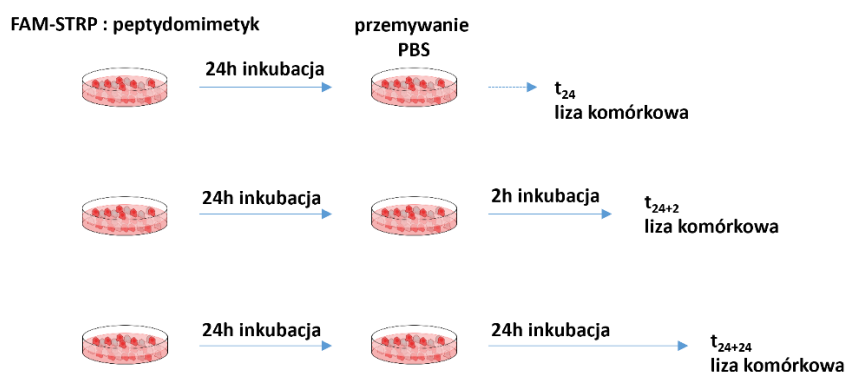
APS - *peroksodisarczan amonu*

4.10.5. Tworzenie kompleksu streptawidyna-β-galaktozydaza z biotynylowanym peptydomimetykiem - inkubacja z liniami komórkowymi

Kompleksy streptawidyna-β-galaktozydaza z biotynylowanym peptydomimetykiem (związki numer **22** i **23**) lub z peptydomimetykiem posiadającym wolny *N*-koniec – **10**, **11** (kontrola) utworzyłam w stosunkach molowych: białko : peptydomimetyk równych 1:2 lub 1:4. Próbkę inkubowałam przez godzinę w temperaturze pokojowej zabezpieczając je od światła.

A) Badanie aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy w lizatach komórkowych

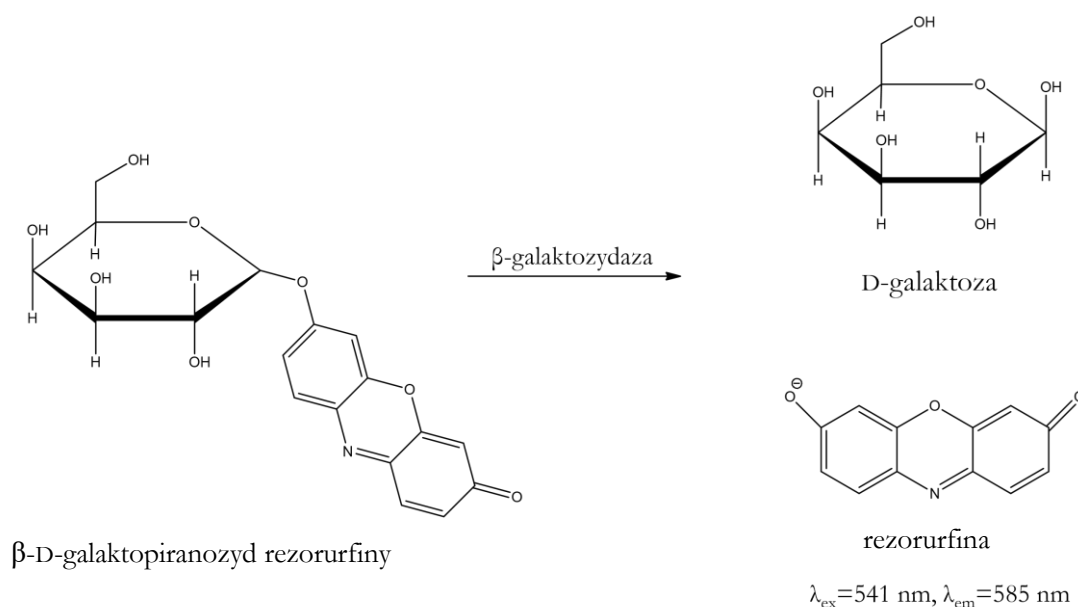
Badane linie komórkowe (HB2, MDA-MB-231, SKBr3, T47D) wysiałam na płytki 96-dołkowe w ilościach podanych w tabeli numer 15 i inkubowałam w 100 μ l pełnowartościowej pożywki przez 48 godzin. Po tym czasie komórki 3-krotnie przemyłam roztworem PBS, a następnie do każdej studni dodałam 50 μ l świeżej pożywki z dodatkiem utworzonego kompleksu, gdzie końcowe stężenie peptydomimetyku wynosiło 10 μ M (kompleks 1:2) oraz 20 μ M (kompleks 1:4). W doświadczeniu zastosowałam 2 próby kontrolne, jedną z nich były same komórki bez dodatku związków, w drugiej zaś były one inkubowane ze Strp- β -gal w takim samym stężeniu, jak to zastosowane do utworzenia kompleksów. Dodatkowo sprawdziłam aktywność β -galaktozydazy w komórkach inkubowanych z samymi peptydomimetykami (C = 10 μ M). Komórki z kompleksami streptawidyna- β -galaktozydaza : peptydomimetyk inkubowałam przez 24 godziny. Następnie przemyłam je 2-krotnie roztworem PBS i wykonywałam lizę komórek (natychmiast po przemyciu PBS ; po 2 godzinach i po 24 godzinach od przemycia komórek PBS) przy użyciu buforu lizującego – Reporter Lysis 5 \times Buffer - RLB (Promega, Wisconsin, Stany Zjednoczone) rozcieńczonego 5-krotnie wodą (rys. 37). Tak przygotowane lizaty, do momentu wykonywania badań, przechowywałam w temperaturze - 80°C.



Rysunek 37. Schemat otrzymywania lizatów komórkowych.

Aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy zawartej w lizatach komórkowych oceniłam przy użyciu substratu β -D-galaktopiranozydu rezorufiny (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone) o stężeniu 5 mg/ml DMSO, przed

pomiarem rozcieńczonego 2-krotnie w buforze fosforanowym pH 7,0. Pomiar wykonywałam w czarnych płytkach 96 – dołkowych, do pojedynczej studni dodawałam: 2,5 µl lizatu, 5 µl substratu oraz 100 µl buforu fosforanowego. Przyrost intensywności fluorescencji produktu mierzyłam za pomocą czytnika mikropłytek FluoroStar OMEGA, gdzie długości fal wzbudzenia oraz emisji wynosiły odpowiednio 541 nm i 585 nm. W trakcie pomiaru przyrostu fluorescencji β-galaktozydaza dostarczona przez peptydomimetyk do wnętrza komórek hydrolizuje substrat β-D-galaktopiranozyd rezorurfiny do D-galaktozy oraz rezorurfiny (rys. 38).



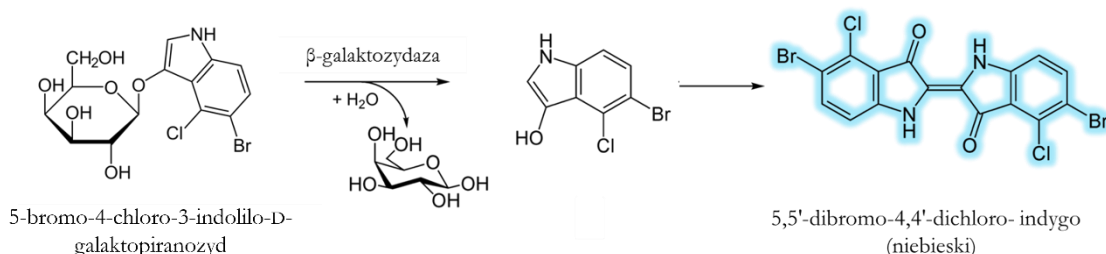
Rysunek 38. Enzymatyczny rozpad β-D-galaktopiranozydu rezorurfiny.

B) Test na obecność β-galaktozydazy w liniach komórkowych

Następnie dokonałam kolorymetrycznej detekcji β-galaktozydazy obecnej w badanych liniach komórkowych. W tym celu wysiałam komórki oraz sporządziłam kompleksy analogicznie do punktu: 4.10.5. – Tworzenie kompleksu streptawidyna-β-galaktozydaza z biotynylowanym peptydomimetykiem - inkubacja z liniami komórkowymi. W doświadczeniu zastosowałam 3 próby kontrolne, jedną z nich były same komórki bez dodatku związków, w drugiej zaś były one inkubowane ze Strp-β-gal

w takim samym stężeniu, jak to zastosowane do utworzenia kompleksów. Dodatkowo sprawdziłam aktywność β -galaktozydazy w komórkach inkubowanych z samymi peptydomimetykami ($C = 10 \mu\text{M}$).

Komórki z utworzonymi kompleksami streptawidyna- β -galaktozydaza : peptydomimetyk inkubowałam przez 24 godziny. Następnie przemyłam je 2-krotnie roztworem PBS i utrwaliałam (15 minut) stosując 3,7 % roztwór formaldehydu w PBS (natychmiast po przemyciu PBS; po 2 godzinach i po 24 godzinach od przemycia komórek PBS (rys. 35)). Po czym powtórnie przemyłam je PBS i dodałam do nich 125 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej w swoim składzie: 40 mM kwas cytrynowy, 40 mM Na_3PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM merkaptoetanol, 4 mM MgCl_2 oraz 2 mM X-gal, pH 6,0 [159]. Następnie płytkę inkubowałam przez 2 godziny w 37 °C. Pojawiające się wewnątrz komórek zabarwienie obserwowałam przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus IX51 (Olympus, Tokio, Japonia). Odczynnik X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo-D-galaktopiranozyd) pod wpływem obecnej we wnętrzu komórek β -galaktozydazy ulega hydrolizie do galaktozydazy i 5-bromo-4-chloro-3-hydroksyindolu, który kolejno dimeryzuje i tworzy niebieski, nierozpuszczalny w wodzie związek (rys. 39).



4.11.1. Wpływ zsyntezowanych związków na proliferację komórek

Zbadałam wpływ zsyntezowanych peptydomimetyków na proliferację komórek. W tym celu postępowалаm zgodnie z opisem zawartym w punkcie 4.2.2. Komórki wysiałam na płytki 48-dółkowe w następujących ilościach: HDFa – $5,5 \times 10^3$, MEL - $1,5 \times 10^4$, HS-695T - $1,7 \times 10^4$, RAW264.7 - $1,5 \times 10^4$.

4.11.2. Test na obecność kaspazy-3 w liniach komórkowych

Kaspazy w największym stopniu odpowiadają za zniszczenie komórki podczas pierwszych etapów apoptozy. W związku z tym postanowiłam określić czy pod wpływem zsyntezowanych peptydomimetyków wzrasta ich poziom w wybranych liniach komórkowych. W tym celu komórki umieściłam w naczynkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² w odpowiednio suplementowanej pożywce. Do badań wykorzystywałam następujące linie komórkowe: HS-695T (5×10^5), MEL-CLS-2 ($3,5 \times 10^5$), HDFa ($1,2 \times 10^5$), HaCaT (5×10^5) – w nawiasach podałam ilości komórek pasażowanych do naczynka. Po 24 godzinach do komórek dodawałam związki nr **8**, **10** oraz **11**, których stężenie w butelce hodowlanej wynosiło 10 μM. Następnie linie komórkowe inkubowałam z peptydomimetykami przez 6 lub 24 godziny. Próbką kontrolną były komórki bez dodatku związków. Po tym czasie komórki poddałam trypsynizacji, a następnie policzyłam ich ilość przy użyciu licznika CASY Model TT (Innovatis AG, Reutlingen, Niemcy). Następnie dodałam do nich bufor lizujący (stosowałam 50 μl buforu / 3×10^5 komórek) Reporter Lysis Buffer 5× (rozcieńczony 5-krotnie w wodzie) i pozostawiłam go na 10 minut. Lizaty komórkowe poddałam wirowaniu (1400 rpm, 10 min), a w uzyskanym supernatancie oznaczyłam zawartości białka metodą Bradforda. Wybrane lizaty rozcieńczyłam powyższym buforem w celu wyrównania/osiągnięcia tego samego stężenia białka. W tak otrzymanych próbkach oznaczyłam aktywność enzymatyczną kaspazy-3. Pomiar aktywności kaspazy-3 wykonałam w buforze 25 mM HEPES pH 7,5, 0,1 % CHAPS, 10 mM DTT wykorzystując substrat Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (c = 1mM w DMSO, gdzie AFC: 7-amino-4-trifluorometylokumaryna). Jako kontrolę ujemną użyłam lizaty inkubowane z inhibitorem kaspazy 3: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CMK (c końcowe = $2,82 \times 10^{-5}$). Pomiar

przyrostu fluorescencji w czasie (przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio: 400 nm i 505 nm) wykonałam na czytniku mikroplitek FLUOstar Omega.

HEPES – kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamonio]-1-propanosulfonian

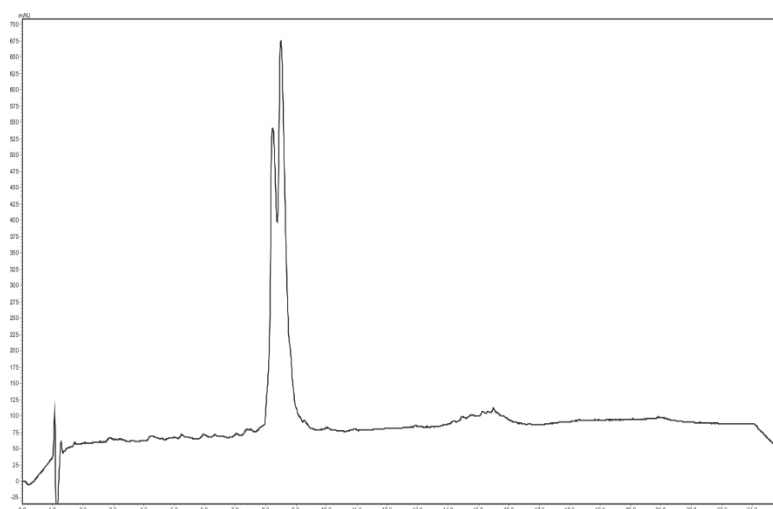
DTT – ditiotreitol

DMSO – dimetylosulfotlenek

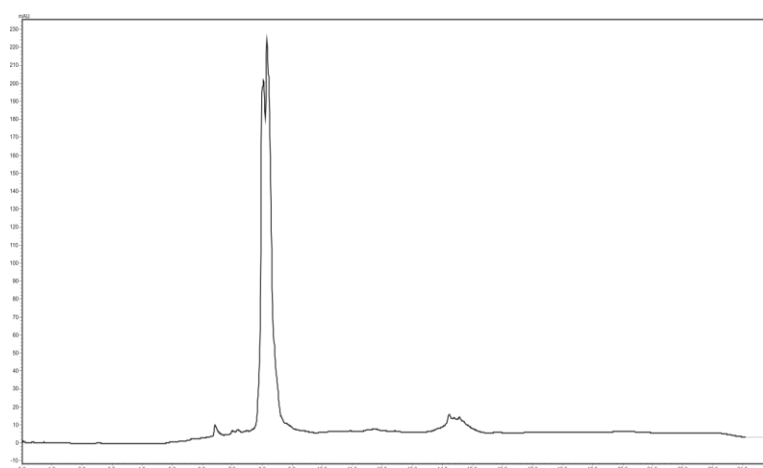
IV. WYNIKI

1. Związki zsyntezowane w ramach rozprawy doktorskiej

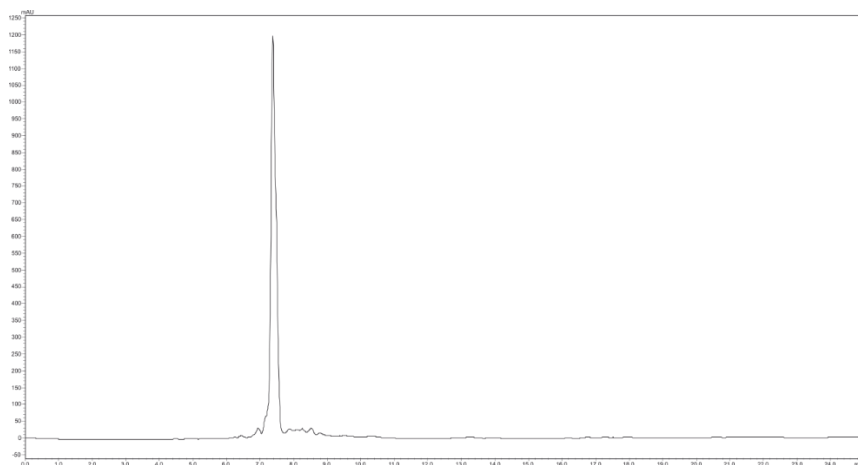
Rysunek numer 40 przedstawia wybrane analizy MS oraz chromatogramy zsyntezowanych peptydomimetyków. Natomiast tabela 19 prezentuje wszystkie związki uzyskane w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej wraz z ich charakterystyką fizykochemiczną.



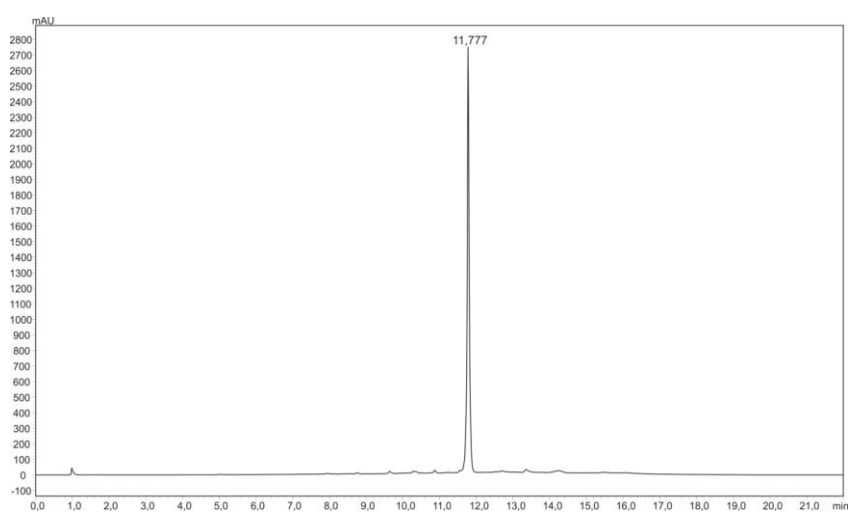
Chromatogram UPLC peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₈-O2Oc-NH₂, t_R=8,2 oraz t_R=8,8.



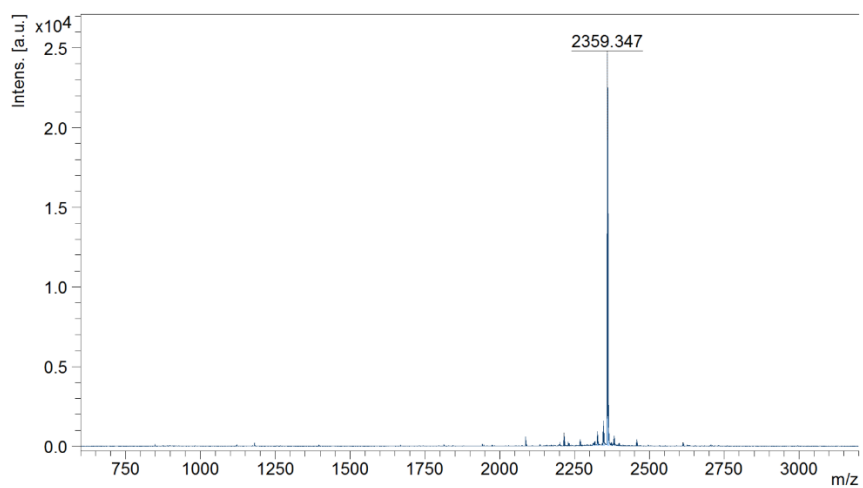
Chromatogram UPLC peptydomimetyku 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)]₈-O2Oc-NH₂, t_R=8,2 oraz t_R=8,5.



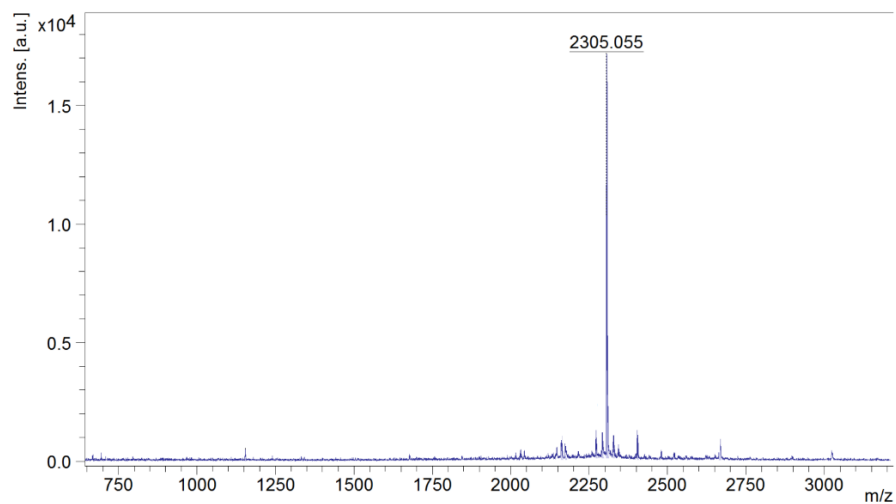
Chromatogram UPLC peptydomimetyku Bt-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂, t_R=7,4.



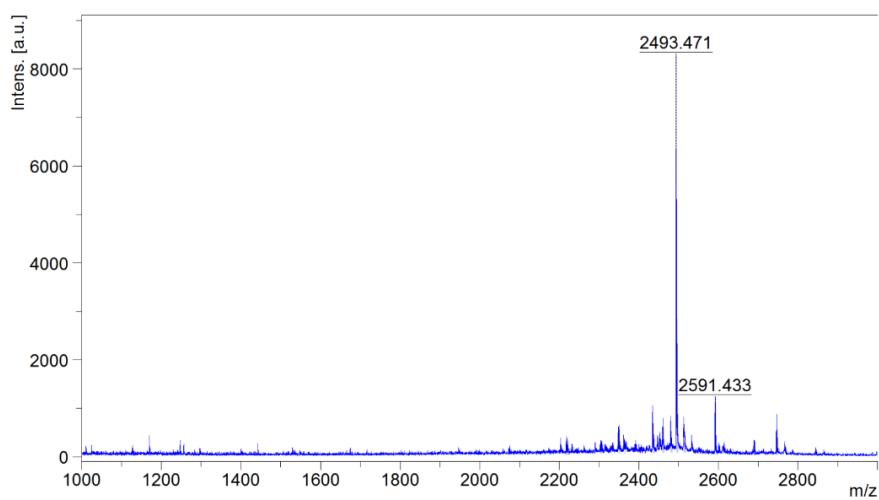
Chromatogram UPLC peptydomimetyku Bt-O2Oc-[Dap(GO2)]₈-O2Oc-NH₂, t_R=11,77.



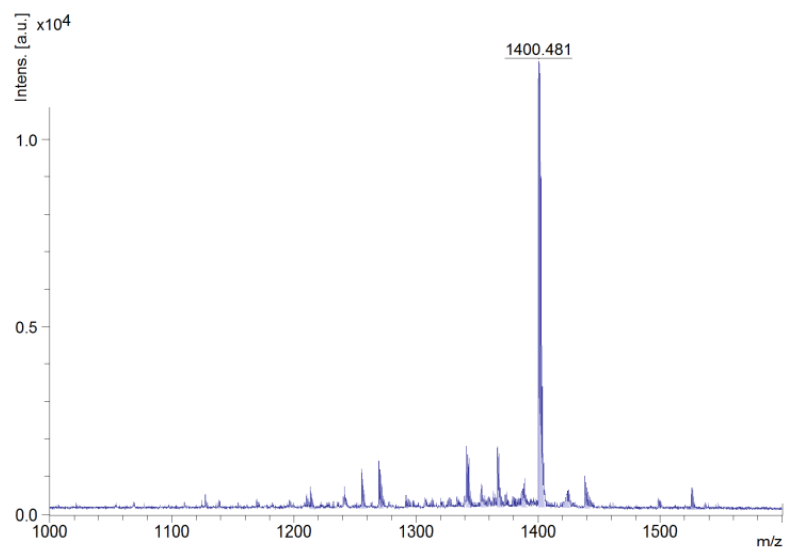
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂ (M=2360,6 g/mol).



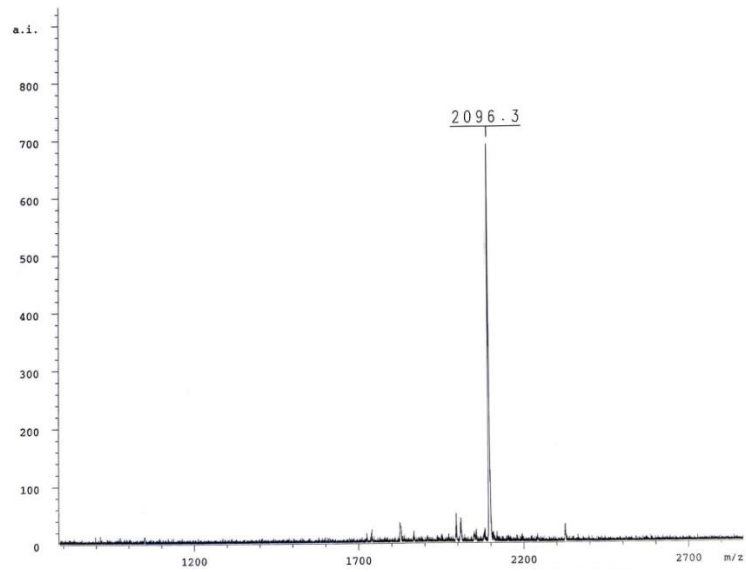
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂ (M=2306,4 g/mol).



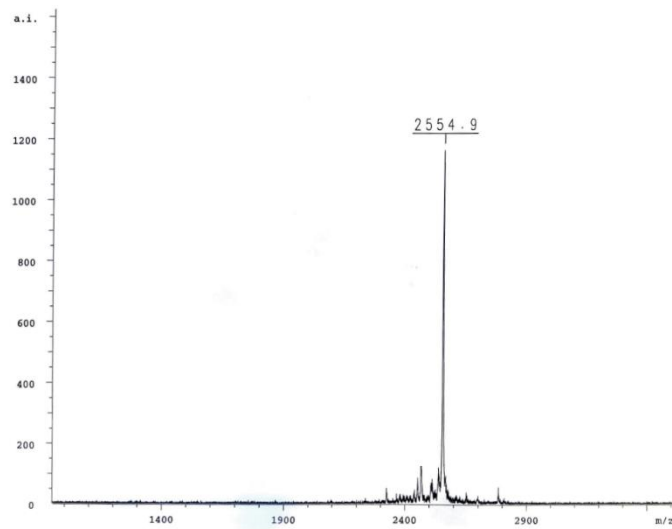
Widmo mas peptydomimetyku O2Oc-[Dap(GO2)]₈-O2Oc-NH₂ (M=2493,7 g/mol).



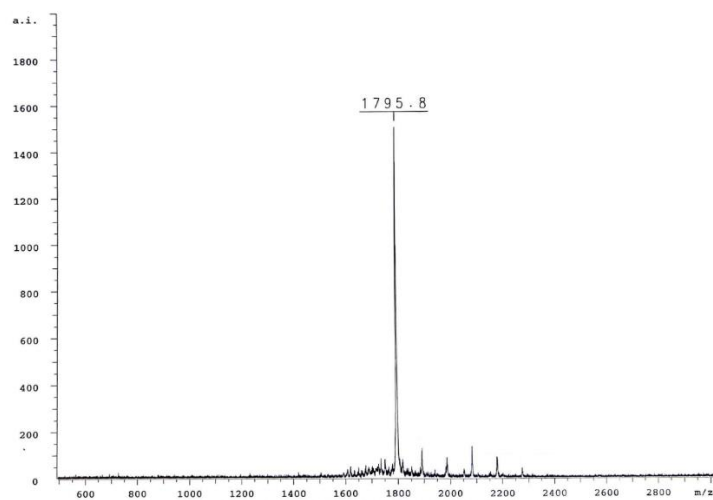
Widmo mas peptydomimetyku O2Oc-[Dap(GO2)]₄-O2Oc-NH₂ (M=1400,5 g/mol).



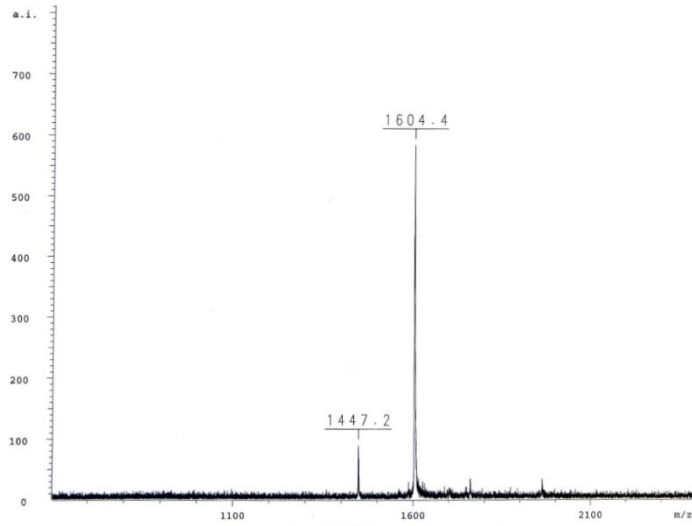
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂ (M=2096,2 g/mol).



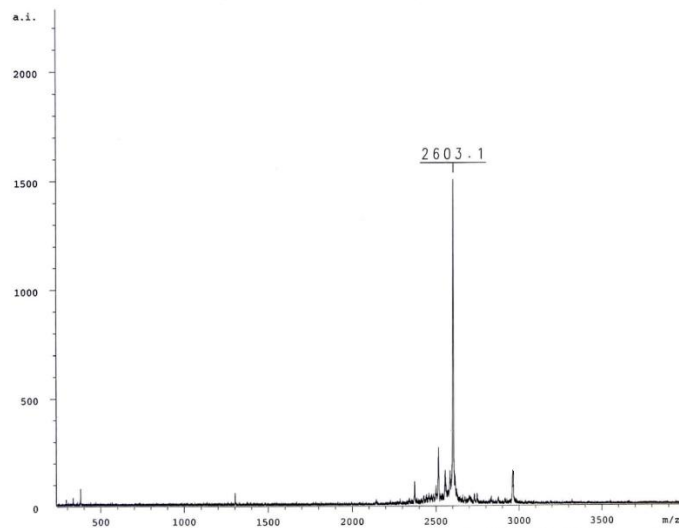
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)]₈-O2Oc-NH₂ (M=2554,9 g/mol).



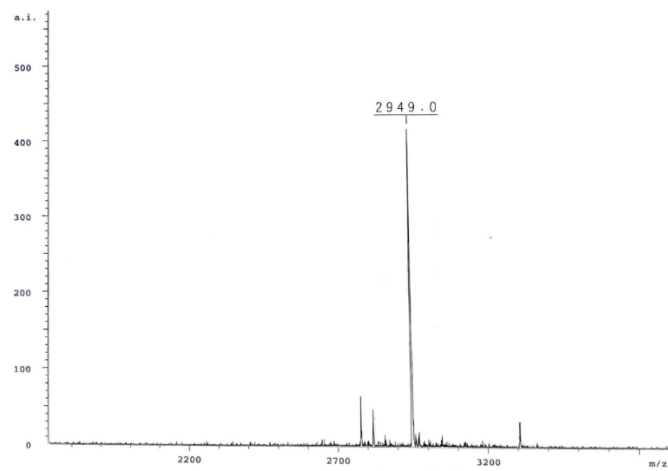
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO1)]₆-O2Oc-NH₂ (M=1796,7 g/mol).



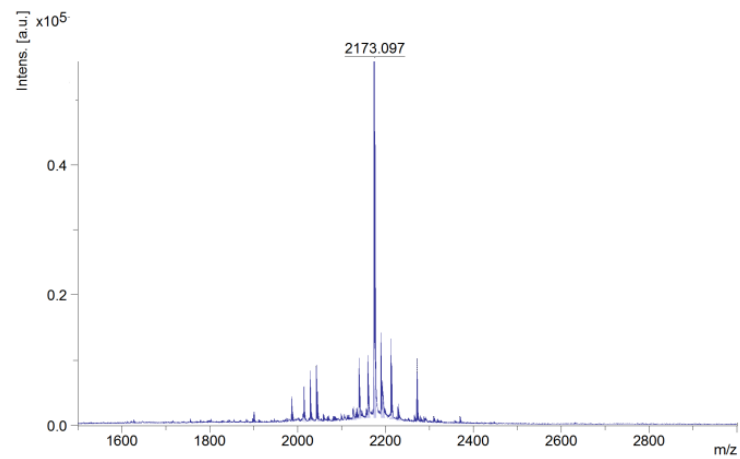
Widmo mas peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-(Arg)₆-O2Oc-NH₂ (M=1603,8 g/mol).



Widmo mas peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)]₄-O1Pen-[Dap(GO1)]₄-O2Oc-NH₂ (M=2599,2 g/mol).



Widmo mas peptydomimetyku 5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)]₄-Pro-[Dap(GO2)]₄-O2Oc-NH₂ (M=2949,1 g/mol).



Widmo mas peptydomimetyku Bt-O₂Oc-[Dap(GO₂)]₆-O₂Oc-NH₂ (M=2174,0 g/mol).

Rysunek 40. Wybrane analizy MS oraz chromatogramy zsyntezowanych związków.

Tabela 19. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych peptydomimetyków.

Nr	Sekwencja	Czas retencji [min]	Masa molekularna obliczona/ wyznaczona
1	O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	2,11	1244,5 / 1254,4
1a	5/6-FAM-O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	9,12 / 9,26	1603,8 / 1604,4
2	O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	2,12	1244,5 / 1245,5
2a	5/6-FAM-O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	8,46 / 8,71	1603,8 / 1604,8
3	O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂	2,45	1329,6 / 1330,4
3a	5/6-FAM-O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂	8,55 / 8,83	1687,9 / 1689,0
4	O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	3,15	1682,8 / 1683,6
4a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	7,89 / 8,13	2042,1 / 2043,0
4b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	8,17 / 8,59	2096,2 / 2096,3
5	O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	2,55	2141,3 / 2142,0
5a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	7,96 / 8,23	2500,6 / 2501,7
5b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	8,32 / 8,55	2554,8 / 2554,9
6	O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂	1,94	853,9 / 854,6
6a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂	10,11/10,41	1213,2 / 1213,5
7	O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂	2,33	1127,2 / 1127,5
7a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂	10,22 / 10,44	1486,5 / 1486,9
8	O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	2,09	1400,5 / 1400,5
8a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	9,78 / 10,01	1759,8 / 1759,8
9	O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂	2,78	1673,8 / 1673,5
9a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂	8,23 / 8,36	2033,1 / 2033,4
10	O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	3,40	1947,1 / 1947,1
10a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,10 / 9,83	2306,4 / 2305,6
10b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,82 / 10,15	2360,6 / 2359,4
11	O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	2,97	2493,7 / 2493,5
11a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	8,2 / 8,8	2852,0 / 2853,7
11b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	8,2 / 8,5	2907,1 / 2908,5
12a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,18 / 9,34	1796,7 / 1795,8
13a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,34 / 9,52	1790,8 / 1790,0
14	O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	3,71	1700,8 / 1701,5
14a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,45 / 9,78	2059,1 / 2060,4
15	O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	3,45	1694,9 / 1696,0
15a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	9,12 / 9,38	2053,2 / 2054,1
16a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	12,16 / 12,38	2599,2 / 2603,1
17a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -Pro-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	12,47 / 12,69	2596,6 / 2596,9
18a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	12,03 / 12,25	2951,4 / 2954,7
19a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -Pro-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	12,69 / 12,93	2949,1 / 2949,0
20a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]	8,5/8,9	2500,6 / 2500,8
21a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]	8,3/8,7	2852,0 / 2852,6
22	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	7,46	2174,0 / 2173,1
23	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	11,77	2720,0 / 2719,3
24	5/6-FAM	11,21	376,3
25	5/6-TAMRA	12,17	431,5

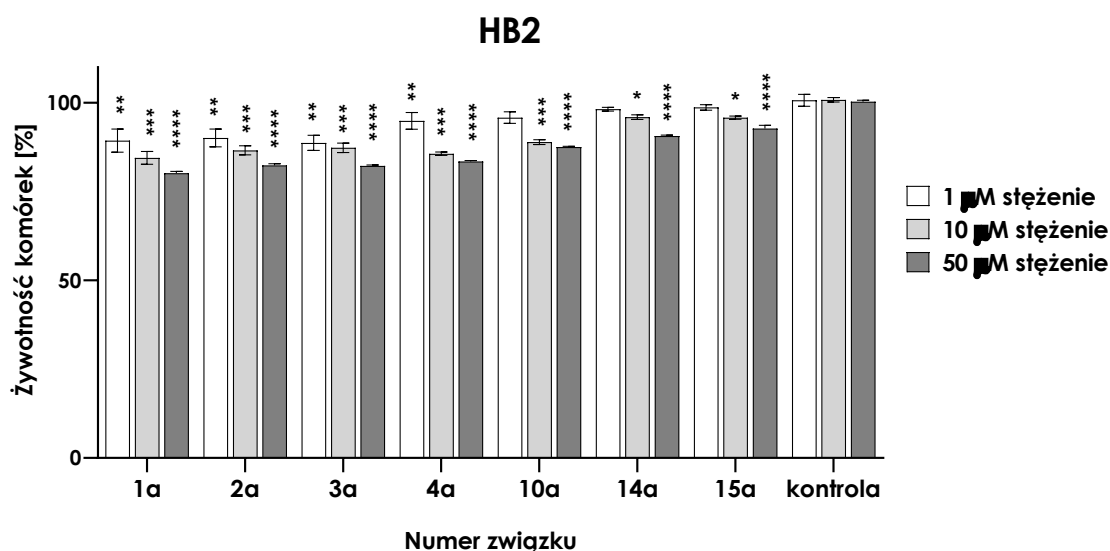
Czas retencji określono za pomocą UPLC przy użyciu chromatografu Nexera X2 LC-30AD, firmy Shimadzu (Japonia), zastosowano metodę: 3 – 50 % B w czasie 20 minut.

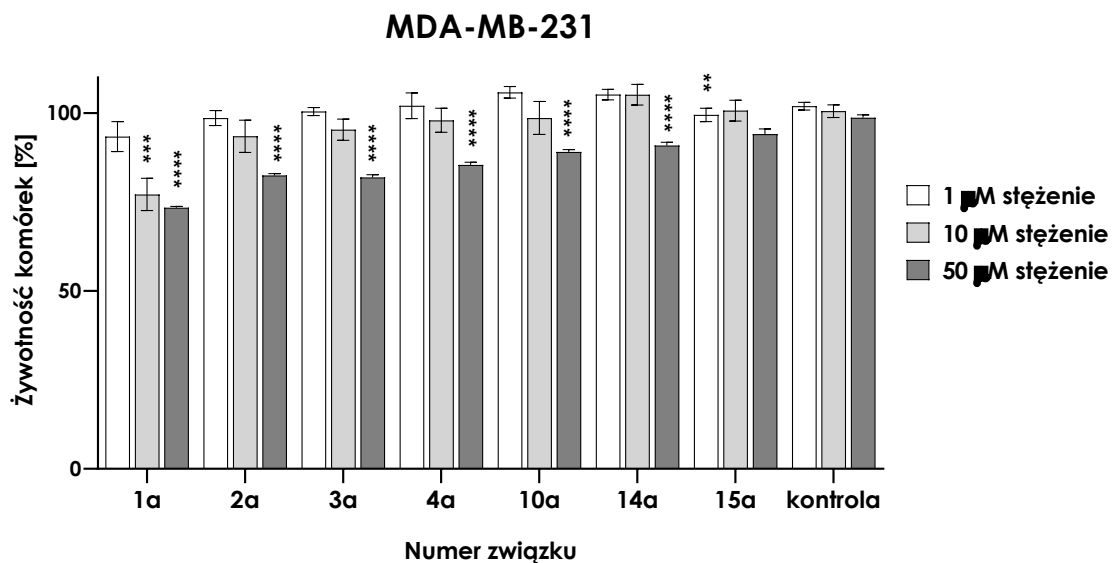
Rejestracja dwóch czasów retencji dla fluorescencyjnych związków związana jest z występowaniem użytych podczas syntezy fluoroforów w formie mieszaniny izomerów 5/6.

