



Załącznik 3a
AUTOREFERAT

**BADANIE KORELACJI STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ PEPTYDÓW BIOLOGICZNIE
CZYNNYCH ORAZ ICH WPŁYWU NA MODELOWE BŁONY LIPIDOWE**

Emilia Sikorska

WYDZIAŁ CHEMII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

GDAŃSK 2015

1. Imię i nazwisko: **Emilia Sikorska**

2. Dyplomy i stopnie naukowe

Doktor nauk chemicznych

Studia doktoranckie – Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Gdańsk 2005.

Temat: „Badania konformacyjne wazopresyny i jej analogów z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.”

Promotor: prof. Bernard Lammek

Inżynier

Studia inżynierskie – Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Gdańsk 2001.

Temat: „Substancje biologicznie czynne pochodzenia roślinnego w kosmetykach.”

Promotor: dr Janina Marcinkiewicz

Magister

Studia magisterskie – Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii oraz Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej w Gdańsku, Gdańsk 2000.

Temat: „Badania zawartości pestycydów w wodach powierzchniowych dorzecza Odry.”

Promotor: prof. Bernard Lammek

3. Dotychczasowe zatrudnienie

11.04.2009-28.08.2009	urlop macierzyński
10.10.2007-12.02.2008	urlop macierzyński
01.01.2006-do dnia dzisiejszego	adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
01.10.2004-31.12.2005	asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

4. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

BADANIE KORELACJI STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ PEPTYDÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH ORAZ ICH WPŁYWU NA MODELOWE BŁONY LIPIDOWE

B. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

H1. Sikorska E[✉], Kwiatkowska A, Sobolewski D, Ślusarz R, Ślusarz MJ. Influence of bulky 3,3-diphenylalanine enantiomers replacing position 2 of AVP analogues on their conformations: NMR and molecular modeling studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45: 4065-4073. (IF₂₀₁₀: 3,193)

- H2.** Lubecka E, Kwiatkowska A, Ciarkowski J, **Sikorska E**[✉]. NMR studies of new arginine vasopressin analogs modified with alpha-2-indanylglycine enantiomers at position 2 bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *Biophys. Chem.* 2010, 151: 139-48. (IF₂₀₁₀: 2,108)
- H3.** **Sikorska E**[✉], Sobolewski D, Kwiatkowska A. Conformational preferences of proline derivatives incorporated into vasopressin analogues: NMR and molecular modelling studies. *Chem. Biol. Drug Des.* 2012, 79: 535-547. (IF₂₀₁₂: 2,469)
- H4.** **Sikorska E**[✉], Iłowska E, Wyrzykowski D, Kwiatkowska A. Membrane structure and interactions of peptide hormones with model lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 2012, 1818: 2982-2993. (IF₂₀₁₂: 3,389)
- H5.** **Sikorska E**[✉], Kwiatkowska A. Micelle-bound conformations of neurohypophyseal hormone analogues modified with a C α -disubstituted residue: NMR and molecular modeling studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2013, 31: 748-764. (IF₂₀₁₃: 2,983)
- H6.** **Sikorska E**[✉], Greber K, Rodziewicz-Motowidło S, Szultka Ł, Łukasiak J, Kamysz W. Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides. *J. Struct. Biol.* 2009, 168: 250-258. (IF₂₀₀₉: 3,673)
- H7.** **Sikorska E**[✉], Dawgul M, Greber K, Iłowska E, Pogorzelska A, Kamysz W. Self-assembly and interactions of short antimicrobial cationic lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *Biochem. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 2014, 1838: 2625-2634. (IF₂₀₁₄: 3,836)
- H8.** **Sikorska E**[✉], Kamysz E. Effect of head-to-tail cyclization on conformation of histatin-5. *J. Pept. Sci.* 2014, 20: 952-957. (IF₂₀₁₄: 1,546)
- H9.** **Sikorska E**[✉], Wyrzykowski D, Szutkowski K, Greber K, Lubecka EA, Zhukov I. Thermodynamics, size and dynamics of zwitterionic dodecylphosphocholine and anionic sodium dodecyl sulfate mixed micelles. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2015, DOI: 10.1007/s10973-015-4918-0. (IF₂₀₁₄: 2,042)

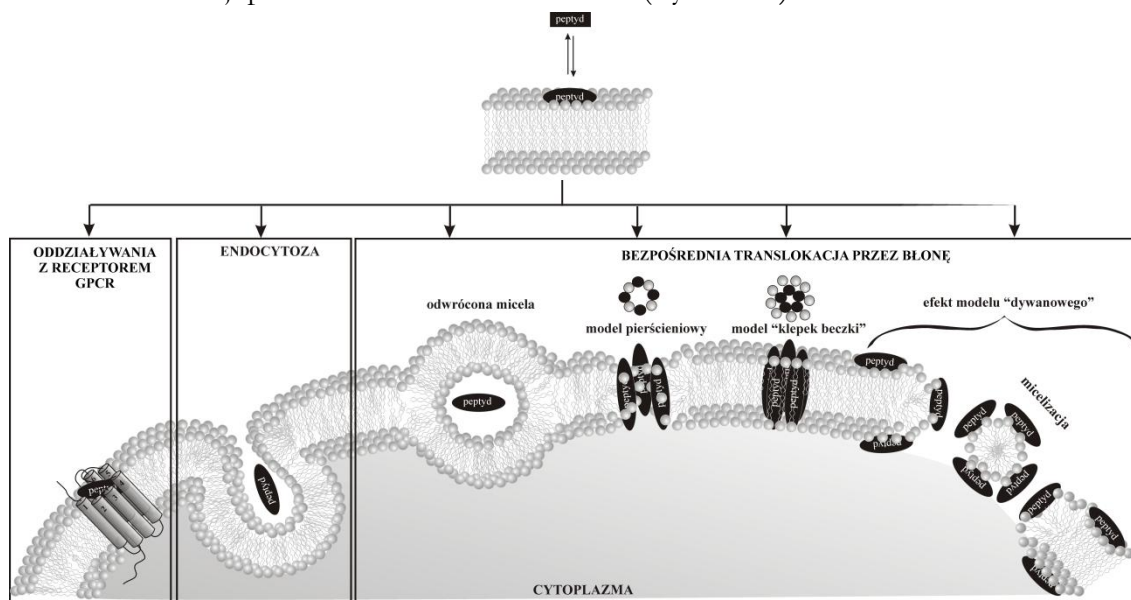
Sumaryczny Impact Factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **25,239** (obliczony na podstawie danych z roku opublikowania pracy). Średnia wartość Impact Factor w przeliczeniu na jedną pracę wynosi 2,8.

Oświadczenia habilitanta dotyczące wykonanych prac i procentowego udziału znajdują się w **załączniku 4a**. Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w **załączniku 5**.

C. Omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

WSTĘP

Przedmiotem badań prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego były dwie grupy peptydów: hormony neuroprzysadkowe (ang. *neurohypophyseal hormones, NPHs*) oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe, tzw. antybiotyki peptydowe (ang. *antimicrobial peptides, AMPs*). Choć obiekty badań są zróżnicowane pod względem funkcji biologicznych, to niewątpliwie elementem łączącym badane związki jest ich zdolność do oddziaływania z błoną komórkową. W przypadku NPHs, oddziaływania te są tylko etapem pośrednim w drodze do odpowiedniego receptora GPCR.¹⁻³ Z kolei, w przypadku większości AMPs, oddziaływania z błoną skutkują jej dezintegracją w wyniku formowania w niej kanałów, depolaryzacją lub fragmentacją, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki^{4,5} (Rysunek 1).



RYСУNEK 1

Przykładowe modele oddziaływania peptydów z błoną komórkową
(na podstawie Trabulo et al.⁶).

W związku z tym, iż dwuwarstwa lipidowa odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu obu grup peptydów, istotne było określenie ich konformacji w warunkach zbliżonych do środowiska błony lipidowej. Rozpuszczalniki organiczne, takie jak DMSO (dimetylosulfotlenek) czy TFE (trifluoroetanol), stosowane są w spektroskopii NMR jako rozpuszczalniki imitujące środowisko błony lipidowej.⁷⁻⁹ Niemniej jednak, znacznie lepszymi modelami błon lipidowych, kompatybilnymi ze spektroskopią NMR, są micelle dodecylofosfocholiny (DPC) oraz dodecylosiarczanu sodu (SDS).^{10,11} SDS nie ma swojego odpowiednika wśród składników błon lipidowych, jednakże ze względu na powierzchniowy ładunek ujemny, micelle SDS stosowane są powszechnie jako modele bakteryjnych błon lipidowych. Z kolei, micelle DPC, ze względu na obecność

zwitterjonowych grup fosfocholinowych, znacznie lepiej imitują błony lipidowe organizmów eukariotycznych.¹² Jednakże, powierzchnia większości membran lipidowych posiada ujemny ładunek elektryczny. Zwykle 10-20% lipidów w błonach biologicznych występuje w formie anionowej.¹³ W celu uwzględnienia ładunku ujemnego na powierzchni błony, w badaniach konformacyjnych stosuje się mieszane micelle DPC/SDS.¹⁴⁻¹⁶ Micelle SDS i DPC są dobrze przebadane i obszernie opisane w literaturze. Znane są również ich modele trójwymiarowe, wykorzystywane w symulacjach dynamiką molekularną w celu uwzględnienia oddziaływań peptyd-micela.^{10,17-27} W przypadku mieszanych miceli DPC/SDS, w literaturze dostępne są tylko wyniki badań przeprowadzonych przez Scorciapino i współpracowników.²⁸ **Dlatego też, w ramach osiągnięcia naukowego przeprowadziłam badania mieszanych miceli DPC/SDS określając wpływ SDS na krytyczne stężenie micelarne (ang. *critical micelle concentration, cmc*) oraz parametry termodynamiczne procesów micelizacji mieszanych miceli, ich wielkość oraz dynamikę.** W badaniach tych wykorzystałam te same metody badawcze, które posłużyły mi do badań konformacyjnych peptydów oraz analizy oddziaływań peptyd-modelowe błony lipidowe.

W przedkładanym autoreferacie omawiane prace zostały podzielone na trzy części: „Hormony neuroprzysadkowe” [H1-H5], „Antybiotyki peptydowe” [H6-H8]) oraz „Charakterystyka mieszanych miceli DPC/SDS, stosowanych w badaniach konformacyjnych peptydów jako modele błon lipidowych” [H9].

