



Imię i nazwisko autora rozprawy: Marta Schielmann
Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Aktywność przeciwgrzybowa koniugatów inhibitorów enzymatycznych z nośnikami peptydowymi

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Antifungal activity of conjugates of enzymatic inhibitors with peptide carriers

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
Dr inż. Piotr Szweda	

*Dziękuję mojemu Promotorowi
Profesorowi dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu
za pomoc merytoryczną podczas prowadzenia badań
i cenne wskazówki udzielane mi podczas redagowania
niniejszej pracy.*

*Chciałabym również podziękować Profesorowi Rajendrze
Prasadowi za możliwość odbycia stażu w jego grupie
badawczej i przeżycia niezapomnianej przygody w Indiach.*

*Dziękuję dr inż. Katarzynie Kozłowskiej-Tylingo za pomoc
w wykorzystaniu w pracy technik chromatografii cieczowej.*

*Wyników przedstawionych w niniejszej pracy
nie udałooby się uzyskać bez wiedzy i wsparcia
dr inż. Iwony Gabriel i dr inż. Piotra Szwedę
za co serdecznie Wam dziękuję!*

*Jestem ogromnie wdzięczna za cierpliwość i wiarę
w moje możliwości Rodzinie,
szczególnie mojemu Mężowi, Michałowi,
a także moim Kochanym Przyjaciółom.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	7
SUMMARY	9
1. CEL I ZAKRES PRACY	11
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	12
2.1 Wprowadzenie	12
2.2 Związki peptydowe pochodzenia naturalnego i syntetycznego	15
2.2.1 <i>Naturalne peptydy odpornościowe</i>	15
2.2.2 <i>Antybiotyki peptydowe</i>	18
2.3 Peptydy penetrujące komórkę	19
2.4 Mechanizmy transportu peptydów do komórek drobnoustrojowych, w tym grzybowych	22
2.4.1 <i>Transport na drodze bezpośredniej translokacji lub endocytozy</i>	23
2.4.2 <i>Transport aktywny za pośrednictwem permeaz peptydowych u grzybów</i>	26
2.4.2.1 <i>Permeazy PTR</i>	27
2.4.2.2 <i>Permeazy OPT</i>	28
2.4.2.3 <i>Regulacja działania permeaz peptydowych</i>	32
2.4.2.4 <i>Koncepcja peptydowego nośnika inhibitora enzymatycznego</i>	34
2.5 Zjawisko oporności na peptydowe związki przeciwgrzybowe	37
2.6 Synergizm peptydów przeciwgrzybowych z innymi związkami przeciwgrzybowymi	39
2.7 Możliwości i ograniczenia wykorzystania AMP i CPP w chemoterapii przeciwgrzybowej	40
2.8 Aminokwasowe inhibitory enzymów występujących w komórkach grzybowych	42
2.8.1 <i>Analogi glutaminy – inhibitory syntazy GlcN-6-P</i>	42
2.8.2 <i>APPA – inhibitor syntazy treoninowej</i>	46
2.8.3 <i>Azoksybacylina – inhibitor enzymów szklaku biosyntezy metioniny</i>	46
2.8.4 <i>Cispentacyna – inhibitor syntazy Ile-tRNA^{Ile}</i>	47
2.8.5 <i>m-FPhe</i>	48
2.8.6 <i>RI-331 – inhibitor dehydrogenazy homoserynowej</i>	48
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	50
3.1 Szczepy drobnoustrojów	50
3.2 Badane związki – aminokwasy, peptydy i związki referencyjne	51
3.3 Inne stosowane odczynniki	54
3.4 Sprzęt i materiały laboratoryjne	54
3.5 Podłoża stosowane w hodowli	55
3.6 Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej <i>in vitro</i>	56

3.7	Określenie wpływu związków na morfologię komórek grzybowych.....	57
3.8	Generowanie potencjalnych mutantów spontanicznych, opornych na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP	58
3.9	Ocena możliwości indukowania mutacji spontanicznych wywoływanych przez koniugaty FMDP-CPP	59
3.10	Określenie właściwości hemolitycznych CPP i FMDP-CPP	59
3.11	Wyznaczanie początkowej szybkości transportu peptydów modelowych oraz koniugatów peptydów z FMDP, BADP i cispentacyną do komórek grzybowych.....	60
3.12	Otrzymywanie znakowanych fluorescencyjnie P5 i F5.....	62
3.13	Jakościowa ocena szybkości transportu FITC-P5 i FITC-F5 do komórek grzybowych z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej	66
3.14	Ilościowa ocena pobierania FITC-P5 i FITC-F5 przez komórki grzybowe z zastosowaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej.....	67
3.15	Określenie obecności inhibitora uwolnionego z koniugatu C5 w ekstrakcie bezkomórkowym z wykorzystaniem RP-HPLC.....	68
3.16	Określenie obecności wolnego inhibitora uwolnionego z koniugatu C5 po inkubacji komórek z wykorzystaniem RP-HPLC	69
4.	OMÓWIENIE i Dyskusja Wyników.....	71
4.1	Rola genów <i>OPT1-8</i> oraz <i>PTR2</i> i <i>PTR22</i> we wrażliwości <i>C. albicans</i> na di- i tripeptydowe związki przeciwgrzybowe zawierające FMDP.....	72
4.1.1	<i>Aktywność Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP wobec mutantów delecyjnych</i>	72
4.1.2	<i>Wpływ Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP na morfologię komórek szczepu C. albicans SC5314 i wybranych mutantów delecyjnych</i>	74
4.1.3	<i>Analiza jakościowa i ilościowa transportu oligopeptydów do komórek mutantów delecyjnych</i>	76
4.2	Charakterystyka fenotypu komórek <i>C. albicans</i> izolowanych z kolonii wyrastających wewnątrz stref zahamowanego wzrostu	80
4.2.1	<i>Oporność mutantów spontanicznych szczepu C. albicans SC5314 na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP.....</i>	81
4.2.2	<i>Początkowa szybkość pobierania Nva-FMDP, Lys-Nva-FMDP i peptydów modelowych przez komórki mutantów spontanicznych.....</i>	84
4.3	Peptydy penetrujące i ich koniugaty z inhibitorami enzymów jako potencjalne związki przeciwgrzybowe	88
4.3.1	<i>Racjonalne projektowanie koniugatów CPP z inhibitorami enzymatycznymi</i>	88
4.3.2	<i>Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i ich koniugatów z FMDP, BADP i cispentacyną wobec szczepu C. albicans ATCC 10231</i>	89
4.3.3	<i>Wpływ obecności surowicy w podłożu na aktywność przeciwgrzybową koniugatów ..</i>	94

4.3.4	<i>Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów FMDP-peptydów i BADP-peptydów wobec szczepu C. albicans SC5314 i jego mutantów delecyjnych</i>	95
4.3.5	<i>Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów wobec klinicznych wielolekoopornych szczepów C. albicans</i>	98
4.3.6	<i>Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów wobec innych grzybów z rodzaju Candida</i>	100
4.3.7	<i>Wpływ obecności N-acetylo-D-glukozaminy w podłożu na aktywność przeciwgrzybową peptydów i ich koniugatów z FMDP i BADP</i>	100
4.3.8	<i>Wpływ obecności inhibitorów endocytozy na aktywność przeciwgrzybową P3N wobec szczepu C. albicans ATCC 10231</i>	103
4.3.9	<i>Poszukiwanie przyczyn różnic aktywności koniugatów w różnych podłożach</i>	104
4.3.10	<i>Ocena możliwości powstawania mutacji spontanicznych w obecności peptydów i koniugatów peptydów-FMDP</i>	109
4.3.11	<i>Właściwości hemolityczne peptydów i koniugatów</i>	110
4.3.12	<i>Kinetyka pobierania tetrapeptydu modelowego oraz koniugatów heksapeptydu P5 z FMDP i cispentacyną do komórek grzybowych</i>	111
4.3.13	<i>Jakościowa ocena akumulacji FITC-P5 i FITC-F5 w komórkach grzybowych z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej</i>	114
4.3.14	<i>Ilościowa ocena pobierania FITC-P5 i FITC-F5 przez komórki grzybowe z zastosowaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej</i>	117
4.3.15	<i>Analiza możliwości hydrolizy koniugatu C5</i>	120
4.3.15.1	<i>Próba oceny możliwości hydrolizy peptydu C5 w ekstrakcie bezkomórkowym</i>	122
4.3.15.2	<i>Próba oceny możliwości pozakomórkowej hydrolizy peptydu C5</i>	123
PODSUMOWANIE		125
LITERATURA		128
DOROBEK NAUKOWY		139