2. Wyniki otrzymane z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2 i MDA-MB-231

2.1. Cytotoksyczność peptydomimetyków względem linii komórkowych piersi HB2 oraz MDA-MB-231

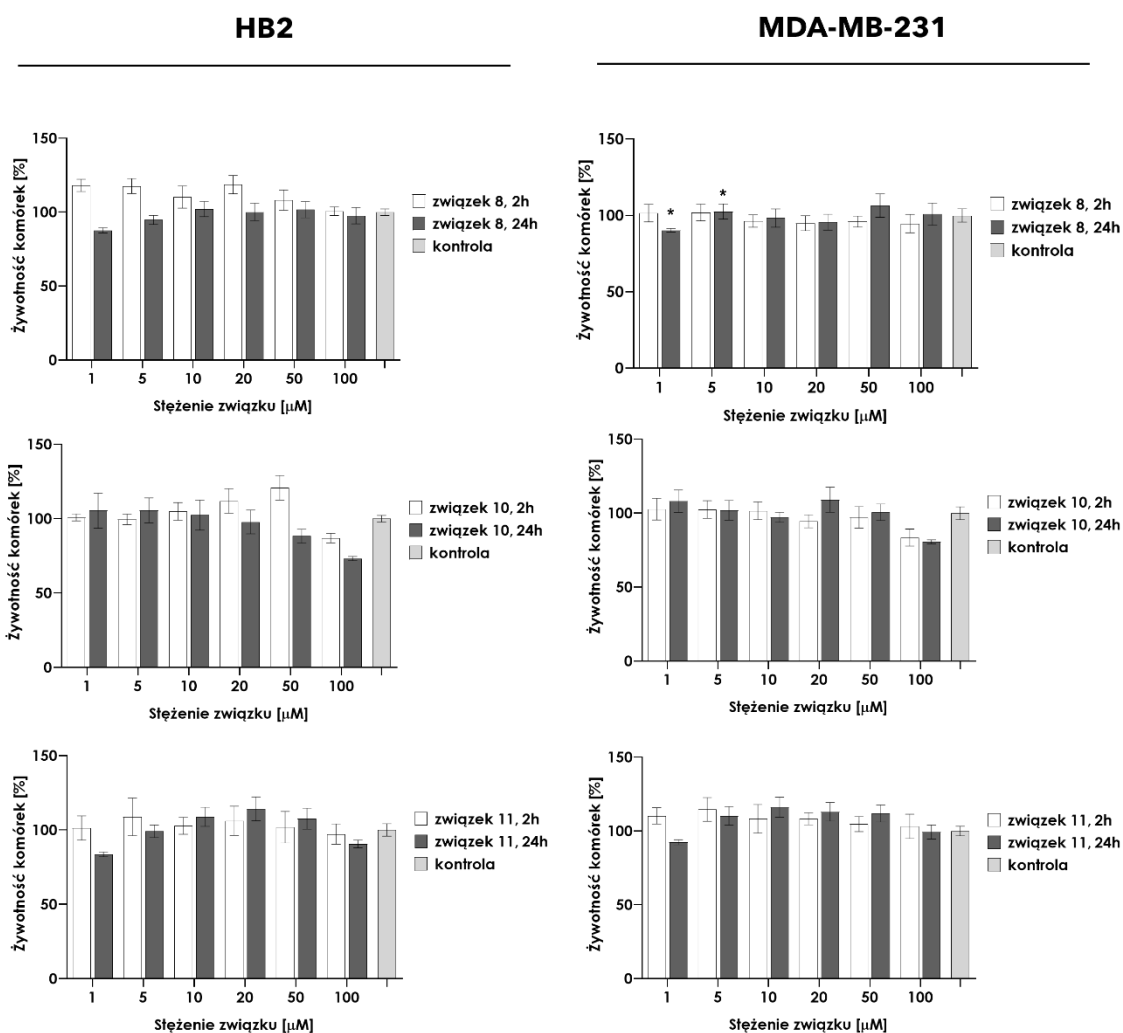
W pierwszym etapie badań biologicznych zsyntezowane peptydomimetyki poddałam testom oceniającym cytotoksyczność wobec linii komórkowych piersi HB2 oraz MDA-MB-231. Związki **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **10a**, **14a** oraz **15a** inkubowałam przez 24 godziny w następujących stężeniach: 1 μ M, 10 μ M i 50 μ M. Następnie wykonałam test cytotoksyczności MTT, którego wyniki zamieściłam na rysunku 41. Wskazują one na to, iż większość analizowanych związków nie wykazywała cytotoksyczności w stężeniu stosowanym podczas badań biologicznych ($c = 10 \mu$ M). Jedynie związki 1a, 2a i 3a wykazywały niewielką cytotoksyczność względem komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 w porównaniu do kontroli [160].





Rysunek 41. Cytotoksyczność związków wobec linii HB2 oraz MDA-MB-231 oceniana na podstawie wyników testu MTT (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$) [160].

Dodatkowo, wybrane peptydomimetyki (**8**, **10** i **11**) poddałam testowi oceny cytotoksyczności CCK8. Związki o stężeniu 1, 5, 10, 20, 50 oraz 100 μ M inkubowałam przez 2 lub 24 godziny z liniami komórkowymi HB2 i MDA-MB-231. Otrzymane wyniki zamieściłam na rysunku 42. Na podstawie poniższych wykresów stwierdzić można, iż peptydomimetyki **8**, **10** oraz **11** nie wykazują znaczącej cytotoksyczności zarówno podczas 2-godzinnej jak i 24-godzinnej inkubacji [160].

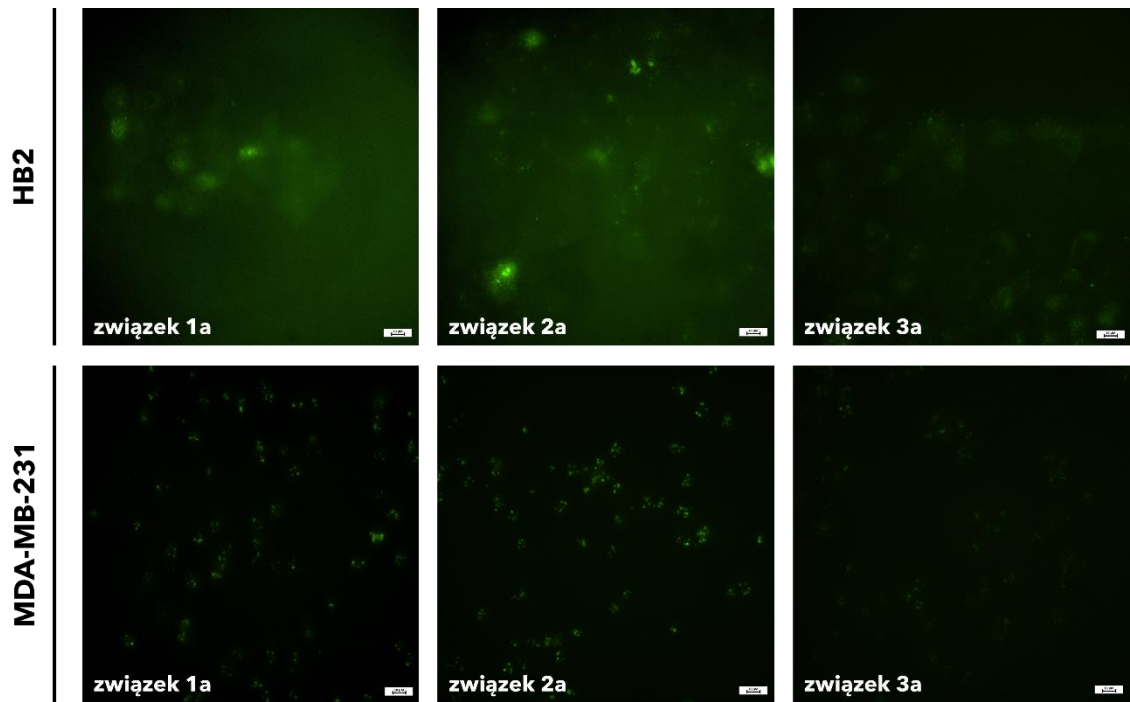


Rysunek 42. Cytotoksyczność związków **8**, **10** i **11** wobec linii HB2 oraz MDA-MB-231 podczas 2-godzinnej i 24-godzinnej inkubacji, oceniana na podstawie wyników testu CCK8 (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 7$) [160].

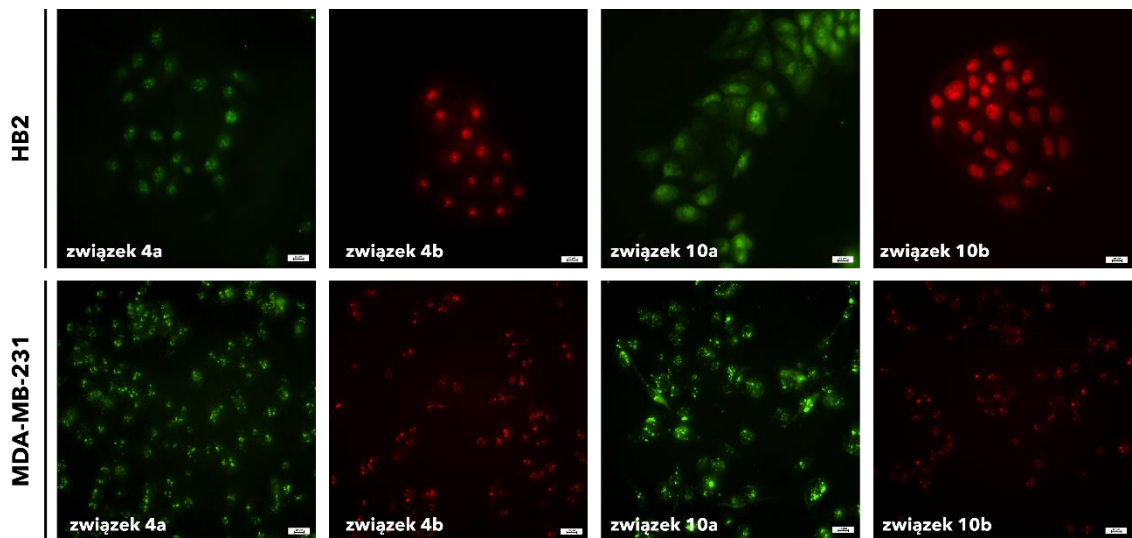
2.2. Zdolności przenikania przez błonę komórkową zsyntezowanych peptydomimetyków

W pierwszym etapie badań biologicznych postanowiłam sprawdzić, które z zsyntezowanych peptydomimetyków (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **10a**, **10b**, **14a** oraz **15a**) posiadają zdolność do przenikania przez błony komórkowe linii HB2 oraz MDA-MB-231. Inkubację prowadziłam przez 24 godziny. Analogiczne doświadczenie wykonałam również z samymi znacznikami fluorescencyjnymi, występującymi w sekwencji peptydomimetyków. W przypadku inkubacji linii komórkowych w obecności samych fluoroforów nie obserwowałam zjawiska fluorescencji [160].

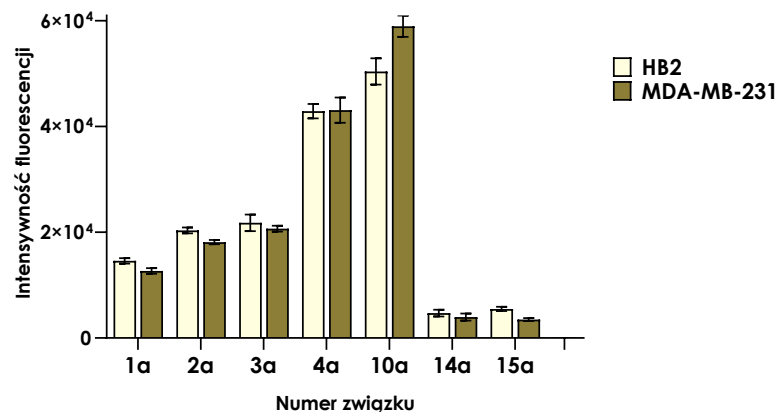
Komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowałam ze związkami: **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **10a** oraz **10b** przez 24 godziny. W oparciu o wyniki wykonanych testów dotyczących cytotoxyczności peptydomimetyków wobec badanych linii komórkowych, stężenie końcowe analizowanych związków podczas inkubacji wynosiło 10 μ M. W kolejnym etapie przeprowadzone zostały eksperymenty z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX51. Wszystkie zdjęcia zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej wykonane zostały przez dr hab. Agnieszkę Piwkowską, prof. IMDiK. Na podstawie otrzymanych zdjęć podzieliłam związki na trzy grupy (rys. 43, 44). Pierwsza z nich obejmuje związki, które zawierają w swojej sekwencji 6 reszt argininy lub jej pochodnych (**1a**, **2a**, **3a**) oraz wnikają do wnętrza komórek lokalizując się głównie w cytoplazmie w postaci ziarnistości. Do drugiej grupy zaliczają się peptydomimetyki zbudowane z sześciu reszt Dap zawierających łańcuchy boczne o różnej długości zakończone ugrupowaniami guanidynowymi (**4a**, **10a**, **10b**). Związki te wyróżniają się nie tylko zdolnością do przenikania przez błonę komórkową, ale także są w stanie penetrować otoczkę jądrową lokalizując się wewnątrz jądra. Zjawisko to wynikać może z efektywnego naśladowania sekwencji aminokwasowej, która przyłączana do białka kieruje je na drodze transportu jądrowego do wnętrza jądra (ang. *nuclear localization signal or sequence*, NLS). Związek **10** najefektywniej penetruje błonę komórkową, przyczynia się do tego najprawdopodobniej długość łańcucha bocznego cząsteczek polimeru. Trzecia grupa związków (**14a**, **15a**), ze względu na zamianę grup guanidynowych na grupy hydroksylowe i aminowe nie posiada zdolności do wnikania do wnętrza komórek. Ze względu na obserwowany zanik fluorescencji 5/6-FAM, zdecydowałam się również na syntezę kluczowych związków znakowanych na *N*-końcu 5/6-TAMRĄ (**4b**, **5b**).



Rysunek 43. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami 1a, 2a oraz 3a [160].



Rysunek 44. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami 4a, 4b oraz 10a, 10b [160].



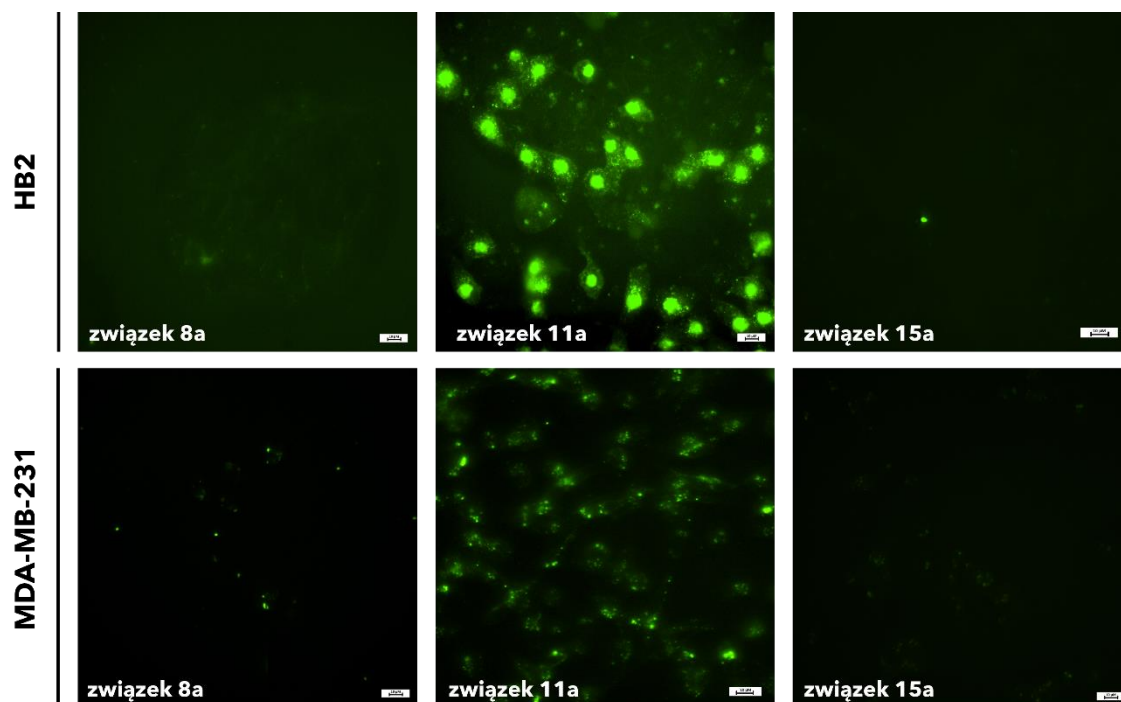
Rysunek 45. Wykres intensywność fluorescencji 5/6-FAM w lizatach komórkowych linii HB2 oraz MDA-MB-231 [160].

Wyniki uzyskane podczas obserwacji mikroskopowych potwierdziłam wykonując pomiar intensywności fluorescencji 5/6-FAM. Komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 po 24-godzinnej inkubacji ze związkami **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **10a**, **14a** i **15a** poddałam lizie komórkowej. W przypadku obu badanych linii najwyższą intensywnością fluorescencji charakteryzują się lizaty komórek inkubowanych z peptydomimetykiem numer **10a**, najniższą zaś ze związkiem **14a** oraz **15a** (rys. 45) [160].

Następnie postanowiłam sprawdzić, jak na efektywne wnikanie do wnętrza komórek wpływa zmiana długości łańcucha głównego związku (ilość ugrupowań guanidynowych) oraz jego charakteru chemicznego. W tym celu wykonałam syntezy peptydomimetyków **6a** – **13a**. W przypadku analogów związku **10a** zawierających 2 i 3 ugrupowania guanidynowe w sekwencji (**6a**, **7a**) po 24-godzinnej inkubacji z komórkami linii HB2 oraz MDA-MB-231 nie zaobserwowałam obecności peptydomimetyków w ich wnętrzu. Znikome zdolności do penetracji błon biologicznych wykazywały związki nr **8a** oraz **9a**, natomiast **11a** wnikał do wnętrza komórek w zbliżonym stopniu lub nawet efektywniej niż jego odpowiednik z sześcioma modyfikowanymi resztami kwasu Dap (**10a**) (rys. 46) [160].

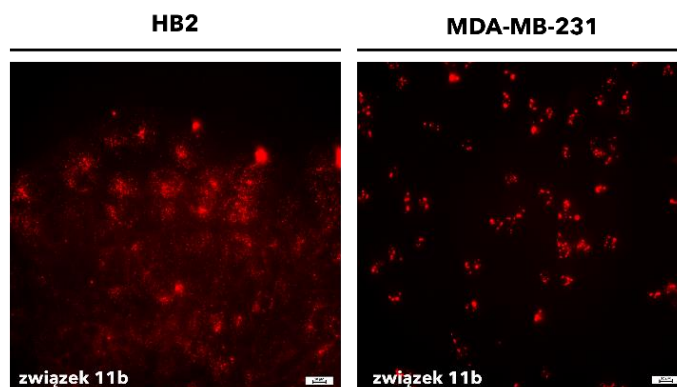
Zamiana wszystkich sześciu ugrupowań guanidynowych w peptydomimetyku na grupy aminowe (-NH₂) w związku zawierającym krótsze łańcuchy boczne cząsteczek polimeru (**13a**) skutkowało znacznym zmniejszeniem zdolności przenikania przez błony komórkowe w porównaniu z jego strukturą wiodącą. Natomiast zastąpienie tych grup

hydroksylowymi (**12a**) powodowało całkowity zanik właściwości penetrujących (rys. 46) [160].



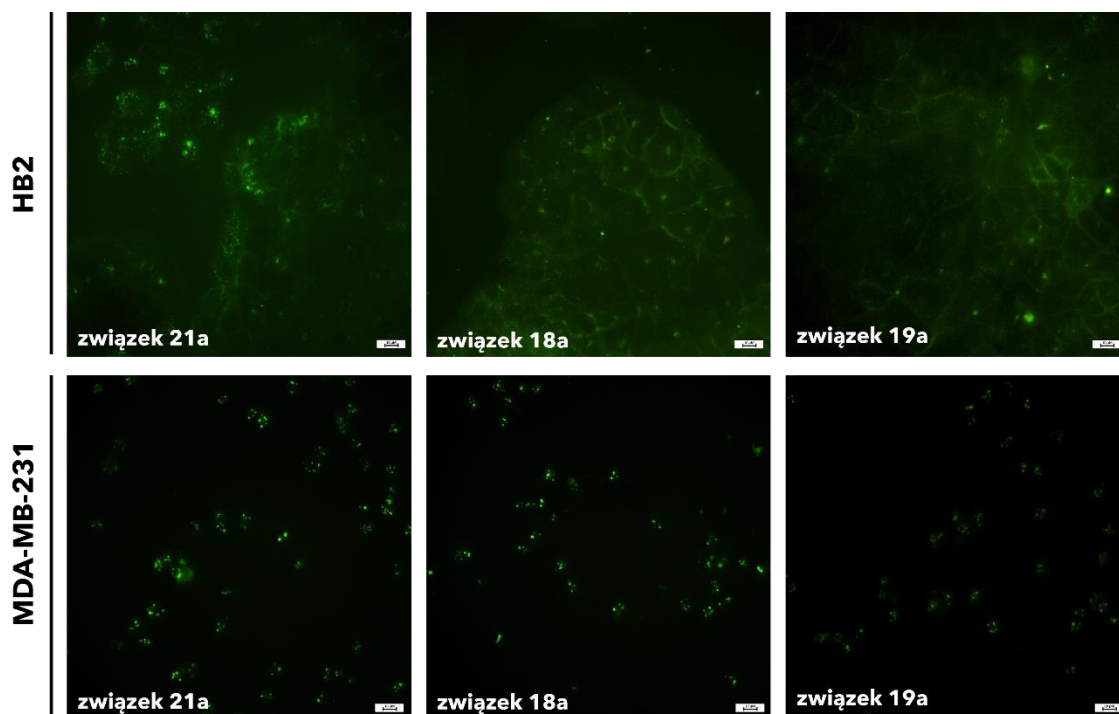
Rysunek 46. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami **8a**, **11a** oraz **15a** [160].

Analizując wyniki przenikania związku **11a** przez błonę komórkową w ciągu 24 godzin, postanowiłam skrócić czas inkubacji z liniami komórkowymi do 2 godzin. W tym celu użyłam analog **11b**. Zdjęcia mikroskopowe przedstawione na rysunku 47 dowodzą, że peptydomimetyk nawet po tak krótkim czasie jest w stanie penetrować błony cytoplazmatyczne i lokalizować się wewnątrz komórek.



Rysunek 47. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 2 godzin ze związkiem **11b**.

W kolejnym etapie postanowiłam sprawdzić, czy zmiana konfiguracji kwasu Dap z L na D wpływa na zdolności penetrujące związku zawierającego 8 ugrupowań guanidynowych (**20a** i **21a**). Wykonałam również syntezę związków nr **16a** - **19a**, które są analogami związków **5a**, **11a** i w pozycji 7 sekwencji zawierają resztę Pro lub O1Pen. Ta modyfikacja powoduje zmianę ułożenia peptydomimetyków w przestrzeni, co może także wpływać na ich właściwości penetrujące błony biologiczne. Związki nr **16a** – **21a** poddałam 24-godzinnej inkubacji z komórkami linii HB2 oraz MDA-MB-231. Nie zaobserwowałam różnic w efektywności przenikania przez membrany biologiczne peptydomimetyków różniących się tylko długością łańcuchów bocznych (np. **16a** i **18a**). W przypadku związku **20a** oraz **21a** zmiana konfiguracji kwasu Dap z L na D nie ma znaczącego wpływu na ich wychwyty przez komórkę. Natomiast dodatek zarówno reszty Pro, jak i O1Pen sprawiał, iż związki te wnikają do wnętrza komórek nowotworowych, jakimi są MDA-MB-231, zaś penetrując membrany komórek zdrowych – linii HB2 – lokalizują się głównie w pobliżu błony cytoplazmatycznej. Rysunek 48 przedstawia zdjęcia mikroskopowe wybranych związków **16a** – **21a** po inkubacji z liniami komórkowymi.



Rysunek 48. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane przez 24 godziny ze związkami **21a**, **18a** oraz **19a**.

W tabeli 20 podsumowałam zdolność wnikania poszczególnych peptydomimetyków do komórek piersi linii – zdrowej (HB2) oraz nowotworowej (MDA-Mb-231).

Tabela 20. Zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne peptydomimetyków oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja określona na podstawie badań z udziałem linii HB2 i MDA-MB-231.

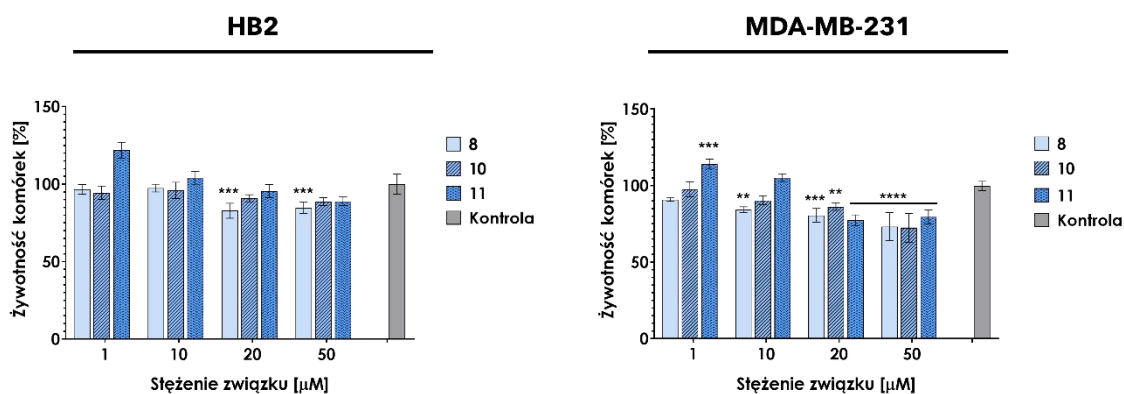
Nr	Sekwencja	Penetracja błon (lokalizacja)
1	O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
1a	5/6-FAM-O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	++ cytoplazma
2	O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
2a	5/6-FAM-O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	++ cytoplazma
3	O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
3a	5/6-FAM-O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂	++ cytoplazma
4	O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
4a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	++ jądro
4b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	++jądro
5	O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	bd
5a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
5b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
6	O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂	bd
6a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂	-
7	O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂	bd
7a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₃ -O2Oc-NH ₂	-
8	O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	bd
8a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	++ cytoplazma
9	O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂	bd
9a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₅ -O2Oc-NH ₂	++ cytoplazma
10	O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
10a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
10b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
11	O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	bd
11a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
11b	5/6-TAMRA-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	+++ jądro
12a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	-
13a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	+ cytoplazma
14	O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
14a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	-
15	O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
15a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	-

16a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	++ błonowo
17a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -Pro-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	++ błonowo
18a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	++ błonowo
19a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -Pro-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	++ błonowo
20a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]	++ jądro
21a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂ [#]	++ jądro
22	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	bd
23	Bt-O2Oc-[Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	bd
24	5/6-FAM	-
25	5/6-TAMRA	-

bd – brak danych

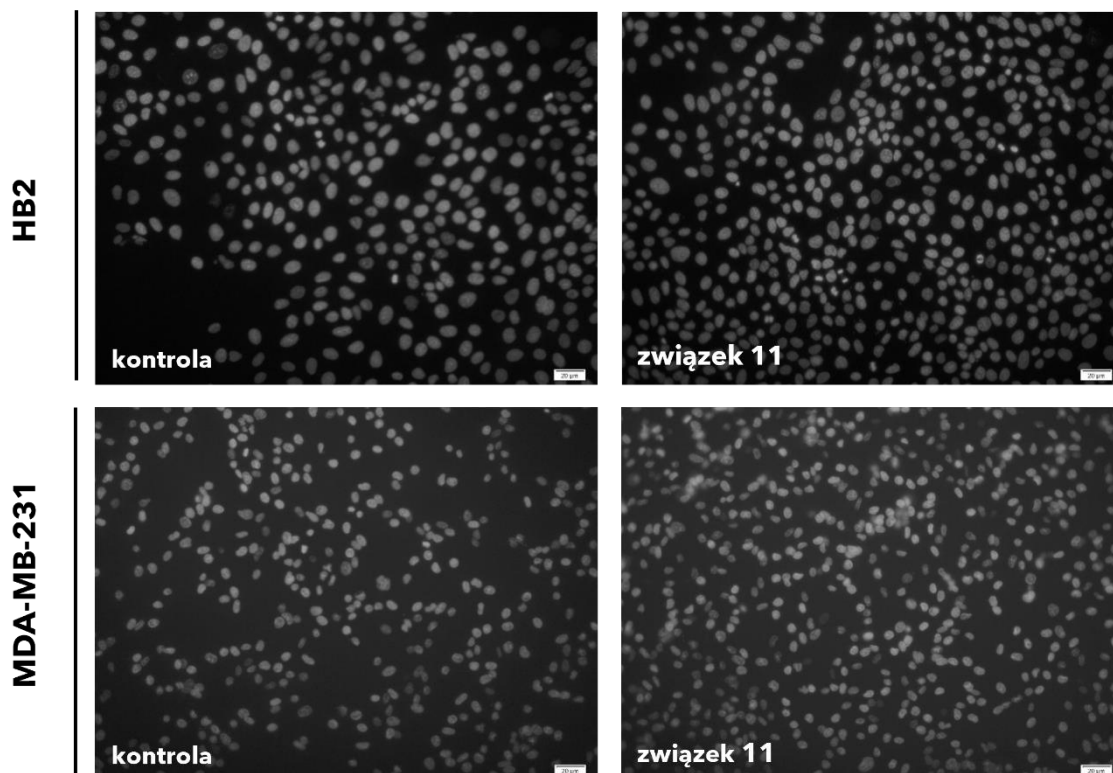
2.3. Wpływ peptydomimetyków na proliferację komórek linii HB2 i MDA-MB-231

Następnie postanowiłam przeprowadzić test oceny proliferacji komórek pod wpływem zsyntezowanych związków. Wyniki otrzymane z przeprowadzonych testów MTT oraz CCK8 dowodzą, iż inkubacja komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 z peptydomimetykami **8**, **10** i **11**, w stężeniach od 1 μ M do 100 μ M nie powoduje znaczącej cytotoksyczności. Zarówno test MTT jak i CCK8 opiera się na ocenie pracy dehydrogenazy mitochondrialnej rozkładającej sól MTT do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. Dlatego też postanowiłam wykonać test oceny proliferacji komórek stosując odczynnik EdU, który jest analogiem nukleozydu tyminy i podczas syntezy nici DNA jest do niej wbudowywany. Wykrywanie związku EdU możliwe jest dzięki katalizowanej miedzią, zachodzącej w odpowiednich warunkach reakcji „klik” pomiędzy azydkiem (zawartym w strukturze FAM), a alkinem (obecny w strukturze EdU). Wykonując test oceny proliferacji, wykorzystałam związki nieznakowane fluorescencyjnie: **8**, **10** i **11**, gdyż obecność fluorofora w sekwencji wpływałaby na uzyskane wyniki. Test przeprowadziłam na liniach komórkowych HB2 oraz MDA-MB-231. Wpływ peptydomimetyków na ich proliferację oceniałam po 24-godzinnej inkubacji. Uzyskane wyniki przedstawiłam za pomocą poniższych wykresów (rys. 49).



Rysunek 49. Test oceny proliferacji z zastosowaniem odczynnika EdU komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny ze związkami 8, 10 i 11 (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 5$).

Analizując powyższe wyniki dotyczące wpływu peptydomimetyków na proliferację komórek mogę stwierdzić, iż w przypadku linii HB2 związek **11** o stężeniu 1 μM powoduje niewielki wzrost namnażania komórek. Związki **8** oraz **10** są w niewielkim stopniu cytotoksyczne, jednak przeżywalność komórek maleje wraz ze wzrostem stężenia związków. Peptydomimetyki w stężeniu 50 μM powodują około 20 % spadek przeżywalności komórek w stosunku do kontroli (rys. 48). Podczas inkubacji komórek linii MDA-MB-231 z peptydomimetykiem **11** o $c = 1 \mu\text{M}$ obserwowałam wzrost proliferacji o około 30 % w porównaniu do kontroli; pozostałe związki nie wykazują cytotoksyczności, nawet przy wyższym stężeniu – 50 μM . Ilość komórek wynosi około 80 % w stosunku do próby kontrolnej. Rysunek 50 przedstawia przykładowe zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego obrazujące wybarwione jądra komórkowe linii HB2 oraz MDA-MB-231 poddanych testowi oceny proliferacji komórek.



Rysunek 50. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego komórek linii HB2 i MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny ze związkiem **11** o stężeniu 1 μM , będące wynikiem testu oceny proliferacji komórek.

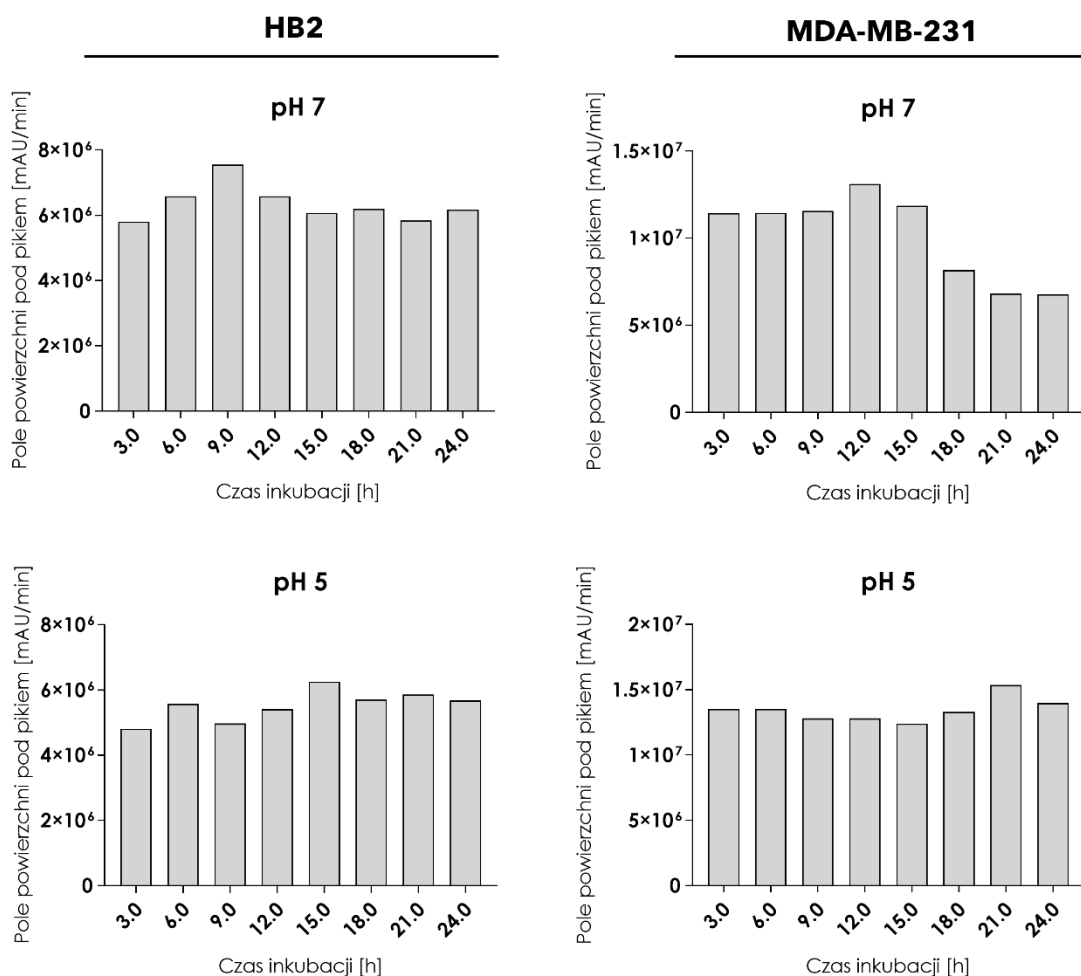
2.4. Stabilność związków 8, 10 oraz 11 w lizatach komórkowych

Ocena stabilności wybranych peptydomimetyków (**8**, **10** i **11**) wykonana została przez mgr Katarzynę Adrych w lizatach komórkowych linii HB2 oraz MDA-MB-231. Analizy wykonano w dwóch różnych środowiskach reakcji: obojętnym – zbliżonym do pH panującego wewnątrz komórki oraz kwaśnym – panującym wewnątrz „późnych” endosomów (ang. *late endosome*) i lizosomów.

W celu potwierdzenia aktywności proteolitycznej uzyskanych lizatów komórkowych zbadano ich wpływ na hydrolizę wiązań peptydowych w sekwencji kazeiny znakowanej fluorescencyjnie (FAM). W trakcie trwania pomiarów wykonywanych za pomocą czytnika płytek FLUOstar Omega zarówno w obojętnym, jak i kwaśnym środowisku zaobserwowano ciągły przyrost fluorescencji. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem, iż stosowane do badań lizaty zawierały enzymy aktywne proteolitycznie.

Inkubację związków (**8**, **10** i **11**) z lizatami komórek HB2 oraz MDA-MB-231 prowadzono przez 24 godziny w odpowiednim buforze, pobierając próbki do analiz co godzinę. Lizaty analizowane były za pomocą UPLC z zastosowaniem metody 3 – 50 % B w czasie 25 minut przy przepływie 0,3 ml/min. Wyniki otrzymane z powyższych analiz potwierdziły zbliżoną stabilność związków **8**, **10** i **11**. Rysunek 51 przedstawia stabilność peptydomimetyku numer **10**. Słupki zaprezentowane na poniższych wykresach przedstawiają pole powierzchni pod pikiem otrzymane w wyniku analiz UPLC.

Analiza poniższych danych wskazuje, że związek nr **10** jest stabilny w lizatach komórek HB2 przez co najmniej 24 godziny zarówno w środowisku obojętnym, jak i kwaśnym. Peptydomimetyk **10** inkubowany z lizatem komórkowym linii MDA-MB-231 w buforze o pH 7 wykazuje stabilność przez około 14 h. W przypadku inkubacji w buforze o pH 5 pozostaje stabilny przez co najmniej 24h.

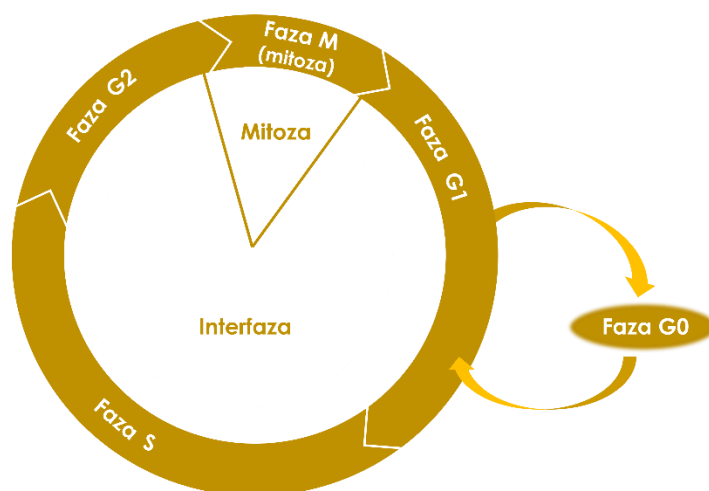


Rysunek 51. Wykresy przedstawiające stabilność związku numer 10 w lisztach komórkowych: HB2 oraz MDA-MB-231 w środowisku obojętnym oraz w kwasowym.

2.5. Wpływ peptydomimetyków na przebieg cyklu komórkowego komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231

Cykl komórkowy jest serią uporządkowanych procesów życiowych prowadzących do powstania dwóch komórek potomnych na skutek podziału komórki. Wyróżnia się w nim dwie główne fazy: interfazę, która jest przygotowaniem do podziału oraz mitozę czyli etap kończący się podziałem. Interfaza dzieli się dodatkowo na 4 stadia: G1 – moment wzrostu komórki, S – proces replikacji DNA, G2 – synteza białek biorących udział w podziale oraz G0 – czyli etap spoczynku. Każde zaburzenie przebiegu cyklu komórkowego może doprowadzić do zmian w funkcjonowaniu komórki (rys. 52) [161], [162].