HORMONY NEUROPRZYSADKOWE

Hormony neuroprzysadkowe są cyklicznymi nonapeptydami, zawierającymi 20-członowy pierścień zamknięty mostkiem disulfidowym pomiędzy Cys¹ i Cys⁶ oraz trójpeptydową część acykliczną. Syntezowane są w postaci białka prekursorowego (preprohormonu) w jądrach przykomorowych i nadwzrokowych podwzgórza. Enzymatyczne rozszczepienie preprohormonu zachodzi w pęcherzykach neurosekrecyjnych, transportowanych wzdłuż aksonów do tylnego płata przysadki mózgowej, gdzie magazynowane są komponenty preprohormonu. Sekrecja hormonów neuroprzysadkowych z zakończeń nerwowych tylnego płata przysadki mózgowej odbywa się na drodze egzocytozy, pod wpływem depolaryzacji błony komórkowej.²⁹⁻³¹

U większości ssaków naturalnie występującymi hormonami neuroprzysadkowymi są argininowa wazopresyna (AVP, CYFQNCPRG-NH₂) oraz oksytocyna (OT, CYIQNCPLG-NH₂). Neurohormony te są obiektem szczególnego zainteresowania ze względu na ich ważne znaczenie farmakologiczne. Wazopresyna wykazuje działanie antydiuretyczne i presyjne,³² bierze także udział w regulacji wydzielania hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z przedniego płata przysadki mózgowej.³³ Różna aktywność wazopresyny jest rezultatem oddziaływania z różnymi receptorami: V₂ (nerkowym, antydiuretycznym), V_{1a} (naczyniowym) oraz V_{1b} (przysadkowym), będącymi typowymi przedstawicielami klasy A transbłonowych receptorów sprzężonych z białkami G (ang. *G-protein coupled receptor, GPCR*).³⁴⁻³⁶ Poza tym, wazopresyna odgrywa ważną rolę

w regulacji temperatury ciała³⁷ oraz w stymulacji agregacji płytek krwi.³⁸ Wydzielana jest także w sytuacjach stresowych.³⁹ Z kolei funkcje oksytocyny związane są przede wszystkim z układem rozrodczym. Oksytocyna odpowiada za skurcze mięśni gładkich macicy oraz skurcze mięśni koszyczkowych otaczających pęcherzyki mleczne (laktacja). Przypisuje się jej także istotną rolę w powstawaniu instynktu macierzyńskiego. Wszystkie efekty wywołane przez oksytocynę są rezultatem oddziaływania z jednym typem receptora GPCR.³⁴

Znaczne podobieństwo sekwencyjne wazopresyny i oksytocyny powoduje, iż oba peptydy oddziałują zarówno z receptorami wazopresynowymi jak i oksytocynowym. Jednakże w przypadku oddziaływań krzyżowych działanie jest mniej efektywne.⁴⁰

Ważnym mediatorem w oddziaływaniach peptyd-receptor jest dwuwarstwa lipidowa, z którą ligand wiąże się niespecyficznie, przybierając orientację oraz konformację umożliwiające jego związanie się z receptorem.^{1,2,9,41} Błona komórkowa ma również istotne znaczenie dla aktywności i funkcjonowania receptorów GPCR.⁴²⁻⁵⁰ Zgodnie z modelem wielu stanów, receptory GPCR pod nieobecność liganda istnieją w wielu stanach aktywacji.⁵¹ Dla uproszczenia jednak często stosuje się model dwóch stanów, który zakłada tylko dwa stany receptora: aktywny (R*) i nieaktywny (R).^{52,53} Jedynie receptory w stanie aktywnym mogą wiązać i aktywować białka G. Agony stabilizują stan aktywny receptora i przesuwają równowagę w jego kierunku. Oddziaływanie tzw. „neutralnego antagona” z receptorem nie zmienia położenia stanu równowagi, gdyż antagon ten wykazuje jednakowe powinowactwo do obu stanów. Jednakże, niektóre związki o właściwościach antagonistycznych wykazują wyższe powinowactwo do receptora w stanie nieaktywnym, przesuwając równowagę w jego kierunku. Związki te nazywane są „odwrotnymi agonami”.^{52,53} Należy podkreślić, iż podając właściwości farmakologiczne analogów hormonów neuroprzysadkowych nie rozróżnia się „neutralnych antagonistów” od „odwrotnych agonów” i obie grupy określa się mianem antagonistów.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje można przypuszczać, iż zmiany w obrębie błony komórkowej, będące rezultatem oddziaływania z ligandem, mogą mieć wpływ na funkcjonowanie receptora i przesuwać równowagę w kierunku stanu aktywnego lub nieaktywnego, wpływając pośrednio na efektywność wiązania agona lub antagona.

Dane statystyczne dowodzą, iż około 10% wszystkich urodzeń kończy się przedwczesnym porodem, co stanowi główną przyczynę umieralności i zachorowalności noworodków. Wskaźniki te nie ulegają poprawie, pomimo intensywnie rozwijanych w ostatnich latach programów opieki prenatalnej.⁵⁴⁻⁵⁸ W kontekście tych danych, antagony receptorów oksytocynowych o potencjalnym zastosowaniu jako leki tokolityczne są obiecującym przedmiotem badań. Dlatego też, do badań konformacyjnych w ramach osiągnięcia naukowego wybrałam przede wszystkim analogi hormonów neuroprzysadkowych wykazujące aktywność antyuterotoniczną (Tabela 1). Pięć z przebadanych analogów selektywnie blokowało receptor oksytocynowy, natomiast trzy okazały się silniejszymi antagonistami odpowiedzi uterotonicznej niż atosiban – stosowany obecnie w lecznictwie analog oksytocyny ([Mpa¹,D-Tyr(Et)²,Thr⁴,Orn⁸]OT), zarejestrowany pod nazwą handlową TRACTOCILE. Niestety, podobnie jak atosiban, peptydy te nie działały selektywnie.⁵⁹

TABELA 1

Analogi hormonów neuroprzysadkowych wybrane do badań konformacyjnych
wraz z ich aktywnością farmakologiczną.^{40,60-66}

Peptyd	Aktywność			Nr publikacji z cyklu habilitacyjnego
	OT	V _{1a}	V ₂	
[Mpa ¹ ,Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP	b. słaby antagonist	nieaktywny	agon	H1
[Mpa ¹ ,D-Dpa ² ,Val ⁴ ,D-Arg ⁸]VP	antagon	słaby antagonist	silny agon	
[D-Dpa ² ,D-Arg ⁸]VP	antagon	nieaktywny	silny agon	
[Mpa ¹ ,D-Dpa ²]AVP	antagon	nieaktywny	silny agon	
[Igl ²]AVP	antagon	nieaktywny	znikoma	H2
[Mpa ¹ ,Igl ²]AVP	antagon	nieaktywny	znikoma	
[D-Igl ²]AVP	silny antagonist	słaby antagonist	znikoma	
[Mpa ¹ ,D-Igl ²]AVP	silny antagonist	słaby antagonist	znikoma	
[Nmp ²]AVP	antagon	słaby antagonist	znikoma	H3
[Nmp ² ,D-Arg ⁸]AVP	antagon	słaby antagonist	nieaktywny	
[APy ²⁻³]AVP	nieaktywny	nieaktywny	nieaktywny	
[Apy ²⁻³]AVP	nieaktywny	nieaktywny	nieaktywny	
[Mpa ¹ ,Ica ² ,D-Arg ⁸]VP	antagon	nieaktywny	znikoma	
OT (CYIQNCPLG-NH ₂)	agon	b. słaby agon	b. słaby agon	H4
AVP (CYFQNCPRG-NH ₂)	b. słaby agon	agon	agon	
[D-Igl ²]AVP	silny antagonist	antagon	znikoma	
[Adg ² ,D-Arg ⁸]VP	b. słaby agon	nieaktywny	znikoma	
[<i>cis</i> -Apc ²]OT	antagon	słaby antagonist	nt	
t-Bba[<i>cis</i> -Apc ² ,Val ⁴]AVP	b. słaby agon	nieaktywny	nieaktywny	H5
Aba[<i>cis</i> -Apc ² ,Val ⁴]AVP	antagon	nieaktywny	nieaktywny	
Aca[<i>cis</i> -Apc ² ,Val ⁴]AVP	słaby antagonist	nieaktywny	nieaktywny	
[<i>cis</i> -Apc ²]OT	antagon	słaby antagonist	nt	
[Mpa ¹ , <i>cis</i> -Apc ²]OT	silny antagonist	słaby antagonist	nt	

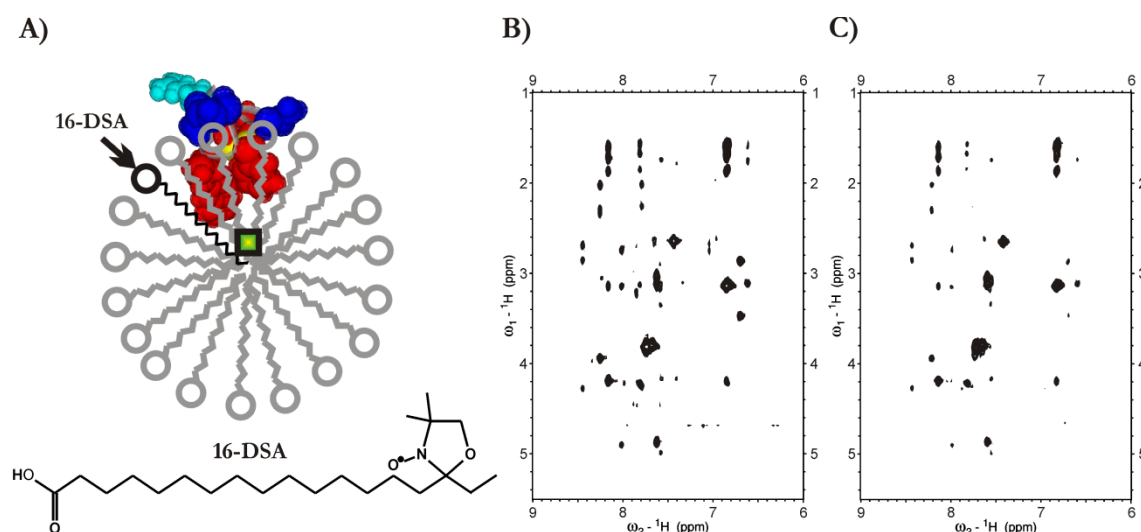
Aba, kwas 4-aminobenzoowy; Aca, kwas 1-adamantylokarboksylowy; Adg, (S)-1-adamantyloglicyna; Apy, kwas (2R,4S)-aminopiroglutaminowy; APy, kwas (2S,4S)-aminopiroglutaminowy; Ica, kwas indolilo-2-karboksylowy; *cis*-Apc, kwas *cis*-1-amino-4-fenylcykloheksylowy; Dpa, 3,3-difenyloalanina; Igl, α -2-indanyloglicyna; Mpa, kwas 3-merkaptopropionowy; Nmp, kwas (2S,4R)-2-naftylometrylopyrolidyno-2-karboksylowy; t-Bba, kwas 4-tert-butylobenzoowy.

nt – test nie został wykonany

Większość z badanych w ramach osiągnięcia naukowego peptydów z grupy hormonów neuroprzysadkowych charakteryzowała się słabą rozpuszczalnością w wodzie, co nastęrczało problemów w trakcie przygotowywania próbek o stężeniach niezbędnych do badań NMR. Ze względu na problemy z rozpuszczalnością w wodzie, widma NMR pierwszych badanych analogów, modyfikowanych resztą 3,3-difenyloalaniny [H1], zostały zarejestrowane w roztworze DMSO-d₆. W przypadku analogów modyfikowanych resztą α -2-indanyloglicyny, pomiary zostały wykonane w micelach SDS [H2]. Micele te dobrze solubilizowały peptydy, umożliwiając tym samym ich rozpuszczenie w roztworze wodnym. W badaniach konformacyjnych pozostałych peptydów z grupy hormonów neuroprzysadkowych zastosowałam mieszane micelle DPC/SDS. Jednakże, i w tym przypadku pojawiły się problemy z rozpuszczalnością peptydów. Dlatego też,

w celu otrzymania klarownego roztworu, peptydy zostały najpierw rozpuszczone w metanolu- d_3 , a następnie rozcieńczone wodnym roztworem mieszanych miceli DPC/SDS [H3 i H5].