WYKAZ SKRÓTÓW

3MPA	kwas 3-merkaptopropanowy, <i>ang. 3-mercaptopropionic acid</i>
ABC	rodzina białek transporterów wielolekowych, <i>ang. ATP binding cassette</i>
AmB	amfoterycyna B
ATCC	amerykańska kolekcja kultur komórkowych, <i>ang. American Type Culture Collection</i>
BADP	kwas (E)-N-(4-fenilo-4-okso-2-butenilo)-L-2,3-diaminopropanowy
BSA	albumina surowicy bydłowej, <i>ang. bovine serum albumin</i>
C	cispentacyna, kwas (1R,2S)-2-aminocyklopentanowy
CLSI	Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych, <i>ang. Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPP	peptydy penetrujące komórkę, <i>ang. cell penetrating peptide</i>
CPP-FMDP	koniugat peptydu penetrującego z FMDP na C-końcu peptydu
DMSO	dimetylosulfotlenek
DSM	niemiecka kolekcja szczepów, <i>niem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen</i>
EH	stężenie związku powodujące lizę erytrocytów, <i>ang. effective hemolysis</i>
EH ₅₀	stężenie związku powodujące lizę erytrocytów i uwolnienie 50% hemoglobiny
FBS	płodowa surowica bydłowa, <i>ang. fetal bovine serum</i>
FITC	izocyjanian fluoresceiny
FL1	detektor fluorescencji odpowiadający FITC
FL2	detektor fluorescencji odpowiadający PI
FLC	flukonazol
FMDP	kwas N ³ -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowy
FMDP-CPP	koniugat peptydu penetrującego z FMDP na N-końcu peptydu
GFP	białko zielonej fluorescencji, <i>ang. green fluorescent protein</i>
GlcN-6-P	glukozamino-6-fosforan
GS	glutaminian sodu
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost, <i>ang. minimal inhibitory concentration</i>
MIC ₅₀	minimalne stężenie hamujące wzrost w 50% w stosunku do kontroli hodowli
MIC ₈₀	minimalne stężenie hamujące wzrost w 80% w stosunku do kontroli hodowli
MOPS	kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy
MTS	sekwencja umożliwiająca translokację przez błony, <i>ang. membrane translocation sequence</i>
NAG	N-acetyloglukozamina
NCCLS	Narodowy Komitet ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych, <i>ang. National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
Nva	norwalina
OD ₆₆₀	gęstość optyczna mierzona przy długości fali $\lambda = 660$ nm, <i>ang. optical density</i>
OPA	aldehyd ftalowy, <i>ang. o-phthalaldehyde</i>
OPT	permeaza oligopeptydowa, <i>ang. oligopeptide transport</i>
PBS	bufor fosforanowy, <i>ang. potassium buffer saline</i>
PI	jodek propidyny, <i>ang. propidium iodide</i>
PMO	rodzaj antysensowego DNA lub RNA, <i>ang. phosphorodiamidate morpholino oligomers</i>
PNA	peptydowy kwas nukleinowy wykorzystywany do naprawy sekwencji podczas splicingu, <i>ang. peptide-nucleic acid</i>
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa faz odwróconych, <i>ang. reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
PTD	domena przenosząca białka, <i>ang. protein transduction domain</i>
PTR	permeaza peptydowa dla di- i tripeptydów, <i>ang. peptide transport</i>
SA	siarczan amonu
SAP	proteazy aspartylowe, SAPs, <i>ang. secreted aspartic proteases</i>
SEM	skanningowa mikroskopia elektronowa, <i>ang. scanning electron microscopy</i>
siRNA	małe, interferujące RNA, <i>ang. small interfering RNA</i>
TCA	kwas trójchlorooctowy, <i>ang. trichloroacetic acid</i>
TFA	kwas trójfluorooctowy, <i>ang. trifluoroacetic acid</i>
TNBS	kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy
YCB	pożywka minimalna, <i>ang. Yeast Carbon Base</i>
YNB	pożywka minimalna, <i>ang. Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	pożywka, ekstrakt-pepton-dekstroza, <i>ang. Yeast Extract Peptone-Dextrose</i>
YPG	pożywka, ekstrakt-pepton-glukoza, <i>ang. Yeast Extract Peptone-Glucose</i>

STRESZCZENIE

Z uwagi na ograniczoną liczbę leków przeciwgrzybowych oraz problem wielolekooporności grzybowych patogenów, nieustannie poszukuje się nowych skutecznych związków również wśród naturalnie występujących w organizmach żywych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP, *ang. antimicrobial peptide*), a także w grupie tzw. peptydów penetrujących komórkę (CPP, *ang. cell penetrating peptide*). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie CPP z uwagi na możliwość ich wykorzystania w transporcie związków znacznie przekraczających rozmiary tych nośników.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii zaproponowano wykorzystanie strategii konia trojańskiego (*ang. warhead delivery system*) w projektowaniu nowych związków przeciwgrzybowych czyli zastosowaniu krótkich peptydów i peptydów penetrujących do transportu związków przeciwgrzybowych, dla których bariera grzybowej błony komórkowej jest trudna lub niemożliwa do pokonania. We wnętrzu komórki połączenie peptydu ze związkiem przeciwgrzybowym ulega zerwaniu przez wewnątrzkomórkowe proteazy tym samym uwalniając aktywny związek, który dociera do miejsca docelowego, np. hamując enzym zaangażowany w biosyntezę ściany komórkowej, syntazy glukozaamino-6-fosforanu.

Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było określenie aktywności przeciwgrzybowej szeregu związków będących koniugatami peptydów z inhibitorami enzymatycznymi (FMDP, BADP, cispentacyna). Zakres badań obejmował zbadanie aktywności peptydów-FMDP, CPP oraz FMDP-CPP wobec grzybów z rodzaju *Candida* w różnego typu podłożach, określenie możliwości powstawania oporności na FMDP-CPP i peptydy-FMDP, a także określenie szybkości transportu i lokalizacji peptydów i ich koniugatów w komórkach. W tym celu wykorzystano szereg szczepów pozbawionych genów permeaz peptydowych, a także otrzymano i scharakteryzowano mutanty spontaniczne odporne na peptydy-FMDP.

Wyniki badań wykazały wysoką aktywność koniugatów CPP z FMDP w podłożach minimalnych YNB, przy braku aktywności w podłożach bogatych, w tym podłożu RPMI-1640. Mechanizm działania koniugatów opiera się o inhibicję biosyntezy aminocukrów, prawdopodobnie na etapie katalizowanym przez syntazę GlcN-6-P. Podjęto próbę znalezienia przyczyny braku aktywności koniugatów w podłożu RPMI-1640. Badania te pozwoliły wyeliminować ewentualny wpływ szeregu składników podłoża RPMI-1640 na aktywność FMDP-CPP oraz określić przypuszczalne kluczowe znaczenie zestawu aminokwasów i innych peptydów jak również wartość pH dla działania koniugatów. Zastosowanie cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej umożliwiło potwierdzenie wydajnego transportu znakowanych fluoresceiną peptydów P5 i F5 do komórek *C. albicans* oraz ich wewnątrzkomórkową akumulację w wakuolach. Dzięki przeprowadzonym badaniom zaobserwowano brak aktywności FMDP-CPP wobec innych niż *C. albicans* grzybów z rodzaju

Candida. Zauważono również na podstawie eksperymentów wykorzystujących kliniczne wielolekooporne szczepy *C. albicans*, że badane peptydy penetrujące z FMDP na N-końcu nie są substratami dla pomp wielolekowych. Wykazano ponadto, że działanie koniugatów FMDP-CPP na komórki *C. albicans* nie indukuje tworzenia tzw. spontanicznych mutantów opornych. Istotne informacje uzyskano badając aktywność i zdolność transportu związków wobec szeregu mutantów delecyjnych szczepu *C. albicans* SC5314. Mutant *opt12345ptr222Δ* pozbawiony istotnych genów kodujących permeaz peptydowych okazał się niewrażliwy na działanie badanych FMDP-CPP, co może sugerować, że peptydy te są transportowane do komórek przez permeazy peptydowe. Jedynie w przypadku koniugatu FMDP z oktaargininą stwierdzono, że jego działanie przeciwgrzybowe jest niezależne od obecności permeaz peptydowych, co wskazuje na działanie oktaargininy jako rzeczywistego nośnika o charakterze CPP. Dzięki przeprowadzonym badaniom stwierdzono, że za transport di- i tripeptydów odpowiadają permeazy PTR kodowane przez geny *PTR2* i *PTR222*, ale także permeazy OPT.