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu peptydomimetyków **8a**, **10a** i **11a** na cykl komórkowy linii HB2 oraz MDA-MB-231. W pierwszym etapie badań określiłam optymalne warunki wykonywania eksperymentu, zsyntezowane związki inkubowałam z wyżej opisanymi liniami przez 24 godziny na płytkach 6 – dołkowych, gdzie stężenie końcowe użytego peptydomimetyku wynosiło 10 μ M. Następnie w ramach współpracy z dr Magdaleną Zdrowowicz – Żamojć wykorzystałam technikę cytometrii przepływowej do oceny intensywności fluorescencji badanych komórek. Metoda ta rejestrując światło rozproszone analizuje jakościowo oraz ilościowo właściwości fizykobiologiczne komórek, zaś wykorzystanie zestawu GUAWA umożliwia określenie rozkładu faz cyklu komórkowego w populacji komórek. Dodatkowo, jako próba kontrolna, zostały wykorzystane inhibitory powodujące zablokowanie komórek w danej fazie cyklu komórkowego. Zastosowanie afidikoliny wywołuje zatrzymanie komórek na granicy faz G1/S, zaś paklitaxel utrzymuje je na etapie G2/M [163], [164].



Rysunek 52. Fazy cyklu komórkowego.
Rysunek wykonany na podstawie [165].

Otrzymane wyniki świadczą o tym, iż peptydomimetyki nr **8a**, **10a** i **11a** nie wpływają znacząco na zmiany w funkcjonowaniu cyklu komórkowego obu badanych linii, o czym świadczą poniższe tabele obrazujące rozkład jego faz w zależności od użytego związku (tab. 21, 22). Zastosowanie inhibitorów udowodniło, iż eksperyment został wykonany poprawnie. Liczba komórek będących w określonej fazie cyklu

w próbkach inkubowanych ze związkami nie różni się istotnie od próby kontrolnej, w której obecne są same komórki. Wykorzystanie cytometrii przepływowej potwierdziło, iż peptydomimetyki nie wpływają znacząco na prawidłową pracę komórki, dlatego mogłam je wykorzystać jako transportery związków biologicznie czynnych.

Tabela 21. Porównanie ilości komórek w danych fazach cyklu komórkowego po 24-godzinnej inkubacji komórek linii HB2 z badanymi związkami.

Badana próbka	Ilość komórek w fazie G0/G1 [%]	Ilość komórek w fazie S [%]	Ilość komórek w fazie G2/M [%]
Kontrola	56,88	10,13	29,36
Związek 8a	56,08	11,08 (*)	30,38
Związek 10a	56,54	9,5	29,32
Związek 11a	60,53 (**)	12,56	27,31
Paklitaksel	44,6 (****)	10,27	37,7 (***)
Afidikolina	70,37 (****)	11,82	16,52 (****)

Tabela 22. Porównanie ilości komórek w danych fazach cyklu komórkowego po 24-godzinnej inkubacji komórek linii MDA-MB-231 z badanymi związkami.

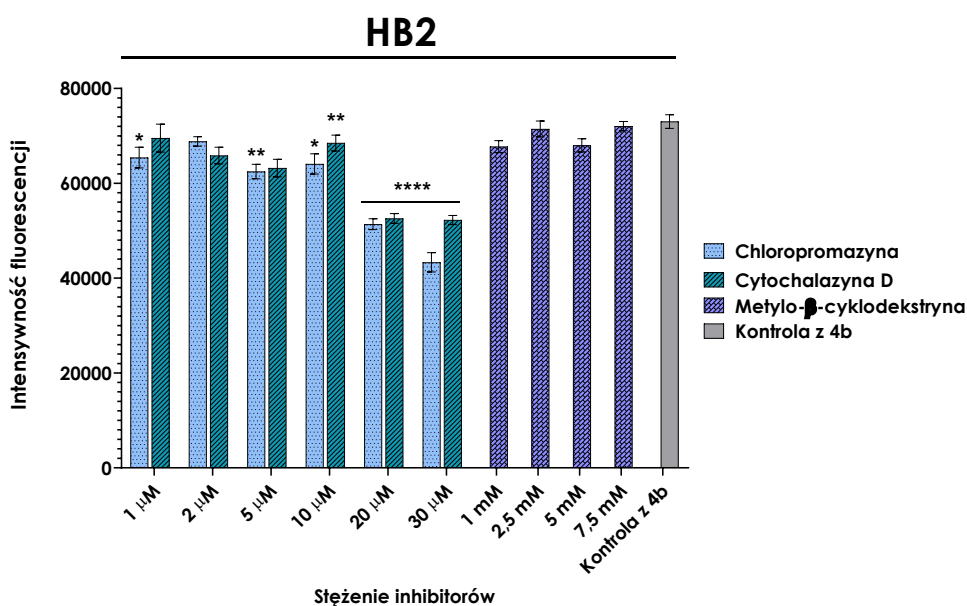
Badana próba	Ilość komórek w fazie G0/G1 [%]	Ilość komórek w fazie S [%]	Ilość komórek w fazie G2/M [%]
Kontrola	67,33	13,93	20,35
Związek 8a	67,25	13,85	20,83
Związek 10a	68,77	12,54	19,95
Związek 11a	69,08	13,33	19,30
Paklitaksel	39,96 (****)	18,33	41,17 (****)
Afidikolina	74,72	13,65	13,50 (*)

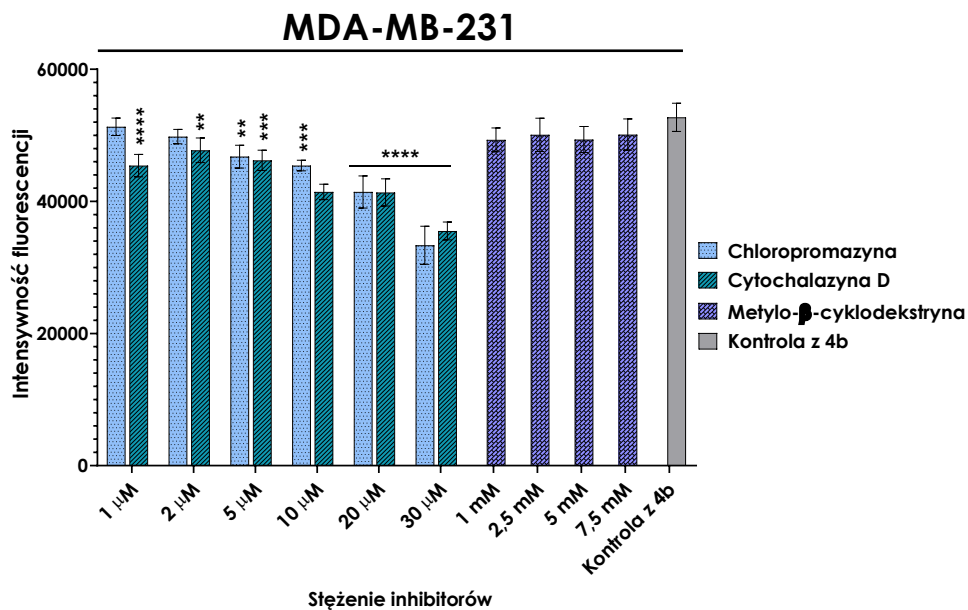
Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 2$).

2.6. Mechanizmy wykorzystywane podczas przenikania związków przez błony biologiczne – zastosowanie inhibitorów endocytozy

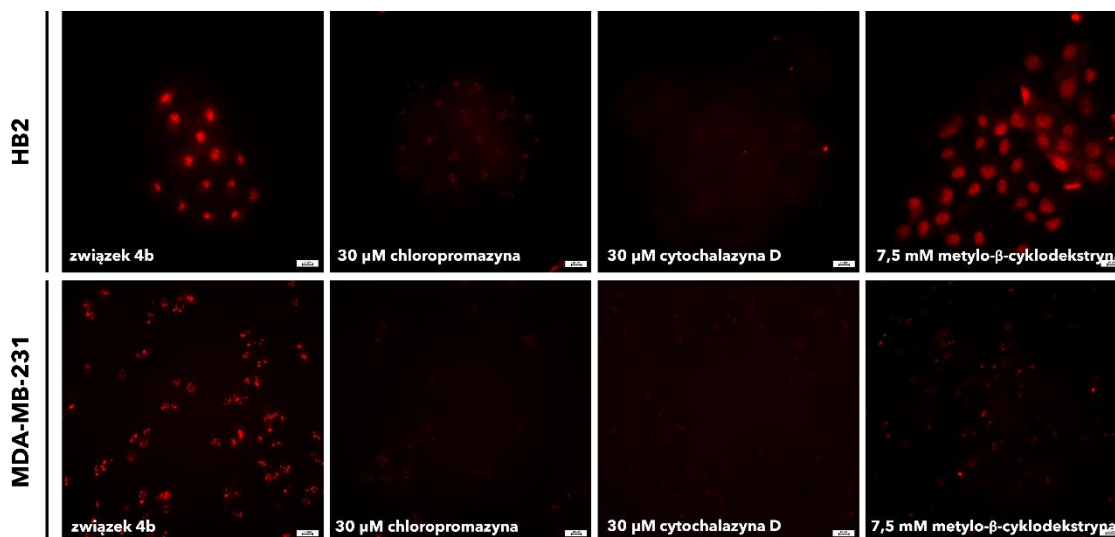
W kolejnym etapie badań podjęłam próbę określenia sposobu przenikania do wnętrza komórki badanych związków. Dwugodzinna inkubacja komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 ze związkiem **4b** w 4° C skutkuje prawie całkowitym zahamowaniem

zdolności penetrujących peptydomimetyku wobec błony cytoplazmatycznej. Powodem tego może być fakt, iż związek wnikając do wnętrza komórki wykorzystuje mechanizm endocytotyczny, który jest znacznie ograniczony w niskiej temperaturze. W następnym etapie sprawdziłam, który rodzaj transportu zależnego od energii uczestniczy w przenikaniu peptydomimetyku **4b** przez błony biologiczne. W tym celu zastosowałam 3 związki zdolne do hamowania różnych mechanizmów endocytozy: cytochalazynę D – hamującą makropinocytozę, chloropromazynę – będącą inhibitorem endocytozy klatryno – zależnej oraz metylo- β -cyklodekstrynę blokującą endocytozę kaweolo – zależną [166], [167]. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego oraz pomiar intensywności fluorescencji peptydomimetyku numer **4b** w lizatach komórkowych linii HB2 i MDA-MB-231 dowodzą, iż zarówno cytochalazyna D jak i chloropromazyna ($c = 30 \mu\text{M}$) ograniczają wnikanie związku do wnętrza komórek (rys. 53, 54). Nie zaobserwowałam natomiast znaczącego zahamowania stopnia penetracji błon biologicznych przez związek **4b** w obecności inhibitora, jakim jest metylo- β -cyklodekstryna. Analiza otrzymanych danych sugeruje, że transport peptydomimetyków odbywa się w oparciu o mechanizm mieszany (makropinocytozy oraz endocytozy zależnej od klatryn) [160].





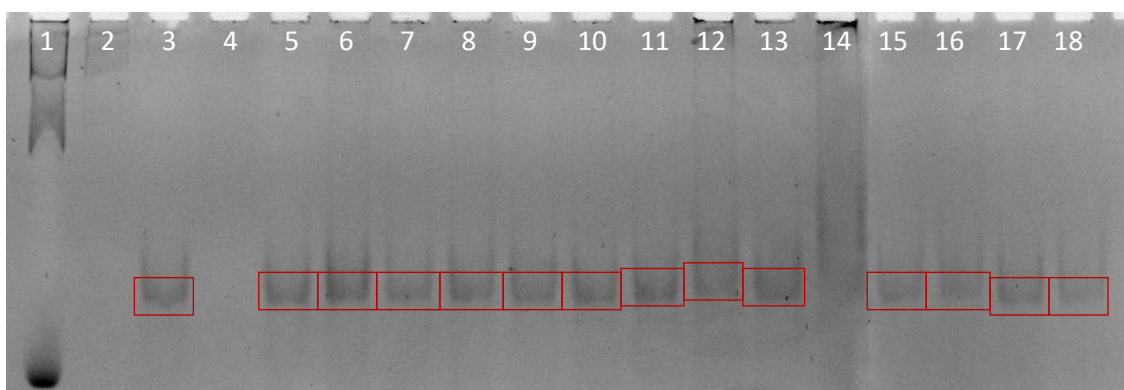
Rysunek 53. Wykresy intensywności fluorescencji pochodzącej od związku 4b w lizatach komórkowych (linia HB2 oraz MDA-MB-231) zawierających dodatek określonych inhibitorów (średnia ± SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń n = 7) [160].



Rysunek 54. Zdjęcia uzyskane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego linii: HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowanych z peptydomimetykiem **4b** oraz z dodatkiem inhibitorów: cytochalazyna D (c = 30 μM), chromopromazyna (c = 30 μM), metylo-β-cyklodekstryna (c = 7,5 mM) [160].

3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym dla kompleksów utworzonych z DNA

Ze względu na obecność w cząsteczce peptydomimetyku licznych ugrupowań guanidynowych, postanowiłam sprawdzić ich powinowactwo do ujemnie naładowanych kwasów nukleinowych. W tym celu wykorzystałam krótki fragment dsDNA składający się z 76 par zasad, zawierający sekwencję beta-aktyny (*Homo sapiens*) oraz peptydomimetyki nieznakowane fluorescencyjnie o numerach **1, 2, 3, 4, 10, 14** i **15**, które po utworzeniu kompleksów poddałam analizie elektroforetycznej. Otrzymane wyniki przedstawiłam na rysunku 55. Oznaczenie N/P określane jest jako stosunek ładunków dodatnich pochodzących od grup guanidynowych lub aminowych peptydomimetyków (N) do ujemnie naładowanych reszt fosforanowych zawartych w kwasach nukleinowych (P).



Rysunek 55. Elektroforegram obrazujący powinowactwo peptydomimetyków do dsDNA. Kolejne ścieżki przedstawiają: **1.** marker DNA; **2.** –; **3.** dsDNA; **4.** –; **5.** dsDNA : związek 1 (N/P – 0,2 : 1); **6.** dsDNA : związek 1 (N/P – 1,5 : 1); **7.** dsDNA : związek 2 (N/P – 0,2 : 1); **8.** dsDNA : związek 2 (N/P – 1,5 : 1); **9.** dsDNA : związek 3 (N/P – 0,2 : 1); **10.** dsDNA : związek 3 (N/P – 1,5 : 1); **11.** dsDNA : związek 4 (N/P – 0,2 : 1); **12.** dsDNA : związek 4 (N/P – 1,5 : 1); **13.** dsDNA : związek 10 (N/P – 0,2 : 1); **14.** dsDNA : związek 10 (N/P – 1,5 : 1); **15.** dsDNA : związek 15 (N/P – 0,2 : 1); **16.** dsDNA : związek 15 (N/P – 1,5 : 1); **17.** dsDNA : związek 14 (N/P – 0,2 : 1); **18.** dsDNA : związek 14 (N/P – 1,5 : 1) [160].

Zaobserwowałam niewielkie różnice w ruchliwości elektroforetycznej związków inkubowanych z dsDNA względem samego dsDNA świadczące o utworzeniu oddziaływań między badanymi peptydomimetykami, a kwasem nukleinowym. Dotyczy to związków **2, 3, 4** oraz **14** przy N/P równym 1,5 : 1 (ścieżki odpowiednio 6, 8 i 9), a przesunięcie to widoczne jest bardziej wobec peptydomimetyku numer **15** inkubowanego z dsDNA w stosunku N/P = 1,5 : 1. Znaczne opóźnienia w rozdziale elektroforetycznym w porównaniu do próbki kontrolnej zaobserwować można

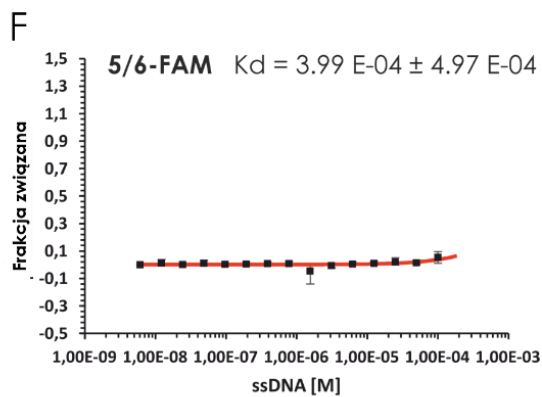
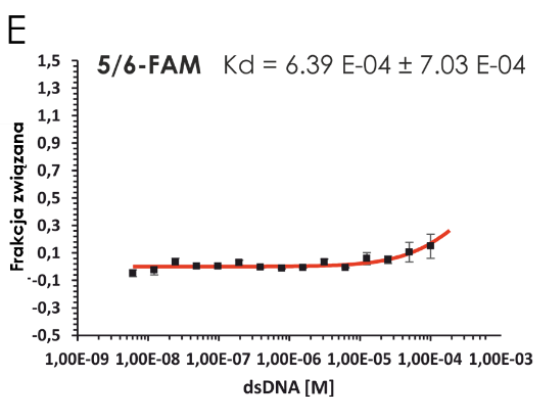
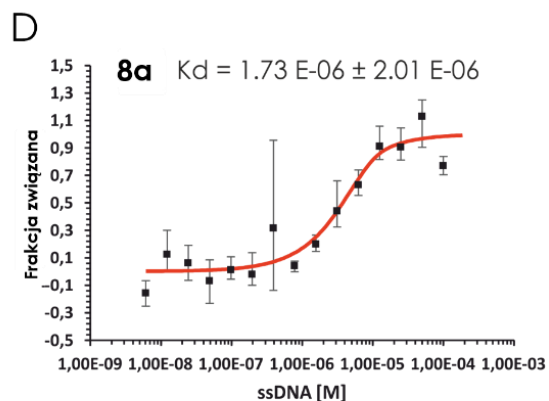
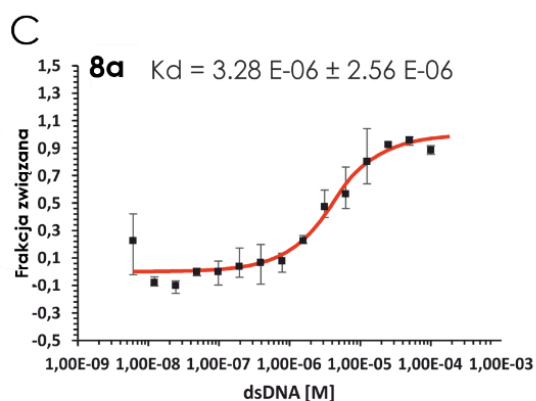
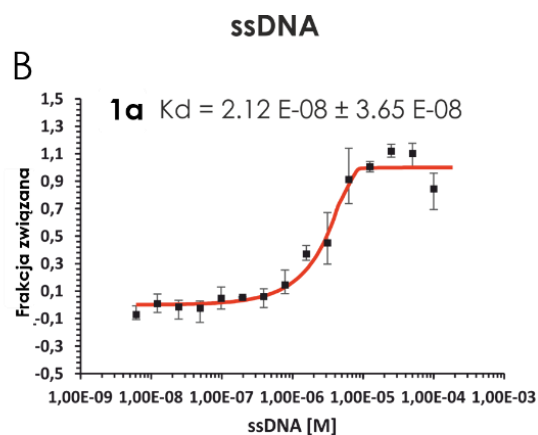
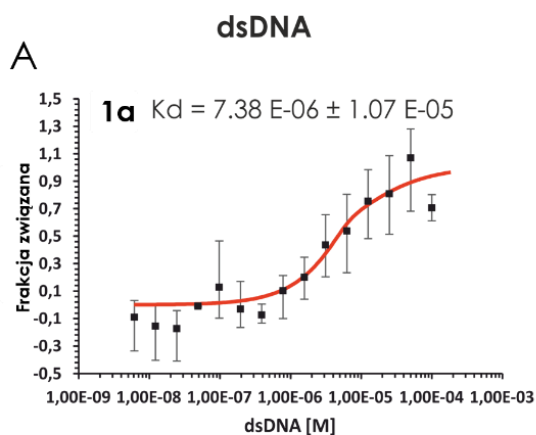
w ścieżce 12 i 14, które odpowiadają kompleksom powstałym przez związki **4** oraz **10** przy stosunku ładunków równym 1,5 : 1 [160].

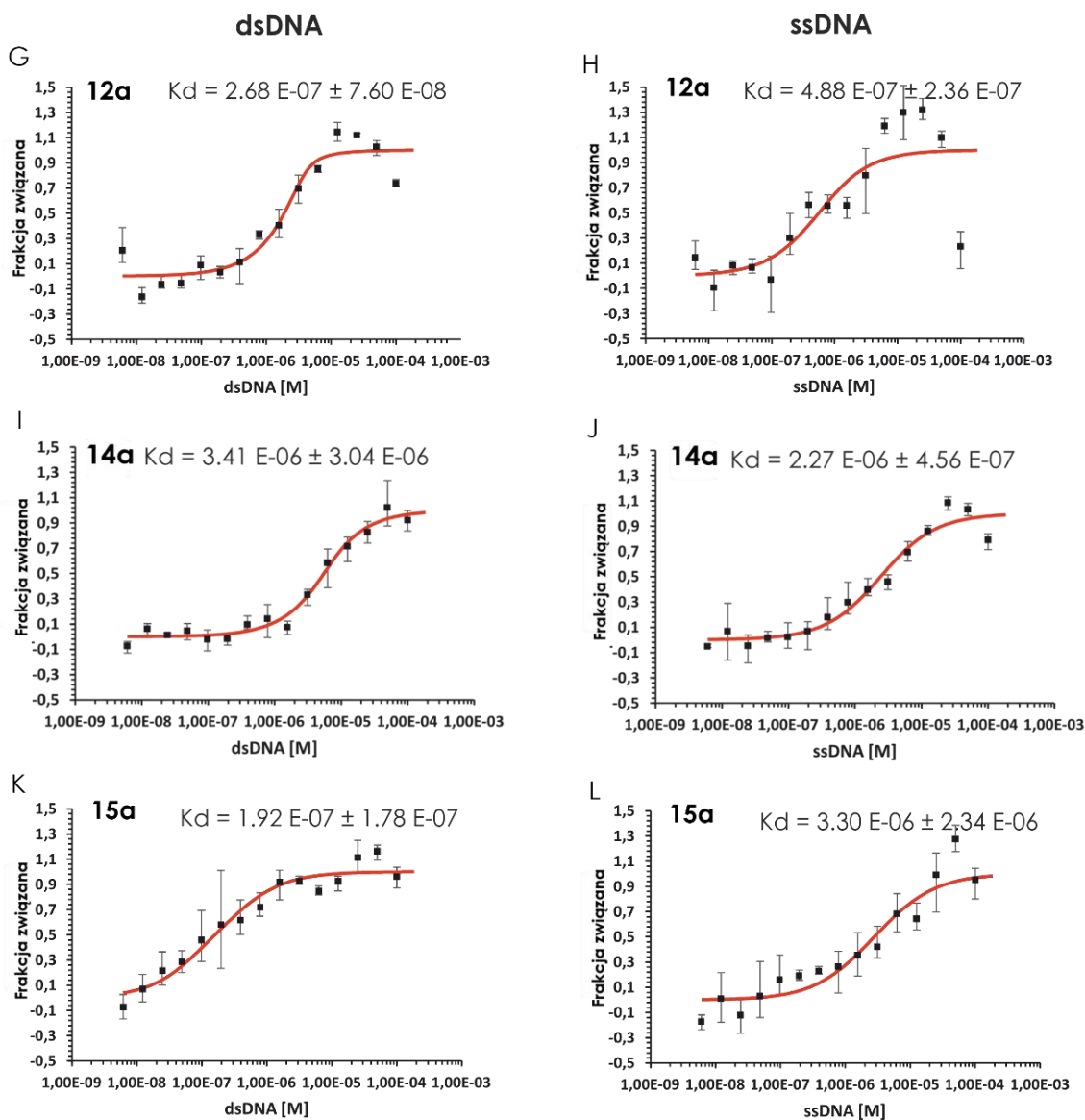
4. Termoforeza w mikroskali (MST) – badanie oddziaływań peptydomimetyków z DNA

Kolejnym doświadczeniem, które wykonałam w celu potwierdzenia zdolności peptydomimetyków do tworzenia kompleksów z kwasami nukleinowymi była technika termoforezy w mikroskali. MST służy do badania oddziaływań pomiędzy dwiema molekułami oraz umożliwia określenie stałej ich wiązania. Rysunek 56 przedstawia wyniki otrzymane dla peptydomimetyków: **1a**, **4a**, **8a**, **10a**, **11a**. W tabeli 23 zamieściłam stałe wiązania (Kd) otrzymane dla związków **16a** – **21a**. Uzyskane wyniki potwierdzają, iż wszystkie poddane analizie peptydomimetyki oddziałują z kwasami nukleinowymi. Najsilniejsze wiązania tworzą związki zawierające osiem ugrupowań guanidynowych w swojej sekwencji (**11a**, **16a**, **18a**, **19a**, **20a**, **21a**). Zmiana konfiguracji reszty Dap z L na D nie powoduje znaczących zmian w wartościach wyznaczonych stałych wiązania. Uzyskane dane nie wskazują jednoznacznie, jaki wpływ wywiera obecność reszt O1Pen oraz Pro w siódmej pozycji sekwencji związków zawierających osiem ugrupowań guanidynowych. Jedynie w przypadku peptydomimetyku **17a** inkubowanego z ssDNA stała wiązania jest niska. Używany znacznik fluorescencyjny nie oddziałuje efektywnie z badanym fragmentem DNA, o czym świadczy niska wartość Kd równa dla ssDNA i dsDNA: $3,99 \times 10^{-4} \text{ M} (\pm 4,97 \times 10^{-4} \text{ M})$, $6,39 \times 10^{-4} \text{ M} (\pm 7,03 \times 10^{-4} \text{ M})$ [160].

Tabela 23. Wartości Kd dla związków 16a – 21a oddziałujących z DNA uzyskane za pomocą MST.

Nr	Sekwencja	Kd [M]	
		dsDNA	ssDNA
16a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	$5,57 \times 10^{-7}$ $\pm 8,38 \times 10^{-8}$	$2,68 \times 10^{-6}$ $\pm 5,85 \times 10^{-7}$
17a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₄ -Pro-[Dap(GO1)] ₄ -O2Oc-NH ₂	$1,70 \times 10^{-4}$ $\pm 7,80 \times 10^{-5}$	$9,90 \times 10^{-5}$ $\pm 5,37 \times 10^{-5}$
18a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O1Pen-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	$4,30 \times 10^{-5}$ $\pm 5,05 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-5}$ $\pm 2,11 \times 10^{-6}$
19a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -Pro-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	$3,98 \times 10^{-6}$ $\pm 6,54 \times 10^{-7}$	$5,63 \times 10^{-6}$ $\pm 1,80 \times 10^{-6}$
20a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO1)] ₈ -O2Oc-NH ₂	$2,57 \times 10^{-7}$ $\pm 3,48 \times 10^{-8}$	$9,67 \times 10^{-9}$ $\pm 5,12 \times 10^{-9}$
21a	5/6-FAM-O2Oc-[D-Dap(GO2)] ₈ -O2Oc-NH ₂	$9,83 \times 10^{-6}$ $\pm 6,55 \times 10^{-6}$	$5,57 \times 10^{-7}$ $\pm 8,38 \times 10^{-8}$



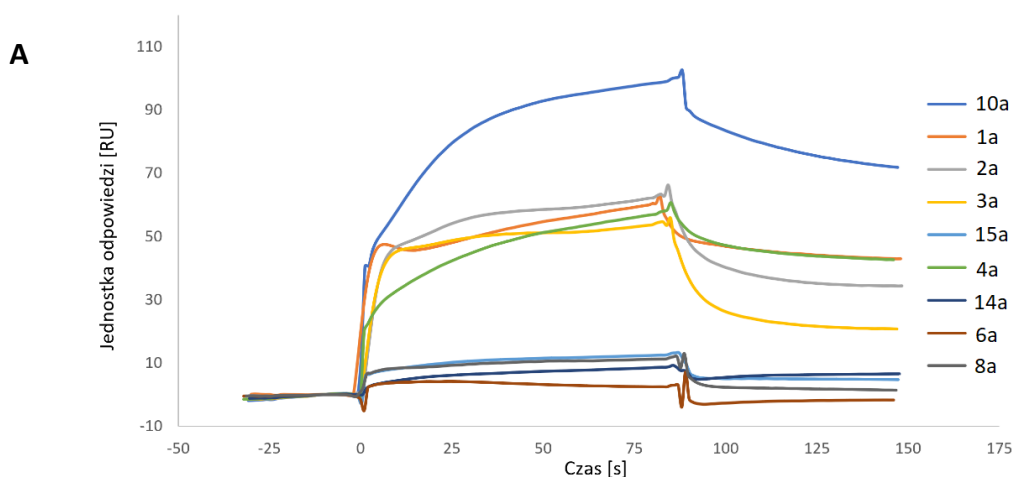


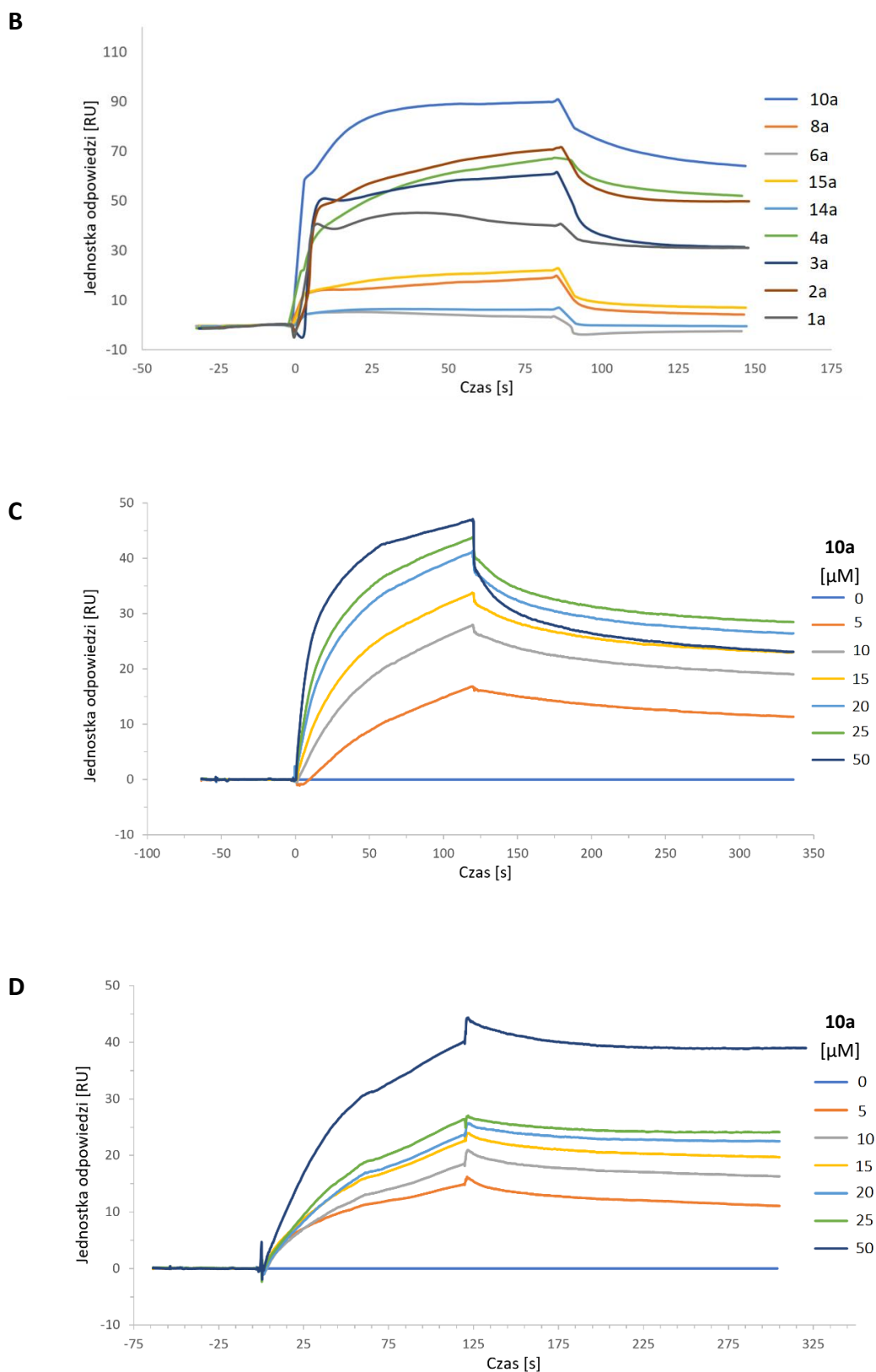
Rysunek 56. Wyniki przedstawiające wiązanie się znakowanych fluorescencyjnie związków do dsDNA (A, C, E, G, I, K) oraz ssDNA (B, D, F, H, J, L) uzyskane za pomocą techniki termoforezy w mikroskali (MST). Poszczególne wykresy obrazują wiązanie się z DNA związków: A, B – 1a; C, D – 4a; E, F – 24; G, H – 8a; I, J – 10a; K, L – 11a [160].

5. Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) – badanie oddziaływań peptydomimetyków z DNA

Wyniki otrzymane z analizy elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym wskazują jednoznacznie na powstawanie kompleksów pomiędzy peptydomimetykami, a podwójną nicią DNA. Na ich podstawie postanowiłam wykonać analizę

z wykorzystaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Badanie zostało przeprowadzone z użyciem znakowanych fluorescencyjnie peptydomimetyków ($c = 50$ i $100 \mu\text{M}$) z wykorzystaniem jako ligandu dsDNA. Spośród peptydomimetyków o stężeniu $50\mu\text{M}$ inkubowanych z fragmentem DNA najwyższą zdolność wiązania się do DNA wykazuje związek nr **10a**, kolejno nr **4a**, a następnie peptydomimetyki **1a**, **2a** i **3a**. Przy wyższym stężeniu silniejsze wiązanie z dsDNA wykazywał zaś związek **4a**, później związek nr **10a**, a kolejno **1a**, **2a** i **3a**. Ponadto zamiana ugrupowań guanidynowych na grupy $-\text{NH}_2$ (związek **15a**) skutkowało zmniejszeniem siły oddziaływania z analizowanym fragmentem kwasu nukleinowego. Natomiast analog **14a** zawierający 6 grup hydroksylowych w łańcuchach bocznych nie oddziałuje z dsDNA (rys. 57). W tabeli nr 24 przedstawiłam stałe wiązania związków charakteryzujących się znaczną zdolnością do tworzenia oddziaływań z DNA, które dla związków **4a** i **10a** wynosiły odpowiednio: $8,8 \pm 2,1 \mu\text{M}$ i $1,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Wykonano również pomiary, w których analizowano wpływ zmian stężenia peptydomimetyku nr **10** na siłę tworzącego się wiązania z pojedynczą oraz podwójną nicią DNA. Wyniki przedstawione na rysunku 56 C i 56 D wskazują, iż wraz ze wzrostem stężenia związku tworzy się silniejsze wiązanie zarówno z ssDNA, jak i z dsDNA. Badania te w dużym stopniu korelują z eksperymentami wykonanymi techniką MST, gdzie jak wspomniałam wcześniej całość odbywa się w fazie ciekłej, w przeciwieństwie do techniki SPR, gdzie ligand immobilizowany jest na powierzchni sensora. Niezależnie od warunków eksperymentu oddziaływania pomiędzy peptydomimetykiem, a fragmentem DNA występują i są niezależne od stosowanej techniki [160].





Rysunek 57. Sensogramy przedstawiające wiązanie się poszczególnych peptydomimetyków do podwójnej nici DNA. Analizę wykonano stosując stężenie związków przepuszczonych przez powierzchnię czujnika z unieruchomionym biotynylowanym dsDNA: A – 50μM oraz B – 100μM. Wyniki przedstawione na rysunku C i D dotyczą związku 10a analizowanego w różnych stężeniach wobec: C – ssDNA, D – dsDNA [160].

Tabela 24. Wartości Kd uzyskane za pomocą techniki SPR.

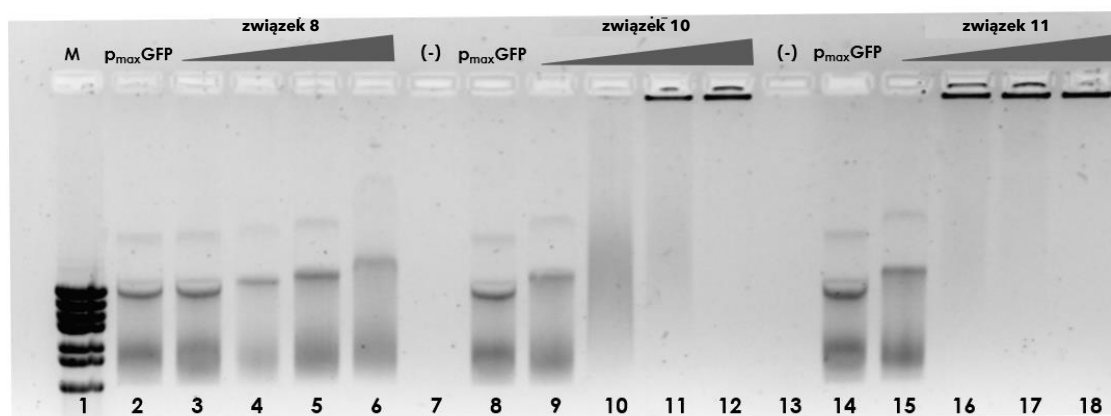
Nr	Sekwencja	Kd [μ M] *	
		ssDNA	dsDNA
1a	5/6-FAM-O2Oc-(Arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	umiarkowana	
2a	5/6-FAM-O2Oc-(D-arg) ₆ -O2Oc-NH ₂	umiarkowana	
3a	5/6-FAM-O2Oc-(Har) ₆ -O2Oc-NH ₂	słabe	
4a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO1)] ₆ -O2Oc-NH ₂	1,81±1,11	8,82±2,13
6a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₂ -O2Oc-NH ₂	słabe	
8a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₄ -O2Oc-NH ₂	-	
10a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(GO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	2,83±1,21	1,80±0,92
14a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(HO2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	słabe	
15a	5/6-FAM-O2Oc-[Dap(O2)] ₆ -O2Oc-NH ₂	słabe	
24	5/6-FAM	-	

* Stała wiązania do pojedynczej nici DNA (ssDNA) oraz podwójnej nici DNA (dsDNA) wyznaczona przy użyciu techniki SPR – wiązanie określone jako „słabe” dotyczy związków poniżej 10 RU, zaś „umiarkowane” – do 60 RFU i zostało ustalone arbitralnie na podstawie eksperymentu SPR (rys. 53)

6. Elektroforeza w żelu agarozowym dla kompleksów utworzonych z plazmidowym DNA

Korzystając z wyników poprzednich badań, które wykazały, iż peptydomimetyk nr **10** oddziałuje z krótkimi fragmentami kwasów nukleinowych postanowiłam sprawdzić, czy jest on w stanie także wiązać się do większych struktur, takich jak plazmidowe DNA. W tym celu zastosowałam plazmid warunkujący ekspresję białka zielonej fluorescencji - p_{max}GFP, który inkubowałam ze związkami numer **8**, **10** oraz **11** w czterech różnych stosunkach N/P (ładunek peptydomimetyku/ładunek plazmidu): 0,2:1; 1:1; 1,5:1 i 3:1. Zdolność do tworzenia oddziaływań oceniłam wykorzystując technikę elektroforezy w żelu agarozowym (rys. 58). Otrzymane wyniki świadczą o tym, iż związek numer **8** wraz ze wzrostem stężenia silniej wiąże się z plazmidem powodując zmniejszoną ruchliwość kompleksu peptydomimetyk : plazmid w żelu w stosunku do kontroli. Natomiast peptydomimetyk nr **10** już przy stosunku N/P 0,2 : 1 powoduje znaczne opóźnienia migracji plazmidowego DNA w rozdiale elektroforetycznym. Stosunek ładunków dodatnich do ujemnych wynoszący 1,5 : 1 oraz 3 : 1 prowadził do utworzenia na tyle dużych kompleksów, że nie były one w stanie wnikać w pory żelu agarozowego i pozostały w miejscu startu. W przypadku związku nr **11** rozdział

wygląda podobnie, jak przy poprzednim peptydomimetyku. Jednak już przy N/P wynoszącym 1:1 tworzący się kompleks najprawdopodobniej ze względu na swój duży rozmiar i ładunek dodatni nie jest w stanie wnikać w głąb żelu i migrować w kierunku anody [160].