W celu identyfikacji oddziaływań pomiędzy peptydem a hydrofobowym rdzeniem mieszanych miceli, wykorzystałam n-doksyłową pochodną kwasu stearynowego (kwas 16-doksylostearynowy, 16-DSA). Cząsteczka kwasu 16-DSA wbudowuje się w micelę, przy czym grupa nitroksylowa znajduje się w hydrofobowym jej rdzeniu. Ze względu na obecność niesparowanego elektronu, grupa nitroksylowa wykazuje właściwości paramagnetyczne, czego konsekwencją jest silne poszerzenie sygnałów, na skutek skrócenia czasów relaksacji T_2 , tych reszt peptydu, które znajdują się w jej pobliżu.^{67,68} Dlatego też, analiza widm NMR otrzymanych przed i po dodaniu kwasu 16-doksylostearynowego (16-DSA) pozwoliła mi określić, które z reszt poszczególnych peptydów zanurzone są w hydrofobowej części miceli (Rysunek 2).



RYСУNEK 2

- (A) Zastosowanie kwasu 16-doksylostearynowego (16-DSA) w celu eksperymentalnego ustalenia oddziaływań peptyd-micela na przykładzie analogu [Nmp²,D-Arg⁸]VP [H3].
 (B) Widma TOCSY analogu [Nmp²,D-Arg⁸]VP zarejestrowane w obecności mieszanej miceli 5:1 DPC/SDS bez dodatku kwasu 16-DSA i (C) z dodatkiem kwasu 16-DSA.

Badane analogi NPHs wykazywały tendencje do tworzenia β -zgięć w pozycjach 2,3 i/lub 3,4, co wskazuje, iż jest to element struktury charakterystyczny dla peptydów oddziałujących z receptorami OT i V_{1a}. β -Zgięcie we fragmencie 1-4 wydaje się być istotne w kontekście wystąpienia aktywności antypresyjnej, nie jest ono jednak konieczne do wystąpienia aktywności antyuterotonicznej [H1-H3, H5]. Spośród analogów wykazujących aktywność antydiuretyczną, peptydy o silniejszym działaniu posiadały β -zgięcie we fragmencie 6-9, które prawdopodobnie wpływa na wzmocnienie aktywności antydiuretycznej, nie jest jednak niezbędne do jej wystąpienia [H1].

Dotychczasowe badania oddziaływań peptyd-receptor sugerują, iż oddziaływania pomiędzy aromatycznymi resztami liganda i aromatycznymi resztami helisy TM6 receptorów V_{1a}R i OTR są charakterystyczne dla wiązania antagonistów.⁶⁹⁻⁷¹ Przypuszcza się, że oddziaływania te zapobiegają zmianom konformacyjnym helisy TM6, warunkującym aktywację receptora, przez co stabilizują jego stan nieaktywny.^{69,70}

Analiza oddziaływań peptyd-micela wykazała, iż aromatyczne łańcuchy boczne badanych peptydów zanurzone są w hydrofobowej części miceli, natomiast dodatnio naładowany łańcuch boczny Arg⁸ oddziałuje z ujemnie naładowanymi fragmentami miceli, bądź też jest wyeksponowany do środowiska wodnego. Wyjątek stanowi analog [Mpa¹,Ica²,D-Arg⁸]VP [H3], w którym łańcuchy boczne obu reszt aromatycznych Ica² i Phe³ ułożone są po przeciwnej stronie cząsteczki, co uniemożliwia ich jednoczesne zanurzenie w hydrofobowej części miceli. W rezultacie, hydrofobowy łańcuch boczny Ica² ułożony jest na zewnątrz kompleksu peptyd-micela. Jednakże, jest on zawinięty do środka cząsteczki, co redukuje niekorzystne oddziaływania z polarnymi cząsteczkami wody. Analog ten charakteryzuje się również obecnością wiązania peptydowego Mpa¹-Ica² o geometrii *cis*.

Ciekawym przypadkiem okazały się analogi modyfikowane resztą kwasu aminopiroglutaminowego, [APy²⁻³]AVP i [Apy²⁻³]AVP [H3]. Oba analogi są nieaktywne i jednocześnie słabo oddziałują z micelą. Peptydy te nie penetrują do hydrofobowego rdzenia miceli i są tylko słabo związane z jej powierzchnią. W przypadku drugiego analogu, widma NMR wykazały obecność więcej niż dwóch populacji sygnałów dla fragmentu Gln⁴-Arg⁸. Zwielokrotnienie linii rezonansowych na widma NMR jest wynikiem powolnych w skali eksperymentu przejść konformacyjnych peptydu.⁷² W przypadku analogu [Apy²⁻³]AVP, obecność kilku zestawów sygnałów na widmach NMR jest prawdopodobnie konsekwencją izomeryzacji *cis/trans* wiązania peptydowego Cys⁶-Pro⁷ i/lub równowagi ustalającej się pomiędzy konformacjami peptydu w różny sposób związanymi z micelą.

Dotychczasowe badania oddziaływań peptydowych ligandów z receptorami VP/OT wskazują, iż miejsca wiążące antagonony oraz konformacje antagonistów w kieszeni wiążącej receptora, mogą być zbliżone lub zupełnie odmienne niż agonów.⁷³⁻⁷⁵ Analiza analogów modyfikowanych resztą *cis*-Apc nie wykazała jednoznacznych różnic pomiędzy konformacją przyjmowaną przez agon i antagonistę [H5]. Spośród wazopresynopodobnych analogów, t-Bba[*cis*-Apc²,Val⁴]AVP jako jedyny okazał się słabym agonem receptorów oksytocynowych. Jest to dość zaskakujące, gdyż Tyr² naturalnie występująca w sekwencji AVP i OT, a zastąpiona w tym analogu resztą *cis*-Apc, jest istotna dla aktywacji receptora i transdukcji sygnału.^{76,77} Pozostałe dwa, Aba[*cis*-Apc²,Val⁴]AVP i Aca[*cis*-Apc²,Val⁴]AVP, zgodnie z oczekiwaniami, to antagonony receptorów oksytocynowych. Porównując struktury przestrzenne tych peptydów zaobserwowałam, iż analogi t-Bba[*cis*-Apc²,Val⁴]AVP i Aca[*cis*-Apc²,Val⁴]AVP wykazują bardzo duże podobieństwo w ułożeniu łańcuchów bocznych, pomimo różnej aktywności. Niemniej jednak, analiza oddziaływań z micelą wykazała, iż w przypadku pierwszego peptydu, reszty Asn⁵ oraz Gly⁹ są mocniej wyeksponowane do środowiska wodnego. Reszta Asn⁵, podobnie jak Tyr², odpowiedzialna jest za transdukcję sygnału. Z kolei, Gly⁹ może odgrywać ważną rolę w selektywności względem receptora oksytocynowego, a C-terminalna grupa amidowa może wpływać na efektywność

wiązania.^{76,78} Dlatego też, różnice w oddziaływaniach z micelą mogą przekładać się na różną aktywność obu peptydów.

Badając analogi modyfikowane *cis*-Apc zaobserwowałam różnice w ułożeniu analogów wazopresyno- i oksytocynopodobnych względem miceli. Pochodne AVP ułożone są w przybliżeniu prostopadle, podczas gdy pochodne OT równoległe do powierzchni miceli. Różnice w ułożeniu są wynikiem różnej polarności fragmentu C-terminalnego: analogi AVP posiadają w pozycji 8 dodatkowo naładowaną resztę argininy, z kolei analogi OT – niepolarną resztę leucyny. Skutkuje to tym, iż w pierwszym przypadku C-koniec jest wyeksponowany do wody, zaś w drugim, zanurzony w hydrofobowej części miceli. Wcześniejsze badania oddziaływań pomiędzy AVP i OT a ich receptorami, również dowiodły różnic w ułożeniu obu peptydów w kieszeniach wiążących poszczególnych receptorów.^{78,79}

Dla wybranych peptydów: AVP, OT, [D-Igl²]AVP, [Adg²,D-Arg⁸]VP i [*cis*-Apc²]OT (**H4**), przeprowadziłam badania oddziaływań z liposomami. Analiza widm CD w obecności liposomów w różnych temperaturach umożliwiła mi prześledzenie wpływu lipidów na konformacje peptydów. Z kolei, temperaturowe widma FT-IR pozwoliły mi na ustalenie wpływu badanych peptydów na uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych oraz temperaturę przejścia fazowego lipidów. Dodatkowo, w celu określenia stałej wiązania peptyd-lipid zostały wykonane pomiary za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ang. *isothermal titration calorimetry*, ITC). Badania ITC zwykle pozwalają na oznaczenie stałej wiązania, stechiometrii reakcji, entalpii oraz entropii. Jednakże, w przypadku badanych analogów nie udało się zbadać oddziaływań peptyd-lipidy metodą ITC. Metoda ta umożliwia bowiem badanie oddziaływań charakteryzujących się stałą wiązania rzędu 10^3 - 10^8 M⁻¹.⁸⁰ W przypadku hormonów neuroprzysadkowych oddziaływania z lipidami są prawdopodobnie znacznie słabsze, a przez to nierejestrowane za pomocą ITC.