W wyniku badania przesiewowego komórek izolowanych z kolonii wyrastających wewnątrz stref wzrostu zahamowanego przez działanie Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP stwierdzono, że dla znakomitej większości z nich (97%) nie występuje trwała oporność. Zidentyfikowano trzy izolaty trwale odporne na działanie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP. Oporność tych izolatów jest związana z brakiem transportu badanych związków, di- i tripeptydów przez permeazy PTR, prawdopodobnie w wyniku zmian w obrębie genów strukturalnych lub regulatorowych.

Wykorzystanie peptydów jako nośników związków przeciwgrzybowych stanowi obiecującą strategię projektowania nowych potencjalnych leków przeciwgrzybowych, jednak wymaga wielu dalszych badań pozwalających na zaproponowanie optymalnych struktur spełniających wszystkie oczekiwania wobec tego typu nośników dla zastosowania nie tylko *in vitro*, ale w szczególności *in vivo*. Wykorzystanie CPP do transportu grzybowych inhibitorów enzymatycznych pozwoliłoby na zwiększenie efektywności transportu tego typu związków do komórek grzybowych, a także co najważniejsze zmniejszyłoby prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska oporności drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: peptydy przeciwgrzybowe, peptydy penetrujące komórkę, *Candida albicans*, inhibitor syntazy GlcN-6-P

SUMMARY

In the view of limited number of antifungal drugs and problem of multidrug resistance of microorganisms, most of the efforts aim at finding novel effective compounds also within the group of naturally occurring in organisms antimicrobial peptides (AMP, antimicrobial peptides) as well as among cell-penetrating peptides (CPP, cell-penetrating peptides). Recently, CPPs became the main interest in the research due to its capability to transport compound that are larger than those carriers.

In the Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, the Trojan horse approach (*warhead delivery system*) was proposed as a potential strategy in the design of novel antifungals. The strategy bases on the usage of short peptides and cell-penetrating peptides as carriers for active compounds that cannot cross the fungal cell membranes. Inside the cell conjugates are cut by intercellular peptidases and the active compound can reach the target, for instance causing inhibition of enzyme involved in cell wall biosynthesis, glucosamine-6-phosphate synthase.

The aim of the research presented within this dissertation was to evaluate antifungal activity of peptides conjugated with enzyme inhibitors (FMDP, BADP, cispentacin). The research included the determination of the activity of peptide-FMDP, CPP and FMDP-CPP towards yeast from *Candida* spp. in different media, the probability of FMDP-CPP and peptide-FMDP to induce the resistance of fungal cells, as well as the transport velocities and localization of peptides and its congeners inside the cell. Therefore, within the research the set of mutants lacking genes encoding peptide permeases were used. Besides that spontaneous mutant resistant to peptide-FMDP were obtained and characterized.

The results of the research indicate high activity of congeners of CPP with FMDP in minimal media YNB, but no activity in reach media, including RPMI-1640. Mechanism of action of those congeners is based on the inhibition of GlcN-6-P synthase. Tests, which were performed due to find the cause for the lack of activity in RPMI-1640 medium, proved no influence of several media elements, but determinate probable impact of amino acids and other peptides as well as pH on the congeners' activity. The usage of flow cytometry and confocal microscopy allow the observation of the efficient transport of fluorescent-labelled peptides P5 and F5 into *C. albicans* cells and their further localization in vacuoles. No activity of FMDP-CPP towards non-*albicans* was noticed. It was also observed, due to the assays on clinical *C. albicans* isolates, that congeners are not substrates for efflux pumps. Moreover, it was shown that tested compound, based on CPP, do not induce resistance. Interesting information was gained from assays on deletion mutant of *C. albicans* SC5314 strain. Mutant *opt12345ptr222Δ* lacking all of the genes encoding peptide permeases was resistant to FMDP-CPP, which indicated that those congeners can be transported by peptide permeases. Only in case of the conjugate of octaarginine and FMDP there are some

evidence that octaarginine carrier can work regardless of permeases' presence. Due to the performed tests, it was shown that di- and tripeptides use not only PTR permeases encoded by *PTR2* and *PTR222* genes, but also OPT permeases.

As result of screening of cells isolated from colonies grown inside the Nva-FMDP or Lys-Nva-FMDP growth inhibitory zones, it was found that majority of them (97%) are not permanently resistant. Three permanently resistant isolates were identified resistance of these isolates can be related to the lack of oligopeptide transport *via* PTR permeases, probably due to changes within the structural or regulatory genes.

The application of peptides as carriers for active compounds is a promising strategy in design of novel potential antifungal drugs, but it requires further research on structure optimization which overcome all of the limitation of activity of such carriers *in vitro*, but especially *in vivo*. The usage of CPP for carry of enzymatic inhibitors through fungal cell membranes could facilitate the effective transport of such compound into the cells, and most importantly could decrease the probability of resistance occurrence.

Keywords: antifungal peptides, cell penetrating peptides, *Candida albicans*, inhibitor of GlcN-6-P syntase

1. CEL I ZAKRES PRACY

Przedmiotem badań opisanych w niniejszej rozprawie były oligopeptydowe związki o aktywności przeciwgrzybowej zawierające w swojej strukturze inhibitory enzymatyczne o strukturze aminokwasowej, należące do jednej z dwóch grup: (a) di- i tripeptydy transportowane przez permeazy oligopeptydowe oraz (b) oligopeptydy zawierające od 5 do 10 reszt aminokwasowych, będące koniugatami inhibitorów i peptydów opisanych w literaturze jako tzw. peptydy penetrujące (CPP).

Badania dotyczące związków z pierwszej grupy ukierunkowane były głównie na zjawisko oporności specyficznej *Candida albicans* na związki będące di- i tripeptydami, w tym charakterystykę odpowiednich mutantów delecyjnych i spontanicznych tego drobnoustroju.

Zakres prac w tym wątku badań obejmował:

- uzyskanie trwałych mutantów spontanicznych opornych na Nva-FMPD lub Lys-Nva-FMDP,
- porównanie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* peptydów-FMDP (MIC) wobec szczepu dzikiego, mutantów delecyjnych i mutantów spontanicznych,
- określenie szybkości transportu peptydów modelowych (Ala-Ala, Ala-Ala-Ala oraz Ala-Ala-Ala-Ala) do komórek grzybowych szczepu dzikiego, mutantów delecyjnych i mutantów spontanicznych,
- porównanie szybkości transportu peptydów Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP do komórek grzybowych szczepu dzikiego i mutantów spontanicznych.

Celem badań dotyczących koniugatów inhibitor-CPP było określenie czynników warunkujących ich aktywność biologiczną i mechanizm działania przeciwgrzybowego. Przedmiotem tych badań było kilkanaście nowych związków, koniugatów peptydów o długości od 5 do 10 reszt aminokwasowych z dołączonym na N-końcu inhibitorem syntazy GlcN-6-P, FMDP lub BADP, lub inhibitorem syntazy Ile-tRNA^{Ile}, cispentacyną. Zakres pracy obejmował określenie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* w różnych podłożach i czynników ją warunkujących, w tym m.in. transport i akumulację peptydów i ich fluorogennych pochodnych w komórkach *C. albicans* ATCC 10231 oraz hydrolizę proteolityczną koniugatów.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1 Wprowadzenie

Zakażenia wywoływane przez drobnoustroje grzybowe stanowią bardzo istotny problem w chemoterapii, co jest związane przede wszystkim z narastającą liczbą mikroorganizmów wielolekoopornych, a także ograniczoną liczbą skutecznych leków przeciwgrzybowych, co w konsekwencji prowadzi do wysokiej śmiertelności pacjentów, sięgającej nawet 35% (Horn i in. 2009). Grzybnice mogą mieć charakter powierzchniowy (zakażenia skóry gładkiej i błon śluzowych) i jako takie nie są chorobami śmiertelnymi, jednak największe niebezpieczeństwo dla ludzkiego życia stanowią grzybnice układowe (głębokie) zajmujące narządy wewnętrzne, układ nerwowy czy węzły chłonne. Większość grzybowych patogenów należy do grupy mikroorganizmów oportunistycznie patogennych, które bytują w organizmie człowieka, a wywołują chorobę w przypadku zaburzenia systemu odpornościowego. Może to mieć miejsce w następstwie stosowania antybiotyków czy leków immunosupresyjnych. Szczególną grupę ryzyka stanowią pacjenci po przeszczepach, transfuzji krwi, chorzy zmagający się z chorobą nowotworową, a także osoby cierpiące na AIDS (Pfaller i Diekema, 2007).