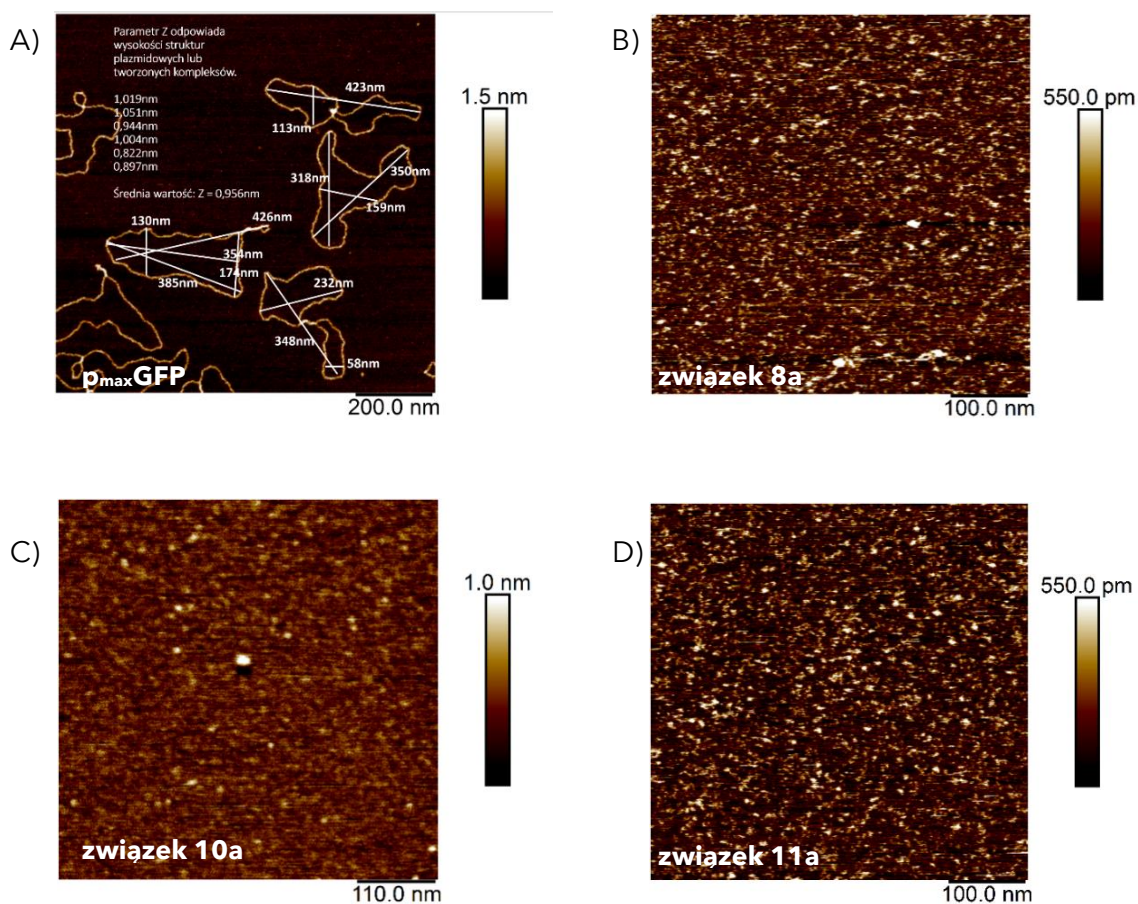
Rysunek 58. Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z plazmidowym DNA. Poszczególne ścieżki odpowiadają: **1.** Marker DNA; **2, 8, 14.** Plazmid p_{maxGFP} ; **3 – 6.** Związek 8 z p_{maxGFP} w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; **9 – 12.** Związek 10 z p_{maxGFP} w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; **15 – 18.** Związek 11 z p_{maxGFP} w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; **7, 13.** Puste ścieżki [160].

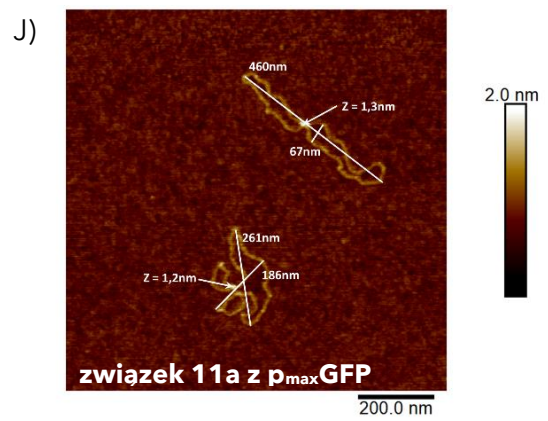
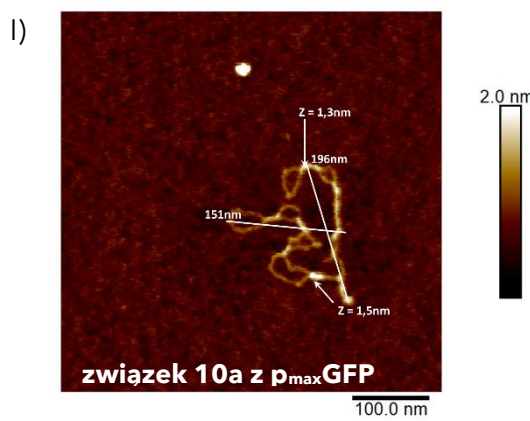
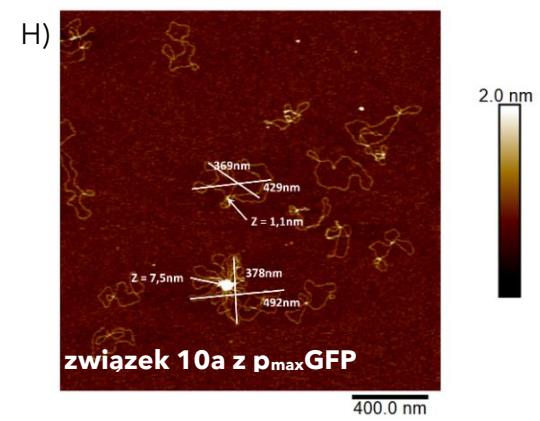
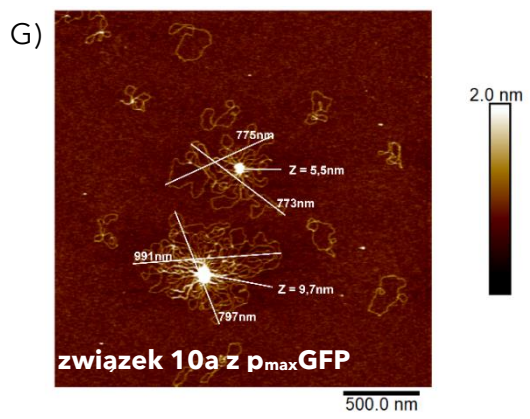
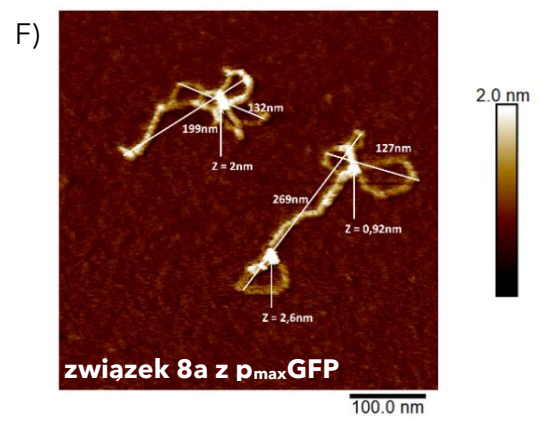
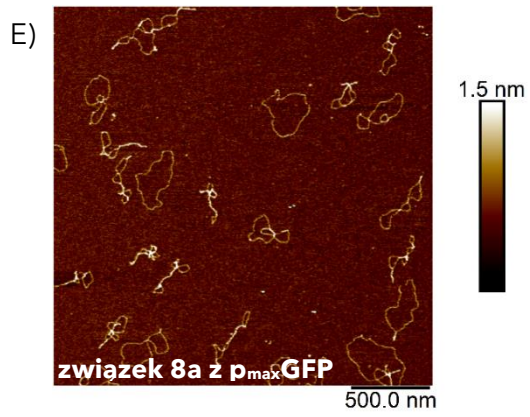
7. Mikroskopia sił atomowych (AFM) – organizacja struktur utworzonych z plazmidowym DNA

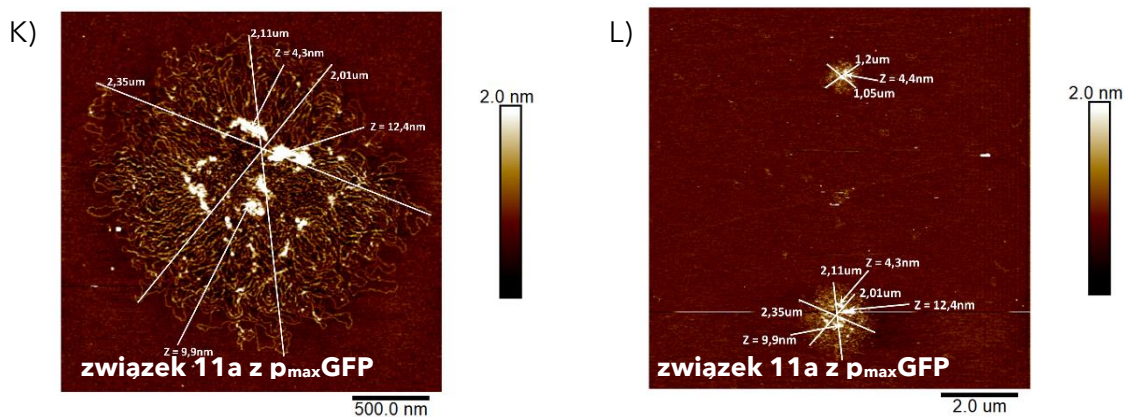
Wyniki otrzymane metodą elektroforezy w żelu agarozowym potwierdziły, że związki nr **8**, **10** oraz **11** tworzą kompleksy z plazmidowym DNA. W kolejnym kroku postanowiliśmy zanalizować ich organizację za pomocą techniki mikroskopii sił atomowych (AFM). Zdjęcia przedstawione na rysunku 59 B, C, D przedstawiają sam peptydomimetyk, który mimo obecności licznych szumów jest widoczny w postaci białych punktów. Związek **8a** inkubowany z DNA w stosunku N/P równym 0,2 : 1 tworzy struktury charakterystyczne dla małych cząsteczek kationowych takich, jak poliaminy, jony metali, czy związki poliargininowe [168], [169]. Oddziałuje on z plazmidowym DNA powodując tym samym jego kondensację oraz zmniejszenie wielkości (rys. 59 E, F). W przypadku związku **10a** tworzącego kompleks z DNA zauważyć można struktury wyglądem przypominające kwiaty, których średnica

zbliżona jest do 900 nm [170]. W układzie z tym peptydomimetykiem widoczna jest zmniejszona liczba struktur odpowiadających pojedynczym plazmidom (nieskondensowanym) (rys. 59 G, H, I). Związek **11a** tworzy z badanym DNA większe cząstki multiplazmidowe (określane w literaturze jako połączone cewki [171]), których rozmiary dochodzą nawet do 2350 nm, jednakże powstają tutaj również kompleksy zawierające peptydomimetyk oraz pojedyncze cząsteczki plazmidu (rys. 59 J, K, L). Związek **11a** powoduje tworzenie się dużych, zwartych struktur lub agregatów z występującym rdzeniem o dużej gęstości charakteryzującym się obecnością kilku cząsteczek związku związanych z kilkoma cząsteczkami DNA. Struktury o pokaźnych rozmiarach widoczne są przy stosunku N/P wynoszącym 0,2 : 1, gdzie ładunek plazmidu jest 5-krotnie wyższy. Wydawać się może, iż służą one jako zmiatacze DNA zdolne do wiązania wszystkich cząsteczek plazmidu w analizowanym układzie.

Podsumowując, tworzące się struktury są złożone i posiadają wiele punktów krzyżowania. Ich organizacja oraz stopień kondensacji zwiększa się wraz ze wzrostem liczby ugrupowań guanidynowych obecnych w badanych peptydomimetykach [160].







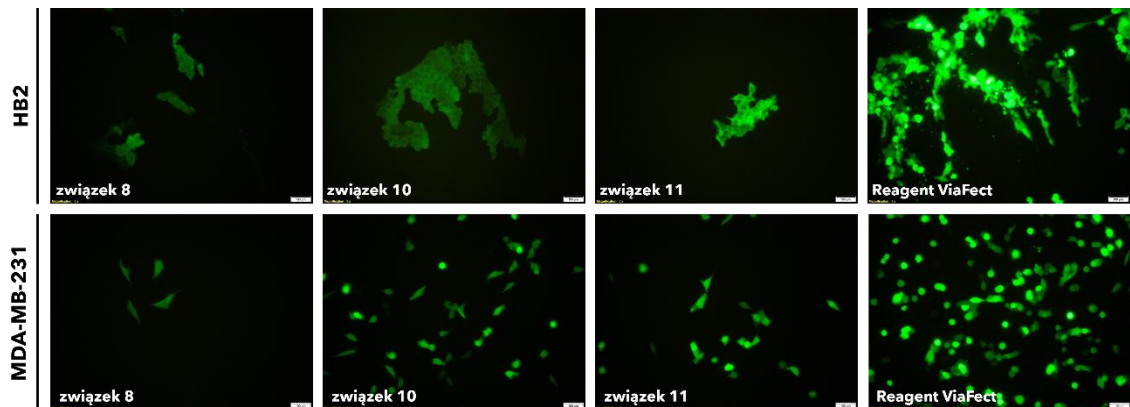
Rysunek 59. Zdjęcia z mikroskopu sił atomowych (AFM). **A** – plazmid $p_{\max}GFP$; **B** – związek 8a; **C** – związek 10a; **D** – związek 11a; **E** – związek 8a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 2,5 μm ; **F** – związek 8a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 500 nm; **G** – związek 10a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 2,5 μm ; **H** – związek 10a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 2,5 μm ; **I** – związek 10a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 500 nm; **J** – związek 11a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 1 μm ; **K** – związek 11a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 2,5 μm ; **L** – związek 11a z plazmidem $p_{\max}GFP$ N/P 0,2 : 1, 10 μm [160].

8. Transfekcja za pośrednictwem peptydomimetyków

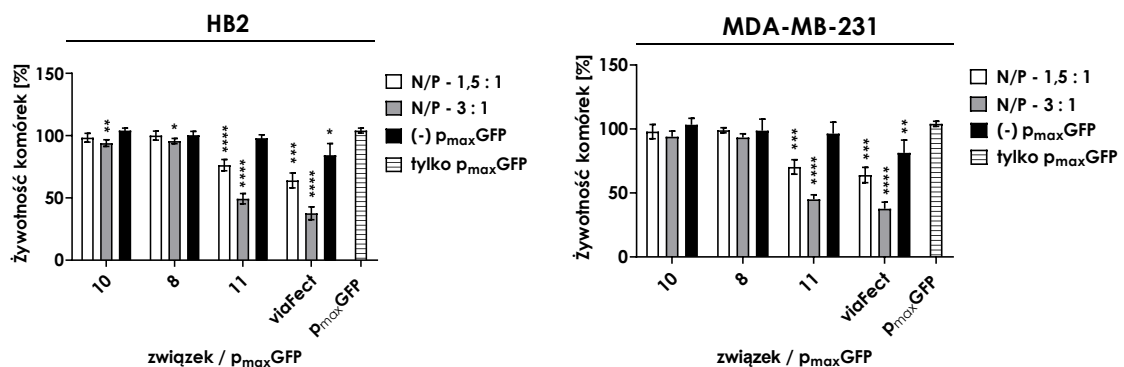
Wyniki uzyskane z analiz wykorzystujących technikę AFM jednoznacznie potwierdziły, że peptydomimetyki **8a**, **10a** oraz **11a** oddziałują z plazmidowym DNA powodując jego kondensację. Postanowiłam sprawdzić czy i jak efektywnie związki **8**, **10** i **11** mogą wprowadzać DNA do komórek. W tym celu użyłam plazmid zawierający 3486 par zasad nukleotydowych, kodujący białko zielonej fluorescencji ($p_{\max}GFP$). Rysunek 60 przedstawia zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego po 24h inkubacji. Wszystkie utworzone kompleksy (N/P 1,5:1 oraz 3:1) skutecznie wprowadziły plazmid $p_{\max}GFP$ do linii komórkowych HB2 i MDA-MB-231. Najwyższą intensywność fluorescencji pochodzącą od ekspresji białka GFP zaobserwowałam dla kompleksu peptydomimetyk **10** : $p_{\max}GFP$, następnie dla **11** i **8**. Transfekcję wykonałam również z zastosowaniem dostępnego komercyjnie reagentu transfekcyjnego - ViaFect, którego skuteczność przedstawiłam na rysunku 60.

Dodatkowo wykonałam test MTT, dzięki któremu określiłam toksyczność utworzonych kompleksów wobec badanych linii komórkowych. Największy wpływ na przeżywalność komórek miał kompleks utworzony przez reagent ViaFect z badanym plazmidem, który powoduje spadek liczby żywych komórek do 50 % w porównaniu do

kontroli (dodatek samego plazmidu), następnie związek numer **11** w kompleksie z p_{max}GFP wykazujący 30 % cytotoksyczności, podczas gdy kompleksy z peptydomimetykami **8** i **10** nie wpływają znacząco na przeżywalność komórek linii HB2 i MDA-MB-231 (rys. 61). Przeprowadzając proces transfekcji oczekiwałam korelacji pomiędzy siłą oddziaływania związków z p_{max}GFP, a skutecznością transfekcji. Jednak związek **11** mimo, iż charakteryzuje się wysoką stałą wiązania z plazmidem oraz stosunkowo szybką penetracją błon biologicznych, to jego efektywność podczas transfekcji jest dość niska. Rozbieżność ta może wynikać z rozmiaru kompleksu DNA-związek, będącego w stanie tworzyć pokaźne struktury, które zostały przedstawione podczas badań AFM [160].



Rysunek 60. Zdjęcia fluorescencyjne komórek linii HB2 i MDA-MB-231 transfekowanych kompleksem peptydomimetyk : p_{max}GFP : (N/P – 1,5 :1), a także reagentem ViaFect [160].



Rysunek 61. Cytotoksyczność kompleksów: peptydomimetyk (8, 10, 11) : p_{max}GFP (stężenie kompleksu równe $4,62 \times 10^{-10}$ M) wobec komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 (średnia \pm SD).

Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001;

****p<0,0001 (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń n = 4) [160].

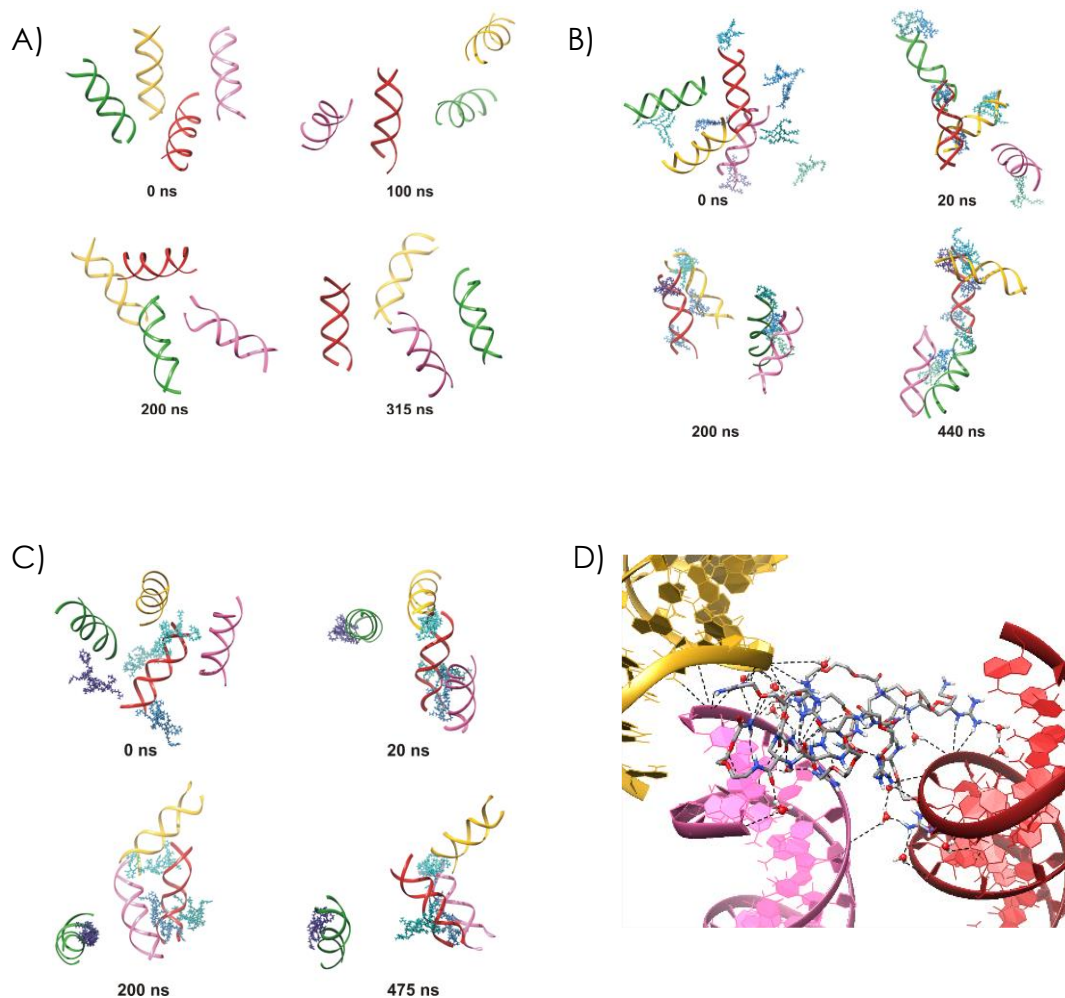
9. Wyniki uzyskane dzięki modelowaniu teoretycznemu

W celu wyjaśnienia roli peptydomimetyków w procesie kondensacji DNA, którą zaobserwowaliśmy dzięki badaniom z użyciem techniki AFM, zdecydowaliśmy się na stworzenie teoretycznych modeli obrazujących interakcje związków numer **8** i **11** z DNA. Powyższe związki zbudowane były z tych samych jednostek budulcowych, lecz różniły się długością sekwencji, co rzutuje na sposoby kondensacji podwójnej nici DNA.

Wyniki przeprowadzonych symulacji z wykorzystaniem dynamiki molekularnej potwierdziły, iż badane związki indukują proces kondensacji DNA, która rozpoczyna się już na wczesnym etapie eksperymentu. Powstałe kompleksy peptydomimetyk : DNA są stabilizowane za pomocą sieci wiązań wodorowych (mostki wodorowe z mostkami wodnymi i mostki solne). W przypadku badań kontrolnych, które dotyczyły DNA bez obecności peptydomimetyku nie zaobserwowano agregacji (rys. 62).

Z tego względu, iż do symulacji oddziaływań użyto związków i DNA w proporcji ładunków 0,2 : 1, do eksperymentu potrzebne było prawie dwukrotnie większe stężenie peptydomimetyku nr **8** w porównaniu do związku **11**, co w przypadku tego pierwszego może powodować większe rozproszenie ładunków dodatnich w układzie badawczym. Proces kondensacji DNA z użyciem związku nr **8** przebiega stopniowo. Początkowo tworzy się kompleks peptydomimetyku z kwasem nukleinowym, przez co osłaniane są ładunki ujemne grup fosforanowych w DNA, a to redukuje odpychanie między sąsiadującymi nićmi i ułatwia wiązanie innych jednostek dsDNA. Podczas pierwszych 20 ns symulacji dochodzi do kondensacji dwóch podwójnych helis DNA, zaś dwie inne są niezagregowane do około 80 ns eksperymentu. W ciągu kolejnych 250 ns tworzą się już dwa zespoły dsDNA, zaś po około 330 ns wszystkie cząsteczki dsDNA ulegają kondensacji. W przypadku związku numer **11**, który posiada dłuższy łańcuch główny kondensacja DNA zachodzi szybciej, gdyż jest on w stanie wychwycić sąsiednie nici DNA już na początku prowadzonej symulacji. Wyniki wskazują, iż 3 cząsteczki peptydomimetyku pośredniczą w kondensacji trzech helis dsDNA już w pierwszych 20 ns doświadczenia, zaś czwarta nić związana jest z cząsteczką związku i pozostaje niezagregowana przez resztę trwania symulacji. Ze względu na długość łańcucha

peptydomimetyk nr **11** może oddziaływać aż z trzema nićmi DNA, co nie występuje w przypadku krótszego związku (**8**) (rys. 62 D) [160].



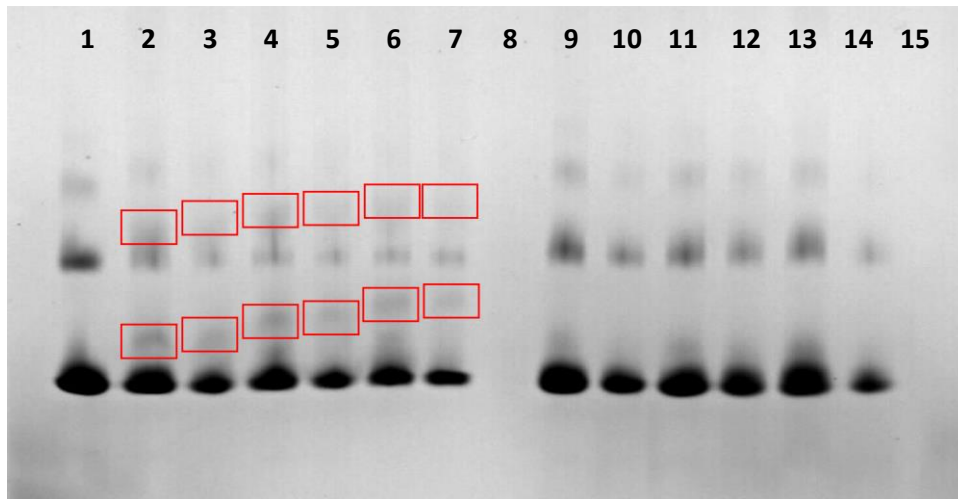
Rysunek 62. Struktury otrzymane z wykorzystaniem symulacji dynamiką molekularną (MD) przedstawiające kondensację DNA w układzie: **A** – bez dodatku związków, **B** – w obecności peptydomimetyku nr 8, **C** – w obecności peptydomimetyku nr 11. Cztery helisy DNA przedstawione są w kolorze złotym, zielonym, różowym oraz czerwonym. Cząsteczki związków występują w różnych odcieniach niebieskiego. **D** – oddziaływanie między pojedynczą cząsteczką związku 11, a trzema podwójnymi helisami DNA w ostatnim etapie symulacji [160].

10. Wewnątrzkomórkowy transport białek za pośrednictwem peptydomimetyków (badania z wykorzystaniem linii komórkowych piersi: HB2, MDA-MB-231, SK-Br-3 i T47D)

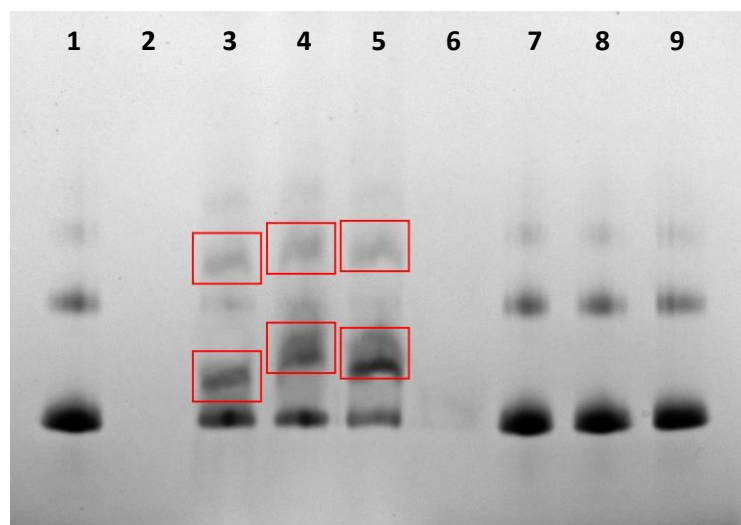
10.1. Zastosowanie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych celem potwierdzenia obecności kompleksów – biotynylowany peptydomimetyk : FAM-streptawidyną.

W kolejnym etapie, zważywszy na to, że zsyntezowane peptydomimetyki zawierające 6 lub 8 ugrupowań guanidynowych efektywnie penetrują błony komórkowe przenikając do wnętrza komórki, postanowiłam sprawdzić ich zdolność do wewnątrzkomórkowego transportu związków innych niż kwasy nukleinowe. W tym celu wykorzystałam związki nr **22** i **23** zawierające biotynylowany *N*-koniec. Mając na uwadze, że streptawidyna charakteryzuje się wysokim powinowactwem do biotyny, podjęłam próbę utworzenia kompleksów pomiędzy biotynylowanym peptydomimetykiem, a powyższym białkiem. W tym celu koniugat FAM-streptawidyna poddałam godzinnej inkubacji z peptydomimetykami w stosunku molowym: 1:1; 1:2; 1:4, a następnie próbki nanosiłam na żel w taki sposób, by stężenie białka wynosiło 0,1 µg lub 0,2 µg na ścieżkę. Poniżej przedstawiłam elektroforegram żelu poliakrylamidowego, wykonanego w warunkach natywnych, potwierdzający obecność utworzonych kompleksów (rys. 63). Procedurę tworzenia kompleksów powtórzyłam również dla analogicznych związków z wolnym *N*-końcem (**10**, **11**).

Na podstawie uzyskanego elektroforegramu zauważyć można, iż związek numer **23** tworzy kompleksy ze znakowaną fluorescencyjnie streptawidyną (uzyskany kompleks zaznaczony jest czerwonym obramowaniem). Widoczne jest miareczkowanie białka, wraz ze wzrostem ilości peptydomimetyku w inkubowanej próbce, zmienia się migracja w żelu uzyskanego kompleksu, natomiast prążek pochodzący od białka staje się mniej intensywny. Powinowactwa do streptawidyny nie wykazuje peptydomimetyk z wolnym *N*-końcem, co przedstawione jest w prawej części elektroforegramu (ścieżki 9-14).



Rysunek 63. Elektroforegram natywnego żelu poliakrylamidowego kompleksów pomiędzy peptydomimetykiem nr **23**, a FAM-streptawidyną. Poszczególne ścieżki przedstawiają: **1.** FAM-Strp 0,2 µg; **2.** Kompleks 23 : FAM-Strp 1:1 (0,2µg); **3.** Kompleks 23 : FAM-Strp 1:1 (0,1µg); **4.** Kompleks 23 : FAM-Strp 2:1 (0,2µg); **5.** Kompleks 23 : FAM-Strp 2:1 (0,1µg); **6.** Kompleks 23 : FAM-Strp 4:1 (0,2µg); **7.** Kompleks 23 : FAM-Strp 4:1 (0,1µg); **8.** Związek nr 23; **9.** Kompleks 11 : FAM-Strp 1:1 (0,2µg); **10.** Kompleks 11 : FAM-Strp 1:1 (0,1µg); **11.** Kompleks 11 : FAM-Strp 2:1 (0,2µg); **12.** Kompleks 11 : FAM-Strp 2:1 (0,1µg); **13.** Kompleks 11 : FAM-Strp 4:1 (0,2µg); **14.** Kompleks 11 : FAM-Strp 4:1 (0,1µg); **15.** Związek nr 11.



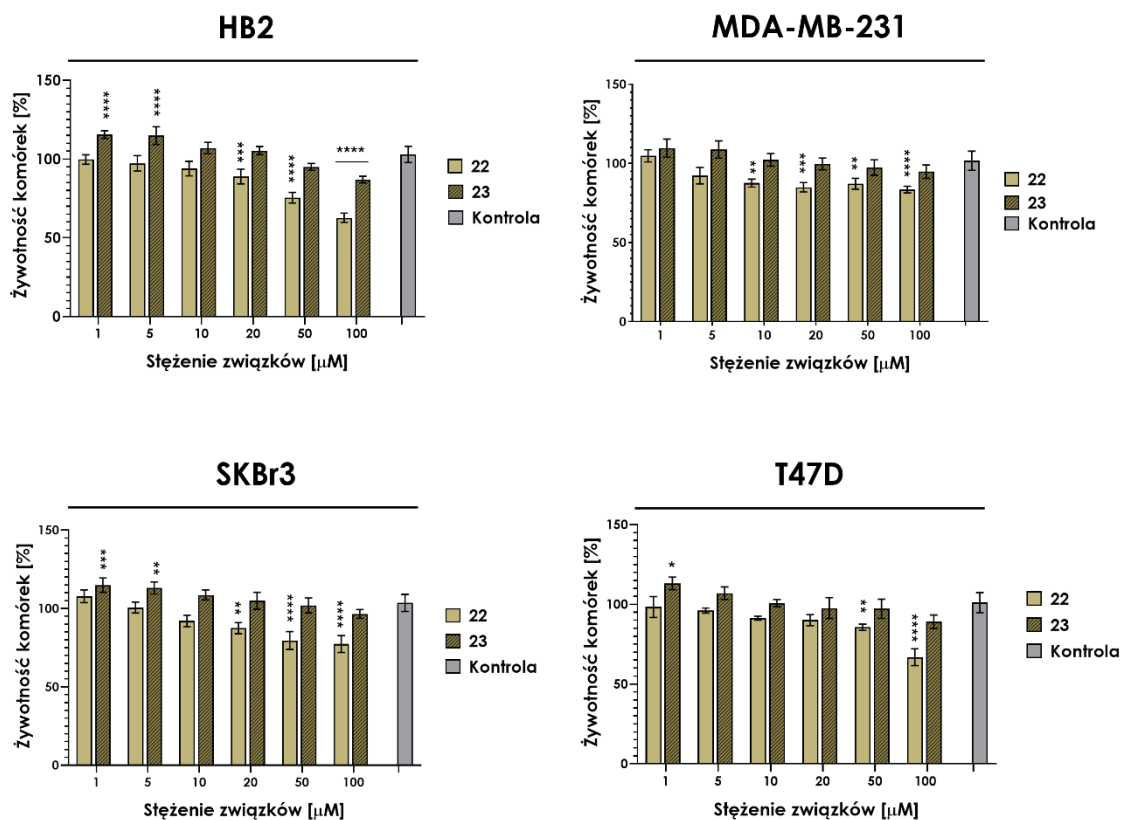
Rysunek 64. Elektroforegram natywnego żelu poliakrylamidowego kompleksów pomiędzy peptydomimetykiem nr **22**, a FAM-streptawidyną. Poszczególne ścieżki przedstawiają: **1.** FAM-Strp; **2.** Związek nr 22; **3.** Kompleks 22 : FAM-Strp 1:1; **4.** Kompleks 22 : FAM-Strp 1:2; **5.** Kompleks 22 : FAM-Strp 1:4; **6.** Związek nr 10; **7.** Kompleks 10 : FAM-Strp 1:1; **8.** Kompleks 10 : FAM-Strp 1:2; **9.** Kompleks 10 : FAM-Strp 1:4.

Rysunek numer 64 przedstawiający elektroforegram kompleksów utworzonych pomiędzy peptydomimetykami zawierającymi sześć ugrupowań guanidynowych w łańcuchu bocznym (odpowiednio – związek nr **22** oraz **10**), a FAM-Strp wygląda analogicznie do powyższego. Stężenie białka w każdym dołku wynosiło 0,2 ug. Obecność trzech prążków, w analizowanych żelach, pochodzących od FAM-Strp może być spowodowana tym, iż białko to jest tetramerem, zatem dolne frakcje prawdopodobnie pochodzą od niepełnej, natywnej formy FAM-streptawidyny.

10.2. Transport streptawidyny znakowanej fluorescencyjnie do wnętrza komórek przy użyciu peptydomimetyków

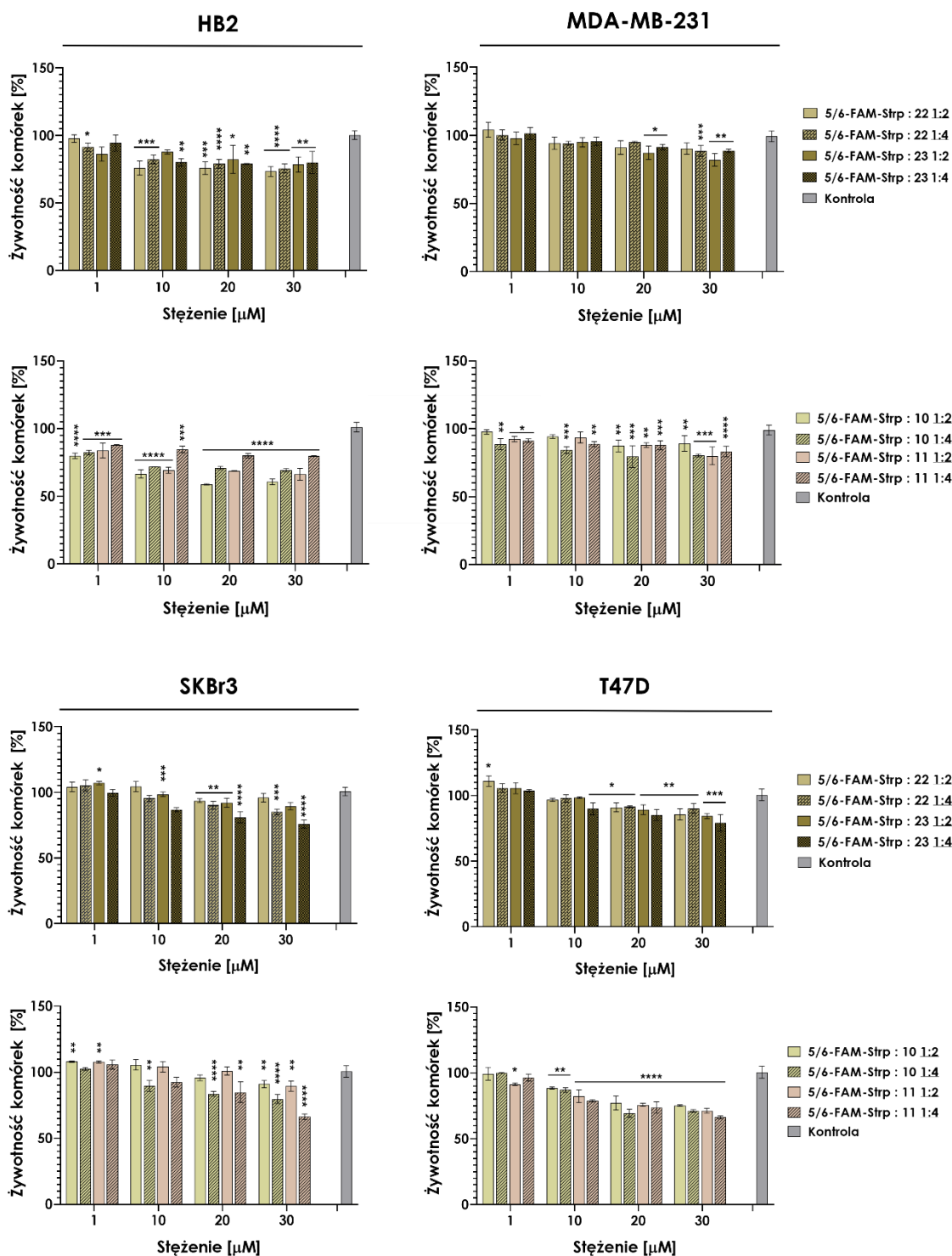
Na tym etapie badań postanowiłam wykorzystać zsyntezowane związki jako transportery białka do wnętrza komórek. W tym celu wykorzystywałam linie komórkowe piersi: HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D, do których postanowiłam wprowadzić kompleksy FAM-Strp ze związkami **22** i **23** (stosunki molowe białko : peptydomimetyk – 1:2 oraz 1:4). Stężenie peptydomimetyku w studni wynosiło 10 μ M dla kompleksu 1:2 oraz 20 μ M dla kompleksu 1:4. W pierwszym etapie badań wykonałam test oceny cytotoxyczności MTT związków **22** i **23** oraz ich kompleksów wobec powyższych linii komórkowych. Postępowałam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4. 10. 3., a wyniki wykonanych testów zaprezentowałam na poniższych wykresach (rys. 65, 66).