Analiza temperaturowych widm FT-IR wykazała, iż wszystkie peptydy wpływają na przejścia fazowe lipidów, obniżając temperaturę głównego przejścia fazowego o około 1,2-1,6°C. Jeden z analogów, [Adg²,D-Arg⁸]VP (bardzo słaby agon receptorów OTR), obniżał płynność modelowej błony lipidowej w fazie ciekłokrystalicznej (powyżej temperatury głównego przejścia fazowego) [**H4**]. Zmiany właściwości błony lipidowej, wynikające z oddziaływań liganda z błoną, mogą mieć niekorzystny wpływ na sam receptor i efektywność wiązania liganda. Wydaje się to uzasadnione, gdyż Gurdal i współpracownicy znaleźli korelację pomiędzy płynnością błony, a oddziaływaniem białka G z receptorem β_2 -adrenergicznym.⁴⁴

Analiza widm CD sugeruje, iż w przypadku oksytocyny związanej z liposomem, łańcuch boczny Tyr² jest bardziej wyeksponowany na zewnątrz cząsteczki, niż w roztworze wodnym bez obecności liposomów. Z kolei w przypadku AVP, w wyniku wiązania się peptydu z liposomem, zanikają oddziaływania stakingowe pomiędzy pierścieniami aromatycznymi Tyr² i Phe³, co przypuszczalnie wynika z zanurzenia obu reszt w hydrofobowej części liposomu. Wprowadzenie przestrzennie rozbudowanych hydrofobowych reszt w N-terminalnej części analogów AVP i OT zwiększyło udział oddziaływań hydrofobowych pomiędzy peptydem a lipidami. W temperaturze powyżej

temperatury przejścia fazowego lipidów zmienia się ułożenie polarnych głów lipidowych, przez co ich ujemnie naładowane fragmenty są bardziej wyeksponowane na zewnątrz liposomu⁸¹. W konsekwencji wzrasta też prawdopodobieństwo oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanym łańcuchem bocznym Arg⁸ peptydów, a ujemnie naładowanymi grupami fosfatydylowymi liposomu, co z kolei może wpływać na konformację C-końcowego fragmentu wazopresynopodobnych peptydów.

ANTYBIOTYKI PEPTYDOWE

Wobec ciągle wzrastającej oporności mikroorganizmów na konwencjonalne antybiotyki, intensywnie poszukuje się nowych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i potencjalnym zastosowaniu klinicznym. Duże nadzieje pokłada się w antybiotykach peptydowych (ang. *Antimicrobial peptides*, AMPs), stanowiących jeden z ważniejszych elementów układu odpornościowego różnych organizmów żywych. AMPs działają przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo, przeciwwirusowo i przeciwpierwotniakowo.^{82,83} Opierając się na ich oryginalnej strukturze można projektować analogi o zwiększonej aktywności i ulepszonych parametrach farmakokinetycznych. Peptydy te dobrze rokują nie tylko jako środki lecznicze, ale również jako środki konserwujące.^{84,85}

W ramach osiągnięcia naukowego przebadalam następujące peptydy z grupy antybiotyków peptydowych: citropinę 1.1 oraz jej dwa analogi, (1-12)citropina i [Ala⁴](1-13)citropina, „N-koniec C-koniec” cykliczny analog histatyny 5 oraz trzy syntetyczne lipopeptydy, C₁₆-KK-NH₂, C₁₆-KGK-NH₂ oraz C₁₆-KKKK-NH₂.

CITROPINA 1.1 I ANALOGI

Citropina 1.1 zbudowana jest z 16 reszt aminokwasowych (GLFDVIKKVASVIGGL-NH₂). Wydzielana jest przez gruczoły grzbietowe australijskiej żabki nadrzewnej, *Litoria citropa*.^{86,87} Oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego i przeciwnowotworowego, citropina 1.1 powoduje inhibicję neuronalnej syntazy tlenu azotu.⁸⁷⁻⁸⁹ Istotnym motywem strukturalnym citropiny 1.1, mającym wpływ na aktywność przeciwbakteryjną są pierwsze trzy N-terminalne reszty (Gly-Leu-Phe) oraz dodatkowo naładowane reszty lizyny w pozycjach 7 i 8.⁸⁷ Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego wykazały, iż skrócenie C-końcowego fragmentu łańcucha peptydowego citropiny 1.1 również obniża aktywność przeciwbakteryjną [H6]. Niemniej jednak, dodatkowa zamiana reszty kwasu asparaginowego z ujemnie naładowanym łańcuchem bocznym w pozycji 4, na obojętną resztą alaniny, może spowodować w niektórych przypadkach polepszenie aktywności przeciwbakteryjnej względem wybranych szczepów bakteryjnych.

Wcześniejsze badania konformacyjne citropiny 1.1 w 50% roztworze TFE wykazały obecność α -helisy wzdłuż całego łańcucha peptydowego.⁸⁶ Struktura ta nie jest zachowana w obecności miceli SDS, gdzie tworzą się dwa fragmenty α -helikalne, 4-7 oraz 10-16, połączone β -zgięciem w pozycji 8,9 [H6]. Nie można wykluczyć, iż jest to konsekwencją oddziaływania z micelą SDS, która ma kształt sferyczny, przez co wymusza wygięcie

łańcucha peptydowego citropiny 1.1. Charakterystyczną cechą strukturalną citropiny 1.1 jest również mostek solny tworzący się pomiędzy ujemnie naładowanym łańcuchem bocznym Asp⁴, a dodatnio naładowanym łańcuchem bocznym Lys⁷. Dla analogu (1-12)citropina zaobserwowałam strukturę α -helikalną we fragmencie Gly¹-Val⁹, zakończoną β -zgięciem typu I w pozycji 9,10. Pomimo obecności α -helisy wzdłuż niemal całego łańcucha, analog (1-12)citropina charakteryzował się najslabszą aktywnością przeciwbakteryjną wśród badanych peptydów. Z kolei, analog [Ala⁴](1-13)citropina, wykazywał nieco wyższe niż natywna citropina 1.1 aktywności względem bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* oraz *P. aeruginosa*). W przypadku tego analogu zaobserwowałam obecność tylko krótkiej α -helisy we fragmencie 4-8, podczas gdy N- i C-końcowe fragmenty pozostały nieuporządkowane. Ponadto, w około 30% analizowanych struktur przestrzennych analogu [Ala⁴](1-13)citropina, α -helisa konkurowała z helisą 3₁₀. Helisa 3₁₀ może stanowić formę pośrednią w faldowaniu, jak również rozfaldowywaniu się α -helisy.⁹⁰ Wspólną cechą strukturalną wszystkich otrzymanych konformacji tego analogu było β -zgięcie typu I w pozycji 10,11, stabilizowane wiązaniem wodorowym HN¹²-CO⁹.

Analiza oddziaływań z micelą SDS wykazała, iż łańcuch boczny Asp⁴ citropiny 1.1 oraz analogu (1-12)citropina jest wyeksponowany do środowiska wodnego, co jest wynikiem odpychania się zjonizowanej grupy karboksylowej z ujemnie naładowanymi grupami sulfonowymi miceli SDS. Zastąpienie Asp⁴ obojętną resztą Ala w analogu (1-13)[Ala⁴]citropina nie wpłynęło na ułożenie łańcucha bocznego reszty w pozycji 4. Natomiast, skrócenie łańcucha peptydowego wyraźnie spowodowało głębsze zanurzenie obu analogów w hydrofobowym rdzeniu miceli w porównaniu do citropiny 1.1 [H6].

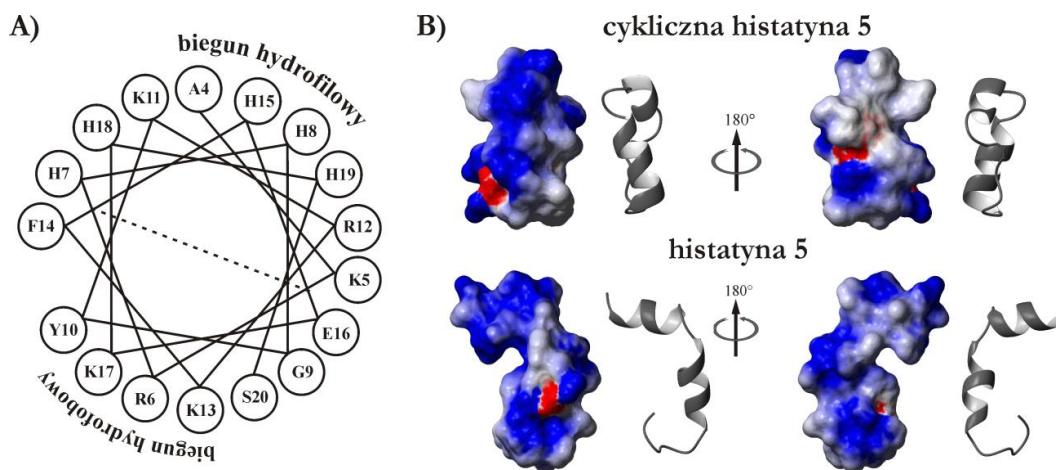
„N-KONIEC C-KONIEC” CYKLICZNY ANALOG HISTATYNY 5

Histatyny tworzą grupę 12 niskocząsteczkowych, bogatych w histydyne kationowych peptydów ślinowych, przy czym histatyny 1, 3 i 5 stanowią zdecydowaną jej większość.⁹¹ W badaniach *in vitro* udowodniono przeciwrzybiczą aktywność histatyn wobec grzybów z rodzaju *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*⁹²⁻⁹⁴ oraz wobec bakterii *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis*.⁹⁵ Wśród histatyn, najbardziej efektywną względem *Candida albicans* jest histatyna 5,⁹⁶ jednakże, peptyd ten jest również podatny na degradację proteolityczną.^{97,98} Jednym ze sposobów zwiększenia stabilności peptydów jest cyklizacja, która często prowadzi również do otrzymania peptydów wykazujących zwiększoną aktywność biologiczną.⁹⁹⁻¹⁰² W przeprowadzonych testach mikrobiologicznych, histatyna 5 oraz jej „N-koniec C-koniec” cykliczny analog, c-Hst5, wykazywały jednakową aktywność.¹⁰³ Wstępne badania konformacyjne cyklicznej histatyny 5 z wykorzystaniem dichroizmu kołowego dowiodły, iż peptyd ten w roztworze trifluoroetanolu (TFE) przyjmuje konformację helikalną. Z kolei, w obecności ujemnie naładowanych miceli niezbędna jest obecność jonów Zn²⁺ do utworzenia struktury helikalnej, podobnie jak w przypadku natywnej histatyny 5.¹⁰³ Działanie jonów Zn²⁺ przypisuje się obecności sekwencji His-Glu-X-X-His wiążącej jony Zn²⁺.¹⁰⁴

Wstępne pomiary NMR cyklicznej histatyny 5 zostały wykonane w obecności miceli SDS. Otrzymane widma charakteryzowały się bardzo słabą rozdzielczością ze względu na

silnie poszerzone sygnały. Dlatego też, kolejne widma NMR c-Hst5 zostały zarejestrowane w roztworze TFE [H8].

Cykliczna histatyna 5 wykazuje tendencję do tworzenia dwóch fragmentów α -helikalnych, Ala⁴-His⁷ oraz Lys¹¹-Ser²⁰, a kąt pomiędzy dwiema helisami wynosi $142 \pm 8^\circ$. Helikalny diagram kołowy dla fragmentu Ala⁴-Ser²⁰ potwierdza, iż peptyd posiada słabe właściwości amfipatyczne (Rysunek 3). Jednakże, biorąc pod uwagę powierzchnie molekularne potencjału elektrostatycznego, obliczone dla struktur przestrzennych otrzymanych w oparciu o dane NMR, można zaobserwować, że reszty naładowane dodatnio umiejscawiają się po jednej stronie cząsteczki. Z kolei, reszty Asp¹ oraz Glu¹⁶ z ujemnie naładowanymi łańcuchami bocznymi są wyraźnie schowane do jej wnętrza. Porównanie struktury cyklicznej histatyny 5 z jej liniowym odpowiednikiem sugeruje, iż cyklizacja poprawia spolaryzowany rozkład reszt hydrofobowych i hydrofilowych (Rysunek 3).