Do grzybów patogennych odpowiadających za zagrażające życiu infekcje należą drożdżaki z rodzaju *Candida*, grzyby strzępkowe z rodzaju *Aspergillus*, *Scedosporium* i *Fusarium*, a także grzyby z rodzaju *Cryptococcus* (Chen i in. 2010). Patogenem uznawanym za najczęstszą przyczynę powierzchniowych i układowych infekcji grzybowych jest drożdżak *Candida albicans* (43,5 %). Tego typu zakażenia powodują również inne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*: *C. glabrata* (24,8 %), *C. parapsilosis* (17,8 %), *C. tropicalis* (8,9 %), rzadziej *C. krusei* (1,9 %) czy *C. lusitaniae* (1,3 %) (Horn i in. 2009; Lyon i in. 2010).

Do leków stosowanych w terapii grzybic należą: antybiotyki z grupy makrolidów polienowych (amfoterycyna B, nystatyna, natamycyna), tzw. „azole” (flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, worikonazol), 5-fluorocytozyna, pochodne alliloamin (naftyfina, terbinafina) oraz echinokandyny (kaspofungina, mikafungina). Tylko niektóre z nich, w tym amfoterycyna B, niektóre azole i kaspofungina, znalazły zastosowanie w chemoterapii grzybic układowych (Nosanchuk, 2006). Ten stosunkowo niewielki arsenał chemoterapeutyków przeciwgrzybowych ulega dalszemu ograniczaniu w wyniku narastającej oporności patogennych drobnoustrojów grzybowych, szczególnie wobec leków z grupy azoli.

Stopniowe nabywanie oporności w wyniku długotrwałych terapii chemoterapeutykami oraz stosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania, oraz immunosupresantów jak również wzrastająca liczba przypadków zagrażających życiu infekcji grzybowych stanowi poważny problem w leczeniu grzybic układowych (Pfaller i Diekema, 2007). Problem rosnącej oporności jest bardzo skomplikowany z uwagi na to, że oporność może być wywoływana jednocześnie na drodze kilku niezależnych mechanizmów (Morschhäuser, 2002). Oporność na

leki przeciwgrzybowe powstaje między innymi na drodze zmian w biosyntezie czy strukturze białek będących celami molekularnymi, a także modyfikacji kompozycji steroli błonowych (Kanafani i Perfect, 2008). Stosunkowo często występuje więcej niż jeden mechanizm oporności. Przykładem mogą być szczepy *C. albicans* wyizolowane przez White'a i współpracowników, które charakteryzują się nadekspresją genów *MDR1*, *ERG11* i grupy genów *CDR*, jak również obecnością mutacji w genie *ERG11* (White, 1997; Morschhäuser, 2002). Oprócz nabytej specyficznej oporności szczepów grzybowych na stosowane leki, występuje także szczególnie niebezpieczna oporność wielolekowa, MDR (*ang. multidrug resistance*). W tym przypadku drobnoustroje nie wykazują wrażliwości nie tylko na jeden, konkretny lek, ale na różne grupy leków. Oporność wielolekowa powstaje głównie w wyniku nadprodukcji białek błonowych o charakterze pomp wyrzucających ksenobiotyki, w tym leki, w konsekwencji zmniejszając ich stężenie w komórkach (Morschhäuser, 2002).

Z uwagi na ograniczoną liczbę skutecznych leków przeciwgrzybowych, ich toksyczność, a także zjawisko wielolekooporności grzybowych patogenów z rodzaju *Candida*, cały czas dąży się do projektowania nowych potencjalnych chemoterapeutyków pozwalających na zwalczanie powierzchniowych i co najważniejsze układowych infekcji grzybowych. Jednocześnie, badania skupiają się na zaproponowaniu nowych strategii, które pozwoliłyby udoskonalić już istniejące leki, w tym zoptymalizować struktury związków, które mogłyby przenosić leki do wnętrza komórek grzybowych. W tym aspekcie przedmiotem szczególnego zainteresowania są związki przeciwgrzybowe o strukturze peptydowej.

Nowych potencjalnych leków przeciwgrzybowych poszukuje się wśród występujących we wszystkich organizmach, począwszy od organizmów prokariotycznych po ssaki, peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMP, *ang. antimicrobial peptides*), będących częścią naturalnego systemu obronnego gospodarza. Interesujące przykłady nowych peptydów o działaniu przeciwgrzybowym są także odkrywane w grupie produktów metabolizmu wtórnego wielu klas drobnoustrojów. W ostatnim czasie wzrosło również zainteresowanie grupą peptydów penetrujących (CPP, *ang. cell-penetrating peptide*), które mogłyby służyć jako nośniki w transporcie cząsteczek aktywnych, dla których grzybowa błona komórkowa jest trudna lub niemożliwa do pokonania (Lundberg i Langel, 2003; Mäe i Langel, 2006).

Oprócz odkrywania nowych potencjalnych antymykotyków pochodzenia naturalnego oraz projektowania nowych związków przeciwgrzybowych poprzez wprowadzanie modyfikacji strukturalnych już istniejących chemoterapeutyków, poszukuje się nowych związków, będących inhibitorami pomp wielolekowych bądź związków dezaktywujących lub hamujących procesy metaboliczne, ważne dla komórek grzybowych, a nietoksyczne dla komórek ssaków. Jest to o tyle trudne, że grzyby patogene dla człowieka, w tym drożdżaki, są organizmami eukariotycznymi o zbliżonym do ludzkiego metabolizmie. W efekcie liczba potencjalnych celów molekularnych

dla chemoterapii przeciwgrzybowej, czyli jakościowych różnic pomiędzy komórką grzybową a ssaczą, jest niewielka. Wśród najbardziej obiecujących wymienia się występowanie u grzybów ściany komórkowej i enzymów katalizujących biosyntezę jej składników. Enzymy te są potencjalnymi celami molekularnymi dla nowych leków przeciwgrzybowych, które mogłyby zapewnić tym samym selektywną toksyczność.

Bardzo interesującą i obiecującą strategią projektowania nowych potencjalnych związków przeciwgrzybowych jest wykorzystanie peptydów jako nośników inhibitorów enzymatycznych, dla których barierę stanowi błona komórkowa. Przykładem takiego inhibitora może być kwas N^3 -(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP), którego działanie polega na zahamowaniu aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu, enzymu niezbędnego do biosyntezy składników grzybowej ściany komórkowej, chityny i mannoprotein (Milewski i in. 1988b; Milewski, 2002). Zaprojektowane zgodnie z założeniami strategii konia trojańskiego (*ang. warhead delivery*) oligopeptydy zawierające FMDP po przedostaniu się do wnętrza komórki grzybowej za pośrednictwem permeaz peptydowych, zostają rozcięte przez cytoplazmatyczne proteazy, uwalniając aktywny związek, inhibitor enzymatyczny, którego działanie ma efekt grzybobójczy. Transport peptydów-FMDP do komórek grzybowych jest możliwy dzięki wystarczająco niskiej specyficzności permeaz peptydowych, w przeciwieństwie do permeaz aminokwasowych (Milewski i in. 1988a).