Rysunek 65 przedstawia wyniki toksyczności biotynylowanych związków (**22**, **23**), która względem linii komórkowych nowotworów piersi prezentuje się podobnie, jak w przypadku analogicznych peptydomimetyków pozbawionych fluorofora (**10**, **11** – rys. 42 dla linii HB2 i MDA-MB-231) lub z przyłączonym fluoroforem (**10a**, **11a** - rys. 41 dla linii HB2 i MDA-MB-231). Związek nr **22** wywiera większy wpływ na żywotność komórek linii HB2, SKBr3 i T47D niż **23**, widoczne jest to zwłaszcza przy wyższych stężeniach, takich jak 50 μ M i 100 μ M. Stosowane stężenia peptydomimetyków podczas wykonywanych badań biologicznych mieszczą się w przedziale 10 – 20 μ M, w którym oba związki wykazują niewielką cytotoxyczność wobec testowanych linii komórkowych. Najbardziej toksyczny w warunkach danych eksperymentów okazał się związek **22** inkubowany z komórkami linii MDA-MB-231.



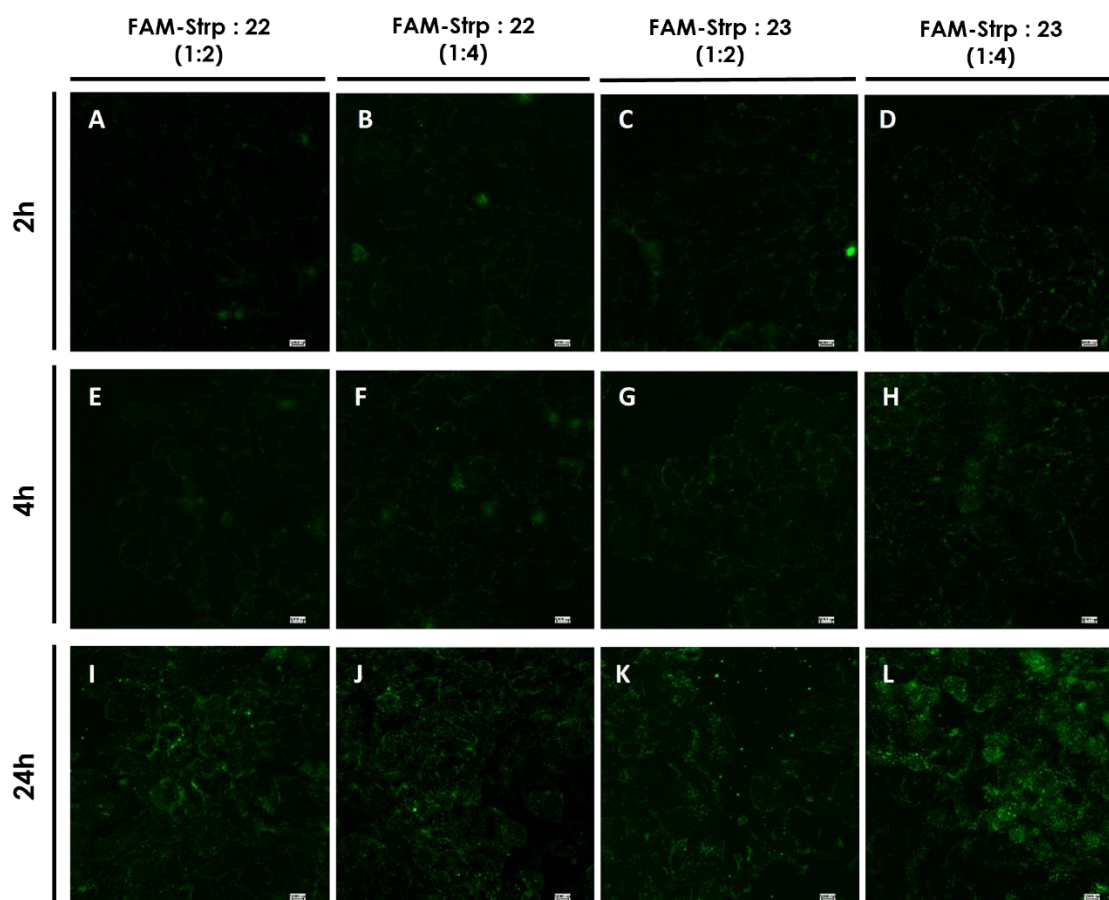
Rysunek 65. Cytotoksyczność peptydomimetyków **22** i **23** inkubowanych przez 24 godziny z komórkami linii: HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).

Na rysunku 66 przedstawiłam wyniki wpływu badanych kompleksów utworzonych w dwóch różnych stosunkach stechiometrycznych (1:2 oraz 1:4) na żywotność panelu linii komórkowych nowotworów piersi (MDA-MB-231, SKBr3 i T47D) oraz kontrolnej (HB2). Na podstawie powyższych wykresów widać, iż inkubowane z komórkami kompleksy nie powodują znacznej cytotoksyczności wobec badanych linii. Większy wpływ na żywotność komórek wykazują peptydomimetyki (**10**, **11**) z wolnym *N*-końcem (pozbawione *N*-końcowej reszty biotyny) zmieszane ze znakowanym białkiem w analogicznych stosunkach stechiometrycznych (1:2 oraz 1:4). Wyniki te potwierdzają, że właściwości penetrujące uzyskanych kompleksów nie są powodowane uszkodzeniem komórek przez składowe mieszaniny. Peptydomimetyki zatem są zdolne do transportu białka do wnętrza komórek nie wpływając przy tym zasadniczo na ich przeżywalność.

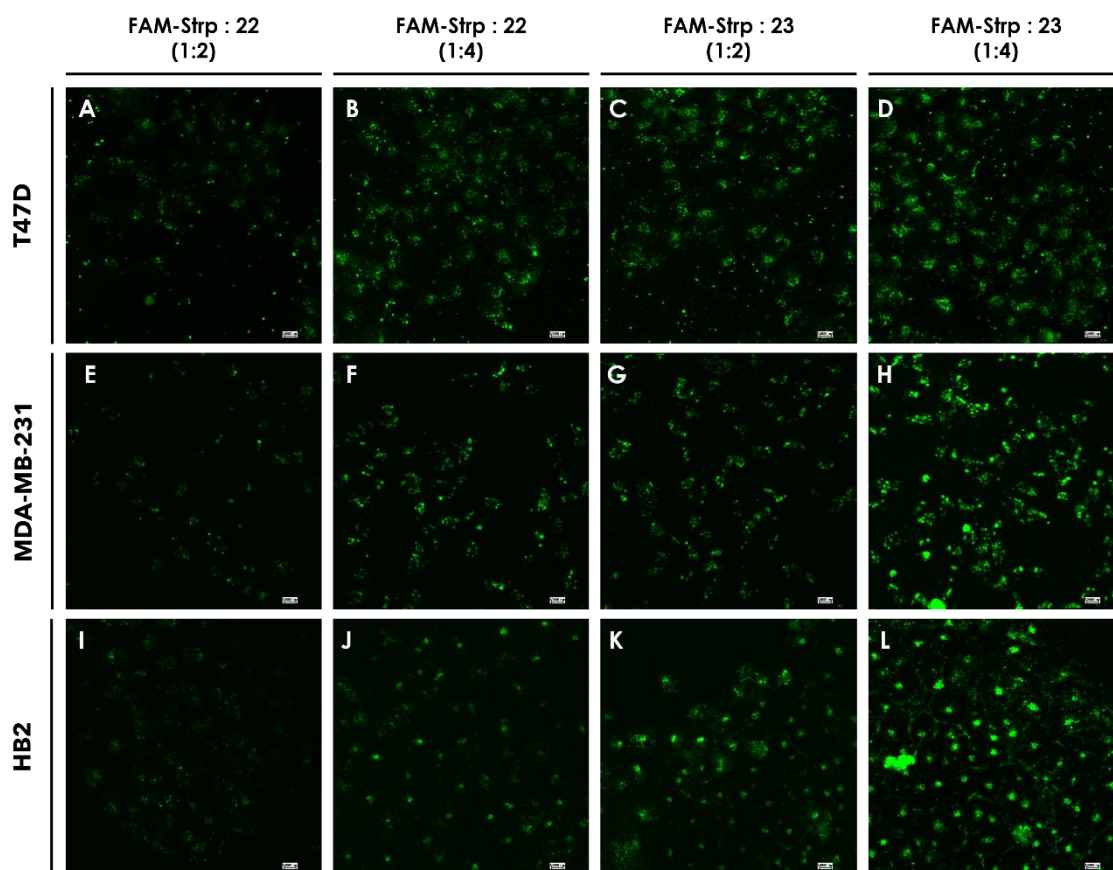


Rysunek 66. Cytotoksyczność kompleksów utworzonych pomiędzy FAM-streptawidyną i peptydomimetykami biotynylowanymi lub z wolnym *N*-końcem, a następnie inkubowanych przez 24 godziny z liniami komórkowymi: HB2, MDA-MB-231, SKBr3, T47D (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).

W kolejnym etapie kompleksy powstałe pomiędzy znakowanym fluorescencyjnie białkiem, a peptydomimetykami z przyłączoną biotyną do *N*-końca sekwencji utworzone w stosunkach molowych 1:2 oraz 1:4 (FAM-Strp : peptydomimetyk) poddałam 2, 4 lub 24-godzinnej inkubacji z komórkami linii HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D. Następnie wykonywane były zdjęcia mikroskopowe, z których wybrane przedstawiłam poniżej (rys. 67). Dla wszystkich linii komórkowych doświadczenie powtórzyłam z analogicznymi związkami niezawierającymi biotyny na swoim *N*-końcu (10, 11).



Rysunek 67. Komórki SKBr3 inkubowane z kompleksem: **A, E, I** – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:2; **B, F, J** – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:4; **C, G, K** – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:2; **D, H, L** – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:4; **A, B, C, D** – przez 2 godziny; **E, F, G, H** – przez 4 godziny; **I, J, K, L** - przez 24 godziny. Zdjęcia uzyskane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.



Rysunek 68. Komórki linii T47D, MDA-MB-231, HB2 inkubowane z kompleksem: **A, E, I** – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:2; **B, F, J** – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:4; **C, G, K** – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:2; **D, H, L** – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:4; **A, B, C, D** – przez 2 godziny; **E, F, G, H** – przez 4 godziny; **I, J, K, L** – przez 24 godziny. Zdjęcia uzyskane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.

W rozprawie doktorskiej przedstawiłam tylko wybrane zdjęcia (rys. 68) uzyskane przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego, ponieważ utworzone kompleksy do każdej z badanych linii komórkowych wnikały w podobnym stopniu. Peptydomimetyki z przenoszonym przez siebie efektem we wszystkich liniach komórkowych po 2-godzinnej inkubacji wnikały do wnętrza komórek, lokalizując się głównie w okolicach błony komórkowej. Jedynie w przypadku linii T47D fluorescencja pochodząca od białka nie była obserwowana pod mikroskopem, co znaczy, iż nie jest to wystarczający okres do efektywnej penetracji komórki przez utworzony kompleks. Po 4-godzinnej inkubacji wewnątrz komórek obserwowano bardziej intensywną fluorescencję pochodzącą od kompleksu FAM-Strp : peptydomimetyk niż w przypadku poprzedniego systemu. Najwolniej proces ten przebiegał wobec linii T47D, jednak także był już zauważalny. Po 24-godzinnej inkubacji

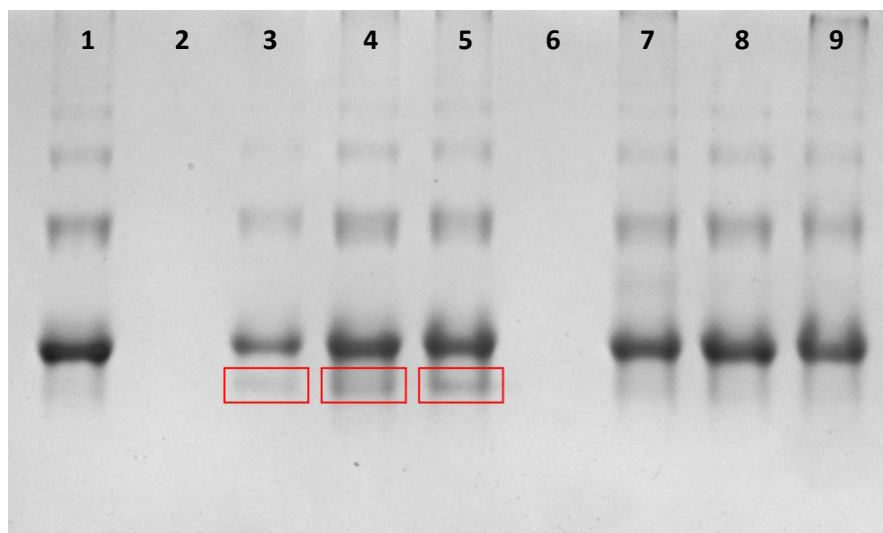
utworzone kompleksy wnikają do wnętrza komórek najefektywniej, na co wskazuje obserwowana intensywność fluorescencji.

Inkubacja komórek z mieszaniną - znakowana FAM streptawidyna : peptydomimetyk w dwóch stężeniach molowych badanych peptydomimetyków (1:2, 1:4 STRP-FAM:peptydomimetyk; mol/mol) skutkuje wyższą obserwowaną fluorescencją dla kompleksu o stechiometrii 1:4. Same zaś peptydomimetyki w różnym stopniu pośredniczą w transporcie znakowanego białka do wnętrza komórki. Dla peptydomimetyku **23** niezależnie od stechiometrii obserwujemy wyższą efektywność transportu niż dla związku **22**. Powyższe obserwacje dotyczą każdej z badanych linii komórkowych (SKBr3, T47D, MDA-MB-231, HB2). Ponadto peptydomimetyki pozbawione *N*-końcowej biotyny (**10** i **11**), dla których nie potwierdzono tworzenia się kompleksu z FAM-Strp przy użyciu technik elektroforetycznych, nie wprowadzają znakowanego białka do wnętrza komórki.

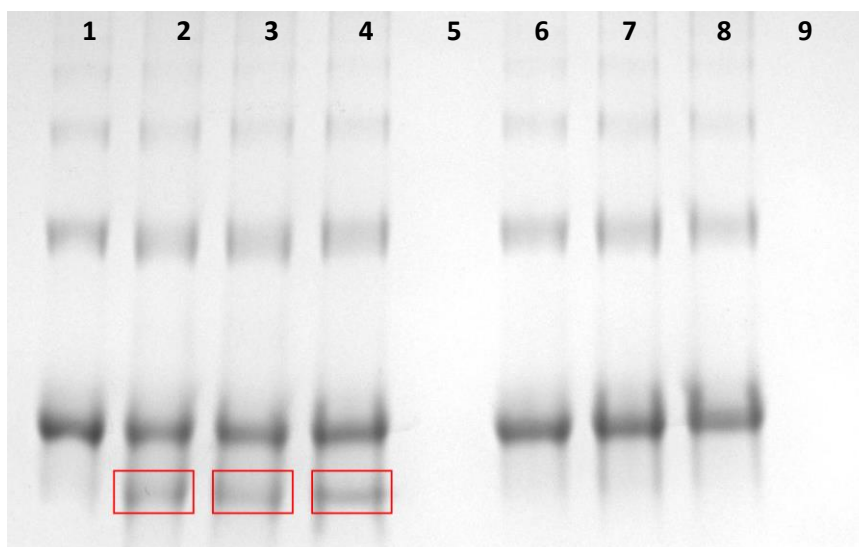
Dodatkowo, w komórkach wszystkich zastosowanych linii inkubowanych z samą FAM-streptawidyną (2h, 4h i 24h) nie obserwowałam obecności białka we wnętrzu komórek.

10.3. Zastosowanie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych dla białek o charakterze zasadowym celem potwierdzenia obecności kompleksów - biotynylowany peptydomimetyk : streptawidyno β -galaktozydaza

Związki **22** i **23** skutecznie wprowadzają FAM-streptawidyną do wnętrza komórek linii SKBr3, T47D, MDA-MB-231, HB2. W kolejnym etapie badań postanowiłam utworzyć kompleksy pomiędzy peptydomimetykami nr **22** lub **23** ze streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych dla białek o charakterze zasadowym potwierdziła obecność utworzonych kompleksów (rys. 69, 70). Procedurę tworzenia kompleksów powtórzyłam również dla analogicznych związków pozbawionych biotyny (**10**, **11**).



Rysunek 69. Elektroforegram żelu poliakrylamidowego wykonanego w warunkach natywnych. Poszczególne ścieżki przedstawiają: **1.** Strp- β -gal; **2.** 22 **3.** Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:1; **4.** Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:2; **5.** Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:4; **6.** 10; **7.** Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:1; **8.** Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:2; **9.** Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:4.



Rysunek 70. Elektroforegram żelu poliakrylamidowego wykonanego w warunkach natywnych. Poszczególne ścieżki przedstawiają: **1.** Strp- β -gal; **2.** Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:1; **3.** Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:2; **4.** Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:4; **5.** Związek 23; **6.** Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:1; **7.** Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:2; **8.** Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:4. **9.** Związek 11.

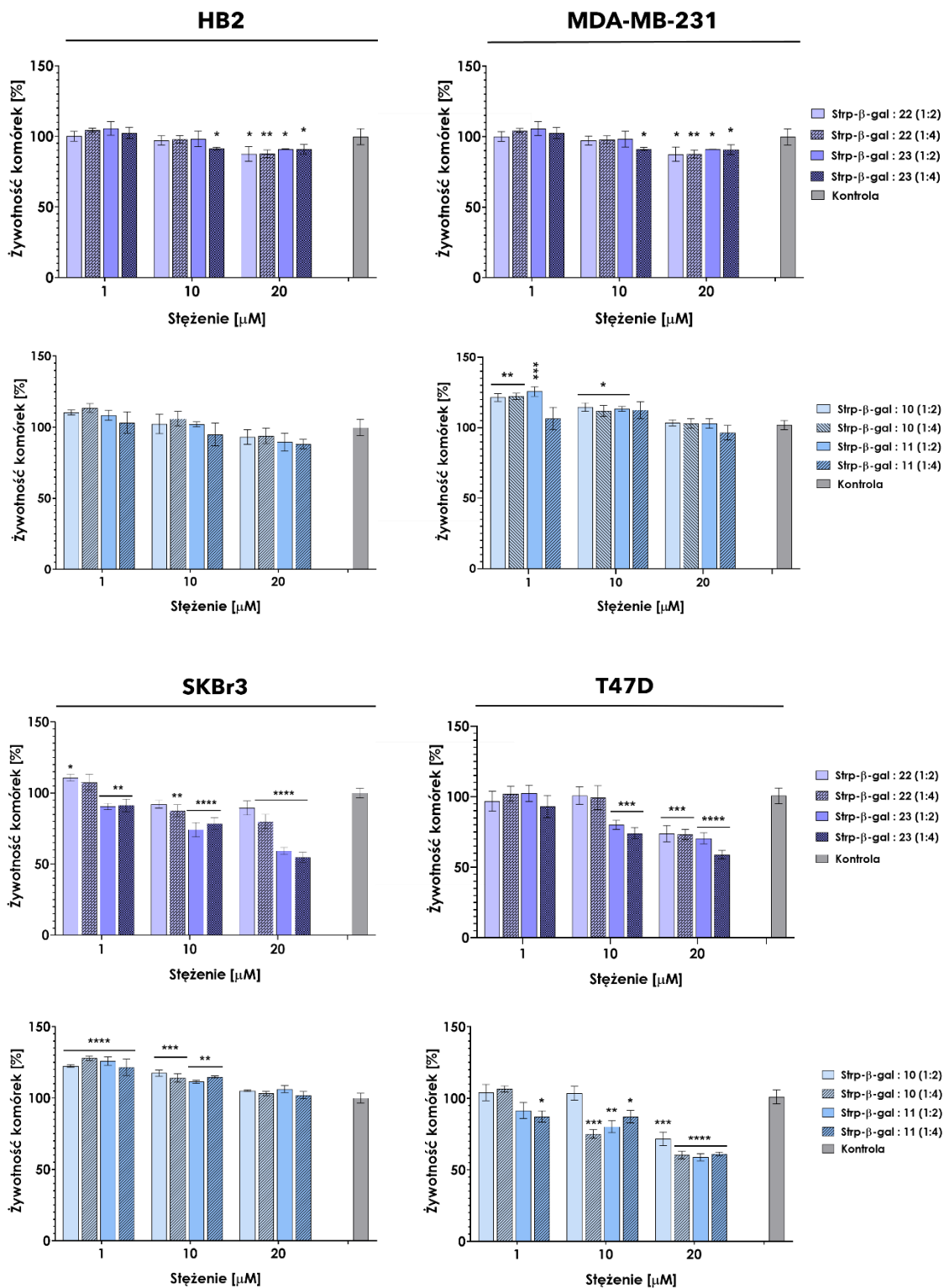
Analiza otrzymanych elektroforegramów (rys. 69 i 70) wskazuje, iż związki z przyłączoną biotyną tworzą kompleksy ze straptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą (uzyskane kompleksy zaznaczyłam czerwonymi obramowaniami), w przeciwieństwie do peptydomimetyków pozbawionych biotyny. W przypadku żelu przedstawionego na rysunku nr 69 zauważyć można, iż kompleks tworzy się w

niewielkim stopniu przy równomolowej zawartości obu inkubowanych składowych, lecz intensywność pochodzącego od niego prążka wzrasta wraz z rosnącym nadmiarem związku nr **22** w stosunku do białka. Natomiast w przypadku żelu przedstawionego na rysunku numer 70 trudno jest jednoznacznie ocenić, w których trzech studzienkach (2, 3 czy 4) dodatkowy prążek pochodzący od kompleksu jest najbardziej intensywny. Podsumowując, do utworzenia kompleksu Bt-O2Oc-[Dap(GO2)]₈-O2Oc-NH₂ (**23**) ze Strp-β-gal wystarcza równomolowy stosunek obu związków, natomiast największa ilość kompleksu Bt-O2Oc-[Dap(GO2)]₆-O2Oc-NH₂ (**22**) : Strp-β-gal powstaje wtedy, gdy stosowałam 2 lub 4-krotny nadmiar peptydomimetyku do skoniugowanego białka.

10.4. Ocena aktywności enzymatycznej β-gal w lizatach komórkowych komórek inkubowanych z kompleksem streptawidyna-β-gal : biotynylowany peptydomimetyk

Następnie postanowiłam wprowadzić za pomocą biotynylowanych peptydomimetyków do wnętrza komórek streptawidynę skoniugowaną z β-galaktozydazą w celu określenia, czy podczas procesu transportu białka w stosowanym układzie dochodzi do utraty jego aktywności. Wykonując ten eksperyment użyłam związków **22** i **23** oraz **10**, **11** (jako kontrole) i streptawidyno-β-galaktozydazę. Białko inkubowałam z każdym z peptydomimetyków przez godzinę w temperaturze pokojowej w dwóch stosunkach molowych, odpowiednio – 1:2 oraz 1:4.

W pierwszym etapie badań wykonałam test oceny cytotoksyczności MTT utworzonych kompleksów wobec linii komórkowych HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D. Postępowałam zgodnie z procedurą opisaną 4. 10. 3., a wyniki wykonanych testów zaprezentowałam na poniższych wykresach (rys. 71).

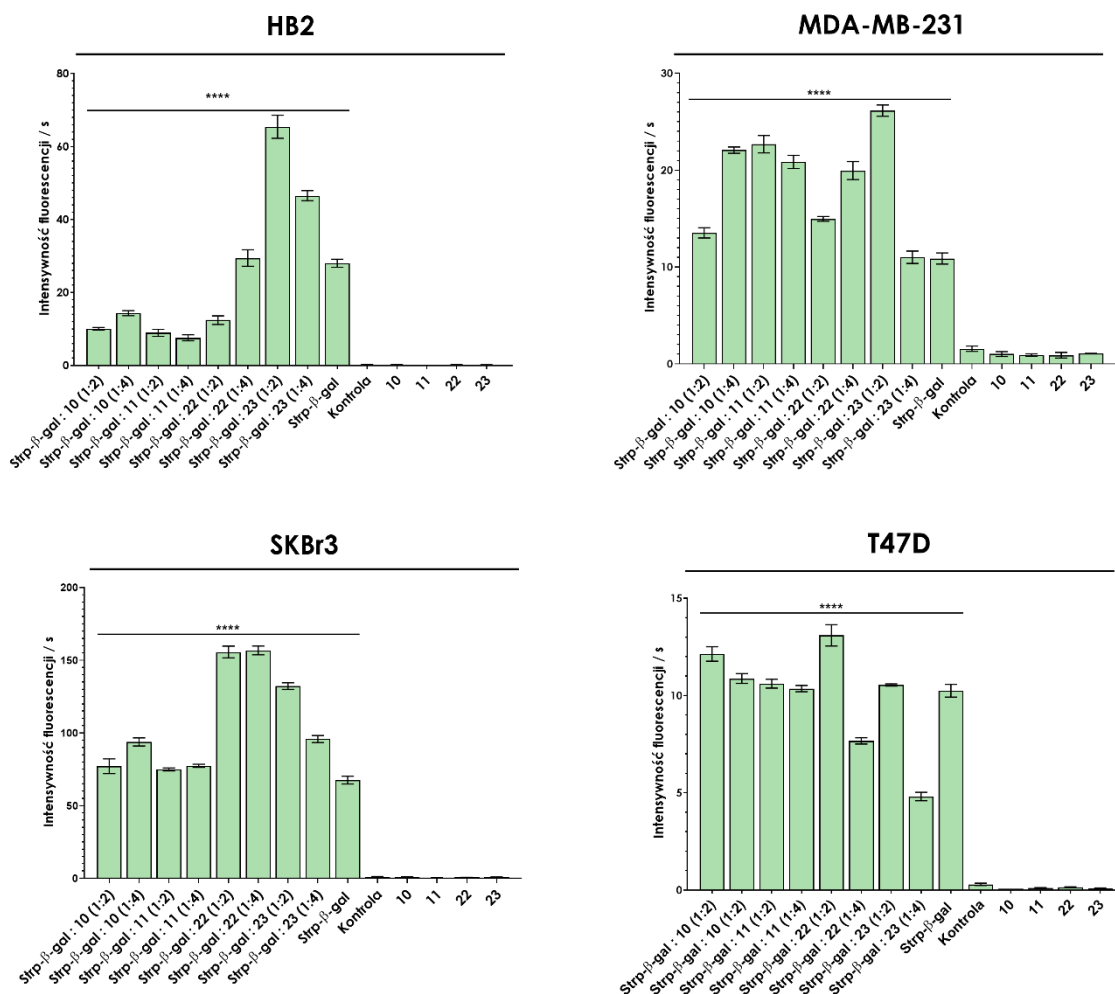


Rysunek 71. Cytotoksyczność kompleksów utworzonych pomiędzy streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą i peptydomimetykami 22, 23, 10 lub 11 inkubowanych przez 24 godziny z liniami komórkowymi: HB2, MDA-MB-231, SKBr3, T47D (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).

Opierając się na powyższych danych można stwierdzić, iż 24-godzinna inkubacja komórek linii HB2 i MDA-MB-231 z otrzymanymi kompleksami nie wpływa na ich żywotność w badanym zakresie stężeń. W przypadku komórek linii SKBr3 24-godzinna inkubacja z kompleksami zawierającymi biotynylowane peptydomimetyki ze Strp- β -gal o stężeniu 20 μ M powoduje spadek liczby komórek o około 20 % (Strp- β -gal : **22** (1:4)) oraz 30 – 40 % (Strp- β -gal : **23** (1:2, 1:4)) w porównaniu do kontroli. Cytotoksyczny efekt na poziomie około 40 % występuje wobec komórek linii T47D, z kompleksami tworzonymi zarówno przez biotynylowane związki, jak i te z wolnym *N*-końcem ($c = 20 \mu$ M).

Następnie otrzymane kompleksy poddałam inkubacji z liniami komórkowymi nowotworów piersi: MDA-MB-231, SKBr3, T47D oraz z linią komórek kontrolnych - HB2 w ciągu 24 godzin. w trzech systemach. Po tym czasie usunęłam pożywkę z komórek, przemyłam je 2-krotnie PBS i wykonałam lizę (rys. 37) przy użyciu buforu lizującego RLB (natychmiast po przemyciu PBS (t_{24}); po 2 godzinach ($t_{24 + 2}$) i następnie po 24 godzinach od przemycia komórek PBS ($t_{24 + 24}$)).

Lizę komórkową przeprowadziłam w 3 powyższych odstępach czasowych celem sprawdzenia, czy komórki są w stanie usunąć ze swego wnętrza wprowadzoną przy pomocy peptydomimetyku β -galaktozydazę. Ponadto zastosowanie trzech punktów czasowych umożliwiło ocenę czy obserwowana aktywność enzymatyczna nie jest efektem adsorpcji β -galaktozydazy na błonie komórkowej. W kolejnym kroku określiłam aktywność enzymatyczną powyższego enzymu w każdym z badanych systemów przy użyciu substratu β -D-galaktopiranozydu rezorufiny. W trakcie eksperymentu wykonywałam pomiar przyrostu fluorescencji pochodzącej od wolnej rezorufiny. Eksperyment przeprowadziłam również w analogiczny sposób z peptydomimetykami niezawierającymi biotyny na *N*-końcu – związkami **10** oraz **11**. W doświadczeniu zastosowałam dwie próby kontrolne, w jednej z nich były same komórki, w drugiej zaś komórki inkubowane z Strp- β -gal. Dodatkowo sprawdziłam wpływ obecności samych peptydomimetyków na aktywność enzymu. Otrzymane wyniki przedstawiające przyrost fluorescencji pochodzącej od rezorufiny powstałej po hydrolizie enzymatycznej substratu β -D-galaktopiranozydu rezorufiny zamieściłam na poniższych wykresach (rys. 72, 73, 74).

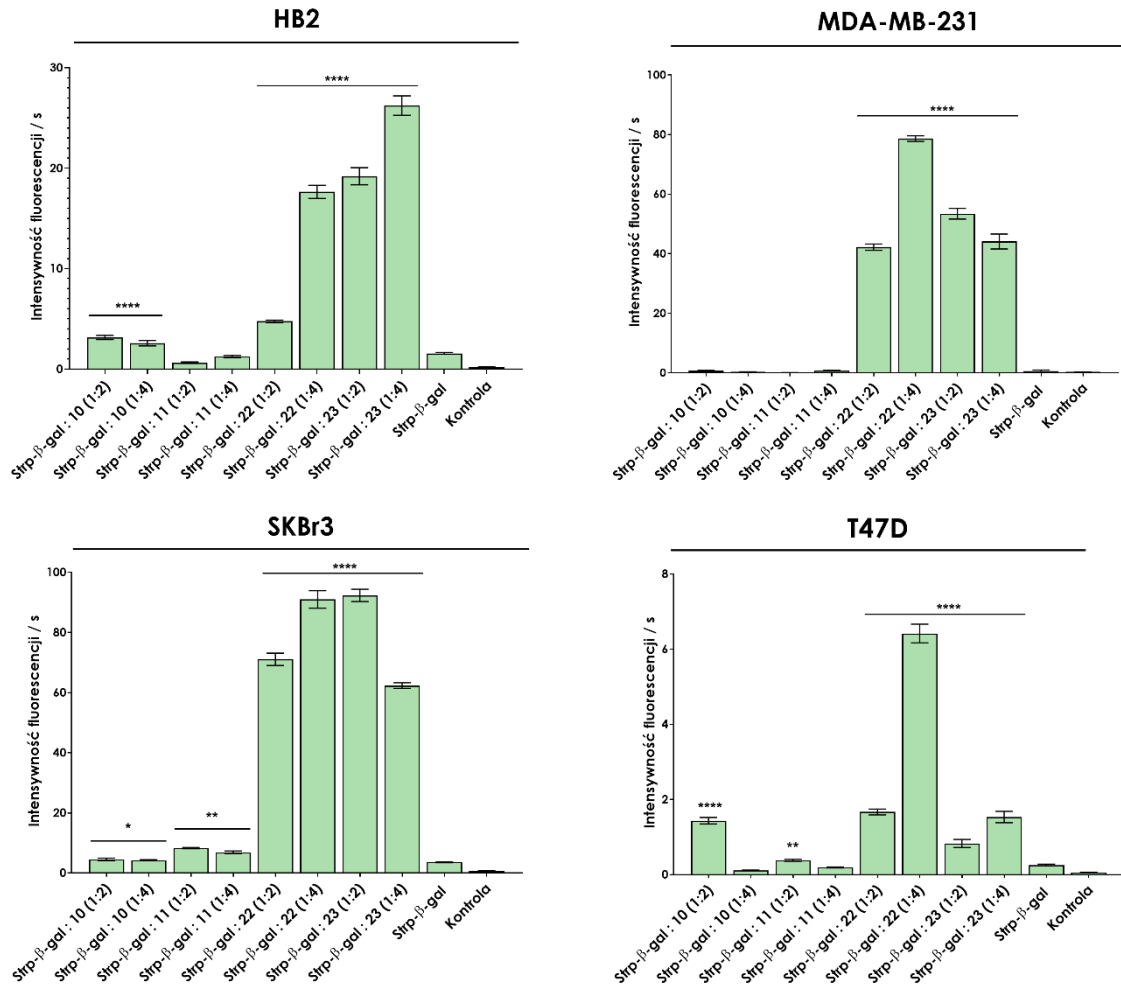


Rysunek 72. Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy w lizatach poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i od razu poddane lizie (t_{24}) (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA:

**** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 3$).

Po 24-godzinnej inkubacji komórek z utworzonymi kompleksami aktywność β -galaktozydazy jest wielokrotnie wyższa niż w przypadku komórek bez dodatku związków. Jednakże aktywność enzymatyczną obserwujemy również w próbce kontrolnej (inkubacja komórek z samą Strp- β -gal). Może to być spowodowane tym, że cząsteczki koniugatu w pewnym stopniu osadzają się na błonie komórkowej lub z nią oddziałują. W przypadku linii nowotworowych: MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D nie widać znacznej różnicy w aktywności enzymu pomiędzy próbkami zawierającymi kompleksy utworzone przez peptydomimetyki zawierające biotynę (**22** i **23**), a tymi gdzie zastosowałam białko z związkami **10** i **11**. Może to wynikać z wcześniej już opisanych możliwych oddziaływań β -galaktozydazy z membraną cytoplazmatyczną.

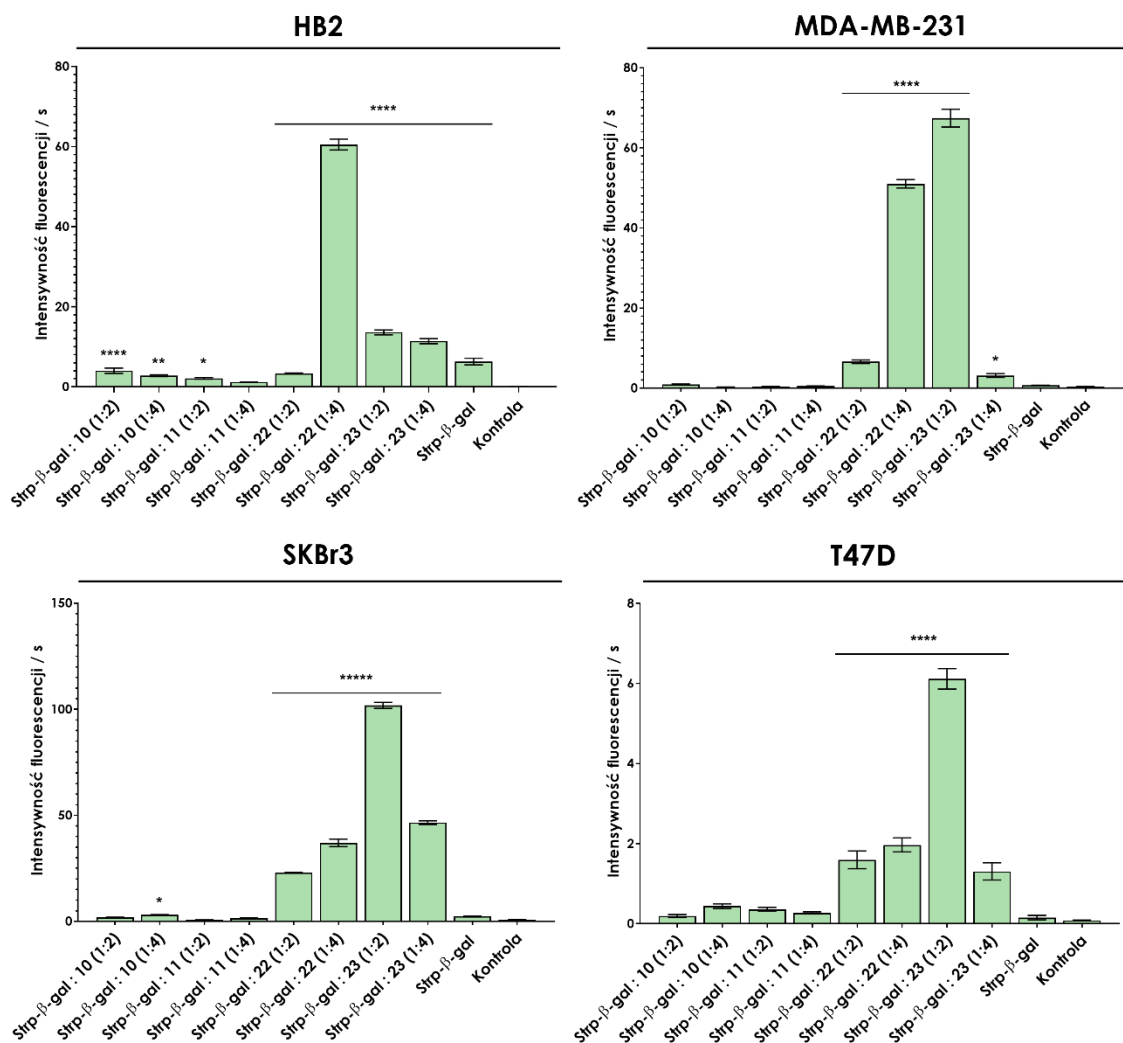
Wzrost intensywności fluorescencji w czasie zauważalny jest zwłaszcza w próbce zawierającej kompleksy utworzone przy udziale biotynylowanych związków (szczególnie w kompleksie Strp- β -gal : 23 w stechiometrii 1:2) w przypadku linii zdrowych komórek – HB2 (rys. 71).



Rysunek 73. Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy w lizatach poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i po kolejnych 2 godzinach poddane lizie (t_{24+2}) (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 3$).

Wyniki zamieszczone na rysunku 73 wskazują, iż wymiana medium po 24 godzinach inkubacji na świeże i pozostawienie hodowli komórkowej na kolejne 2 godziny w 37 °C (w warunkach 5 % CO₂), po których następnie przeprowadziłam lizę komórkową wpływa na zmianę stopnia aktywności enzymu w porównaniu do systemu t_{24} . Poziom intensywności fluorescencji w obu próbach kontrolnych (sama Strp- β -gal i same komórki) wszystkich badanych linii komórkowych jest porównywalny. Jednym

z powodów może być oddysocjowanie się oddziałującego z błoną cytoplazmatyczną koniugatu Strp- β -gal, który kolejno podczas płukania komórek roztworem PBS był wmywany. Wyniki przedstawione na powyższych wykresach wskazują także na niską aktywności enzymu w układach zawierających mieszaniny peptydomimetyków z wolnym *N*-końcem (**10**, **11**) oraz Strp- β -gal. Znaczny wzrost intensywności fluorescencji pochodzącej od rezorufiny obserwowany jest w lizatów komórkowych, które inkubowane były z kompleksami utworzonymi pomiędzy biotynylowanymi peptydomimetykami, a streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą. Owa zależność odpowiada wszystkim badanym liniom komórkowym i wskazuje na to, iż związki **22** i **23** są zdolne do przenoszenia do wnętrza komórek białek aktywnych enzymatycznie.