RYSUNEK 3

(A) Helikalny diagram kołowy dla histatyny 5 w fragmencie Ala⁴-Ser²⁰, obejmującym dwa odcinki α -helikalne zidentyfikowane na podstawie danych NMR. (B) Powierzchnie molekularne potencjału elektrostatycznego cyklicznej histatyny 5 i jej liniowego odpowiednika, wyznaczone w programie MOLMOL.¹⁰⁵

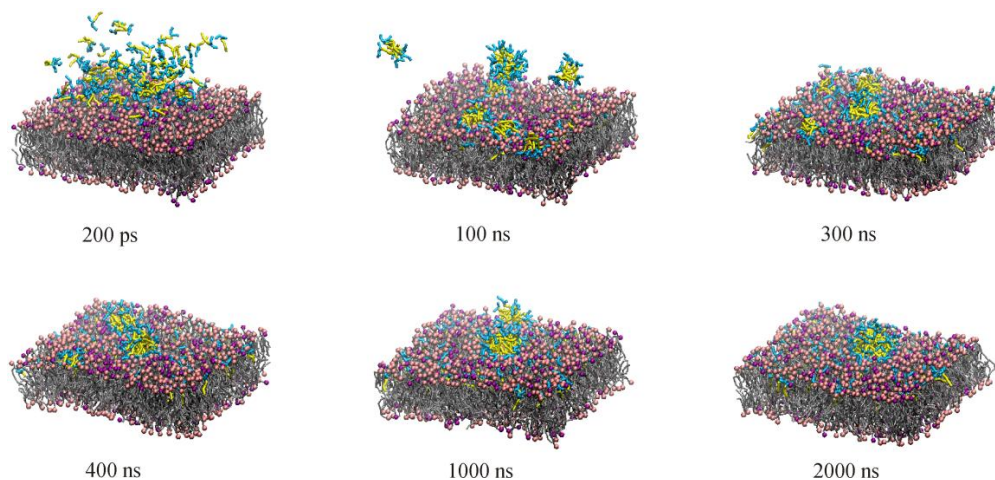
SYNTETYCZNE LIPOPEPTYDY

Ciekawą alternatywą dla konwencjonalnych antybiotyków są krótkie syntetyczne lipopeptydy, zawierające reszty aminokwasów kationowych oraz reszty kwasów tłuszczowych. Spełniają one warunki amfipatyczności oraz sumarycznego ładunku dodatniego, istotnych cech antybiotyków peptydowych. Badane w ramach osiągnięcia naukowego lipopeptydy [H7], poza aktywnością przeciwbakteryjną, wykazują właściwości powierzchniowo czynne, dzięki czemu mogą jednocześnie pełnić rolę emulgatora i konserwantu.

W przypadku tej grupy związków skupiłam się na badaniach procesów micelizacji oraz oddziaływaniach z modelowymi błonami lipidowymi. Badane lipopeptydy wykazują aktywność na podobnym poziomie względem wybranych szczepów bakteryjnych zarówno

bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Minimalne stężenia hamujące (MICs) badanych peptydów mieszczą się w zakresie 4-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, natomiast minimalne stężenia bakteriobójcze w zakresie 4-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Badania właściwości hemolitycznych względem ludzkich czerwonych krwinek wyraźnie pokazują, iż peptyd $\text{C}_{16}\text{-KK-NH}_2$ charakteryzuje się najwyższą aktywnością hemolityczną [H7]. Badania wartości krytycznego stężenia micelarnego (*cmc*) za pomocą pomiarów napięcia powierzchniowego wykazały, iż wartość *cmc* wzrasta w następującej kolejności: $\text{C}_{16}\text{-KK-NH}_2 < \text{C}_{16}\text{-KGK-NH}_2 < \text{C}_{16}\text{-KKKK-NH}_2$. Dodatkowo, symulacje procesów micelizacji przeprowadzone metodami dynamiki molekularnej wykazały, iż wraz ze wzrostem wartości *cmc* maleje liczba agregacji, co jest rezultatem większych efektów sterycznych w obrębie polarnej części powstających miceli. Analiza oddziaływań lipopeptydów z modelowymi błonami lipidowymi z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni oraz izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego przyniosła zaskakujące rezultaty. Analiza widm FTIR badanych peptydów w obecności zwiterjonowych liposomów DPPC wykazała, iż wszystkie lipopeptydy penetrują hydrofobowy rdzeń liposomów, co jest wynikiem obecności fragmentu lipidowego, ułatwiającego zakotwiczenie lipopeptydu w liposomie. Zgodnie z oczekiwaniami, lipopeptydy $\text{C}_{16}\text{-KK-NH}_2$ oraz $\text{C}_{16}\text{-KGK-NH}_2$ oddziałują również z ujemnie naładowanymi liposomami DPPG i POPG, imitującymi bakteryjną błonę lipidową, potwierdzając tym samym ważną rolę oddziaływań elektrostatycznych w procesie wiązania się peptydu do powierzchni błony. Z kolei, w przypadku lipopeptydu $\text{C}_{16}\text{-KKKK-NH}_2$, który charakteryzuje się najwyższym dodatnim ładunkiem całkowitym spośród badanych lipopeptydów, przeprowadzone badania FTIR i ITC sugerują brak oddziaływań z ujemnie naładowanymi liposomami [H7]. Podobne rezultaty uzyskano dla pięciopeptydu Lys_5 .¹⁰⁶ Brak efektu oddziaływania pomiędzy dodatnio naładowanym peptydem a ujemnie naładowanym liposomem jest rezultatem kompensacji efektów hydrofobowych oraz elektrostatycznych.

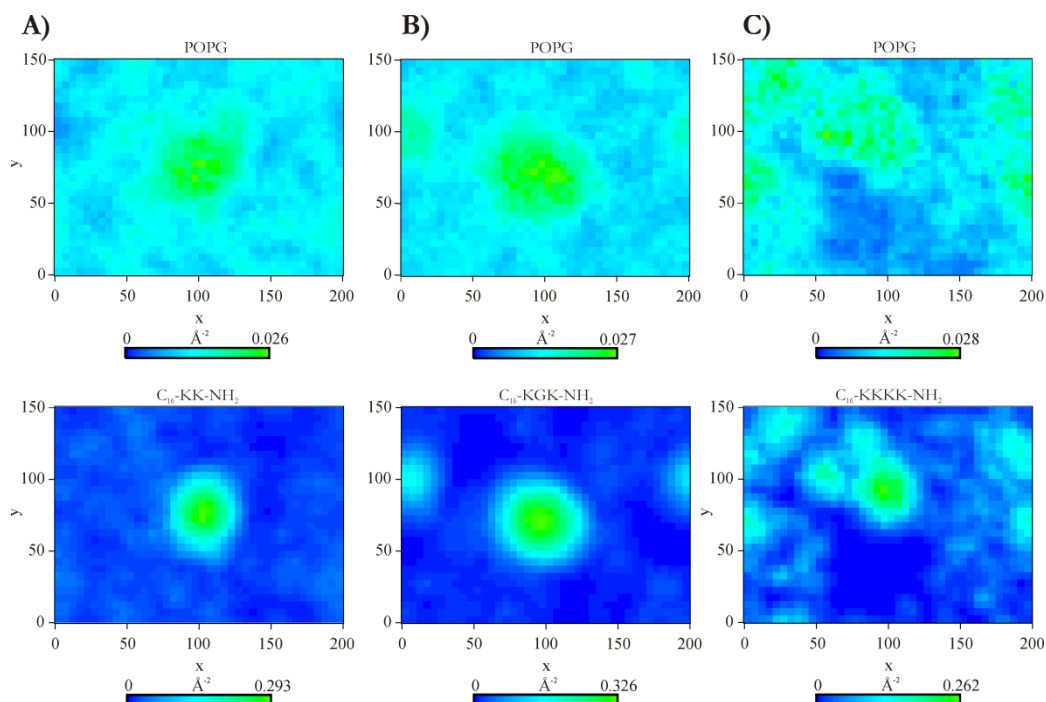
W celu wizualizacji oddziaływań pomiędzy badanymi lipopeptydami a bakteryjną błoną lipidową, przeprowadziłam symulacje dynamiką molekularną w modelu gruboziarnistym, wykorzystując pakiet GROMACS 4.5.5.¹⁰⁷ W trakcie trwania dynamiki zaobserwowałam trzy ważne procesy: tworzenie się miceli lipopeptydów związanych z powierzchnią błony, wbudowywanie się monomerów lipopeptydów w błonę oraz wbudowywanie się utworzonych miceli lipopeptydów w błonę (Rysunek 4). Micele, które pozostały na powierzchni błony spowodowały jej reorganizację, poprzez lokalne wzbogacenie błony w ujemnie naładowane lipidy POPG w miejscu wiązania się miceli lipopeptydów (Rysunek 5).



RYSUNEK 4

Ramki z symulacji dynamiką molekularną w modelu gruboziarnistym dla lipopeptydu C_{16} -KK-NH₂ w obecności modelu bakteryjnej błony lipidowej (1:3 POPE:POPG). Kolor żółty odpowiada reszcie kwasu palmitynowego, kolor błękitny odpowiada resztom lizyny.

Hydrofobowe fragmenty lipidów błony komórkowej zaznaczone są kolorem szarym, natomiast kolory: różowy i fioletowy odpowiadają fragmentom polarnym POPG i POPE.



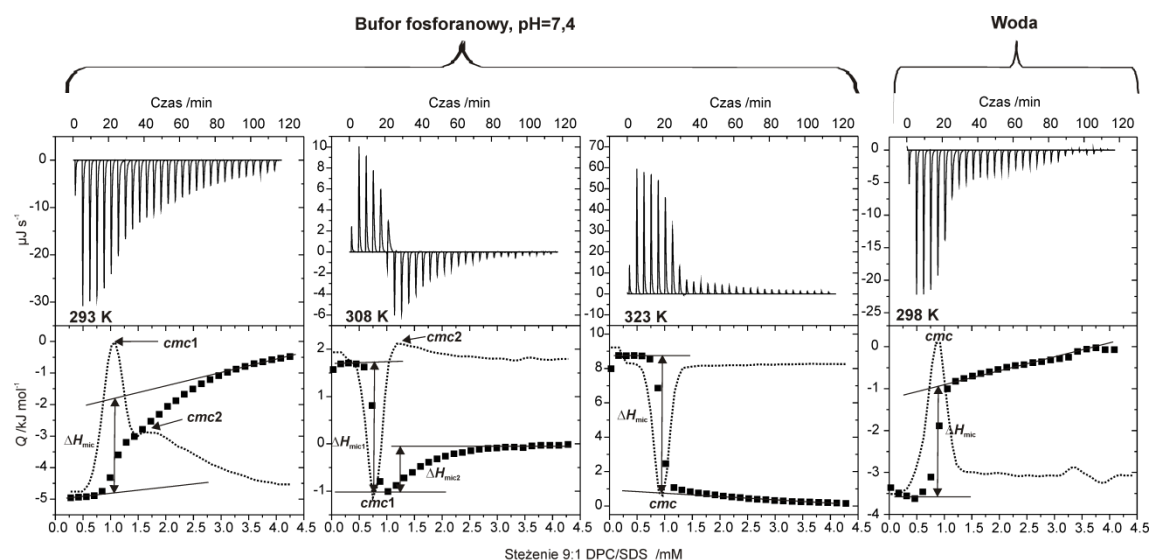
RYSUNEK 5

Mapa gęstości badanych lipopeptydów oraz lipidów POPG, wchodzących w skład modelowej bakteryjnej błony komórkowej, wyznaczona na podstawie ostatnich 100 ns 2 μ s dynamiki molekularnej w modelu gruboziarnistym. (A) C_{16} -KK-NH₂, (B) C_{16} -KGG-NH₂ i (C) C_{16} -KKKK-NH₂.