Spośród kilkudziesięciu oligopeptydów-FMDP zbudowanych z 2 do 5 reszt aminokwasowych, otrzymanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii WCH PG, wyselekcjonowano dwa związki o szczególnie obiecujących właściwościach, Nva-FMDP oraz Lys-Nva-FMDP (Andruszkiewicz i in. 1987; Andruszkiewicz i in. 1990). Mimo wysokiej aktywności przeciwgrzybowej, peptydy-FMDP nie są niestety pozbawione wad. Należy tu wymienić między innymi niekorzystne parametry farmakokinetyczne, niską stabilność w surowicy krwi oraz możliwość powstania oporności specyficznej będącej konsekwencją „wyłączenia” przez patogenne drożdżaki permeaz peptydowych według niepoznanego dotychczas mechanizmu (Kasprzak i in. 1992; Milewski i in. 1988a).

Oprócz FMDP, znanych jest także co najmniej kilka innych inhibitorów enzymatycznych o strukturze aminokwasowej. Należą do nich: cispentacyna, *m*-fluorofenyloalanina i związek RI-331. Aktywność przeciwgrzybowa tych związków jest ograniczona możliwościami ich transportu do komórki grzybowej. Do tej pory jedynie w przypadku *m*-fluorofenyloalaniny zaproponowano wykorzystanie strategii konia trojańskiego i syntezy koniugatów (Kingsbury i in. 1983).

Nie zostały dotychczas podjęte próby wykorzystania potencjału transportowego peptydów penetrujących w kierunku konstrukcji ich koniugatów z aminokwasowymi inhibitorami enzymatycznymi w celu uzyskania nowych związków przeciwgrzybowych.

Pogłębienie wiedzy na temat specyficzności poszczególnych permeaz jak również sposobów regulacji transportu i metabolizmu związków azotu w komórkach grzybowych może pozwolić na znalezienie odpowiedzi na pytania związane ze zjawiskiem powstawania oporności specyficznej na związki przeciwgrzybowe oparte na peptydach. Mechanizmy generowania oporności mogą obejmować zaprzestanie produkcji przez komórki grzybowe permeaz peptydowych, bądź też, co wydaje się bardziej prawdopodobne, wprowadzanie zmian w systemach regulujących transport peptydów czy innych związków azotu. Poznanie tych mechanizmów może umożliwić projektowanie struktur nośników inhibitorów enzymatycznych do komórek grzybowych, co w dalszej perspektywie mogłoby skutkować zaproponowaniem struktur leków przeciwgrzybowych na bazie peptydów.

2.2 Związki peptydowe pochodzenia naturalnego i syntetycznego

Dotychczas otrzymano i scharakteryzowano różnorodne związki o budowie peptydowej wykazujące działanie przeciwdrobnoustrojowe. Wyróżnić tu należy naturalnie występujące peptydy odpornościowe stanowiące część systemu odpornościowego organizmów wyższych, antybiotyki peptydowe i ich pochodne o szerokim spektrum działania obejmującym również patogeny grzybowe, a także peptydy syntetyczne, których liczba wciąż wzrasta. W grupie peptydów syntetycznych znajdują się tzw. peptydy penetrujące komórkę, jak również inne, zdecydowanie krótsze, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, które są przenoszone przez transportery błonowe lub na drodze bezpośredniej translokacji.

2.2.1 Naturalne peptydy odpornościowe

Naturalne peptydy odpornościowe, inaczej peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP, *ang. antimicrobial peptides*; HDP, *ang. host defense peptides*), występujące we wszystkich rodzajach organizmów żywych począwszy od organizmów prokariotycznych po ssaki, stanowią integralną część systemu obronowego organizmu (Nijnik i Hancock, 2009). Poza rolę stymulowania systemu odpornościowego organizmów wyższych, wykazują szerokie działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych oraz grzybów (Nijnik i Hancock, 2009), a także działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciw pasożytnicze, a nawet przeciwnowotworowe (Chan i in. 2006; Zaiou, 2007). Do tej pory wyizolowano już ponad 1200 naturalnych peptydów odpornościowych (Wang i in. 2008).

Naturalne peptydy odpornościowe są to małe peptydy zawierające w swojej cząsteczce od 6 do 50 reszt aminokwasowych. Ich masa cząsteczkowa nie przekracza 10 kDa. Większość z AMP ma charakter kationowy i posiada wypadkowy ładunek w zakresie od +2 do +9, uzyskany przez obecność cząsteczek lizyny i argininy w łańcuchu peptydowym. Ponadto, znaczną liczbę reszt aminokwasowych w sekwencji (ponad 30%) stanowią reszty aminokwasów hydrofobowych

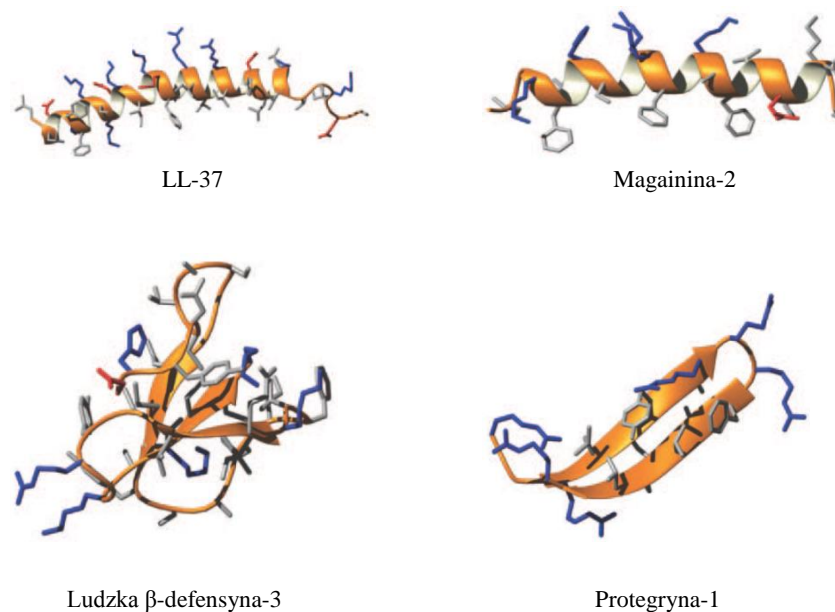
(Matejuk i in. 2010). AMP są zróżnicowane pod względem długości sekwencji, składu aminokwasowego, a także struktury drugorzędowej.

Ze względu na budowę dokonano podziału AMP na: liniowe peptydy o strukturze α -helisy bez mostków disiarczkowych (katelicyny, magaininy, cekropiny), peptydy o strukturze β -kartki stabilizowanej wiązaniami disiarczkowymi (defensyny, protegryny), z przewagą jednego lub kilku aminokwasów oraz peptydy o strukturze pętli (Epand i Vogel, 1999; Matejuk i in. 2010; Steinstraesser i in. 2009). Przykłady AMP przedstawiono w tabeli poniżej (tab. 1), natomiast modele struktur przestrzennych wybranych AMP pokazano na rys. 1.

Tab. 1 Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe – przykłady.

Pochodzenie	Nazwa peptydu	Liczba reszt aminokwasowych
Owady	Cekropiny A/B	37/35
	Drosomycyna	44
	Tanatyna	21
Bezkęgowce	Dermaseptyna b/s	27/34
	Magainina-2	23
Ssaki	Defensyny NP-1/-2/-3/-4/-5	33-34
	Defensyny HNP-1/-2/-3	29-30
	Gallinacyna-1	39
	Lactoferrycyna-B	18
	Protegryny-1/-2/-3	16-18
	LL-37	37
	Bac7	59
Rośliny	Zeamatyna	22
	Tioniny	45-48

Mechanizm działania peptydów odpornościowych nie został jeszcze dokładnie poznany. Przypuszcza się, że ich budowa i wypadkowy dodatni ładunek cząsteczki sprzyjają dezintegracji błony komórkowej i powstawaniu porów, a w konsekwencji wywołują lizę i śmierć patogennych komórek. Jednak ich mechanizm działania wydaje się być bardziej złożony i często opiera się na wewnątrzkomórkowych celach molekularnych takich jak synteza białek i DNA, a także aktywność enzymów oraz funkcjonalność i biosynteza składowych części komórki, na przykład komponentów ściany komórkowej (Brogden, 2005; Chan i in. 2006).