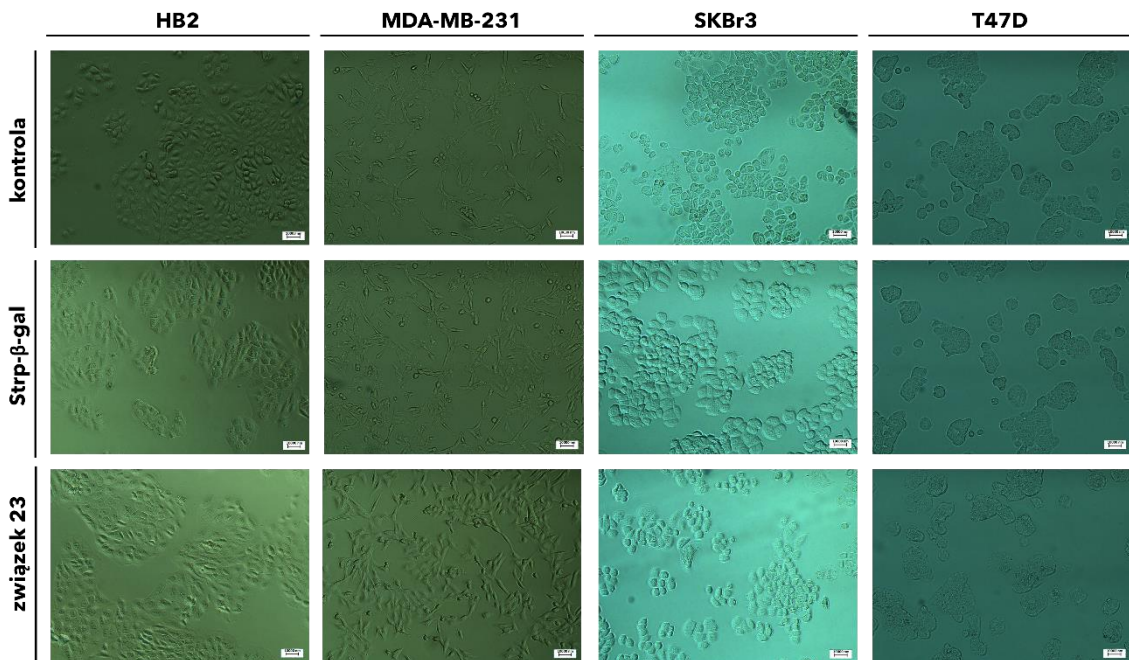
Rysunek 74. Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy w lizatach poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i po kolejnych 24 godzinach poddane lizie (t_{24+24}) (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 3$).

Wyniki aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy przedstawione na rysunku 74 prezentują się podobnie, jak w przypadku systemu t_{24+2} . Analizując wykresy przedstawione na rysunkach 72 i 73 (odpowiednio systemy t_{24+2} i t_{24+24}) zauważyć można, iż między innymi w przypadku linii HB2 inkubowanej z kompleksem Strp- β -gal : **22** w stosunku 1:4 aktywność enzymatyczna β -galaktozydazy jest wyższa po pozostawieniu komórek do 24-godzinnej inkubacji ze świeżym medium niż po 2-godzinach. Trudno jest określić jednoznaczną przyczynę tego zjawiska, jednak może ono wynikać z tego, iż wzrost aktywności enzymu lizosomalnego, jakim jest β -galaktozydaza związany jest z procesami starzenia komórki. Jego obecność została zaobserwowana w starzeniu naturalnym, czyli replikacyjnym oraz w starzeniu przyspieszonym, jednak wzrost aktywności β -galaktozydazy może występować również w przypadku, zbyt dużej konfluencji hodowli komórkowej [172]. Zatem prawdopodobne jest, iż przetransportowane do wnętrza komórek kompleksy wpływają na ich procesy starzeniowe lub powodują zwiększoną konfluencję, jednak żeby odpowiedzieć na to pytanie, należałoby wykonać szereg dodatkowych badań w tym test na proliferację. Na podstawie wszystkich powyższych wykresów dotyczących wzrostu aktywności β -galaktozydazy we wnętrzu komórek stwierdzić mogę, iż tworzą się kompleksy pomiędzy Strp- β -gal, a biotynylowanymi peptydomimetykami w stosunku molowym 1:2 oraz 1:4, które następnie przenikają do wnętrza komórek linii HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D. Biotynylowane peptydomimetyki **22** i **23** wydajnie transportują białko do wnętrza komórek, a β -galaktozydaza nie traci swojej aktywności enzymatycznej.

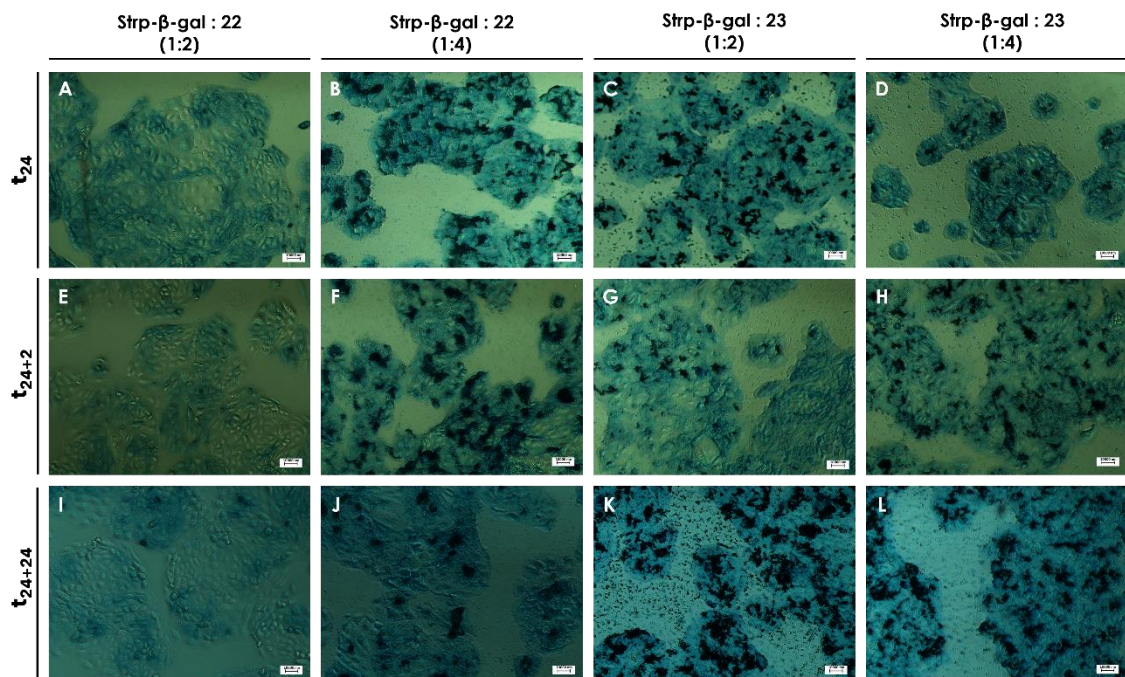
10.4.1. Badanie obecności β -galaktozydazy we wnętrzu komórek

Powyższy eksperyment dowiódł, że w wyniku inkubacji peptydomimetyków **22** lub **23** ze streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą obserwujemy wzrost aktywności enzymatycznej β -gal wewnątrz badanych linii komórkowych. Dodatkowo postanowiłam przeprowadzić test potwierdzający transport enzymu do wnętrza komórek. Podczas eksperymentu wykorzystałam bezbarwny odczynnik X-gal, który jest hydrolizowany przez transportowany enzym - β -galaktozydazę, w wyniku czego wewnątrz komórek widoczny jest pod mikroskopem świetlnym niebieski osad

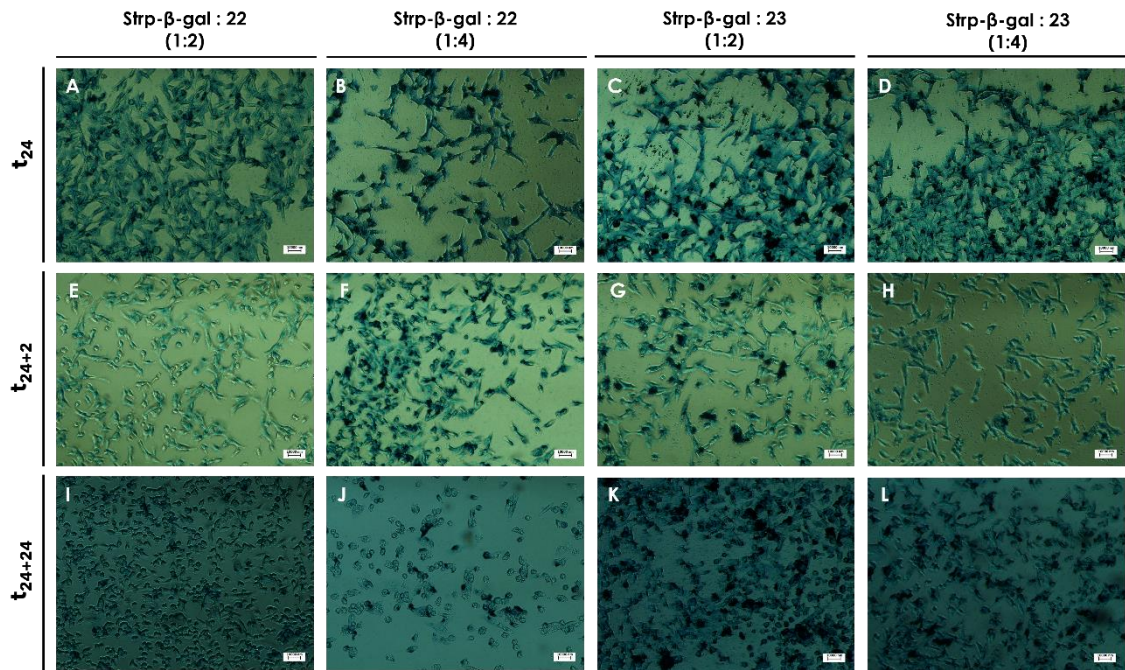
pochodzący od związku 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indygo. Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia otrzymane przy użyciu mikroskopu świetlnego (rys. 75 – 79).



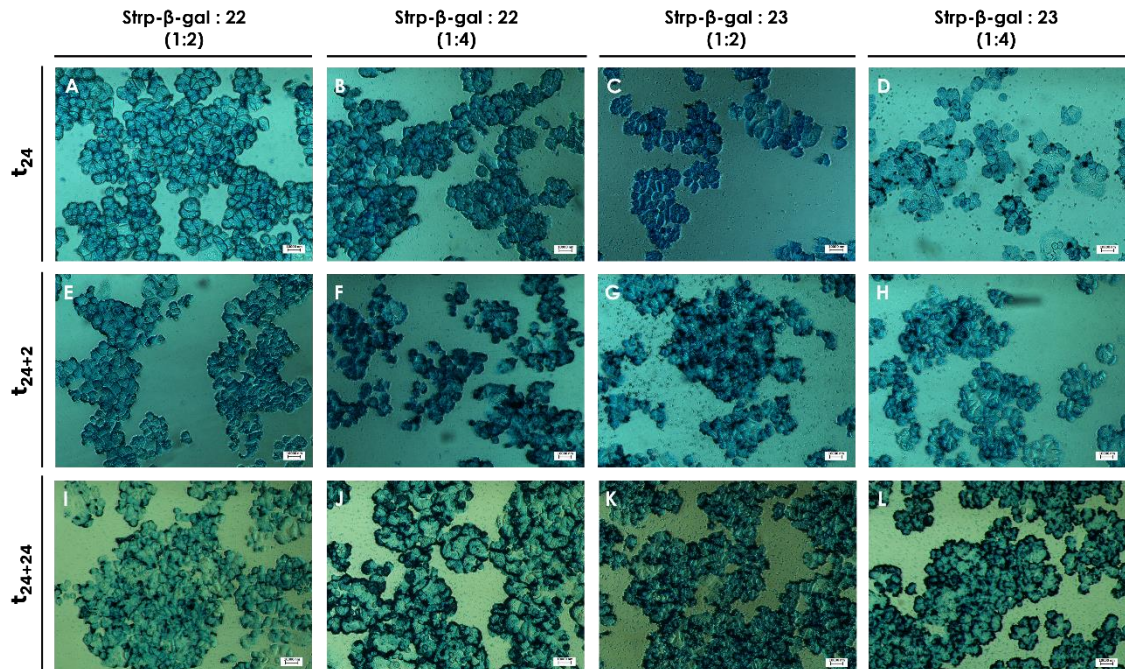
Rysunek 75. Komórki linii HB2, MDA-MB-231, SKBr3 i T47D widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy. Próba kontrolna oraz komórki inkubowane z dodatkiem Strp-β-gal lub związkiem 23 w ciągu 24 godzin.



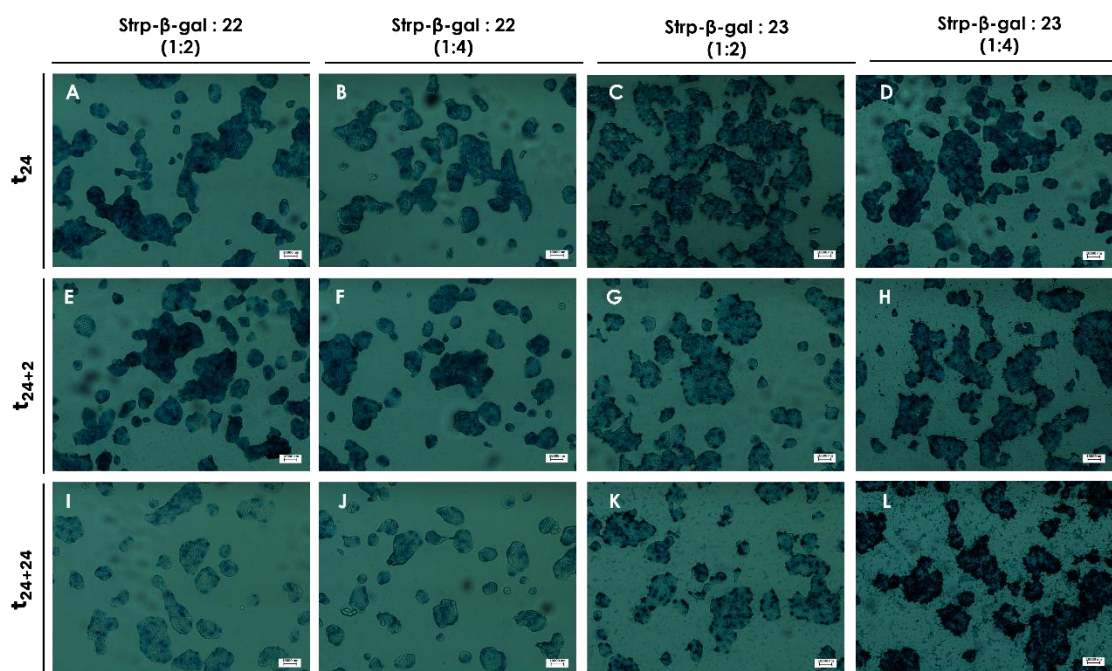
Rysunek 76. Komórki HB2 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24 godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t₂₄, E, F, G, H – t₂₄₊₂, I, J, K, L – t₂₄₊₂₄.



Rysunek 77. Komórki MA-MB-231 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t₂₄, E, F, G, H – t₂₄₊₂, I, J, K, L – t₂₄₊₂₄.



Rysunek 78. Komórki SKBr3 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t₂₄, E, F, G, H – t₂₄₊₂, I, J, K, L – t₂₄₊₂₄.



Rysunek 79. Komórki T47D widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β -galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp- β -gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp- β -gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp- β -gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp- β -gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t_{24} , E, F, G, H – t_{24+2} , I, J, K, L – t_{24+24} .

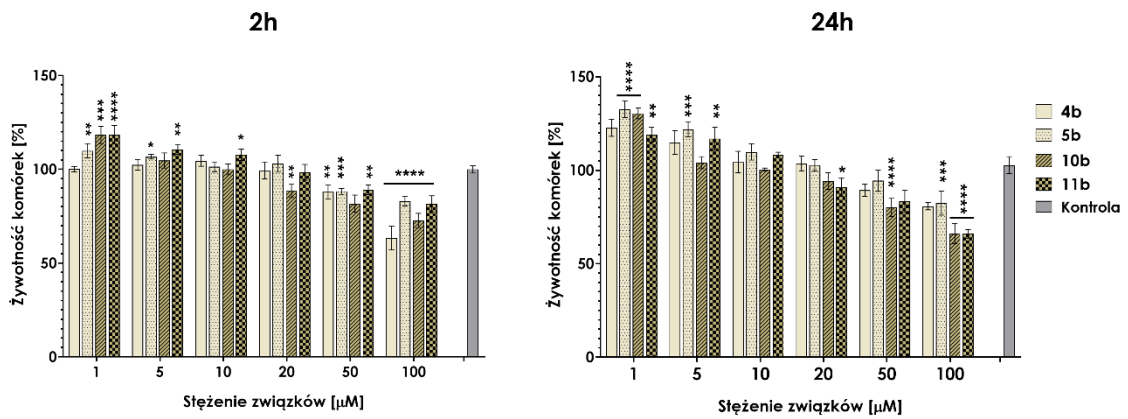
Powyższe rysunki (rys. 76 – 79) jednoznacznie wskazują na obecność aktywnego enzymu wewnątrz komórek użytych linii komórkowych. Porównanie komórek nietraktowanych mieszaniną peptydomimetyk : streptawidyna skoniugowana z β -galaktozydazą do komórek inkubowanych z kompleksem uwidacznia znaczne zaciemnienia pochodzące od produktu rozpadu enzymatycznego substratu X-gal. Efekt ten jest widoczny niezależnie od linii komórkowej i zastosowanego biotynylowanego peptydomimetyku. Inkubacja z samym białkiem lub peptydomimetykiem pozbawionym biotyny nie powoduje tego efektu (rys. 75). Pozwala to na jednoznaczne stwierdzenie, że kompleks efektywnie pokonał błonę komórkową i wielokrotnie zwiększył stężenie enzymu w komórce. Szczegółowa lokalizacja aktywnej formy enzymu wymaga dalszych pogłębionych badań komórkowych, w których wybarwione zostaną wszystkie istotne organelle komórkowe i dopiero dysponując tymi danymi będzie możliwe określenie ilości/stopnia w jakim kompleks wiąże się z błoną komórkową oraz innymi strukturami wewnątrz komórki.

11. Zdolności przenikania przez błonę komórkową zsyntezowanych peptydomimetyków wobec pozostałych linii komórkowych

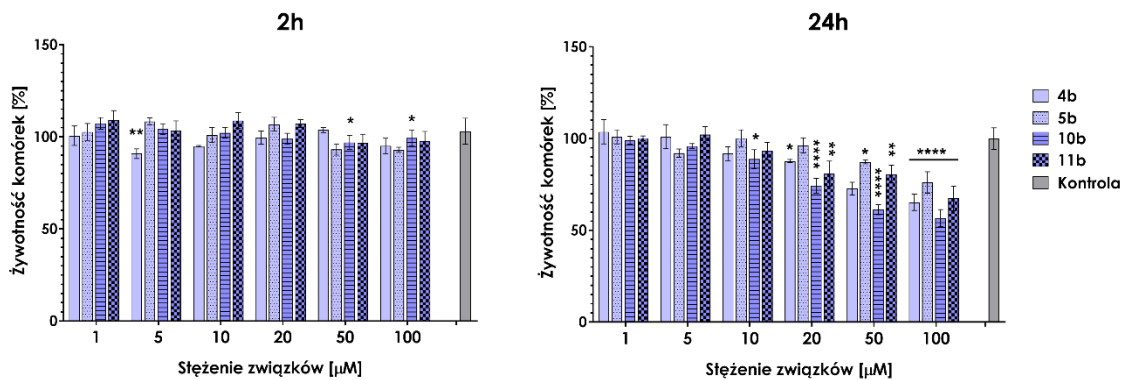
W ostatnim etapie realizacji pracy doktorskiej postanowiłam ocenić zdolność penetracji błon cytoplazmatycznych przez zsyntezowane peptydomimetyki na dodatkowym panelu linii komórkowych oraz na komórkach pierwotnych. W tym celu wybrałam tylko te związki, które najefektywniej wnikały do wnętrza komórek, czyli zawierające 6 lub 8 ugrupowań guanidynowych w sekwencji.

11.1. Cytotoksyczność peptydomimetyków względem badanych linii komórkowych

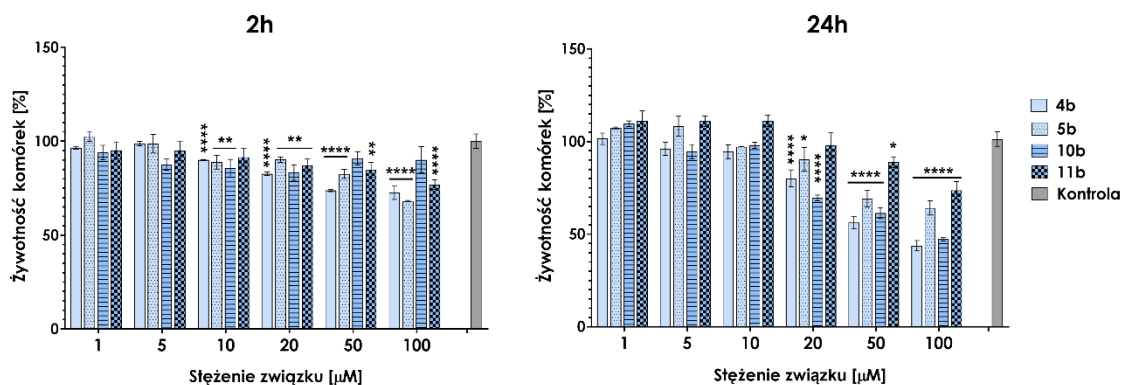
Przeprowadziłam testy oceny cytotoksyczności Mtt peptydomimetyków wobec wszystkich opisanych poniżej linii komórkowych (piersi, pęcherza moczowego, skóry, makrofagów białaczki mysiej oraz podocytów szczurzych) jednak w rozdziale tym zaprezentuję jedynie wybrane wyniki. W celu wykonania testu Mtt komórki pierwotne HDFa, komórki linii MEL-CLS-2, HS-695T inkubowałam ze związkami **4b**, **5b**, **10b** oraz **11b**. Natomiast komórki linii RAW 264.7 inkubowałam z peptydomimetykami numer **10b** i **11b**. Stężenie związków w studni wynosiło 1, 5, 10, 20, 50 oraz 100 μM . Podczas większości eksperymentów wykonywanych na liniach komórkowych stężenie używanych peptydomimetyków wynosiło 10 μM . Analizując poniższe wykresy, zauważyć można, iż takie stężenie związków nie jest toksyczna dla żadnej z testowanych linii komórkowych. Dopiero 50 μM oraz 100 μM ich stężenie w pożywce może przyczyniać się do obniżonej żywotności komórek. Widoczne jest to zwłaszcza po 24-godzinnej inkubacji wobec większości badanych linii. Niższe stężenie dodawanych związków, to jest 1 μM , może powodować wzrost namnażania komórek. Poniżej przedstawiłam wykresy będące wynikiem przeprowadzonych testów oceniających cytotoksyczność (MTT) zsyntezowanych peptydomimetyków (rys. 80 – 83).



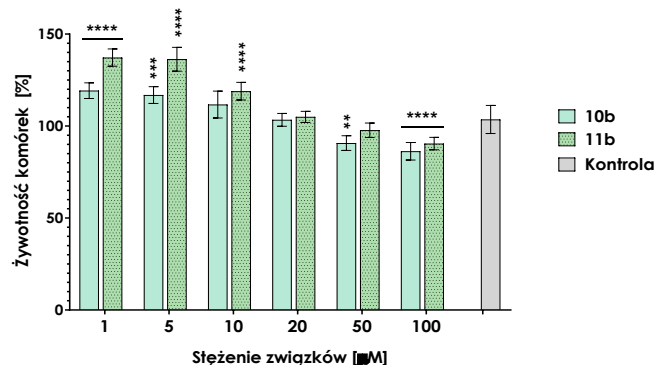
Rysunek 80. Cytotoksyczność związków **4b**, **5b**, **10b** i **11b** wobec linii komórkowej HDFa po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).



Rysunek 81. Cytotoksyczność związków **4b**, **5b**, **10b** i **11b** wobec linii komórkowej MEL-CLS-2 po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).



Rysunek 82. Cytotoksyczność związków **4b**, **5b**, **10b** i **11b** wobec linii komórkowej HS-695T po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).

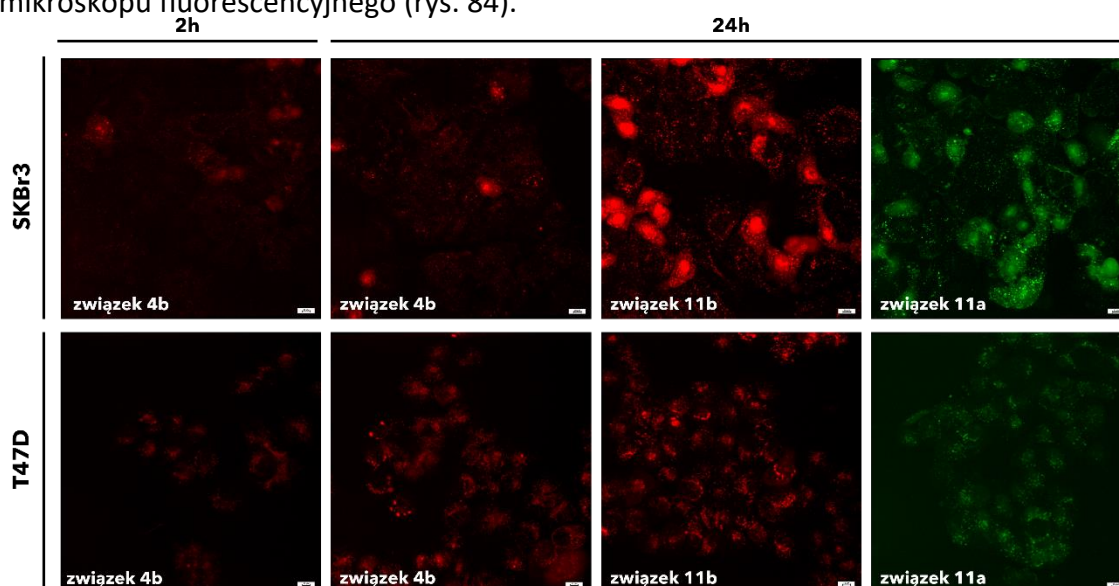


Rysunek 83. Cytotoksyczność związków **10b** oraz **11b** wobec linii komórkowej RAW 264.7 po 24 – godzinnej inkubacji (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 6$).

11.2. Ocena właściwości penetrujących związków wobec błon cytoplazmatycznych – obserwacje mikroskopowe

11.2.1. Linie komórkowe nowotworu piersi: SKBr3 i T47D

Linie komórkowe SKBr3 oraz T47D inkubowałam ze związkami: **4b**, **5b**, **10a**, **10b**, **11a**, **11b** o stężeniu 10 μ M w studni przez 2 oraz 24 godziny. Podczas 2-godzinnej inkubacji z komórkami linii SKBr3 jedynie peptydomimetyk **4b** jest w stanie wnikać w niewielkim stopniu do ich wnętrza, zaś w przypadku linii T47D zdolności penetrujące po tym czasie wykazuje także związek **5b**. 24-godzinna inkubacja obu powyższych linii ze wszystkimi sześcioma peptydomimetykami skutkuje ich obecnością we wnętrzu komórek (tab. 25). Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (rys. 84).

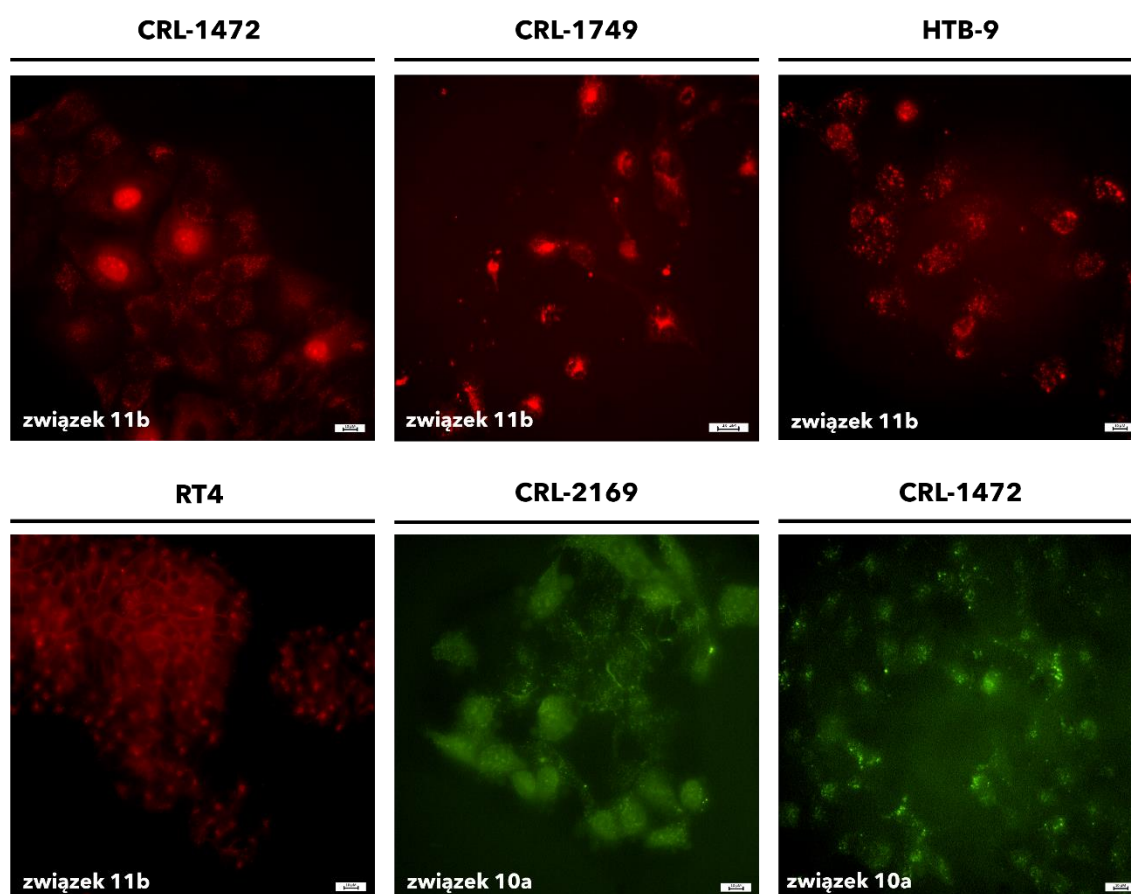


Rysunek 84. Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek SKBr3 oraz T47D, inkubowanych ze związkiem **4b** przez 2 godziny i 24 godziny oraz z peptydomimetykami **11b** i **11a** w ciągu 24 godziny.

11.2.2. Linie komórkowe pęcherza moczowego

- Linie nowotworowe: CRL-2169, CRL-1472, CRL-1749, RT4, HTB-9, HTB-4

Komórki nowotworowe pęcherza linii CRL-2169, CRL-1472, CRL-1749, RT4, HTB-9 oraz HTB-4 inkubowałam ze związkami: **4a**, **5a**, **5b**, **10a** i **11b** o stężeniu 10 μ M w studni przez 2 oraz 24 godziny. Wszystkie poddane badaniu peptydomimetyki już po 2-godzinnej inkubacji z komórkami zdolne są do penetracji błon cytoplazmatycznych badanych linii w takim samym stopniu, jak przy 24 godzinnej inkubacji (tab. 25). Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia mikroskopowe (rys. 85).

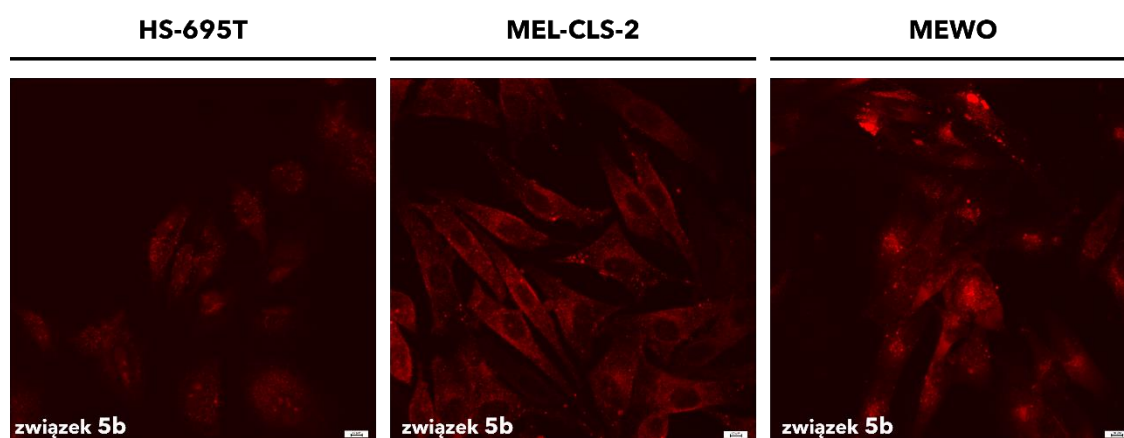


Rysunek 85. Obraz komórek widzianych pod mikroskopem fluorescencyjnym inkubowanych przez 2 godziny ze związkiem **11b** (linie CRL-1472, CRL-1749, HTB-9, RT4) oraz z peptydomimetykiem **10a** (linie CRL-2169, HTB-4).

11.2.3. Linie komórkowe skóry

- Linie nowotworowe: HS-695T, MEL-CLS-2, MEWO

Powyższe linie komórkowe inkubowałam ze związkami: **4b**, **5b**, **10b**, **11a**, **11b** o stężeniu 10 μM w studni przez 24 godziny. Po tym czasie wszystkie wymienione związki są w stanie wnikać do wnętrza komórek. Najskuteczniej przebiega to w przypadku linii: HS-695T dla związku **4b** i **11b**; MEL-CLS-2 i MEWO dla peptydomimetyków **5b** oraz **11b** (tab. 25). Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia mikroskopowe potwierdzające zdolności penetrujące zsyntezowanych związków (rys. 86).



Rysunek 86. Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek HS-695T, MEL-CLS-2 oraz MEWO inkubowanych przez 24 godziny ze związkiem 5b.

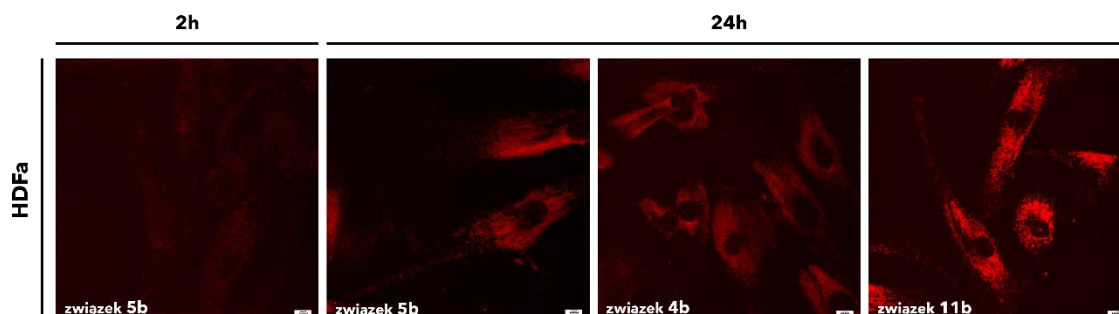
- Linia HaCaT

Komórki linii HaCaT to jedyna badana przeze mnie linia, gdzie 24-godzinna inkubacja komórek z najefektywniej penetrującymi związkami, których stężenie w studni wynosiło 10 μM nie skutkowało obecnością peptydomimetyków w ich wnętrzu (tab. 25).

- Komórki pierwotne HDFa

Komórki pierwotne HDFa (pasaż 18) inkubowałam przez 2 oraz 24 godziny ze związkami: **4b**, **5b**, **10b**, **11a**, **11b** o stężeniu 10 μM w studni. Wszystkie wymienione peptydomimetyki po 24 godzinach były w stanie wnikać do wnętrza komórek (tab. 25). W przypadku 2-godzinnej inkubacji zauważyć można, iż jedynie związki

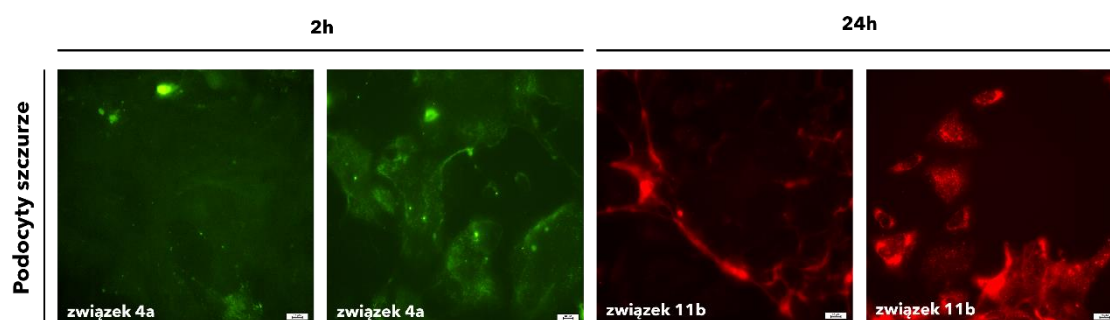
zawierające w sekwencji 8 ugrupowań guanidynowych w niewielkim stopniu zdolne są do penetracji błon biologicznych. Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia mikroskopowe (rys. 87).



Rysunek 87. Zdjęcia wykonane przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek HDFa inkubowanych przez 2 godziny oraz 24 godziny ze związkiem **5b**, a także przez 24 godziny z peptydomimetykiem **4b** i **11b**.

11.2.4. Podocyty szczurze

Podocyty szczurze inkubowałam ze związkami: **4a**, **10a**, **10b**, **11a**, **11b** przez 2 oraz 24 godzin. Już po krótszym czasie inkubacji zaobserwować można obecność badanych peptydomimetyków we wnętrzu określonych struktur komórkowych, lecz najefektywniej penetracja zachodzi podczas 24-godzinnej inkubacji (tab. 25). Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia mikroskopowe (rys. 88).



Rysunek 88. Obraz uzyskany przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego podocytów szczurzych inkubowanych przez: 2 godziny ze związkiem **4a** oraz 24 godziny ze związkiem **11b**.

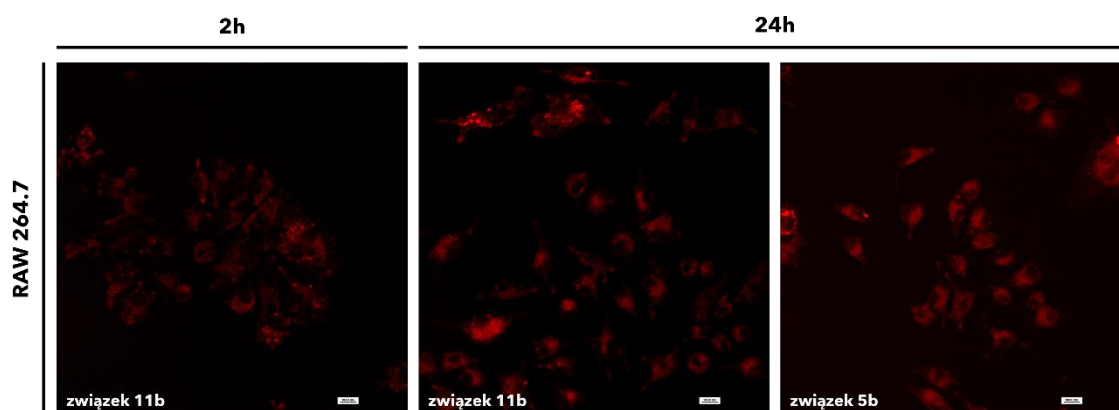
11.2.5. Makrofagi białaczki mysiej

- Linia RAW 264.7

Komórki linii RAW 264.7 poddałam 2- oraz 24-godzinnej inkubacji ze związkami **5b**, **10a**, **11a**, **11b**, których stężenie w studni wynosiło 10 μ M.

W efekcie zobserwowałam zwiększającą się wraz z upływem czasu (2h i 24 h) fluorescencję w obszarze emisji charakterystycznym dla rodaminy, co stanowiło potwierdzenie obecności znakowanego związku wewnątrz komórek.

Szczegółowa analiza lokalizacji wewnątrzkomórkowej wskazuje, że większość związku znajduje się w cytozolu a nie w jądrze komórkowym (tab. 25). Poniżej przedstawiłam wybrane zdjęcia mikroskopowe (rys. 89).



Rysunek 89. Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek RAW 264.7 inkubowanych przez: 2 godziny oraz 24 godziny ze związkiem **11b**, a także przez 24 godziny ze związkiem **5b**.