CHARAKTERYSTYKA MIESZANYCH MICELI DPC/SDS STOSOWANYCH W BADANIACH KONFORMACYJNYCH PEPTYDÓW JAKO MODELE BŁON LIPIDOWYCH

Badania konformacyjne peptydów zdolnych do wiązania się z błoną komórkową wymagają zastosowania rozpuszczalników, bądź układów imitujących środowisko błony komórkowej dla odpowiedniego faldowania się i stabilności konformacji łańcucha polipeptydowego.^{2,6,83,108,109} Spośród stosowanych modeli błon lipidowych, podobieństwo do błon biologicznych maleje w kolejności liposomy, bicele, mieszane micelle i micelle.¹¹⁰ Badania NMR peptydów w obecności liposomów ograniczają się zazwyczaj do badań w fazie stałej, ze względu na duże rozmiary liposomów. W roztworze, powolna reorientacja molekularna układu liposom-peptyd, spowodowana rozmiarem samego liposomu prowadzi do poszerzenia sygnałów NMR. Sprawia to, że wyznaczenie wysokorozdzielczej struktury trójwymiarowej peptydu w oparciu o dane NMR staje się trudne, a często wręcz niemożliwe.^{111,112} Dlatego też, micelle stanowią dobrą alternatywę jako modele błon lipidowych w badaniach konformacyjnych z wykorzystaniem spektroskopii NMR, ze względu na ich szybką reorientację molekularną w roztworze.¹¹³

W związku z tym, iż do badań konformacyjnych peptydów wykorzystywałam mieszane micelle DPC/SDS, przeprowadziłam również badania tych miceli. Krytyczne stężenia micelarne (*cmc*) oraz parametry termodynamiczne procesów micelizacji wyznaczyłam za pomocą izotermicznej kalymetrii miareczkowej (ITC). Do badania dynamiki układów micelarnych oraz ich rozmiarów wykorzystałam spektroskopię NMR [H9].



RYСУNEK 6

Termogramy, krzywe miareczkowania kalorymetrycznego oraz pierwsze pochodne krzywych miareczkowania kalorymetrycznego dla układu 9:1 DPC/SDS w buforze fosforanowym oraz w wodzie.

Z przeprowadzanych badań wynika, iż mieszaniny surfaktantów DPC/SDS wykazują tendencję do tworzenia dwóch rodzajów miceli w roztworze buforu fosforanowego, pH=7,4. Podwyższenie temperatury, jak również rozpuszczenie mieszaniny surfaktantów w niebuforowanym roztworze, skutkuje tworzeniem się tylko jednego rodzaju mieszanych miceli (Rysunek 6). Dodatek ujemnie naładowanego SDS do miceli DPC spowodował obniżenie wartości krytycznego stężenia micelnego, co wskazuje na synergizm w tworzeniu się mieszanych miceli DPC/SDS.

Analiza parametrów termodynamicznych procesów micelizacji sugerują różnice w hydratacji mieszanych miceli w porównaniu do miceli jednoskładnikowych. Współczynniki samodyfuzji wyznaczone w oparciu o eksperymenty PFG-NMR wskazują, iż rozmiar miceli nieznacznie wzrasta po dodaniu SDS. Analiza czasów relaksacji T_1 i T_2 protonów oraz wartości ich stosunku T_1/T_2 dowodzi, iż warstwa utworzona z grup metylenowych znajdujących się w pozycji 1 łańcucha węglowodorowego ($-\text{OC}^1\text{H}_2-\text{CH}_2\cdots\text{C}^{12}\text{H}_3$) stanowi główną barierę blokującą wnikanie cząsteczek wody do hydrofobowego rdzenia miceli. Porównanie wartości T_1/T_2 protonów wzdłuż całej cząsteczki DPC, potwierdza jednakowe ułożenie łańcuchów węglowodorowych DPC i SDS w hydrofobowym rdzeniu mieszanych miceli. Znaczne obniżenie wartości czasów relaksacji poprzecznej T_2 jąder atomów ^{31}P , przy jednoczesnych małych zmianach obserwowanych dla czasów relaksacji podłużnej T_1 , sugeruje iż dodatek SDS do miceli DPC powoduje wzrost całkowitego czasu korelacji, a co za tym idzie wzrost hydrodynamicznej objętości miceli.

PODSUMOWANIE

Celem badań prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego była korelacja struktur przestrzennych biologicznie czynnych peptydów z ich aktywnością i sposobem oddziaływania z błoną lipidową. Badania obejmowały 21 peptydów z grupy hormonów neuroprzysadkowych oraz 7 peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Ponadto, ze względu na wykorzystanie mieszanych miceli DPC/SDS jako modelu błony lipidowej w analizie konformacyjnej analogów hormonów neuroprzysadkowych, zostały przeprowadzone badania parametrów termodynamicznych procesów micelizacji, dynamiki i rozmiarów mieszanych miceli DPC/SDS.

Wiele antybiotyków peptydowych przed związaniem z błoną posiada strukturę nieuporządkowaną. Rezultatem oddziaływania z błoną jest faldowanie się łańcucha polipeptydowego, co jest kluczowe dla aktywności peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Dlatego też, badania konformacyjne antybiotyków peptydowych przeważnie są prowadzone w układach imitujących błony komórkowe. Intensywnie prowadzone są również badania oddziaływań antybiotyków peptydowych z modelowymi błonami lipidowymi w celu określenia czy potwierdzenia mechanizmów ich działania. W przypadku hormonów neuroprzysadkowych, znaczenie błony komórkowej jako mediatora oddziaływań peptyd-receptor było dotychczas ignorowane. Dlatego też, badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego stanowią element nowości naukowej, gdyż

podobne zagadnienia dotyczące tej grupy związków nie były dotychczas opisywane w literaturze.

W procesie wiązania się hormonów neuroprzysadkowych oraz antybiotyków peptydowych do błony lipidowej, istotną rolę odgrywają zarówno oddziaływania elektrostatyczne jak i hydrofobowe. Jednakże, różne są efekty końcowe tych oddziaływań dla obu grup peptydów, co wynika z ich różnych funkcji biologicznych. Wyniki badań prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego wskazują, że modyfikacja hormonów neuroprzysadkowych przestrzennie rozbudowanymi resztami hydrofobowymi ogranicza swobodę konformacyjną peptydów oraz powoduje ich głębsze zanurzenie w modelowej błonie lipidowej. Głównym segmentem kotwiczącym peptydy w błonie jest ich N-terminalny fragment. Oddziaływania hormonów neuroprzysadkowych z błoną lipidową mogą zmieniać jej strukturę i wpływać tym samym na funkcjonowanie receptorów GPCR, dlatego też, istotne jest, aby nie prowadziły do destabilizacji dwuwarstwy lipidowej. Z kolei, efekt ten jest pożądany w przypadku antybiotyków peptydowych, działających na zasadzie permeabilizacji dwuwarstwy lipidowej. Wyniki badań prowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego wskazują, iż efektem oddziaływania antybiotyków peptydowych z błoną komórkową może być również segregacja lipidów w membranach bakteryjnych, co skutkuje tworzeniem się domen zawierających ujemnie naładowane lub neutralne lipidy błonowe.

Badania prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego miały głównie charakter poznawczy. Jednakże, uzyskane wyniki rzucają nowe światło na rolę oddziaływań peptydów z błoną lipidową w kontekście ich aktywności biologicznej, co z kolei może mieć znaczenie praktyczne w projektowaniu nowych analogów o określonych właściwościach farmakologicznych.

LITERATURA

1. Schwyzer R. In search of the 'bio-active conformation'-is it induced by the target cell membrane? *J Mol Recog* 1995;8(1-2):3-8.
2. Sargent D, Schwyzer R. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(16):5774-5778.
3. Schwyzer R. Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry* 1986;25(20):6335-6342.
4. Melo MN, Ferre R, Castanho MA. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(3):245-250.
5. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology* 2010;5(10):905-917.
6. Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, De Lima MCP. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals* 2010;3(4):961-993.
7. Zhou G-P, Troy FA. Characterization by NMR and molecular modeling of the binding of polyisoprenols and polyisoprenyl recognition sequence peptides: 3D structure of the complexes reveals sites of specific interactions. *Glycobiology* 2003;13(2):51-71.
8. Duarte AM, van Mierlo CP, Hemminga MA. Molecular dynamics study of the solvation of an α -helical transmembrane peptide by DMSO. *J Phys Chem B* 2008;112(29):8664-8671.
9. Mierke DF, Giragossian C. Peptide hormone binding to G-protein-coupled receptors: Structural characterization via NMR techniques. *Med Res Rev* 2001;21(5):450-471.
10. Beswick V, Guerois R, Cordier-Ochsenbein F, Coïc Y-M, Huynh-Dinh T, Tostain J, Noël J-P, Sanson A, Neumann J-M. Dodecylphosphocholine micelles as a membrane-like environment: new results from NMR relaxation and paramagnetic relaxation enhancement analysis. *Eur Biophys J* 1998;28(1):48-58.