Rys. 1 Przykłady struktur przestrzennych AMP (Nguyen i in. 2011).

Bogatym źródłem AMP o wysokim stopniu zróżnicowania są owady i bezkręgowce. Do najlepiej poznanych peptydów z tej grupy należą cekropiny. Cekropiny A (KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIA-NH₂) i B (KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGAEAKAL-NH₂) są to liniowe peptydy produkowane przez ćmę *Hyalopora cecropia* wykazujące działanie lityczne wobec *F. oxysporum* i *A. fumigatus*. Interesujące z punktu widzenia odporności na degradację proteolityczną wydają się obserwacje dotyczące braku zmian w aktywności cekropiny B na skutek wymiany aminokwasów o konfiguracji L na D. Do tej grupy należą również bogate w cysteinę peptydy, drosomycyna i tanatyna uzyskane odpowiednio, z *Drosophila melanogaster* i *Podisus maculiveris*. Drosomycyna wykazuje aktywność wobec *F. oxysporum*, a tanatyna wobec *F. oxysporum* i *A. fumigatus*. Wśród peptydów uzyskanych z organizmów bezkręgowych można wymienić dermaseptyny, Skin-PYY i magaininy (magainina-1: GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-OH, magainina-2: GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH). Pierwsze działają grzybobójczo przeciwko *A. flavus* i *A. fumigatus*, a dwa kolejne przeciwko *C. albicans* (Ajesh i Sreejith, 2009; De Lucca i Walsh, 1999).

AMP produkowane przez ssaki to przede wszystkim α -defensyny i β -defensyny, które wykazują działanie przeciwko *C. albicans*. Do grupy defensyn należą: HNP-1, HNP-2 i HNP-3, NP-1, NP-2 i NP-3, a także bogate w cysteinę: TAP, gallinacyny (gallinacyna-1, gallinacyna -1 α) i protegryny (protegryna-1, -2, -3). Warto tu wymienić również białko BPI oraz jego analogi, peptydy XMP (De Lucca i Walsh, 1999). U człowieka peptydy przeciwdrobnoustrojowe produkowane są w licznych tkankach i komórkach, takich jak: ślinianki, skóra, oczy, wątroba, tkanka nabłonkowa i płytki krwi (Matejuk i in. 2010).

Roślinne defensyny stanowią grupę krótkich, zasadowych, bogatych w cysteinę peptydów wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe. Warto tu wymienić zeamatynę, 22 kDa peptyd wyizolowany z *Zea mays*. Wykazuje on aktywność wobec *C. albicans* (MIC=0,5 µg/mL), *N. crassa* i *Trichoderma reesei* (Roberts i Selitrennikoff, 1990). Kolejny związek, tionina Thi2.1, został wyizolowany z *Arabidopsis thaliana* i choć wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową, działa również cytotoksycznie (Loeza-Ángeles i in. 2008). Inne wykazujące działanie przeciwgrzybowe to między innymi α -basrubrina i β -basrubrina z *Basella rubra*, peptyd przeciwgrzybowy z *Cocos nucifera* czy arietyna z *Cicer arietinum* (Ajesh i Sreejith, 2009).

2.2.2 Antybiotyki peptydowe

Kolejną grupę peptydowych związków przeciwdrobnoustrojowych stanowią peptydy i pochodne peptydów produkowane przez drobnoustroje, będące produktami ich metabolizmu wtórnego. Wśród antybiotyków peptydowych pochodzenia bakteryjnego warto wymienić ituryny, syryngomycyny, syryngostatyny, syryngotoksyny, cepacydyny, a także nikkomycyny.

Ituryny to grupa cyklicznych peptydolidów wyizolowanych z *Bacillus subtilis*, które mimo aktywności przeciwgrzybowej wykazują również aktywność hemolityczną, co uniemożliwia ich zastosowanie jako potencjalnych chemoterapeutyków. Ituryny powodują tworzenie porów w błonie komórkowej, prowadząc do wypływu jonów i ostatecznej lizy komórek grzybowych. Do grupy ituryn należą: ituryna A, C, D, E, bacillomycyna D, F, L, mykosubtylina i bacillopeptyna (Besson i in. 1978; Maget-Dana i Peypoux, 1994).

Syryngomycyny, syryngostatyny i syryngotoksyny to małe lipodepsipeptydy, których działanie polega na tworzeniu porów i w konsekwencji umożliwieniu pasywnego przepływu jonów. Do najaktywniejszych związków z tej grupy należy syryngostatyna A i syryngomycyna-E (Sorensen i in. 1998).

Cepacydyny, to glikopeptydy wyizolowane z *Burkholderia cepacia*, które wykazały nawet wyższą aktywność niż amfoterycyna B wobec *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* i *Fusarium oxysporum* (Lee i in. 1994; Lim i in. 1994).

Nikkomycyny (nikkomycyna X i Z) to związki o budowie nukleozydo-peptydowej, nietoksyczne wobec komórek ssaczy. Produkowane przez *Streptomyces tendae* (Dähn i in. 1976). Mimo uzyskania wysokiej aktywności są degradowane w warunkach *in vivo*. Ich działanie polega na hamowaniu aktywności syntazy chityny (McCarthy i in. 1985c).

Związki peptydowe pochodzenia grzybowego charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwgrzybową niż peptydy pochodzenia bakteryjnego czy roślinnego. Do tej grupy związków peptydowych należą echinokandyny i aureobazydyny. Echinokandyny stanowią liczną i zróżnicowaną grupę cyklicznych lipopeptydów produkowanych przez *Aspergillus nidulans*.

Echinokandyny hamują biosyntezę ściany komórkowej *C. albicans* poprzez niekompetytywne hamowanie syntazy β -(1,3)-D-glukanu. Działają grzybobójczo wobec *C. albicans* i grzybostatycznie wobec *A. niger*. Nie działają natomiast na inne istotne patogeny grzybowe takie jak *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans* czy grzyby z rodzaju *Fusarium* (Denning, 2003). Nietoksyczne i rozpuszczalne w wodzie echinokandyny uzyskano dopiero dzięki modyfikacji echinokandyn pochodzenia naturalnego. Do tej grupy związków wprowadzonych na rynek należą między innymi kaspofungina (Cancidas, MK-991), mikafungina (Mycamine, FK-463) i anidulafungina (Eraxis, LY-303366, VER002) (DrugBank 3.0; Ernst i in. 1996; Denning, 2003; Chandrasekar i Sobel, 2006). Udowodniono również, że kaspofungina nie jest substratem dla pomp transportujących ksenobiotyki na zewnątrz komórki (Bachmann i in. 2002), jednak mimo to, wyizolowano już szczepy odporne na tę grupę związków (Kurtz i in. 1996; Laverdiere i in. 2006; Perlin, 2007). Natomiast aureobazydyny produkowane przez *Aureobasidium pullulans*, to grupa cyklicznych lipofilowych depsipeptydów składających się z ośmiu aminokwasów. Ich mechanizm działania opiera się na inhibicji procesu tworzenia aktyny i chityny, a także uniemożliwieniu syntezy sfingolipidów (Nageic i in. 1997). Mimo dużo wyższej aktywności przeciwgrzybowej niż powszechnie stosowane leki m.in. echinokandyny, flukonazol czy amfoterycyna B, wykazują działanie toksyczne i hemolityczne (Takesako i in. 1991; Nageic i in. 1997; Yamaguchi, 1997).

2.3 Peptydy penetrujące komórkę

Peptydy penetrujące komórkę czyli CPP (*ang. cell penetrating peptides*), należą do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, a swoją nazwę zawdzięczają mechanizmowi wnikania do wnętrza komórek. Peptydy penetrujące są zbudowane z mniej niż 30 reszt aminokwasowych i podobnie do AMP charakteryzują się wysoką zawartością aminokwasów kationowych, takich jak lizyna i arginina. Dodatni ładunek CPP umożliwia oddziaływanie z błoną komórkową drobnoustrojów, może prowadzić do dezintegracji ściany komórkowej, a w konsekwencji wywołać lizę komórek drobnoustrojów (Mäe i Langel, 2006).