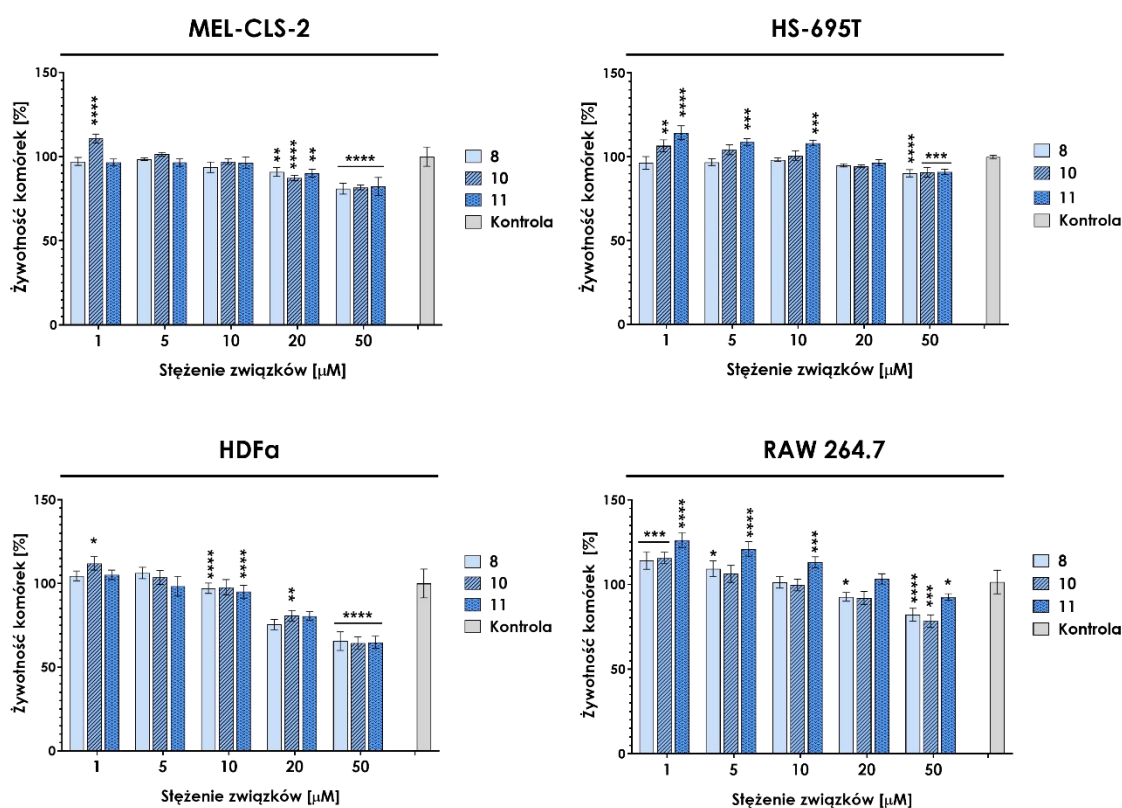
Tabela 25. Zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne peptydomimetyków oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja określona na podstawie badań z udziałem poszczególnych linii komórkowych.

Linia komórkowa	Związek							
	4a	4b	5a	5b	10a	10b	11a	11b
SKBr3	bd	++ jądro	bd	++ jądro	bd	+++ jądro		
T47D						++ jądro		
CRL-1472	+ jądro	bd	+ jądro			bd	+ jądro	
CRL-1749	++ jądro		++ jądro				++ jądro	
HTB-9			++ jądro				++ jądro	
RT-4			++ jądro				++ jądro	
CRL-2169	+++ jądro		+++ jądro				+++ jądro	
CRL-1472	++ jądro	++ jądro			++ jądro			
HS-695t	bd	++ jądro	bd	++ jądro	bd	bd	++ jądro	
MEL-CLS-2		+++ cytoplazma		+++ cytoplazma			+++ cytoplazma	
Mewo		+ jądro		+ jądro			+ jądro	
HDFa		+++ cytoplazma		+++ cytoplazma			+++ cytoplazma	
HaCaT	-							
RAW 264.7	bd		+ jądro	bd	+ jądro	bd	+ jądro	
Podocyty szczurze	++ cytoplazma	bd			++ cytoplazma			

bd – brak danych

11.3. Wpływ peptydomimetyków na proliferację komórek

W kolejnym etapie, postanowiłam przeprowadzić test oceny proliferacji komórek w obecności wybranych peptydomimetyków. Powyższe wyniki z przeprowadzonych testów MTT dowodzą, iż inkubacja komórek linii MEL-CLS-2, HS-695T, RAW 264.7 oraz HDFa z niższym stężeniem peptydomimetyków (1 μM) powoduje wzrost absorbancji mierzonego spektrofotometrycznie barwnego formazanu. Postanowiłam sprawdzić, czy jest to spowodowane zwiększoną liczbą namnożonych komórek w stosunku do kontroli, czy powodem może być zwiększona praca dehydrogenazy mitochondrialnej rozkładającej sól MTT do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. W tym celu wykonałam test oceny proliferacji komórek stosując odczynnik EdU. Badania przeprowadziłam na następujących liniach komórkowych: MEL-CLS-2, HS-695T, RAW 264.7 oraz HDFa. Wpływ peptydomimetyków na proliferację poszczególnych linii komórkowych oceniałam po 24-godzinnej inkubacji. Uzyskane wyniki przedstawiłam za pomocą poniższych wykresów (rys. 90).

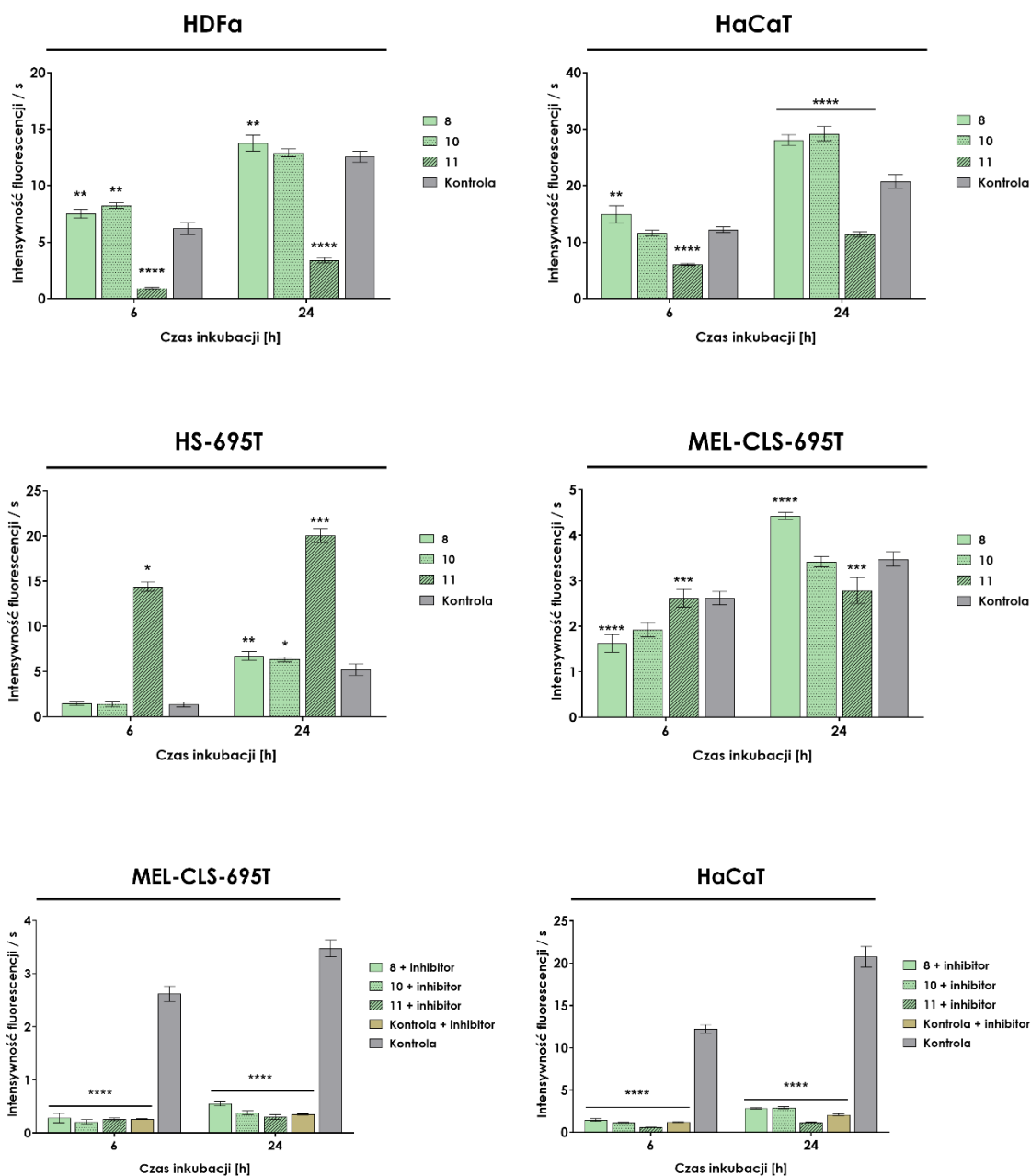


Rysunek 90. Wyniki testu CCK8 przeprowadzonego na liniach komórkowych: MEL-CLS-2, HS-695T, HDFa oraz RAW 264.7 po inkubacji z peptydomimetykami **8**, **10** oraz **11** (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 5$).

Analizując powyższe wyniki mogę stwierdzić, iż w przypadku linii MEL-CLS-2 – inkubacja komórek z testowanym związkami **10** o stężeniu 1 μM przyczynia się do niewielkiego wzrostu ilości namnożonych komórek, pozostałe związki dopiero przy stężeniu 50 μM hamują ich namnażanie. Związki inkubowane z komórkami linii HS-695T nie wpływają znacznie na spadek ilości namnożonych komórek nawet przy stężeniu 50 μM w studni. Właściwości sprzyjające proliferacji posiada peptydomimetyk **11** przedziale stężeń 1 – 10 μM . W przypadku linii HDFa wszystkie badane związki inkubowane w roztworze związku o stężeniu 1 μM wpływają na wzrost ilości komórek, właściwości te maleją wraz ze wzrostem ich stężenia w studni (peptydomimetyk **8** w stężeniu 5 μM wpływa najefektywniej na namnażanie komórek). Inkubacja komórek z peptydomimetykami w stężeniu 50 μM powoduje 30 – 40 % zmniejszenie przeżywalności komórek w stosunku do próby kontrolnej. Peptydomimetyki inkubowane z komórkami linii RAW 264.7 o stężeniu 1 μM i 5 μM w studni powodują wzrost proliferacji, najbardziej widoczne jest to w przypadku związku **11**, którego dodatek nawet 50 μM nie wpływa znacząco na przeżywalność komórek. Pozostałe związki wraz ze wzrostem stężenia powodują spadek ilości namnażanych komórek.

11.4. Wpływ peptydomimetyków na aktywację kaspazy 3 w wybranych liniach komórkowych

Następnie przeprowadziłam test określający wpływ peptydomimetyków na aktywność kaspazy 3 w wybranych liniach komórkowych. Kaspazy należą do enzymów z grupy proteinaz cysteinowych, których aktywacja odpowiada za inicjację apoptozy w komórkach. Na tej podstawie postanowiłam ocenić ich aktywność enzymatyczną w komórkach linii HDFa, HaCaT, HS-695T oraz MEL-CLS-2 inkubowanych przez 6 godzin oraz 24 godziny z peptydomimetykami **8**, **10** i **11** (C = 10 μM). Uzyskane wyniki przedstawiłam na poniższych wykresach (rys. 91).



Rysunek 91. Wykresy przedstawiające aktywności kaspazy 3 w lizatach komórkowych: HDFa, HaCaT, HS-695T, MEL-CLS-2 po 6- oraz 24-godzinnej inkubacji z peptydomimetykami (średnia \pm SD). Statystyka wykonana za pomocą testu One-way ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (próbki porównane do kontroli, liczba powtórzeń $n = 3$).

Inkubacja komórek HDFa z peptydomimetykami **8** oraz **10** zarówno 6-godzinna jak i 24-godzinna nie powoduje zwiększonej aktywności kaspazy 3 w stosunku do kontroli. Jednakże zastosowanie związku **11** sprawia, że jej poziom po 6h wzrasta 6-krotnie, zaś po 24 godzinach 4-krotnie w porównaniu do próby kontrolnej. W przypadku linii HaCaT inkubacja komórek ze związkiem **11** skutkuje obniżeniem aktywności kaspazy 3. Podwyższony poziom enzymu można zaobserwować po 24-

godzinnej inkubacji z peptydomimetykami **8** oraz **10**. Inkubacja komórek linii HS-695T ze związkami **8** oraz **10** nie wpływa znacząco na działanie kaspazy 3, jednak spadek jej aktywności zauważalny jest po inkubacji komórek z peptydomimetykiem **11**. W przypadku linii MEL-CLS-2 24-godzinna inkubacja w pożywce ze związkiem **8** powoduje nieznaczny wzrost aktywności badanego enzymu. Zastosowanie inhibitora powoduje we wszystkich badanych próbkach spadek aktywności kaspaz o około 90 % (hamuje on działanie kaspazy 3, 6, 7, 8 i 10) w porównaniu do lizatów analizowanych bez dodatku inhibitora – dane przedstawione na wykresie dotyczą linii HaCaT oraz MEL-CLS-2. Na podstawie uzyskanych wstępnych wyników zauważyć można, iż aktywność kaspazy 3 różni się w zależności od użytej linii komórkowej. Związek numer 11 obniża aktywność kaspazy 3 i najprawdopodobniej hamuje pierwsze etapy apoptozy zdrowych komórek skóry linii HDF oraz w niewielkim stopniu HaCaT. Ten sam związek znacząco podwyższa aktywność badanego enzymu, tym samym aktywując wczesne etapy apoptozy linii czerniaka (HS-695T). Jednak, żeby potwierdzić powyższe wstępne wnioski wymagane jest, przeprowadzenie szerszych badań dotyczących procesu apoptozy w badanych liniach komórkowych.

V. Podsumowanie i wnioski

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej można przedstawić następująco:

1. Otrzymałam 36 peptydomimetyków.
2. Zsyntezowane peptydomimetyki przy stężeniach stosowanych do badań biologicznych (10 μ M) nie powodują cytotoksyczności wobec badanych linii komórkowych lub występuje ona w bardzo niewielkim stopniu.
3. Zsyntezowane peptydomimetyki są zdolne do przenikania przez błony komórkowe.
 - Wymiana reszt argininy na modyfikowane oksakwasy zakończone ugrupowaniem guanidynowym powoduje wzrost stopnia penetracji membran cytoplazmatycznych przez związki.
 - Zastąpienie ugrupowań guanidynowych w sekwencji peptydomimetyku na grupy - NH₂ skutkuje zmniejszeniem właściwości penetrujących wobec błon biologicznych, natomiast zastąpienie ich grupą – OH prowadzi do całkowitej utraty zdolności penetrujących związków.
 - Efektywne przenikania peptydomimetyków przez błony komórkowe jest konsekwencją ilości ugrupowań guanidynowych obecnych w ich sekwencji i przedstawia się następująco: 2, 3 grupy – brak właściwości penetrujących; 4, 5 – znikoma penetracja błon biologicznych; 6, 8 – najwyższy stopień wnikania do wnętrza komórek.
 - Zmiana konfiguracji kwasu Dap z L na D nie wpływa znacząco na zdolności peptydomimetyków do przenikania przez membrany cytoplazmatyczne.
 - Dodatek reszty Pro lub O1Pen w pozycji 7 sekwencji związku skutkuje spadkiem właściwości penetrujących wobec badanych linii komórkowych.
4. Związek numer **11** wzmagą proliferację komórek pochodzących linii HB2, MDA-MB-231, HDFa, MEL-CLS, HS-695T oraz RAW 264.7 po 24 godzinach inkubacji.
5. Peptydomimetyki numer **8**, **10** i **11** są stabilne w lizatach komórek HB2 przez co najmniej 24 godziny zarówno w środowisku kwasowym jak i w obojętnym.

W lizatach pochodzących linii MDA-MB-231 w buforze o pH 7,0 związki **8**, **10** i **11** ulegają stopniowemu rozkładowi po 14 godzinach, natomiast w buforze o pH 5,0 pozostają stabilne przez co najmniej 24 godziny.

6. Związki numer **8**, **10** oraz **11** podczas 24-godzinnej inkubacji z komórkami linii HB2 i MDA-MB-231 nie wpływają znacząco na przebieg ich cyklu komórkowego.
7. Zsyntezowane peptydomimetyki podczas wnikania do wnętrza komórek stosują mieszany mechanizm penetracji błon biologicznych. W pewnym stopniu wykorzystują makropinocytózę oraz endocytózę zależną od klatryn.
8. Peptydomimetyki zawierające w sekwencji ugrupowania guanidynowe oddziałują z kwasami nukleinowymi.
 - Siła oddziaływań związków z DNA (ssDNA, dsDNA) rośnie wraz z ilością grup guanidynowych zawartych w peptydomimetykach (związek numer: **8** < **10** < **11**).
 - Zastąpienie grup guanidynowych w peptydomimetykach grupami – NH₂ oraz – OH skutkuje znacznym zmniejszeniem siły tworzących się oddziaływań lub brakiem powstawania kompleksów.
 - Związki **8**, **10** oraz **11** powodują kondensację plazmidowego DNA tworząc zapętlone struktury, których złożoność i zwartość zwiększają się wraz ze wzrostem liczby ugrupowań guanidynowych obecnych w badanych peptydomimetykach.
9. Peptydomimetyki **8**, **10** i **11** mogą zostać wykorzystane jako środki transfekcyjne, jednak transfekcja plazmidu p_{max}GFP najefektywniej zachodzi podczas użycia związku nr **10**.
10. Inkubacja biotynylowanych peptydomimetyków (**22** i **23**) ze streptawidyną prowadzi do utworzenia się pomiędzy nimi kompleksów.
 - Kompleks FAM-Strep : biotynylowany peptydomimetyk (**22** / **23**) wnika do wnętrza komórek linii HB2, MDA-MB-231, SKBr3 i T47D.
 - Kompleks streptawidyna-β-galaktozydaza : biotynylowany peptydomimetyk (**22** / **23**) efektywnie penetruje błony cytoplazmatyczne komórek linii HB2,

MDA-MB-231, SKBr3 i T47D i skutkuje wzrostem aktywności B-galaktozydazy we wnętrzu komórek.

11. Związki numer 10a, 10b oraz 11a, 11b wnikają do wnętrza badanych linii komórkowych piersi, pęcherza, skóry (oprócz HaCaT), podocytów szczurzych oraz makrofagów białaczki mysiej.
12. Związek numer **11** powoduje znaczny wzrost aktywności kaspazy 3 po 6 oraz 24 godzinach inkubacji z komórkami linii HDFa, natomiast w przypadku linii HS-695T nie obserwujemy wzrostu poziomu omawianego enzymu.

VI. Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

- Magdalena Wysocka, Anita Romanowska, Natalia Gruba, Michalina Michalska, Artur Giełdoń, Adam Lesner, A peptidomimetic fluorescent probe to detect the trypsin β 2 subunit of the human 20S proteasome, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2396 (2020).
- Anita Romanowska, Katarzyna Węgrzyn, Katarzyna Bury, Emilia Sikorska, Aleksandra Gnatek, Agnieszka Piwkowska, Igor Konieczny, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, Novel cell permeable polymers of *N*-substituted L-2,3-diaminopropionic acid (DAPEGs) and cellular consequences of their interactions with nucleic acids, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2571 (2021).
- Natalia Gruba, Anita Romanowska, Wiktoria Rejmak, Honorata Sikora, Magdalena Wysocka, Adam Lesner, Monitorowanie aktywności proteolitycznej jako element diagnostyki chorób cywilizacyjnych, *Wiadomości chemiczne*, 76, 335-347 (2022).

Oryginalne prace naukowe opublikowane w sprawozdaniach zjazdowych

- Magdalena Wysocka, Anita Romanowska, Irena Audzeyenka, Adam Lesner, Nucleus penetrating peptidomimetic synthesis and application, *Proceedings of the 35th European Peptide Symposium*, (P. Timmons, Ch. Hewage, M. Lebl, eds.), str. 158-159, Dublin, Irlandia (2018).

Komunikaty ustne na konferencjach krajowych

- Anita Romanowska, Agnieszka Piwkowska, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, Peptydy penetrujące błonę komórkową mediatorem transportu cząsteczek do wnętrza komórki, *XVII Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów "Na Pograniczu Chemii i Biologii"*, 12 – 15.05.2019, Jastrzębia Góra, Polska

Postery na konferencjach krajowych i zagranicznych

- Anita Romanowska, Magdalena Wysocka, Agnieszka Piwkowska, Adam Lesner, Projektowanie i synteza peptydomimetyków penetrujących błony komórkowe, *II Konferencja Doktorantów Pomorza "BioMed Session"*, 07.12.2018, Gdańsk, Polska
- Anita Romanowska, Magdalena Wysocka, Adam Lesner, Zdolność peptydów penetrujących błony komórkowe do lokalizowania się w jądrze komórki, *VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP*, 30.11.2019, Lublin, Polska

- Anita Romanowska, Agnieszka Piwkowska, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, Analogs of DAPEG cell permeable peptidomimetics, *25th Polish Peptide Symposium*, 08 – 12.09.2019, Wojanów, Polska
- Anita Romanowska, Dominika Wołoszyn, Michalina Michalska, Irena Audzeyenka, Natalia Gruba, Katarzyna Węgrzyn, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, Interactions of DAPEG peptidomimetics with DNA, *25th Polish Peptide Symposium*, 08 – 12.09.2019, Wojanów, Polska
- Kajetan Godziątkowski, Honorata Flemming, Anita Romanowska, Natalia Gruba, Franciszek Kasprzykowski, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, Design and synthesis of doxorubicin-DAPEG peptidomimetic conjugate, *25th Polish Peptide Symposium*, 08 – 12.09.2019, Wojanów, Polska
- Anita Romanowska, Katarzyna Węgrzyn, Katarzyna Bury, Emilia Sikorska, Agnieszka Piwkowska, Adam Lesner, Magdalena Wysocka, A new class of cell penetrating peptides and their binding affinity with nucleic acids, *17th Naples Workshop on Bioactive Peptides "Emerging peptide science in 2022"*, 16 – 18.06.2022, Neapol, Włochy

Nagrody i wyróżnienia

- Wyróżnienie Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Chemicznego (OG PTCh) za najlepszą pracę magisterską w zakresie chemii obronioną na Wydziale Chemii UG w 2018 roku.

Finansowanie projektów naukowych

Badania naukowe służące rozwojowi młodych naukowców oraz doktorantów na Wydziale Chemii UG:

- Projektowanie, synteza i badania biologiczne peptydomimetyków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego (539-8720-B310-19) – 2019.
- Określenie specyficzności substratowej proteazy 3CLpro wirusa SARS-CoV-2 (539-T070-B467-20) – 2020.
- Wpływ peptydomimetyków zawierających liczne ugrupowania guanidynowe na przebieg cyklu komórkowego linii HB2 oraz MDA-MB-231 (539-T070-B033-22) – 2021.
- Tworzenie, charakterystyka i ocena właściwości biologicznych kompleksu biotynylowanego peptydomimetyku ze streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą (539-T070-B033-22) – 2022.

VII. Literatura cytowana

- [1] J. Xu, A. R. Khan, M. Fu, R. Wang, J. Ji, G. Zhai, Cell-penetrating peptide: a means of breaking through the physiological barriers of different tissues and organs, *Journal of Controlled Release*, 309, 106-24 (2019).
- [2] Z. Kang, G. Ding, Z. Meng, Q. Meng, The rational design of cell-penetrating peptides for application in delivery systems, *Peptides*, 121, 170149 (2019).
- [3] W. Kilarski, Strukturalne podstawy biologii komórki, *Wydawnictwo Naukowe PWN*, 67 – 85, 160 – 169, Warszawa (2005).
- [4] G. L. Nicolson, The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838, 1451-66 (2014).
- [5] X. Yu, L. Sha, Q. Liu, Y. Zhao, H. Fang, Y. Cao, J. Zhao, Recent advances in cell membrane camouflage-based biosensing application, *Biosensors and Bioelectronics*, 194, 113623 (2021).
- [6] <https://www.dreamstime.com/fluid-mosaic-model-vector-illustration-cell-membrane-structure-infographic-labeled-educational-scheme-phospholipids-protein-image159015732> (dostęp: 11.10.2022).
- [7] J. Kulbacka, A. Choromańska, J. Rossowska, J. Weźgowiec, J. Saczko, M. Rols, Cell Membrane Transport Mechanisms: Ion Channels and Electrical Properties of Cell Membranes, w: *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology: Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy*, J. Kulbacka, S. Satkauskas, Springer, 39–58 (2017).
- [8] S. Ray, A. Kassan, A. R. Busija, P. Rangamani, H. H. Patel, H. H. Patel, The plasma membrane as a capacitor for energy and metabolism, *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 310, 181-92 (2016).
- [9] K. Alleva, O. Chara, G. Amodeo, Aquaporins: Another piece in the osmotic puzzle, *FEBS Letters*, 586, 2991-2999 (2012).
- [10] <https://www.wizeprep.com/online-courses/16916/chapter/3/core/3/1> (dostęp: 11.10.2022).
- [11] N. J. Yang, M. J. Hinner, Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1266, 29–53 (2015).
- [12] C. Bechara, S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *FEBS Letters*, 587, 1693-1702 (2013).
- [13] M. Mueckler, B. Thorens, The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters, *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 121-38 (2013).
- [14] J. D. Torres-Vanegas, J. C. Cruz, L. H. Reyes, Delivery systems for nucleic acids and proteins: Barriers, cell capture pathways and nanocarriers, *Pharmaceutics*, 13, 428 (2021).
- [15] J. Du, J. Jin, M. Yan, Y. Lu, Synthetic Nanocarriers for Intracellular Protein Delivery, *Current Drug Metabolism*, 13, 82-92 (2012).
- [16] A. C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, S. Reis, Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858, 2231-44 (2016).
- [17] W. Chiangjong, S. Chutipongtanate, S. Hongeng, Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application, *International Journal of Oncology*, 57, 687-96 (2020).

- [18] G. Li, Y. Huang, Q. Feng, Y. Chen, Tryptophan as a probe to study the anticancer mechanism of action and specificity of α -helical anticancer peptides, *Molecules*, 19, 12224-41 (2014).
- [19] S. Baritaki, S. Apostolakis, P. Kanellou, M. T. Dimanche-Boitrel, D. A. Spandidos, B. Bonavida, Reversal of Tumor Resistance to Apoptotic Stimuli by Alteration of Membrane Fluidity: Therapeutic Implications, *Advances in Cancer Research*, 98, 149–190 (2007).
- [20] M. Logozzi, E. Spugnini, D. Mizzoni, R. di Raimo, S. Fais, Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors, *Cancer and Metastasis Reviews*, 38, 93–101 (2019).
- [21] S. H. Wang, J. Yu, Structure-based design for binding peptides in anti-cancer therapy, *Biomaterials*, 156, 1–15, (2018).
- [22] D. Guo, Y. Liu, Y. Jiang, S. Zheng, T. Xu, J. Zhu, P. Chen, P. Huang, Y. Zhu, A narrative review of the emerging role of lymphocyte antigen 6 complex locus K in cancer: from basic research to clinical practice, *Annals of Translation Medicine*, 10, 26 (2022).
- [23] M. F. Gottardo, C. Capobianco, J. Sidabra, J. Garona, Y. Perera, S. Perea, D. Alonso, H. Farina, Preclinical efficacy of CIGB-300, an anti-CK2 peptide, on breast cancer metastatic colonization, *Scientific Reports*, 10, 14689 (2020).
- [24] H. Derakhshankhah, S. Jafari, Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 1090-96 (2018).
- [25] H. He, L. Sun, J. Ye, E. Liu, S. Chen, Q. Liang, M. Shin, V. Yang, Enzyme-triggered, cell penetrating peptide-mediated delivery of anti-tumor agents, *Journal of Controlled Release*, 240, 67–76 (2016).
- [26] A. Falanga, L. Lombardi, E. Galdiero, V. del Genio, S. Galdiero, The world of cell penetrating: The future of medical applications, *Future Medicinal Chemistry*, 12, 1431-46 (2020).
- [27] A. Borrelli, A. L. Tornesello, M. L. Tornesello, F. M. Buonaguro, Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents, *Molecules*, 23, 295 (2018).
- [28] Ü. Langel, CPP, Cell-Penetrating Peptides, *Springer*, 29-63, Singapur (2019).
- [29] S. Rehmani, J. E. Dixon, Oral delivery of anti-diabetes therapeutics using cell penetrating and transcytosing peptide strategies, *Peptides*, 100, 24–35 (2018).
- [30] L. van Oppen, J. Pille, G. Stuut, M. van Stevendaal, L. van der Vorm, J. Smeitink, W. Koopman, P. Willems, J. van Hest, R. Brock, Octa-arginine boosts the penetration of elastin-like polypeptide nanoparticles in 3D cancer models, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 137, 175–184 (2019).
- [31] C. Allolio, A. Magarkar, P. Jurkiewicz, K. Baxova, M. Javanainen, R. Sachl, P. Jungwirth, Arginine-rich cell-penetrating peptides induce membrane multilamellarity and subsequently enter via formation of a fusion pore, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115, 11923-28 (2018).
- [32] G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi, Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics, *Trends in Pharmacological Sciences*, 38, 406-24 (2017).
- [33] M. Oba, T. Kato, K. Furukawa, M. Tanaka, A Cell-Penetrating Peptide with a Guanidinyethyl Amine Structure Directed to Gene Delivery, *Scientific Reports*, 6, 19913 (2016).
- [34] A. Krichevsky, S. Kozlovsky, Y. Gafni, V. Citovsky, Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes, *Molecular Plant Pathology*, 7, 131-46 (2006).

- [35] F. Milletti, Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape, *Drug Discovery Today*, 17, 15–16 (2012).
- [36] S. Signorelli, S. Santini, T. Yamada, A. R. Bizzarri, C. W. Beattie, S. Cannistraro, Binding of Amphipathic Cell Penetrating Peptide p28 to Wild Type and Mutated p53 as studied by Raman, Atomic Force and Surface Plasmon Resonance spectroscopies, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861, 910-921 (2017).
- [37] M. Klein, S. Schmidt, P. Wadhvani, J. Burck, J. Reichert, S. Afonin, M. Berditsch, T. Schober, R. Brock, M. Kansy, A. Ulrich, Lactam-Stapled Cell-Penetrating Peptides: Cell Uptake and Membrane Binding Properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 8071-82 (2017).
- [38] D. Kalafatovic, E. Giralt, Cell-penetrating peptides: Design strategies beyond primary structure and amphipathicity, *Molecules*, 22, 1929 (2017).
- [39] E. Eiríksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798, 1119-28 (2010).
- [40] J. Váňová, A. Hejtmánková, M. Kalbáčová, H. Španielová, The utilization of cell-penetrating peptides in the intracellular delivery of viral nanoparticles, *Materials*, 12, 2671 (2019).
- [41] Y. Rao, S. J. J. Kwok, J. Lombardi, N. J. Turro, K. B. Eisenthal, Label-free probe of HIV-1 TAT peptide binding to mimetic membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111, 12684-88 (2014).
- [42] M. T. Kawczyński, J. Kreczko-Kurzawa, Z. Maćkiewicz, Peptydy penetrujące-rodzaje i mechanizmy przenikania przez błony komórkowe, *Wiadomości chemiczne*, 69, 9-33 (2015).
- [43] D. A. Simon Davis, C. R. Parish, Heparan sulfate: A ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity, *Frontiers in Immunology*, 4, 470 (2013).
- [44] S. Gerbal-Chaloin, C. Gondeau, G. Aldrian-Herrada, F. Heitz, C. Gauthier-Rouvière, G. Divita, First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling, *Biology of the Cell*, 99, 223-38 (2007).
- [45] D. Raucher, J. S. Ryu, Cell-penetrating peptides: Strategies for anticancer treatment, *Trends in Molecular Medicine*, 21, 560-70 (2015).
- [46] J. Yang, Y. Luo, M. A. Shibu, I. Toth, M. Skwarczynska, Cell-penetrating Peptides: Efficient Vectors for Vaccine Delivery, *Current Drug Delivery*, 16, 430-43 (2019).
- [47] J. Durzyńska, Ł. Przysiecka, R. Nawrot, J. Barylski, G. Nowicki, A. Warowicka, O. Musidlak, A. Goździcka-Józefiak, Viral and other cell-penetrating peptides as vectors of therapeutic agents in medicine, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354, 32-42 (2015).
- [48] D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides: Design, synthesis, and applications, *ACS Nano*, 8, 1972-94 (2014).
- [49] J. P. Lim, P. A. Gleeson, Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps, *Immunology and Cell Biology*, 89, 836-43 (2011).
- [50] X. Niu, Z. Gao, S. Qi, L. Su, N. Yang, X. Luan, J. Li, Q. Zhang, Y. An, S. Zhang, Macropinocytosis activated by oncogenic Dbl enables specific targeted delivery of tat/pDNA nano-complexes into ovarian cancer cells, *International Journal of Nanomedicine*, 13, 4895–911 (2018).
- [51] L. M. Traub, Tickets to ride: Selecting cargo for clathrin-regulated internalization, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 583-96 (2009).

- [52] H. McMahon, E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 517-33 (2011).
- [53] R. G. Parton, K. Simons, The multiple faces of caveolae, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 185-94 (2007).
- [54] S. Pescina, C. Ostacolo, M. Gomez-Monterrey, M. Sala, A. Bertamino, F. Sonvico, C. Padula, S. Nicoli, Cell penetrating peptides in ocular drug delivery: State of the art, *Journal of Controlled Release*, 284, 84–102 (2018).
- [55] S. El Andaloussi, T. Lehto, I. Mager, K. Rosenthal-Aizman, U. Langel, Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo, *Nucleic Acids Research*, 39, 3972-87 (2011).
- [56] S. Hyun, Y. Choi, H. Lee, Ch. Lee, D. Oh, D. Lee, Ch. Lee, J. Yu, Construction of histidine-containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for: In vitro and in vivo delivery of siRNAs, *Chemical Science*, 9, 3820-27 (2018).
- [57] A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: Ways to overcome endosomal entrapment, *The AAPS Journal*, 11, 13-22 (2009).
- [58] W. Liang, J. Lam, Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems, w: *Molecular Regulation of Endocytosis*, B. Ceresa, *Intech Open*, 17, 429-56, Londyn (2012).
- [59] I. Ruseska, A. Zimmer, Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 101–123 (2020).
- [60] J. R. Maiolo, M. Ferrer, E. A. Ottinger, Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1712, 161-72 (2005).
- [61] L. Soo-Jin, S. H. Yoon, K. O. Doh, Enhancement of gene delivery using novel homodimeric tat peptide formed by disulfide bond, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 802-7 (2011).
- [62] H. Liu, F. Zeng, M. Zhang, F. Huang, J. Wang, J. Guo, Ch. Liu, H. Wang, Emerging landscape of cell penetrating peptide in reprogramming and gene editing, *Journal of Controlled Release*, 226, 124-137 (2016).
- [63] B. Kim, H. Kang, K. Doh, S. Lee, J. Park, S. Lee, T. Lee, Homodimeric SV40 NLS peptide formed by disulfide bond as enhancer for gene delivery, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 5415–18 (2012).
- [64] J. Zaro, W. Shen, Cationic and amphipathic cell-penetrating peptides (CPPs): Their structures and in vivo studies in drug delivery, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 9, 407–27 (2015).
- [65] B. Layek, L. Lipp, J. Singh, Cell penetrating peptide conjugated chitosan for enhanced delivery of nucleic acid, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28912–30 (2015).
- [66] C. Kizil, A. Iltzsche, A. K. Thomas, P. Bhattacharai, Y. Zhang, M. Brand, Efficient cargo delivery into adult brain tissue using short cell-penetrating peptides, *PLOS One*, 10, 124073 (2015).
- [67] H. Maeda, G. Y. Bharate, J. Daruwalla, Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 409–19 (2014).
- [68] M. C. Shin, J. Zhang, K. Ah Min, K. Lee, Ch. Moon, J. Balthasar, V. Yang, Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy, *Journal of Controlled Release*, 194, 197–210 (2014).

- [69] S. Aroui, A. Kenani, Cell-Penetrating Peptides: A Challenge for Drug Delivery, w: *Cheminformatics and its Applications*, A. Stefaniu, A. Rasul, G. Hussain, *Intech Open*, Londyn (2020).
- [70] E. L. Snyder, Ch. Saenz, C. Denicourt, B. Meade, X. Cui, I. Kaplan, S. Dowdy, Enhanced targeting and killing of tumor cells expressing the CXCR4 chemokine receptor 4 by transducible anticancer peptides, *Cancer Research*, 65, 10646–50 (2005).
- [71] S. Aroui, S. Brahim, J. Hamelin, M. de Waard, J. Bréard, A. Kenani, Conjugation of doxorubicin to cell penetrating peptides sensitizes human breast MDA-MB 231 cancer cells to endogenous TRAIL-induced apoptosis, *Apoptosis*, 14, 1352–65 (2009).
- [72] S. Aroui, N. Ram, F. Appaix, M. Ronjat, A. Kenani, F. Pirollet, M. De Waard, Maurocalcine as a non-toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231, *Pharmaceutical Research*, 26, 836–45 (2009).
- [73] W. L. Long Zhu, S. Y. Shin, Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal action, *Journal of Peptide Science*, 15, 345–352 (2009).
- [74] H. Wang, K. Xu, L. Liu, J. Tan, Y. Chen, Y. Li, W. Fan, Z. Wei, J. Sheng, Y. Yang, L. Li, The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis, *Biomaterials*, 31, 2874–81 (2010).
- [75] H. D. Herce, A. E. Garcia, M. C. Cardoso, Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules, *Journal of the American Chemical Society*, 136, 17459–67 (2014).
- [76] M. Vazdar, J. Heyda, P. Mason, G. Tesei, Ch. Allolio, M. Lund, P. Jungwirth, Arginine “magic”: guanidinium like-charge ion pairing from aqueous salts to cell penetrating peptides, *Accounts of Chemical Research*, 51, 1455–64 (2018).
- [77] P. Gund, Guanidine, Trimethylenemethane, and “ π -Delocalization”. Can acyclic compounds have “aromatic” stability?, *Journal of Chemical Education*, 49, 100–3 (1972).
- [78] J. L. MacCallum, W. F. Drew Bennett, D. Peter Tieleman, Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations, *Biophysical Journal*, 94, 3393–404 (2008).
- [79] S. Futaki, I. Nakase, Cell-Surface Interactions on arginine-rich cell penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization, *Accounts of Chemical Research*, 50, 2449–56 (2017).
- [80] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 5836–40 (2001).
- [81] M. Morishita, N. Kamei, J. Ehara, K. Isowa, K. Takayama, A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, *Journal of Controlled Release*, 118, 177–84 (2007).
- [82] P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, Oligocarbamate molecular transporters: Design, synthesis, and biological evaluation of a new class of transporters for drug delivery, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 13382–83 (2002).
- [83] C. Cho, E. Moran, S. Cherry, J. Stephans, S. Fodor, C. Adams, A. Sundaram, J. Jacobs, P. Schultz, An unnatural biopolymer, *Science*, 261, 1303–1305 (1979).
- [84] C. Cooley, B. Trantow, F. Nederberg, M. Kiesewetter, J. Hedrick, R. Waymouth, P. Wender, Oligocarbonate molecular transporters: Oligomerization-based syntheses and cell-penetrating studies, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 16401–3 (2009).