11. Young JK, Hicks RP, Anklin C. NMR and molecular modeling investigations of the neuropeptide substance P in the presence of 15 mM sodium dodecyl sulfate micelles. *Biopolymers* 1994;34(11):1449-1462.
12. Langham AA, Waring AJ, Kaznessis YN. Comparison of interactions between beta-hairpin decapeptides and SDS/DPC micelles from experimental and simulation data. *BMC Biochemistry* 2007;8:11.
13. Gennis RB. *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer Science & Business Media; 2013.
14. Jaroniec CP, Kaufman JD, Stahl SJ, Viard M, Blumenthal R, Wingfield PT, Bax A. Structure and dynamics of micelle-associated human immunodeficiency virus gp41 fusion domain. *Biochemistry* 2005;44(49):16167-16180.
15. Weller K, Lauber S, Lerch M, Renaud A, Merkle HP, Zerbe O. Biophysical and biological studies of end-group-modified derivatives of Pep-1. *Biochemistry* 2005;44(48):15799-15811.
16. Scrima M, Campiglia P, Esposito C, Gomez-Monterrey I, Novellino E, D'Ursi AM. Obestatin conformational features: a strategy to unveil obestatin's biological role? *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(3):500-505.
17. Hsu S-TD, Breukink E, Bierbaum G, Sahl H-G, de Kruijff B, Kaptein R, van Nuland NA, Bonvin AM. NMR Study of Mersacidin and Lipid II Interaction in Dodecylphosphocholine Micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *J Biol Chem* 2003;278(15):13110-13117.
18. Kallick DA, Tessmer MR, Watts CR, Li C-Y. The use of dodecylphosphocholine micelles in solution NMR. *J Magn Reson, Ser B* 1995;109(1):60-65.
19. Wang X, Wang R, Zheng Y, Sun L, Yu L, Jiao J. Interaction between zwitterionic surface activity ionic liquid and anionic surfactant: Na(+)-driven wormlike micelles. *J Phys Chem B* 2013;117(6):1886-95.
20. Hicks RP, Mones E, Kim H, Koser BW, Nichols DA, Bhattacharjee AK. Comparison of the conformation and electrostatic surface properties of magainin peptides bound to sodium dodecyl sulfate and dodecylphosphocholine micelles. *Biopolymers* 2003;68(4):459-470.
21. Taheri-Kafrani A, Bordbar A-K. Energetics of micellization of sodium n-dodecyl sulfate at physiological conditions using isothermal titration calorimetry. *J Therm Anal Calorim* 2009;98(2):567-575.
22. Makowska J, Wyrzykowski D, Pilarski B, Chmurzyński L. Thermodynamics of sodium dodecyl sulphate (SDS) micellization in the presence of some biologically relevant pH buffers. *J Therm Anal Calorim* 2015; 121(1):257-261.
23. Tieleman D, Van der Spoel D, Berendsen H. Molecular dynamics simulations of dodecylphosphocholine micelles at three different aggregate sizes: micellar structure and chain relaxation. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000;104(27):6380-6388.
24. Lazaridis T, Mallik B, Chen Y. Implicit solvent simulations of DPC micelle formation. *J Phys Chem B* 2005;109(31):15098-15106.
25. Rodziewicz-Motowidło S, Sikorska E, Oleszczuk M, Czaplewski C. Conformational studies of vasopressin and mesotocin using NMR spectroscopy and molecular modelling methods. Part II: studies in the SDS micelle. *J Pept Sci* 2008;14(1):85-96.
26. Wymore T, Gao X, Wong T. Molecular dynamics simulation of the structure and dynamics of a dodecylphosphocholine micelle in aqueous solution. *J Mol Struct* 1999;485:195-210.
27. Sammalkorpi M, Karttunen M, Haataja M. Ionic surfactant aggregates in saline solutions: sodium dodecyl sulfate (SDS) in the presence of excess sodium chloride (NaCl) or calcium chloride (CaCl₂). *J Phys Chem B* 2009;113(17):5863-5870.
28. Manzo G, Carboni M, Rinaldi AC, Casu M, Scorciapino MA. Characterization of sodium dodecylsulphate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering. *Magn Reson Chem* 2013;51(3):176-183.
29. McEwen BB. General Introduction to Vasopressin and Oxytocin: Structure / Metabolism, Evolutionary Aspects, Neural Pathway / Receptor Distribution, and Functional Aspects Relevant to Memory Processing. *Adv Pharmacol* 2004;50:1-50.
30. Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 1980;207(4429):373-378.
31. Robinson AG, Fitzsimmons MD. Vasopressin homeostasis: coordination of synthesis, storage and release. *Regulatory Peptides* 1993;45(1):225-230.
32. Rascher W, Lang R, Unger T. Vasopressin, cardiovascular regulation, and hypertension. *Neurobiology of vasopressin*. Springer 1985; p. 101-136.
33. Laszlo F, Laszlo F, De Wied D. Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev* 1991;43(1):73-108.
34. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001;81(2):629-683.

35. Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 1998;156(2):223-229.
36. Zingg HH. Vasopressin and oxytocin receptors. *Bailliere Clin Endoc* 1996;10(1):75-96.
37. Wang Z, Young LJ, Insel TR. Voles and vasopressin: a review of molecular, cellular, and behavioral studies of pair bonding and paternal behaviors. *Prog Brain Res* 1999;119:483-499.
38. Haslam R, Rosson G. Aggregation of human blood platelets by vasopressin. *Am J Physiol* 1972;223(4):958.
39. Gibbs DM. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci* 1984;35(5):487-491.
40. Lebl M, Jošt K, Brtník F. Tables of analogs. *Handbook of Neurohypophyseal Hormone Analogs* 1987;2(Part 2):127-267.
41. Inooka H, Ohtaki T, Kitahara O, Ikegami T, Endo S, Kitada C, Ogi K, Onda H, Fujino M, Shirakawa M. Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Mol Biol* 2001;8(2):161-165.
42. Oates J, Watts A. Uncovering the intimate relationship between lipids, cholesterol and GPCR activation. *Curr Opin Struct Biol* 2011;21(6):802-807.
43. Mahaut-Smith MP, Martinez-Pinna J, Gurung IS. A role for membrane potential in regulating GPCRs? *Trends Pharmacol Sci* 2008;29(8):421-429.
44. Gurdal H, Friedman E, Johnson MD. Beta-adrenoceptor-G alpha S coupling decreases with age in rat aorta. *Mol Pharmacol* 1995;47(4):772-778.
45. Paila YD, Chattopadhyay A. Membrane cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Subcell Biochem* 2010;51:439-466.
46. Booth PJ, Curnow P. Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding. *Curr Opin Struct Biol* 2006;16(4):480-488.
47. Chini B, Parenti M. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 2004;32(2):325-338.
48. Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *BBA-Biomembranes* 2004;1666(1):62-87.
49. Gimpl G, Reitz J, Brauer S, Trossen C. Oxytocin receptors: ligand binding, signalling and cholesterol dependence. *Prog Brain Res* 2008;170:193-204.
50. Wang Y, Botelho AV, Martinez GV, Brown MF. Electrostatic properties of membrane lipids coupled to metarhodopsin II formation in visual transduction. *J Am Chem Soc* 2002;124(26):7690-7701.
51. Perez DM, Karnik SS. Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* 2005;57(2):147-161.
52. Milligan G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 2003;64(6):1271-1276.
53. Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *N-S Arch Pharmacol* 2002;366(5):381-416.
54. Serradeil-Le Gal C, Valette G, Foulon L, Germain G, Advenier C, Naline E, Bardou M, Martinolle J-P, Pouzet B, Raufaste D. SSR126768A (4-chloro-3-[(3R)-(+)-5-chloro-1-(2, 4-dimethoxybenzyl)-3-methyl-2-oxo-2, 3-dihydro-1H-indol-3-yl]-N-ethyl-N-(3-pyridylmethyl)-benzamide, hydrochloride): a new selective and orally active oxytocin receptor antagonist for the prevention of preterm labor. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309(1):414-424.
55. McParland P. Obstetric management of moderate and late preterm labour. Elsevier; 2012. p. 138-142.
56. Usta IM, Khalil A, Nassar AH. Oxytocin antagonists for the management of preterm birth: a review. *Am J Perinatol* 2011;28(6):449.
57. Papatsonis D, Flenady V, Cole S, Liley H. Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(3): CD004452.
58. Manning M, Cheng LL, Stoev S, Wo NC, Chan W, Szeto HH, Durroux T, Mouillac B, Barberis C. Design of peptide oxytocin antagonists with strikingly higher affinities and selectivities for the human oxytocin receptor than atosiban. *J Pept Sci* 2005;11(10):593-608.
59. Manning M, Stoev S, Cheng LL, Ching Wo N, Chan W. Design of oxytocin antagonists, which are more selective than atosiban. *J Pept Sci* 2001;7(9):449-465.
60. Kwiatkowska A, Ptach M, Borovičková L, Slaninová J, Lammek B, Prahla A. Design, synthesis and biological activity of new neurohypophyseal hormones analogues conformationally restricted in the N-terminal part of the molecule. Highly potent OT receptor antagonists. *Amino Acids* 2012; 43(2):617-627.
61. Kwiatkowska A, Sobolewski D, Prahla A, Borovičková L, Slaninová J. Arginine vasopressin and its analogues - the influence of position 2 modification with 3,3-diphenylalanine enantiomers. Highly potent V₂ agonists. *Eur J Med Chem* 2009; 44(7): 2862-2867.