Peptydy penetrujące pochodzące od białek nazywane są często PTD (*ang. protein transduction domain*) czyli domenami białek odpowiedzialnymi za proces transdukcji. W literaturze można spotkać również skrót MTS (*ang. membrane translocation sequence*) oddający właściwość peptydów do translokacji przez błonę komórkową (Schwarze i in. 1999; Mi i in. 2000).

Pierwsze doniesienia o domenach białek odpowiedzialnych za proces transportu w poprzek błon biologicznych zostały uzyskane dzięki obserwacji translokacji 86-aminokwasowego fragmentu białka HIV-1 Tat (Frankel i Pabo, 1988; Green i Loewenstein, 1988). Tat-86 jest czynnikiem regulującym transkrypcję genu ludzkiego wirusa upośledzenia

oporności, HIV-1 (Albini i in. 1998). Grupa Vivès i współpracowników zidentyfikowała fragment Tat⁴⁸⁻⁶⁰ jako ten o najwyższej aktywności translokacji (Vivès i in. 1997). Za PTD tego białka został uznany fragment krótszy, o wypadkowym ładunku +8, Tat⁴⁷⁻⁵⁷ (YGRKKRRQRRR). Schwarze i współpracownicy potwierdzili zdolność translokacji koniugatu Tat⁴⁷⁻⁵⁷ z cząsteczką β-galaktozydazy. Po iniekcji u myszy odnotowano obecność białka we wszystkich tkankach, z pokonaniem bariery krew-mózg włącznie (Schwarze i in. 1999).

Innym, interesującym koniugatem białka Tat jest TAT-A1, koniugat z heksapeptydem o sekwencji WFLMTM. Peptyd A1 posiada duże powinowactwo do receptora naczyńnośródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGFR1) występującego w wielu guzach (Fairbrother i in. 1998). Udowodniono, że koniugat efektywnie wnika do komórek guza, szczególnie tych z nadekspresją *VEGFR1*, a także powoduje delecję w siRNA na poziomie mRNA (Fang i in. 2013). Kolejne badania potwierdziły zdolność peptydu Tat⁴⁷⁻⁵⁷ do przenoszenia PNA (Ganguly i in. 2008; Lundin i in. 2008), siRNA (Moschos i in. 2007; Nakase i in. 2013), a także plazmidowego DNA i liposomów (Torchilin i in. 2003; Tseng i in. 2002). Ponadto wykazano przeciwbakteryjną aktywność Tat⁴⁸⁻⁶⁰, a także brak właściwości hemolitycznych (Zhu i in. 2009). Podobne wyniki uzyskano dla fragmentu Tat⁴⁷⁻⁵⁸ (Jung i in. 2006). Dodatkowo, Jung i współpracownicy wykazali aktywność przeciwgrzybową, zaobserwowaną wobec *C. albicans* i *S. cerevisiae*.

Kolejnym scharakteryzowanym peptydem penetrującym był 16-aminokwasowy oligopeptyd, penetratyna fragment 60-aminokwasowej homodomeny białka antennapedia wyizolowanego z *Drosophila melanogaster* (Joliot i in. 1991). Penetratyna (pAntp, RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂) jest hydrofobowym, bogatym w argininę peptydem penetrującym o wypadkowym ładunku +7, którego mechanizm działania opiera się na lizie błony komórkowej (Derossi i in. 1994). Penetratyna przy niewielkiej toksyczności posiada wysoką zdolność translokacji. Udowodniono, że może służyć jako efektywny nośnik dla peptydów i białek (Derossi i in. 1996; Joliot i in. 1991), a także PNA i siRNA (Bendifallah i in. 2006; Moschos i in. 2007). Ponadto, Lundberg i współpracownicy zaprojektowali pochodną penetratyny (EB1), w której sekwencji dwa zasadowe aminokwasy zastąpiono resztami histydyny. Dodatkowo, do N-końca łańcucha dołączono heksapeptyd, dzięki czemu uzyskano peptyd inicjujący lizę endosomów. Uzyskany peptyd EB1 wyróżniał się dużo wyższą wydajnością tworzenia kompleksów z siRNA i wyższą efektywnością przenoszenia aktywnej biologicznie cząsteczki niż wyjściowa penetratyna (Lundberg i in. 2007).

Inna grupa, Abes i współpracownicy, badająca translokację PNA i PMO do jądra komórkowego wykorzystwała analog penetratyny, R6-penetratynę i uzyskała bardzo obiecujące wyniki, nawet przy nieobecności związków sprzyjających lizie endosomów (Abes i in. 2007).

Warto również zwrócić uwagę na inny peptyd penetrujący, transportan (TP, GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL). TP wydajnie transportuje do komórek ssaczych białka o rozmiarach od 30 do 150 kDa, co zostało zbadane w przypadku GFP i licznych przeciwciał (Pooga i in. 2001). Co ciekawe, zaobserwowano większą zdolność transportanu do przenoszenia PNA, niż przy wykorzystaniu penetratyny czy Tat (Bendifallah i in. 2006; El-Andaloussi i in. 2006). Przez wprowadzenie modyfikacji sekwencji polegającej na usunięciu pierwszych sześciu aminokwasów z N-końca peptydu uzyskano analog transportanu, TP-10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL) o mniejszej toksyczności (Soomets i in. 2000). W oparciu o sekwencję transportanu zostały otrzymane dwa peptydy penetrujące zawierające na N-końcu grupę stearynową, PepFect3 i PepFect6, które charakteryzują się wyższą efektywnością transportu kwasów nukleinowych *in vitro*, a w przypadku PepFect6 również *in vivo* (El-Andaloussi i in. 2011; Mäe i in. 2009).

Innym, ciekawym peptydem penetrującym jest HSV VP22, białko składające się z 301 reszt aminokwasowych, posiadające zdolność do transportu peptydów oraz białek z przekroczeniem bariery krew-mózg, takich jak GFP (Elliott i O'Hare, 1997), a także białka E7 wirusa brodawczaka ludzkiego wywołując odpowiedź immunologiczną u myszy (Weidt i in. 1994; Michel i in. 2002) czy czynnika transkrypcyjnego GATA4 jako obiecujący środek w leczeniu uszkodzenia mięśnia sercowego (Bian i in. 2007).

Peptyd *pVEC* (LLILRRRIRKQAHHSK), 18-aminokwasowy fragment kadheryny, posiada wypadkowy ładunek +8, może służyć jako nośnik PNA o wielkości 1,7 kDa, a także dużo większych cząsteczek, takich jak FITC-streptawidyna (67 kDa). Ponadto wykazuje dużo wyższą niż penetratyna zdolność translokacji *in vivo* nie naruszając przy tym integralności błony komórkowej (Elmqvist i in. 2001). Grupy Palma i Nekhotiaeva zaobserwowały aktywność przeciwbakteryjną *pVEC* wobec *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, a także wobec drożdży *S. cerevisiae* (Nekhotiaeva i in. 2004; Palm i in. 2006). Holm i współpracownicy natomiast zwrócili uwagę na stabilność i wysoką zdolność translokacji *pVEC* w komórkach drożdżowych *S. cerevisiae* i *C. albicans* (Holm i in. 2005). Analog składający się z aminokwasów o konfiguracji D, *retro-pVEC* charakteryzuje się stabilnością w surowicy i nie ulega enzymatycznej degradacji (Elmqvist i Langel, 2005).

Warto wspomnieć tutaj również o modelowym α -helikalnym, otrzymanym *de novo* peptydzie MAP (KLA, KLAL) o sekwencji KLALKLALKALKAAKLKLA-NH₂ (Oehlke i in. 1998). Jego mechanizm działania opiera się na tworzenia porów i permeabilizacji błony komórkowej. MAP wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *B. megaterium* w stężeniu 1 μ M oraz wobec *E. coli* na poziomie 25 μ M. Charakteryzuje się natomiast brakiem aktywności wobec *S. cerevisiae* (Palm i in. 2006). Hällbrink i współpracownicy wykazali wyższą niż transportan, Tat⁴⁸⁻⁶⁰ i penetratyna efektywność transportu MAP *in vivo* (Hällbrink i in. 2001).

Dzięki badaniom nad translokacją MAP i jego pochodnych zaobserwowano, że to dzięki amfifilowości, a nie dodatniemu ładunkowi peptyd zachowuje swoje własności penetrujące. Na skutek wymiany lizyn w łańcuchu peptydowym na aminokwasy o charakterze polarnym, peptydy MAP12 (LKTLTETLTKELTKLTEL-NH₂) i MAP17 (QLALQLALQALQAALQLA-NH₂) posiadały cechę translokacji (Scheller i in. 2000).