- [85] P. A. Wender, W. C. Galliher, E. A. Goun, L. R. Jones, T. H. Pillow, The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 452–72 (2007).
- [86] J. Sun, Z. Li, Peptoid applications in biomedicine and nanotechnology, w: *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, S. Koutsopoulos, Woodhead Publishing, 183 – 213 (2018).
- [87] G. Gasparini, E. K. Bang, J. Montenegro, S. Matile, Cellular uptake: lessons from supramolecular organic chemistry, *Chemical Communications*, 51, 10389–402 (2015).
- [88] A. S. Chauhan, Dendrimers for Drug Delivery, *Molecules*, 23, 938 (2018).
- [89] A. Dragulescu-Andrasi, P. Zhou, G. He, D. H. Ly, Cell-permeable GPNA with appropriate backbone stereochemistry and spacing binds sequence-specifically to RNA, *Chemical Communications*, 2, 244–246 (2005).
- [90] P. Zhou, M. Wang, L. Du, G. W. Fisher, A. Waggoner, D. H. Ly, Novel binding and efficient cellular uptake of guanidine-based peptide nucleic acids (GPNA), *Journal of the American Chemical Society*, 125, 6878–79 (2003).
- [91] C. J. McKinlay, R. M. Waymouth, P. A. Wender, Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Oligophosphoesters: Effective and Versatile Molecular Transporters for Drug and Probe Delivery, *Journal of the American Chemical Society*, 138, 3510–17 (2016).
- [92] S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, Studying non-covalent drug-DNA interactions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576, 49–60 (2015).
- [93] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction, *Materials Science and Engineering C*, 61, 1002–17 (2016).
- [94] L. Andrezálová, Z. Országhová, Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 225, 111624 (2021).
- [95] J. Watson, F. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171, 737–8 (1953).
- [96] Y. Sha, X. Chen, B. Niu, Q. Chen, The interaction mode of groove binding between quercetin and calf thymus DNA based on spectrometry and simulation, *Chemistry and Biodiversity*, 14, 1700133 (2017).
- [97] S. Neidle, DNA minor-groove recognition by small molecules, *Natural Product Reports*, 18, 291–309 (2001).
- [98] V. K. Misra, J. L. Hecht, A. S. Yang, B. Honig, Electrostatic contributions to the binding free energy of the λ cl repressor to DNA, *Biophysical Journal*, 75, 2262–73 (1998).
- [99] R. Martínez, L. Chacón-García, The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work, *Current Medicinal Chemistry*, 12, 127–51 (2005).
- [100] M. Blackburn, M. Gait, D. Loakes, D. Williams, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, *RSC Publishing*, wyd. III, 1-12, Cambridge (2006).
- [101] A. Erxleben, Interactions of copper complexes with nucleic acids, *Coordination Chemistry Reviews*, 360, 92–121 (2018).
- [102] D. Salerno, G. Beretta, G. Zanchetta, S. Brioschi, M. Cristofalo, N. Missana, L. Nardo, V. Cassina, T. Bellini, F. Mantegazza, Platinum-based drugs and DNA interactions studied by single-molecule and bulk measurements, *Biophysical Journal*, 110, 2151–61 (2016).

- [103] N. Farrell, Metal complexes as drug and chemotherapeutic agents, w: *Comprehensive Coordination Chemistry II*, J. McCleverty, T. Meyer, 9, 809-40 (2003).
- [104] T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi, Y. Yoshida, M. Tanabe, T. Yoshida, M. Kuwano, K. Kohno, Cisplatin resistance and transcription factors, *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5, 15-27 (2005).
- [105] C. R. Rocha, M. M. Silva, A. Quinet, J. B. Cabral-Neto, C. F. Menck, DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship, *Clinics*, 73, e478s (2018).
- [106] A. Emamjomeh, D. Choobineh, B. Hajieghrari, N. MahdiNezhad, A. Khodavirdipour, DNA–protein interaction: identification, prediction and data analysis, *Molecular Biology Reports*, 46, 3571–96 (2019).
- [107] R. Rohs, X. Jin, S. M. West, R. Joshi, B. Honig, R. S. Mann, Origins of specificity in protein-DNA recognition, *Annual Review of Biochemistry*, 79, 233–69 (2010).
- [108] A. Ganguly, P. Rajdev, S. M. Williams, D. Chatterji, Nonspecific interaction between DNA and protein allows for cooperativity: A case study with mycobacterium DNA binding protein, *Journal of Physical Chemistry*, 116, 621–32 (2012).
- [109] T. P. Chiu, S. Rao, R. S. Mann, B. Honig, R. Rohs, Genome-wide prediction of minor-groove electrostatic potential enables biophysical modeling of protein-DNA binding, *Nucleic Acids Research*, 45, 12565–76 (2017).
- [110] J. E. Donald, W. W. Chen, E. I. Shakhnovich, Energetics of protein - DNA interactions, *Nucleic Acids Research*, 35, 1039–47 (2007).
- [111] L. A. Harris, L. D. Williams, G. B. Koudelka, Specific minor groove solvation is a crucial determinant of DNA binding site recognition, *Nucleic Acids Research*, 42, 14053–9 (2014).
- [112] H. Wang, Z. Feng, B. Xu, Supramolecular assemblies of peptides or nucleopeptides for gene delivery, *Theranostics*, 9, 3213–22 (2019).
- [113] P. Saccardo, A. Villaverde, N. González-Montalbán, Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy, *Biotechnology Advances*, 27, 432–8 (2009).
- [114] C. Plank, M. X. Tang, A. R. Wolfe, F. C. Szoka, Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes, *Human Gene Therapy*, 10, 319-32 (1999).
- [115] H. H. Kim, W. S. Lee, J. M. Yang, S. Shin, Basic peptide system for efficient delivery of foreign genes, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1640, 129–36 (2003).
- [116] A. Mullard, FDA approves landmark RNAi drug, *Nature Reviews Drug Discovery*, 17, no. 9, 613 (2018).
- [117] V. Bloomfield, DNA condensation, *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 334–41 (1996).
- [118] M. Martin, K. Rice, Peptide-guided gene delivery, *AAPS Journal*, 9, 18–29 (2007).
- [119] D. Lechardeur, K. Sohn, M. Haardt, P. Joshi, M. Monck, H. O’Brodivich, G. Lukacs, Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer, *Gene Therapy*, 6, 482-97 (1999).
- [120] T. Zhou, A. Llizo, C. Wang, G. Xu, Y. Yang, Nanostructure-induced DNA condensation, *Nanoscale*, 5, 8288–306 (2013).

- [121] M. Rimann, T. Lühmann, M. Textor, B. Guerino, J. Ogier, H. Hall, Characterization of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles for the delivery of therapeutic DNA, *Bioconjugate Chemistry*, 19, 548–57 (2008).
- [122] P. Kumar, H. Wu, J. McBride, K. Jung, M. Kim, B. Davidson, S. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system, *Nature*, 448, 39–43 (2007).
- [123] M. C. Branco, J. P. Schneider, Self-assembling materials for therapeutic delivery, *Acta Biomaterialia*, 5, 817–31 (2009).
- [124] M. L. Ainalem, T. Nylander, DNA condensation using cationic dendrimers - Morphology and supramolecular structure of formed aggregates, *Soft Matter Journal*, 7, 4577–94 (2011).
- [125] M. Wysocka, N. Gruba, R. Grzywa, A. Giełdoń, R. Bąchor, K. Brzozowski, M. Sieńczyk, J. Dieter, Z. Szewczuk, K. Rolka, A. Lesner, PEGylated substrates of NSP4 protease: A tool to study protease specificity, *Scientific Reports*, 6, 22856 (2016).
- [126] M. Wysocka, A. Romanowska, N. Gruba, M. Michalska, A. Giełdoń, A. Lesner, A peptidomimetic fluorescent probe to detect the trypsin β 2 subunit of the human 20S proteasome, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2396 (2020).
- [127] G. Binnig, H. Rohrer, Scanning tunneling microscopy from birth to adolescence', *Reviews of Modern Physics*, 59, 615 (1986).
- [128] G. Binnig, C. F. Quate, E. L. Gi, C. Gerber, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters*, 56, 930–3 (1986).
- [129] S. Vahabi, B. Nazemi Salman, A. Javanmard, Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study, *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38, 76-83 (2013).
- [130] M. Krieg, G. Flaschner, D. Alsteens, B. Gaub, W. Roos, G. Wuite, H. Gaub, Ch. Gerber, Y. Dufrene, D. Muller, Atomic force microscopy-based mechanobiology, *Nature Reviews Physics*, 1, 41–57 (2019).
- [131] D. P. Allison, N. P. Mortensen, C. J. Sullivan, M. J. Doktycz, Atomic force microscopy of biological samples, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 618–34 (2010).
- [132] Y. An, S. Manuguri, J. Malmstrom, Atomic force microscopy of proteins, w: *Methods in Molecular Biology*, J. A. Gerrard, L. J. Domigan, *Springer Nature*, 2073, 247-86 (2020).
- [133] M. C. Piontek, W. H. Roos, Atomic force microscopy: An introduction, w: *Methods in Molecular Biology*, E. Peterman, *Springer Nature*, 1665, 243–58 (2018).
- [134] H. Ho, P. West, Optimizing AC-mode atomic force microscope imaging, *Scanning*, 18, 339-43 (1996).
- [135] R. Garcia, R. Perez, Dynamic atomic force microscopy methods, *Surface Science Reports*, 47, 197–301 (2002).
- [136] L. W. Francis, P. D. Lewis, C. J. Wright, R. S. Conlan, Atomic force microscopy comes of age, *Biology of the Cell*, 102, 133–43 (2010).
- [137] A. Schneider, L. Richert, G. Francius, J. C. Voegel, C. Picart, Elasticity, biodegradability and cell adhesive properties of chitosan/hyaluronan multilayer films, *Biomedical Materials*, 2, 45-51 (2007).
- [138] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, Molecular interaction studies using microscale thermophoresis, *Assay and Drug Development Technologies*, 9, 342–53 (2011).

- [139] M. Jerabek-Willemsen, T. Andre, R. Wanner, H. M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, D. Breitsprecher, MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond, *Journal of Molecular Structure*, 1077, 101–13 (2014).
- [140] https://www.isbg.fr/IMG/pdf/manual_nt115_new.pdf
- [141] L. Huang, Ch. Zhang, Microscale Thermophoresis (MST) to detect the interaction between purified protein and small molecule, w: *Plant Chemical Genomics Methods and Protocols Second Edition (Methods in Molecular Biology)*, G. R. Hicks, C. Zhang, 2213, 187-94 (2021).
- [142] M. Piliarik, H. Vaisocherová, J. Homola, Surface plasmon resonance biosensing, *Methods in molecular biology*, 503, 65–88 (2009).
- [143] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications, *Sensors*, 15, 10481–510 (2015).
- [144] G. Elia, M. Silacci, S. Scheurer, J. Scheuermann, D. Neri, Affinity-capture reagents for protein arrays, *Trends in Biotechnology*, 20, S19–S22 (2002).
- [145] F. E. Ahmed, J. E. Wiley, D. A. Weidner, C. Bonnerup, H. Mota, Surface Plasmon Resonance (SPR) spectrometry as a tool to analyze nucleic acid-protein interactions in crude cellular extracts, *Cancer Genomics and Proteomics*, 7, 303-9 (2010).
- [146] K. Rajpoot, Recent advances and applications of biosensors in novel technology, *Biosensors Journal*, 6, 10145 (2017).
- [147] S. Wang, G. M. K. Poon, W. D. Wilson, Quantitative investigation of protein–nucleic acid interactions by biosensor surface plasmon resonance, *Methods in Molecular Biology*, 1334, 313–32 (2015).
- [148] B. Nguyen, F. A. Tanius, W. D. Wilson, Biosensor-surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions, *Methods*, 42, 150–61 (2007).
- [149] S. G. Patching, Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838, 43–55 (2014).
- [150] G. Zeder-Lutz, E. Zuber, J. Witz, M. H. van Regenmortel, Thermodynamic analysis of antigen-antibody binding using biosensor measurements at different temperatures, *Analytical Biochemistry*, 246, 123-32 (1997).
- [151] C. L. Baird, E. S. Courtenay, D. G. Myszka, Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions, *Analytical Biochemistry*, 310, 93–99 (2002).
- [152] P. Pattnaik, Surface Plasmon Resonance Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 126, 79-92 (2005).
- [153] S. Manska, R. Octaviano, C. C. Rossetto, 5-Ethynyl-2-deoxycytidine and 5-ethynyl-2-deoxyuridine are differentially incorporated in cells infected with hsv-1, hcmv, and kshv viruses, *Journal of Biological Chemistry*, 295, 5871–90 (2020).
- [154] D. A. Case Ross C Walker T. Darden Junmei Wang, Amber 2016 Reference manual principal contributors to the current codes, *Amber*, University of California, San Francisco (2016).
- [155] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP Model, *The Journal of Physical Chemistry*, 97, 10269-80 (1993).

- [156] M. W. Schmidt, K. Baldrige, J. Boatz, S. Elbert, M. Gordon, J. Jensen, S. Koseki, M. Matsunaga, K. Nguyen, S. Su, T. Windus, M. Dupuis, J. Montgomery, General atomic and molecular electronic structure system, *Journal of Computational Chemistry*, 14, 1347-63 (1993).
- [157] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible, and free, *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1701–18 (2005).
- [158] E. F. Pettersen, T. Goddard, C. Huang, G. Couch, D. Greenblatt, E. Meng, T. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *Journal of Computational Chemistry*, 25, 1605–12 (2004).
- [159] R. K. Gary, S. M. Kindell, Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts, *Analytical Biochemistry*, 343, 329–34 (2005).
- [160] A. Romanowska, K. Węgrzyn, K. Bury, E. Sikorska, A. Gnatek, A. Piwkowska, I. Konieczny, A. Lesner, M. Wysocka, Novel Cell Permeable Polymers of N-Substituted L-2,3-Diaminopropionic Acid (DAPEGs) and Cellular Consequences of Their Interactions with Nucleic Acids, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2571 (2021).
- [161] L. X. Li, X. Li, Epigenetically mediated ciliogenesis and cell cycle regulation, and their translational potential, *Cells*, 10, 1662 (2021).
- [162] J. A. Coffman, Cell cycle development, *Development Cell*, 6, 321-7 (2004).
- [163] J. Jackman, O'Connor, Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle', *Current Protocols in Cell Biology*, 8.3.1–8.3.20 (2001).
- [164] T. H. Wang, H. S. Wang, Y. K. Soong, M. Ph, Paclitaxel-induced cell death, where the cell cycle and apoptosis come together, *Cancer*, 88, 2619-28 (2000).
- [165] [https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Book%3A_Biology_for_Non-Majors_I_\(Lumen\)/07%3A_Cell_Division/7.04%3A_Cell_Cycle_Checkpoint](https://bio.libretexts.org/Courses/Lumen_Learning/Book%3A_Biology_for_Non-Majors_I_(Lumen)/07%3A_Cell_Division/7.04%3A_Cell_Cycle_Checkpoint) (dostęp: 20.10.2022).
- [166] C. Wang, S. Dong, L. Zhang, Y. Zhao, L. Huang, X. Gong, H. Wang, D. Shang, Cell surface binding, uptake and anticancer activity of L-K6, a lysine/leucine-rich peptide, on human breast cancer MCF-7 cells, *Scientific Reports*, 7, 8293 (2017).
- [167] D. Vercauteren, R. Vandenbroucke, A. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. De Smedt, N. Sanders, K. Braeckmans, The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: Optimization and pitfalls', *Molecular Therapy*, 18, 561–9 (2010).
- [168] T. Gao, W. Zhang, Y. Wang, G. Yang, DNA compaction and charge neutralization regulated by divalent ions in very low pH solution, *Polymers*, 11, 337 (2019).
- [169] G. Iacomino, G. Picariello, L. D'Agostino, DNA and nuclear aggregates of polyamines, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823, 1745–55 (2012).
- [170] B. A. Kaufman, N. Durisic, J. Mativetsky, S. Costantino, M. Hancock, P. Grutter, E. Shoubridge, The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures, *Molecular Biology of the Cell*, 18, 3225–36 (2007).
- [171] E. Zabolotnaya, I. Mela, M. Williamson, S. Bray, S. Yau, D. Papatziomou, J. Edwardson, N. Robinson, R. Henderson, Modes of action of the archaeal Mre11/ Rad50 DNA-repair complex revealed by fast-scan atomic force microscopy, 117, 14936–47 (2020).
- [172] Z. Korwek, O. Alster, Znaczniki starzenia komórkowego, *Postępy Biochemii*, 60, 138–46 (2014).

Wykaz rysunków

Rysunek 1.	<i>Budowa błony komórkowej.</i>	str. 12
Rysunek 2.	<i>Schematyczny podział sposobów transportu związków przez błonę komórkową.</i>	str. 17
Rysunek 3.	<i>Selektywna przepuszczalność błony komórkowej.</i>	str. 14
Rysunek 4.	<i>Schemat obrazujący nakładanie się właściwości fizykochemicznych CPP.</i>	str. 19
Rysunek 5.	<i>Podział amfipatycznych peptydów penetrujących błony komórkowe.</i>	str. 21
Rysunek 6.	<i>Mechanizmy bezpośredniego transportu przez błony komórkowe wykorzystywane przez CPP, gdzie: a – tworzenie porów beczkowatych; b – pory toroidalne, c – mechanizm dywanowy, d – tworzenie odwróconej miceli, e – model pocieniania błony cytoplazmatycznej.</i>	str. 24
Rysunek 7.	<i>Schematyczne przedstawienie szlaków endocytozy wykorzystywanych przez CPP do penetracji błon komórkowych, gdzie: a – makropinocytoza, b – endocytoza zależna od klatryny, c – endocytoza kaweoło-zależna, d – fagocytoza.</i>	str. 26
Rysunek 8.	<i>Sposoby połączenia peptydów penetrujących błony komórkowe z transportowanymi związkami.</i>	str. 29
Rysunek 9.	<i>Struktury chemiczne obrazujące kation guanidynowy oraz argininę w łańcuchu poliargininowym.</i>	str. 33
Rysunek 10.	<i>Struktury przedstawiające: a – oligokarbaminiany, b – oligowęglany, c – oligopeptoidy. R – łańcuch boczny.</i>	str. 35
Rysunek 11.	<i>Struktury przykładowych polidisiarczków penetrujących błony komórkowe zawierających ugrupowania guanidynowe.</i>	str. 36
Rysunek 12.	<i>Struktura dendrymerycznego związku zawierającego liczne ugrupowania guanidynowe.</i>	str. 37
Rysunek 13.	<i>Wzór strukturalny peptydowego kwasu nukleinowego zawierającego ugrupowania guanidynowe (GPNA). Fl – fluoresceina.</i>	str. 38
Rysunek 14.	<i>Struktura ogólna oligosfosfoestru zawierającego ugrupowania guanidynowe.</i>	str. 39
Rysunek 15.	<i>Oddziaływania związków z DNA, A – interkalacja, B – wiązanie do rowków, C – oddziaływania elektrostatyczne.</i>	str. 40
Rysunek 16.	<i>Wzory strukturalne związków wiążących się do mniejszego rowka DNA – dystamycyny oraz netropsyny.</i>	str. 41
Rysunek 17.	<i>Wzory strukturalne związków oddziałujących z DNA.</i>	str. 42
Rysunek 18.	<i>Aktywacja cis-platyny oraz jej włączanie pomiędzy zasady azotowe wewnątrz nici DNA.</i>	str. 43
Rysunek 19.	<i>Nomenklatura sfunkcjonalizowanych reszt kwasu Dap.</i>	str. 48
Rysunek 20.	<i>Przegląd biblioteki oraz jej komponentów.</i>	str. 49
Rysunek 21.	<i>Schematyczne przedstawienie zasady działania mikroskopii sił atomowych.</i>	str. 51
Rysunek 22.	<i>Schematyczne przedstawienie oddziałujących sił oraz odległości pomiędzy sondą pomiarową, a próbką w zależności od trybu pracy.</i>	str. 52
Rysunek 23.	<i>Schematyczne przedstawienie typowego sygnału otrzymywanego podczas skanowania pojedynczej kapilary.</i>	str. 55
Rysunek 24.	<i>Zasada działania powierzchniowego rezonansu plazmonowego.</i>	str. 57
Rysunek 25.	<i>Sensogram będący wynikiem pojedynczego eksperymentu SPR.</i>	str. 58
Rysunek 26.	<i>Wzory strukturalne zsyntezowanych związków numer 1–4b, 10–10b, 12a–15a *.</i>	str. 63
Rysunek 27.	<i>Wzory strukturalne zsyntezowanych peptydomimetyków numer 5–5b, 6–9a, 11a, 11b *.</i>	str. 66
Rysunek 28.	<i>Wzory strukturalne peptydomimetyków 16a–19a *.</i>	str. 68
Rysunek 29.	<i>Wzory strukturalne związków numer 22, 23 *.</i>	str. 69
Rysunek 30.	<i>Ogólny wzór związków otrzymywanych w wyniku syntezy automatycznej, gdzie: n – ilość reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego z osłoną ivDde, P – linker przyłączony do żywicy.</i>	str. 74
Rysunek 31.	<i>Ogólny wzór związków otrzymanych w wyniku syntezy automatycznej, gdzie: n – ilość reszt kwasu L-2,3-diaminopropionowego z osłoną ivDde (n=6 dla związku 22, n=8 dla związku 23), P – linker przyłączony do żywicy.</i>	str. 78
Rysunek 32.	<i>Ogólny wzór związków, gdzie: n – zmienna ilość reszt kwasu L- lub D-2,3-diaminopropionowego z osłoną Mtt, P – linker przyłączony do żywicy.</i>	str. 80
Rysunek 33.	<i>Wzory strukturalne stosowanych pochodnych fluorescencyjnych, od lewej: 5/6-FAM-NHS; 5/6-TAMRA-NHS.</i>	str. 84
Rysunek 34.	<i>Schemat syntezy peptydomimetyku numer 8a.</i>	str. 85
Rysunek 35.	<i>Przebieg reakcji inkorporacji EdU.</i>	str. 95
Rysunek 36.	<i>Schemat przebiegu procesu transfekcji.</i>	str. 103

Rysunek 37.	<i>Schemat otrzymywania lizatów komórkowych.</i>	str. 109
Rysunek 38.	<i>Enzymatyczny rozpad β-D-galaktopiranozydu rezorurfiny.</i>	str. 110
Rysunek 39.	<i>Hydrolyza substratu X-gal w obecności β-galaktozydazy.</i>	str. 111
Rysunek 40.	<i>Wybrane analizy MS oraz chromatogramy zsyntezowanych związków.</i>	str. 119
Rysunek 41.	<i>Cytotoksyczność związków wobec linii HB2 oraz MDA-MB-231 oceniana na podstawie wyników testu MTT (średnia \pm SD).</i>	str. 122
Rysunek 42.	<i>Cytotoksyczność związków 8, 10 i 11 wobec linii HB2 oraz MDA-MB-231 podczas 2-godzinnej i 24-godzinnej inkubacji, oceniana na podstawie wyników testu CCK8 (średnia \pm SD).</i>	str. 123
Rysunek 43.	<i>Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami 1a, 2a oraz 3a.</i>	str. 125
Rysunek 44.	<i>Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami 4a, 4b oraz 10a, 10b.</i>	str. 125
Rysunek 45.	<i>Wykres intensywność fluorescencji 5/6-FAM w lizatach komórkowych linii HB2 oraz MDA-MB-231.</i>	str. 126
Rysunek 46.	<i>Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 24 godzin ze związkami 8a, 11a oraz 15a.</i>	str. 127
Rysunek 47.	<i>Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane w ciągu 2 godzin ze związkiem 11b.</i>	str. 127
Rysunek 48.	<i>Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowane przez 24 godziny ze związkami 21a, 18a oraz 19a.</i>	str. 128
Rysunek 49.	<i>Test oceny proliferacji z zastosowaniem odczynnika EdU komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny ze związkami 8, 10 i 11 (średnia \pm SD).</i>	str. 131
Rysunek 50.	<i>Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego komórek linii HB2 i MDA-MB-231 inkubowanych przez 24 godziny ze związkiem 11 o stężeniu 1 μM, będące wynikiem testu oceny proliferacji komórek.</i>	str. 132
Rysunek 51.	<i>Wykresy przedstawiające stabilność związku numer 10 w lizatach komórkowych: HB2 oraz MDA-MB-231 w środowisku obojętnym oraz w kwasowym.</i>	str. 134
Rysunek 52.	<i>Fazy cyklu komórkowego.</i>	str. 135
Rysunek 53.	<i>Wykresy intensywności fluorescencji pochodzącej od związku 4b w lizatach komórkowych (linia HB2 oraz MDA-MB-231) zawierających dodatek określonych inhibitorów (średnia \pm SD).</i>	str. 138
Rysunek 54.	<i>Zdjęcia uzyskane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego linii: HB2 oraz MDA-MB-231 inkubowanych z peptydomimetykiem 4b oraz z dodatkiem inhibitorów: cytochalazyna D (c = 30 μM), chromopromazyna (c = 30 μM), metylo-β-cyklodekstryna (c = 7,5 mM)</i>	str. 138
Rysunek 55.	<i>Elektroforegram obrazujący powinowactwo peptydomimetyków do dsDNA. Kolejne ścieżki przedstawiają: 1. marker DNA; 2. –; 3. dsDNA; 4. –; 5. dsDNA : związek 1 (N/P – 0,2 : 1); 6. dsDNA : związek 1 (N/P – 1,5 : 1); 7. dsDNA : związek 2 (N/P – 0,2 : 1); 8. dsDNA : związek 2 (N/P – 1,5 : 1); 9. dsDNA : związek 3 (N/P – 0,2 : 1); 10. dsDNA : związek 3 (N/P – 1,5 : 1); 11. dsDNA : związek 4 (N/P – 0,2 : 1); 12. dsDNA : związek 4 (N/P – 1,5 : 1); 13. dsDNA : związek 10 (N/P – 0,2 : 1); 14. dsDNA : związek 10 (N/P – 1,5 : 1); 15. dsDNA : związek 15 (N/P – 0,2 : 1); 16. dsDNA : związek 15 (N/P – 1,5 : 1); 17. dsDNA : związek 14 (N/P – 0,2 : 1); 18. dsDNA : związek 14 (N/P – 1,5 : 1)</i>	str. 139
Rysunek 56.	<i>Wyniki przedstawiające wiązanie się znakowanych fluorescencyjnie związków do dsDNA (A, C, E, G, I, K) oraz ssDNA (B, D, F, H, J, L) uzyskane za pomocą techniki termoforezy w mikroskali (MST). Poszczególne wykresy obrazują wiązanie się z DNA związków: A, B – 1a; C, D – 4a; E, F – 2a; G, H – 8a; I, J – 10a; K, L – 11a</i>	str. 142
Rysunek 57.	<i>Sensogramy przedstawiające wiązanie się poszczególnych peptydomimetyków do podwójnej nici DNA. Analizę wykonano stosując stężenie związków przepuszczonych przez powierzchnię czujnika z unieruchomionym biotynylowanym dsDNA: A – 50 μM oraz B – 100 μM. Wyniki przedstawione na rysunku C i D dotyczą związku 10a analizowanego w różnych stężeniach wobec: C – ssDNA, D – dsDNA.</i>	str. 144
Rysunek 58.	<i>Elektroforegram kompleksów peptydomimetyków z plazmidowym DNA. Poszczególne ścieżki odpowiadają: 1. Marker DNA; 2, 8, 14. Plazmid pmaxGFP; 3 – 6. Związek 8 z pmaxGFP w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; 9 – 12. Związek 10 z pmaxGFP w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; 15 – 18. Związek 11 z pmaxGFP w stosunkach N/P odpowiednio – 0,2 : 1, 1 : 1, 1,5 : 1 i 3:1; 7, 13. Puste ścieżki.</i>	str. 147
Rysunek 59.	<i>Zdjęcia z mikroskopu sił atomowych (AFM). A – plazmid pmaxGFP; B – związek 8a; C – związek 10a; D – związek 11a; E – związek 8a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 2,5 μm; F – związek 8a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 500 nm; G – związek 10a z</i>	str. 149

	plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 2,5 μ m; H – związek 10a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 2,5 μ m; I – związek 10a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 500 nm; J – związek 11a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 1 μ m; K – związek 11a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 2,5 μ m; L – związek 11a z plazmidem pmaxGFP N/P 0,2 : 1, 10 μ m.	
Rysunek 60.	Zdjęcia fluorescencyjne komórek linii HB2 i MDA-MB-231 transfekowanych kompleksem peptydomimetyk : pmaxGFP : (N/P – 1,5 :1), a także reagentem ViaFect.	str. 150
Rysunek 61.	Cytotoksyczność kompleksów: peptydomimetyk (8, 10, 11) : pmaxGFP (stężenie kompleksu równe 4,62 \times 10 ⁻¹⁰ M) wobec komórek linii HB2 oraz MDA-MB-231 (średnia \pm SD).	str. 150
Rysunek 62.	Struktury otrzymane z wykorzystaniem symulacji dynamiką molekularną (MD) przedstawiające kondensację DNA w układzie: A – bez dodatku związków, B – w obecności peptydomimetyku nr 8, C – w obecności peptydomimetyku nr 11. Cztery helisy DNA przedstawione są w kolorze złotym, zielonym, różowym oraz czerwonym. Cząsteczki związków występują w różnych odcieniach niebieskiego. D – oddziaływanie między pojedynczą cząsteczką związku 11, a trzema podwójnymi helisami DNA w ostatnim etapie symulacji.	str. 152
Rysunek 63.	Elektroforegram natywnego żelu poliakrylamidowego kompleksów pomiędzy peptydomimetykiem nr 23, a FAM-streptawidyną. Poszczególne ścieżki przedstawiają: 1. FAM-Strp 0,2 μ g; 2. Kompleks 23 : FAM-Strp 1:1 (0,2 μ g); 3. Kompleks 23 : FAM-Strp 1:1 (0,1 μ g); 4. Kompleks 23 : FAM-Strp 2:1 (0,2 μ g); 5. Kompleks 23 : FAM-Strp 2:1 (0,1 μ g); 6. Kompleks 23 : FAM-Strp 4:1 (0,2 μ g); 7. Kompleks 23 : FAM-Strp 4:1 (0,1 μ g); 8. Związek nr 23; 9. Kompleks 11 : FAM-Strp 1:1 (0,2 μ g); 10. Kompleks 11 : FAM-Strp 1:1 (0,1 μ g); 11. Kompleks 11 : FAM-Strp 2:1 (0,2 μ g); 12. Kompleks 11 : FAM-Strp 2:1 (0,1 μ g); 13. Kompleks 11 : FAM-Strp 4:1 (0,2 μ g); 14. Kompleks 11 : FAM-Strp 4:1 (0,1 μ g); 15. Związek nr 11	str. 154
Rysunek 64.	Elektroforegram natywnego żelu poliakrylamidowego kompleksów pomiędzy peptydomimetykiem nr 22, a FAM-streptawidyną. Poszczególne ścieżki przedstawiają: 1. FAM-Strp; 2. Związek nr 22; 3. Kompleks 22 : FAM-Strp 1:1; 4. Kompleks 22 : FAM-Strp 1:2; 5. Kompleks 22 : FAM-Strp 1:4; 6. Związek nr 10; 7. Kompleks 10 : FAM-Strp 1:1; 8. Kompleks 10 : FAM-Strp 1:2; 9. Kompleks 10 : FAM-Strp 1:4.	str. 154
Rysunek 65.	Cytotoksyczność peptydomimetyków 22 i 23 inkubowanych przez 24 godziny z komórkami linii: HB2, MDA-MB-231, SKBr3 oraz T47D (średnia \pm SD).	str. 156
Rysunek 66.	Cytotoksyczność kompleksów utworzonych pomiędzy FAM-streptawidyną i peptydomimetykami biotynylowanymi lub z wolnym N-końcem, a następnie inkubowanych przez 24 godziny z liniami komórkowymi: HB2, MDA-MB-231, SKBr3, T47D (średnia \pm SD).	str. 157
Rysunek 67.	Komórki SKBr3 inkubowane z kompleksem: A, E, I – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:2; B, F, J – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:4; C, G, K – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:2; D, H, L – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:4; A, B, C, D – przez 2 godziny; E, F, G, H – przez 4 godziny; I, J, K, L - przez 24 godziny. Zdjęcia uzyskane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.	str. 158
Rysunek 68.	Komórki linii T47D, MDA-MB-231, HB2 inkubowane z kompleksem: A, E, I – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:2; B, F, J – FAM-Strp : 22 w stosunku molowym 1:4; C, G, K – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:2; D, H, L – FAM-Strp : 23 w stosunku molowym 1:4; A, B, C, D – przez 2 godziny; E, F, G, H – przez 4 godziny; I, J, K, L - przez 24 godziny. Zdjęcia uzyskane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.	str. 159
Rysunek 69.	Elektroforegram żelu poliakrylamidowego wykonanego w warunkach natywnych. Poszczególne ścieżki przedstawiają: 1. Strp- β -gal; 2. 22 3. Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:1; 4. Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:2; 5. Kompleks 22 : Strp- β -gal 1:4; 6. 10; 7. Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:1; 8. Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:2; 9. Kompleks 10 : Strp- β -gal 1:4.	str. 161
Rysunek 70.	Elektroforegram żelu poliakrylamidowego wykonanego w warunkach natywnych. Poszczególne ścieżki przedstawiają: 1. Strp- β -gal; 2. Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:1; 3. Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:2; 4. Kompleks 23 : Strp- β -gal 1:4; 5. Związek 23; 6. Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:1; 7. Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:2; 8. Kompleks 11 : Strp- β -gal 1:4. 9. Związek 11.	str. 161
Rysunek 71.	Cytotoksyczność kompleksów utworzonych pomiędzy streptawidyną skoniugowaną z β -galaktozydazą i peptydomimetykami 22, 23, 10 lub 11 inkubowanych przez 24 godziny z liniami komórkowymi: HB2, MDA-MB-231, SKBr3, T47D (średnia \pm SD).	str. 163
Rysunek 72.	Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy w lizatach poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i od razu poddane lizie (t24) (średnia \pm SD).	str. 165
Rysunek 73.	Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy w lizatach	str. 166

	<i>poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i po kolejnych 2 godzinach poddane lizie (t24 + 2) (średnia ± SD).</i>	
Rysunek 74.	<i>Wykresy przedstawiające aktywność enzymatyczną β-galaktozydazy w lizatach poszczególnych linii komórkowych inkubowanych przez 24h z kompleksami lub mieszaninami i po kolejnych 24 godzinach poddane lizie (t24 + 24) (średnia ± SD).</i>	str. 167
Rysunek 75.	<i>Komórki linii HB2, MDA-MB-231, SKBr3 i T47D widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy. Próba kontrolna oraz komórki inkubowane z dodatkiem Strp-β-gal lub związkiem 23 w ciągu 24 godzin.</i>	str. 169
Rysunek 76.	<i>Komórki HB2 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24 godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t24, E, F, G, H – t24+2, I, J, K, L – t24+24.</i>	str. 169
Rysunek 77.	<i>Komórki MA-MB-231 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t24, E, F, G, H – t24+2, I, J, K, L – t24+24.</i>	str. 170
Rysunek 78.	<i>Komórki SKBr3 widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t24, E, F, G, H – t24+2, I, J, K, L – t24+24.</i>	str. 170
Rysunek 79	<i>. Komórki T47D widziane pod mikroskopem świetlnym po przeprowadzonym teście na obecność β-galaktozydazy inkubowane przez 24godziny z kompleksem: Strp-β-gal : 24 (1:2) – A, E, I; Strp-β-gal : 22 (1:4) – B, F, J; Strp-β-gal : 23 (1:2) – C, G, K; Strp-β-gal : 23 (1:4) – D, H, L. A, B, C, D – t24, E, F, G, H – t24+2, I, J, K, L – t24+24.</i>	str. 171
Rysunek 80.	<i>Cytotoksyczność związków 4b, 5b, 10b i 11b wobec linii komórkowej HDFa po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD).</i>	str. 173
Rysunek 81.	<i>Cytotoksyczność związków 4b, 5b, 10b i 11b wobec linii komórkowej MEL-CLS-2 po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD).</i>	str. 173
Rysunek 82.	<i>Cytotoksyczność związków 4b, 5b, 10b i 11b wobec linii komórkowej HS-695T po 2 – godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji (średnia ± SD).</i>	str. 173
Rysunek 83.	<i>Cytotoksyczność związków 10b oraz 11b wobec linii komórkowej RAW 264.7 po 24 – godzinnej inkubacji (średnia ± SD).</i>	str. 174
Rysunek 84.	<i>Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek SKBr3 oraz T47D, inkubowanych ze związkiem 4b przez 2 godziny i 24 godziny oraz z peptydomimetykami 11b i 11a w ciągu 24 godziny.</i>	str. 174
Rysunek 85.	<i>Obraz komórek widzianych pod mikroskopem fluorescencyjnym inkubowanych przez 2 godziny ze związkiem 11b (linie CRL-1472, CRL-1749, HTB-9, RT4) oraz z peptydomimetykiem 10a (linie CRL-2169, HTB-4).</i>	str. 175
Rysunek 86.	<i>Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek HS-695T, MEL-CLS-2 oraz MEWO inkubowanych przez 24 godziny ze związkiem 5b.</i>	str. 176
Rysunek 87.	<i>Zdjęcia wykonane przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek HDFa inkubowanych przez 2 godziny oraz 24 godziny ze związkiem 5b, a także przez 24 godziny z peptydomimetykiem 4b i 11b.</i>	str. 177
Rysunek 88.	<i>Obraz uzyskany przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego podocytów szczurzych inkubowanych przez: 2 godziny ze związkiem 4a oraz 24 godziny ze związkiem 11b.</i>	str. 175
Rysunek 89	<i>Obraz uzyskany przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego komórek RAW 264.7 inkubowanych przez: 2 godziny oraz 24 godziny ze związkiem 11b, a także przez 24 godziny ze związkiem 5b.</i>	str. 178
Rysunek 90.	<i>Wyniki testu CCK8 przeprowadzonego na liniach komórkowych: MEL-CLS-2, HS-695T, HDFa oraz RAW 264.7 po inkubacji z peptydomimetykami 8, 10 oraz 11 (średnia ± SD).</i>	str. 179
Rysunek 91.	<i>Wykresy przedstawiające aktywność kaspazy 3 w lizatach komórkowych: HDFa, HaCaT, HS-695T, MEL-CLS-2 po 6- oraz 24-godzinnej inkubacji z peptydomimetykami (średnia ± SD).</i>	str. 181

Wykaz tabel

Tabela 1.	<i>Sposoby klasyfikacji peptydów penetrujących błony komórkowe.</i>	str. 18
Tabela 2.	<i>Sekwencje zsyntezowanych peptydomimetyków.</i>	str. 70
Tabela 3.	<i>Warunki sprzęgania stosowane podczas standardowego cyklu syntezy prowadzonej w skali 0,1 mmola.</i>	str. 72
Tabela 4.	<i>Reagenty stosowane podczas automatycznej syntezy mikrofalowej.</i>	str. 73
Tabela 5.	<i>Liczba reszt L-Dap(ivDde) (n) zawartych w sekwencji peptydomimetyku.</i>	str. 74
Tabela 6.	<i>Warunki przebiegu testu Kaisera oraz chloranilowego.</i>	str. 75
Tabela 7.	<i>Warunki przyłączania pochodnych: Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (GO2) , Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (GO1).</i>	str. 76
Tabela 8.	<i>Liczba reszt Dap(Mtt) zawartych w sekwencji peptydomimetyków.</i>	str. 80
Tabela 9.	<i>Pochodne użyte podczas syntezy automatycznej związków numer 16a – 21a.</i>	str. 80
Tabela 10.	<i>Warunki przyłączania pochodnych Boc,Pbf-guanidyno-O2Oc-OH (GO2) oraz Boc,Pbf-guanidyno-O1Pen-OH (GO1).</i>	str. 83
Tabela 11.	<i>Warunki przyłączania pochodnych Boc-O1Pen (O1), Boc-O2Oc-OH (O2), kwasu 5-hydroksy-3-oksapentanowego (HO1) oraz kwasu 8-hydroksy-3,6-dioksaoktanowego (HO2).</i>	str. 83
Tabela 12.	<i>Pochodne fluorescencyjne przyłączone do peptydomimetyków.</i>	str. 84
Tabela 13.	<i>Parametry stosowane podczas analizy UPLC.</i>	str. 86
Tabela 14.	<i>Podstawowe informacje dotyczące wykorzystywanych linii komórkowych/komórek pierwotnych.</i>	str. 91
Tabela 15.	<i>Ilości komórek wysiewanych na określone naczynka hodowlane.</i>	str. 92
Tabela 16.	<i>Skład mieszaniny reakcyjnej.</i>	str. 95
Tabela 17.	<i>Skład 8 % żelu poliakrylamidowego.</i>	str. 99
Tabela 18.	<i>Skład 4 % żelu zagęszczającego oraz 8 % żelu rozdzielającego.</i>	str. 108
Tabela 19.	<i>Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych peptydomimetyków.</i>	str. 120
Tabela 20.	<i>Zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne peptydomimetyków oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja określona na podstawie badań z udziałem linii HB2 i MDA-MB-231.</i>	str. 129
Tabela 21.	<i>Porównanie ilości komórek w danych fazach cyklu komórkowego po 24-godzinnej inkubacji komórek linii HB2 z badanymi związkami.</i>	str. 136
Tabela 22.	<i>Porównanie ilości komórek w danych fazach cyklu komórkowego po 24-godzinnej inkubacji komórek linii MDA-MB-231 z badanymi związkami.</i>	str. 136
Tabela 23.	<i>Wartości Kd dla związków 16a – 21a oddziałujących z DNA uzyskane za pomocą MST.</i>	str. 140
Tabela 24.	<i>Wartości Kd uzyskane za pomocą techniki SPR.</i>	str. 145
Tabela 25.	<i>Zdolność do przenikania przez błony cytoplazmatyczne peptydomimetyków oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja określona na podstawie badań z udziałem poszczególnych linii komórkowych.</i>	str. 178