62. Kwiatkowska A, Śleszyńska M, Derdowska I, Prahł A, Sobolewski D, Borovičková L, Slaninová J, Lammek B. Novel analogues of arginine vasopressin containing α -2-indanylglycine enantiomers in position 2. *J Pept Sci* 2010;16(1):15-20.
63. Lammek B, Kwiatkowska A, Sobolewski D, Borovickova L, Slaninová J, Prahł A. New analogues of arginine vasopressin and its selected agonists modified at position 2 with (S)-1-adamantyl-glycine. In: M. Lebl, M. Meldal, K.J. Jensen, T. Hoeg-Jensen (Eds.) *Peptides 2010*, Copenhagen, Denmark 2010; p. 432-433.
64. Derdowska I, Kwiatkowska A, Prahł A, Sobolewski D, Slaninova J, Lammek B. Influence of (2S, 4R)-4-(2-naphthylmethyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid replacing position 2 of Arginine Vasopressin (AVP) and its analogues on their pharmacological properties. In: Lankinen H (Ed.) *Peptides 2008*, Helsinki, Finland 2008; p. 296-297.
65. Sobolewski D, Prahł A, Derdowska I, Slaninová J, Kaczmarek K, Zabrocki J, Lammek B. Analogs of arginine vasopressin modified in the N-terminal part of the molecule with a conformationally constrained cis-peptide bond motif. *J Pept Sci* 2007;13(2):128-132.
66. Kwiatkowska A, Lewandowska M, Borovičková L, Slaninová J, Lammek B, Prahł A. Design, Synthesis and Structure–Activity Relationship of New Arginine Vasopressin Analogues Containing Proline Derivatives in Position 2. *Chem Biol Drug Design* 2013;81(3):420-428.
67. Bourbigot S, Dodd E, Horwood C, Cumby N, Fardy L, Welch WH, Ramjan Z, Sharma S, Waring AJ, Yeaman MR. Antimicrobial peptide RP-1 structure and interactions with anionic versus zwitterionic micelles. *Biopolymers* 2009;91(1):1-13.
68. Brown LR, Bösch C, Wüthrich K. Location and orientation relative to the micelle surface for glucagon in mixed micelles with dodecylphosphocholine EPR and NMR studies. *BBA-Biomembranes* 1981;642(2):296-312.
69. Ślusarz MJ, Gieldoń A, Ślusarz R, Trojnar J, Meadows R, Ciarkowski J. Study of new oxytocin antagonist barusiban (fe200 440) affinity toward human oxytocin receptor versus vasopressin V1A and V2 receptors—molecular dynamics simulation in popc bilayer. *QSAR Comb Sci* 2005;24(5):603-610.
70. Ślusarz M, Ślusarz R, Trojnar R, Wiśniewski K, Ciarkowski J. Molecular modeling of the neurohypophyseal receptor/atosiban complexes. *Protein Pept Lett* 2003;10(3):295-302.
71. Phalipou S, Cotte N, Carnazzi E, Seyer R, Mahe E, Jard S, Barberis C, Mouillac B. Mapping peptide-binding domains of the human V1a vasopressin receptor with a photoactivatable linear peptide antagonist. *J Biol Chem* 1997;272(42):26536-26544.
72. Akke M, Palmer AG. Monitoring macromolecular motions on microsecond to millisecond time scales by R1 ρ -R1 constant relaxation time NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1996;118(4):911-912.
73. Mouillac B, Chini B, Balestre M-N, Elands J, Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Hibert M, Jard S, Barberis C. The Binding Site of Neuropeptide Vasopressin V1a Receptor. *J Biol Chem* 1995;270(43):25771-25777.
74. Postina R, Kojro E, Fahrenholz F. Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem* 1996;271(49):31593-31601.
75. Phalipou S, Seyer R, Cotte N, Breton C, Barberis C, Hibert M, Mouillac B. Docking of Linear Peptide Antagonists into the Human V1a Vasopressin Receptor. *J Biol Chem* 1999;274(33):23316-23327.
76. Hruby VJ, Chow M-S, Smith D. Conformational and structural considerations in oxytocin-receptor binding and biological activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30(1):501-534.
77. Walter P. Identification of sites in oxytocin involved in uterine receptor recognition and activation. *Fed Proc Am Soc Exp Biol* 1977; 36(6): 1872-1878.
78. Ślusarz MJ, Ślusarz R, Ciarkowski J. Molecular dynamics simulation of human neurohypophyseal hormone receptors complexed with oxytocin—modeling of an activated state. *J Pept Sci* 2006;12(3):171-179.
79. Ślusarz MJ, Gieldoń A, Ślusarz R, Ciarkowski J. Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors—molecular dynamics study of the activated receptor—vasopressin—G α systems. *J Pept Sci* 2006;12(3):180-189.
80. Sigurskjold BW. Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* 2000;277(2):260-266.
81. Chen C, Tripp CP. A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes. *BBA-Biomembranes* 2012;1818(7):1673-1681.
82. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs. *PLoS Pathog* 2010;6(10):e1001067.
83. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003;55(1):27-55.

84. Touch V, Hayakawa S, Commins T. Natural antimicrobial proteins: a review of current challenges and solutions for food applications. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2009;2(1):1-16.
85. Jabeen U, Khanum A. Isolation and characterization of potential food preservative peptide from *Momordica charantia* L. *Arab J Chem* 2014; doi:10.1016/j.arabjc.2014.06.009.
86. Wegener KL, Wabnitz PA, Carver JA, Bowie JH, Chia B, Wallace JC, Tyler MJ. Host defence peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree-frog *Litoria citropa*. *Eur J Biochem* 1999;265(2):627-637.
87. Apponyi MA, Pukala TL, Brinkworth CS, Maselli VM, Bowie JH, Tyler MJ, Booker GW, Wallace JC, Carver JA, Separovic F. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides* 2004;25(6):1035-1054.
88. Wabnitz P, Bowie J, Wallace J, Tyler M. The antibiotic citropin peptides from the Australian tree frog *Litoria citropa*. Structure determination using electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1999;13:1724-1732.
89. Doyle J, Brinkworth CS, Wegener KL, Carver JA, Llewellyn LE, Olver IN, Bowie JH, Wabnitz PA, Tyler MJ. nNOS inhibition, antimicrobial and anticancer activity of the amphibian skin peptide, citropin 1.1 and synthetic modifications. *Eur J Biochem* 2003;270(6):1141-1153.
90. Long HW, Tycko R. Biopolymer conformational distributions from solid-state NMR: α -helix and 3^{10} -helix contents of a helical peptide. *J Am Chem Soc* 1998;120(28):7039-7048.
91. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(25):14637-14642.
92. Abraham CM, Al-Hashimi I, Haghghat N. Evaluation of the levels of oral *Candida* in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86(1):65-68.
93. Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van't Hof W, Simoons-Smit I, Veerman EC, Amerongen AVN. Amphotericin B-and Fluconazole-Resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and Other Newly Emerging Pathogenic Fungi Are Susceptible to Basic Antifungal Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(3):702-704.
94. Nikawa H, Jin C, Fukushima H, Makihira S, Hamada T. Antifungal activity of histatin-5 against non-albicans *Candida* species. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(4):250-252.
95. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono V, Krost S, Pollock J. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1984;44(3):695-701.
96. Oppenheim F, Xu T, McMillian F, Levitz S, Diamond R, Offner G, Troxler R. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988;263(16):7472-7477.
97. Ruissen AL, Groenink J, Krijtenberg P, Walgreen-Weterings E, Hof Wvt, Veerman EC, Amerongen A. Internalisation and degradation of histatin 5 by *Candida albicans*. *Biol Chem* 2003;384(1):183-190.
98. Helmerhorst E, Alagl A, Siqueira W, Oppenheim F. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol* 2006;51(12):1061-1070.
99. Monroc S, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E, Bardají E. De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides* 2006;27(11):2567-2574.
100. Dartois V, Sanchez-Quesada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Granja J, Gritzen C, Weinberger D, Ghadiri MR. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3302-3310.
101. Gururaja TL, Narasimhamurthy S, Payan DG, Anderson D. A novel artificial loop scaffold for the noncovalent constraint of peptides. *Chem Biol* 2000;7(7):515-527.
102. Oren Z, Shai Y. Cyclization of a cytolytic amphipathic α -helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. *Biochemistry* 2000;39(20):6103-6114.
103. Kamysz E, Sikorska E, Karafova A, Dawgul M. Synthesis, biological activity and conformational analysis of head-to-tail cyclic analogues of LL37 and histatin 5. *J Pept Sci* 2012;18(9):560-566.
104. Melino S, Rufini S, Sette M, Morero R, Grottesi A, Paci M, Petruzzelli R. Zn²⁺ ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry* 1999;38(30):9626-9633.
105. Koradi R, Billeter M, Wuthrich K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 1996;14(1):51-55.
106. Hoernke M, Schwieger C, Kerth A, Blume A. Binding of cationic pentapeptides with modified side chain lengths to negatively charged lipid membranes: Complex interplay of electrostatic and hydrophobic interactions. *BBA-Biomembranes* 2012;1818(7):1663-1672.

107. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 2008;4(3):435-447.
108. Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Vitiello M, Morelli G, Galdiero M. Peptide-lipid interactions: experiments and applications. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):18758-18789.
109. Langelaan DN, Rainey JK. Membrane catalysis of peptide-receptor binding. *Biochem Cell Biol* 2010;88(2):203-210.
110. Bader R, Lerch M, Zerbe O. NMR of Membrane-Associated Peptides and Proteins. In: Zerbe O (Ed) *BioNMR in Drug Research*. Volume 16. Weinheim: Wiley-VCH 2003; p. 95-117.
111. Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É, Marcotte I. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *BBA-Biomembranes* 2011;1808(8):1957-1974.
112. Damberg P, Jarvet J, Gräslund A. Micellar systems as solvents in peptide and protein structure determination. *Methods Enzymol* 2001;339:271-285.
113. Marassi FM, Opella SJ. NMR structural studies of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8(5):640-648.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Dorobek naukowy

Moje zainteresowania naukowe skupiają się wokół badań konformacyjnych peptydów z wykorzystaniem metod eksperymentalnych i teoretycznych oraz na analizie oddziaływań peptyd-lipidy w układach imitujących błony lipidowe. Wśród badanych przeze mnie peptydów, oprócz omawianych w pierwszej części autoreferatu hormonów neuroprzysadkowych oraz antybiotyków peptydowych, znajdują się również analogi bradykininy, peptydy biorące udział w chorobach amyloidowych, peptydy modulujące aktywności proteasomu, peptydy obrazujące, wiążące się z receptorem CXCR4 (receptor chemokinowy) oraz peptydy stanowiące transmembranowe fragmenty bilitranslokazy. W ramach wewnątrzwydziałowej współpracy naukowej uczestniczyłam również w badaniach konformacyjnych oligomerów zbudowanych z aminokwasów cukrowych (pochodnych sacharydów, które do pierścienia cukrowego mają dołączoną grupę aminową i karboksylową) oraz brałam udział w badaniach oddziaływań związków biologicznie czynnych z cyklodekstrynami. Wszystkie prowadzone przeze mnie badania składają się na dorobek naukowy w postaci 46 publikacji z *listy JCR* (w tym 9 stanowi osiągnięcie naukowe), 12 publikacji spoza *listy JCR*, 4 referatów i 40 posterów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, 1 wykładu na zaproszenie oraz 1 rozdziału w książce (**załącznik 4a**).

5.2 Udział w projektach badawczych

W 2003 roku otrzymałam grant promotorski MNiSW na realizację badań związanych z tematem pracy doktorskiej. W latach 2009-2012 kierowałam grantem badawczym MNiSW, który zaowocował 9 publikacjami, z czego 5 wchodzi w skład osiągnięcia naukowego. Ponadto, pełniłam rolę wykonawcy w 5 grantach MNiSW/NCN, a obecnie jestem wykonawcą jednego grantu NCN. W 2011 roku byłam beneficjentem dwóch projektów East-NMR oraz Bio-NMR realizowanych w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, umożliwiających dostęp do nowoczesnej aparatury NMR. Projekty te umożliwiły mi wykonanie pomiarów NMR w Słoweńskim Centrum NMR w Lublanie.

5.3 Współpraca naukowa

Doświadczenie zdobyte podczas mojej pracy naukowej zaowocowało nawiązaniem krajowej i zagranicznej współpracy naukowej. Prowadzone przeze mnie badania antybiotyków peptydowych realizowane są we współpracy z dr hab., prof. nadzw. Wojciechem Kamyszem z Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach nawiązanej współpracy międzynarodowej uczestniczę w badaniach konformacyjnych fragmentów białka transbłonowego, bilitranslokazy – transportera anionów organicznych (prof. Marjana Novič z Narodowego Instytutu Chemii w Lublanie, Słowenia oraz dr Igor Zhukov z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie) oraz w badaniach konformacyjnych peptydów obrazujących, wiążących się z receptorem chemokinowym (prof. Sridhar Nimmagadda z Uniwersytetu Johna Hopkinsa w Baltimore, USA). W tym roku rozpoczęłam współpracę dotyczącą badań inhibitorów konwertaz prekursorów białkowych (prof. Robert Day, Uniwersytet Sherbrooke, Sherbrooke, Kanada).

Emilia Sikorska