Do peptydów o wysokim stopniu penetracji należy również grupa pentapeptydów (*ang. small penetrating peptides*). Przypuszcza się, że przekraczają one barierę błony komórkowej na drodze endocytozy lub pinocytozy. Wśród peptydów tej grupy najwyższą zdolność translokacji do komórek HeLa, powyżej 90%, przy jednoczesnej niskiej toksyczności, do 1 mM, wykazują KLPVM, VPMLK i VSALK (Gomez i in. 2007; Gomez i in. 2010). Co ciekawe, udowodniono, że peptydy VPTLK i KLPVM pełnią rolę ochronną, zapobiegając apoptozie zależnej od Bax (Gomez i in. 2007). Ponadto, wykorzystanie znakowanych FAM peptydów pozwoliło na zaobserwowanie bardziej wydajnej translokacji wspomnianych pentapeptydów niż w przypadku peptydu TAT czy R₈ (Gomez i in. 2010). Niewykluczone jednak, że peptydy o tak krótkiej sekwencji są transportowane jeszcze w inny sposób.

Kolejną grupą peptydów penetrujących są heksapeptydy otrzymane przez López-García i współpracowników, z której PAF26 (PFK26, Ac-rkkwfw-NH₂), PAF32 (Ac-rkwhfw-NH₂) i PAF34 (Ac-rkwlfw-NH₂) wykazują najwyższą aktywność przeciwgrzybową wobec *Neurospora crassa*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* i *Botrytis cinerea* (López-García i in. 2000; Muñoz i in. 2006). PAF26, najlepiej zbadany związek z tej grupy, wykazuje pod względem budowy podobieństwo do penetratyny, a składa się z dwóch części: jednej – obdarzonej ładunkiem, a drugiej – hydrofobowej (López-García i in. 2007). Co więcej, badacze wykazali, że bardzo istotna w transporcie PAF26 jest obecność reszt tryptofanu (Muñoz i in. 2012).

Spośród peptydów penetrujących komórkę wyróżnia się również grupę peptydów bogatych w prolinę, które mimo właściwości penetrujących nie są cytotoksyczne. Warto tu wymienić peptyd SAP pochodzący z białka γ -zeiny złożony z powtarzającej się sekwencji VRLPPP, (VRLPPP)₃ (Pujals i Giralt, 2008).

2.4 Mechanizmy transportu peptydów do komórek drobnoustrojowych, w tym grzybowych

Przy omawianiu poszczególnych grup związków peptydowych zwrócono uwagę na różnorodne możliwe mechanizmy pokonywania przez te związki biwarstwy lipidowej. Działanie naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych opiera się na bezpośrednim oddziaływaniu na błonę komórkową, natomiast inne związki peptydowe muszą, dla wywołania efektu grzybobójczego, zostać wprowadzone do wnętrza komórek grzybowych. Z uwagi na polarność peptydów, pokonanie biwarstwy lipidowej na drodze dyfuzji prostej jest często niemożliwe. Peptydy penetrujące komórkę (CPP) z uwagi na odpowiednią budowę wykorzystują bezpośrednią

translokację przez błonę lub endocytozę jako mechanizm transportu, natomiast inne peptydy i ich pochodne o długości nieprzekraczającej ośmiu reszt aminokwasowych wykorzystują mało specyficzne, systemy transportu oligopeptydów oparte na umieszczonych w błonie cytoplazmatycznej białkach, permeazach peptydowych.

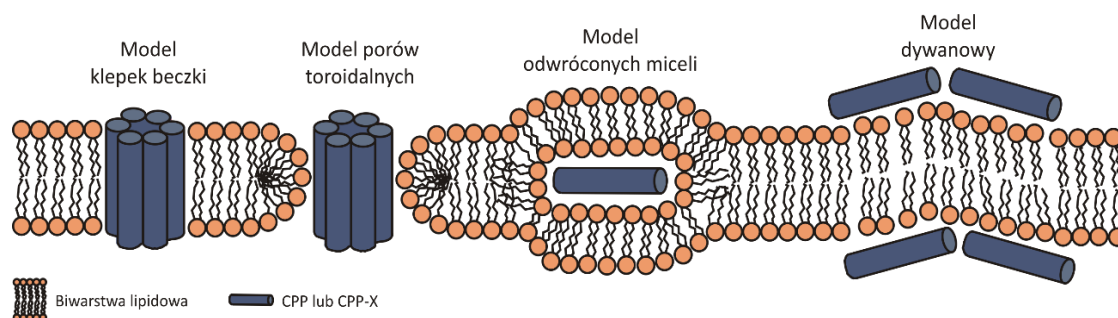
2.4.1 Transport na drodze bezpośredniej translokacji lub endocytozy

Przenikanie CPP przez błony komórkowe prawdopodobnie odbywa się na drodze translokacji przez błonę komórkową. Mechanizm translokacji CPP stał się tematem wielu badań i nie został jeszcze szczegółowo wyjaśniony. Oprócz teorii obejmującej transport na drodze endocytozy lub fagocytozy z udziałem np. makrofagów, przypuszcza się, że CPP są zdolne do bezpośredniego przenikania przez błony biologiczne, niezależnie od energii. Zauważono, że transport niektórych CPP do komórek zachodzi wydajnie nawet w temperaturze 4°C. Według tej teorii peptydy penetrujące mogą dostać się do wnętrza komórek dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i tworzeniu porów w błonie cytoplazmatycznej (Zorko i Langel, 2005). Grupa Richarda zaproponowała endocytozę jako główny mechanizm translokacji w poprzek błony cytoplazmatycznej dwóch peptydów penetrujących, Tat i R₉. W temperaturze 4°C nie zaobserwowano przemieszczania się badanych CPP do komórek (Richard i in. 2003). W przypadku PAF26, mechanizm jego przenikania przez błonę komórkową zależy prawdopodobnie od stężenia peptydu. Zaobserwowano, że przy niższym stężeniu PAF26 ma miejsce endocytoza, natomiast przy wyższych – bezpośrednia translokacja, prawdopodobnie oparta o tzw. mechanizm dywanowy (Muñoz i in. 2012).

W badaniach obejmujących poznanie mechanizmu wnikania CPP uzyskiwano różne charakterystyki transportu nawet dla tych samych peptydów. Na proces przenikania i/lub metody stosowane do badań mechanizmu może mieć wpływ wiele czynników, między innymi wypadkowy ładunek, struktura pierwszo- i drugorzędowa, modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów, ale prawdopodobnie także stężenie peptydu czy czas inkubacji peptydu z zawiesiną komórek (Duchardt i in. 2007; Trabulo i in. 2010). Z uwagi na złożoność czynników, do tej pory nie określono jednoznacznie mechanizmu transportu dla poszczególnych peptydów penetrujących (Lundberg i Langel, 2003). Generalnie, krótsze peptydy prawdopodobnie są przenoszone na drodze bezpośredniej translokacji, natomiast dłuższe polipeptydy za pomocą endocytozy.

Bezpośrednia translokacja CPP odbywa się niezależnie od energii i temperatury. Zaproponowane dotąd teorie dotyczące mechanizmów bezpośredniej translokacji CPP przez błony biologiczne obejmują model klepek beczki (Gazit i in. 1994), model porów toroidalnych (Yeaman i Yount, 2003), model odwróconych miceli (Derossi i in. 1996) i model dywanowy (Pouny i in. 1992). Większość modeli zakłada naruszenie struktury błony komórkowej. Model

odwróconych miceli prawdopodobnie tłumaczy przenikanie niewielkich hydrofilowych peptydów penetrujących przez biwarstwę lipidową np. penetratyny (Trabulo i in. 2010). Model porów toroidalnych opisuje mechanizm transportu peptydów bogatych w arginę i peptydu Tat (Bechara i Sagan, 2013), a model dywanowy - peptydu PAF26 (Muñoz i in. 2012). Modele zostały przedstawione schematycznie poniżej (rys. 2).



Rys. 2 Prawdopodobne mechanizmy bezpośredniej translokacji peptydów penetrujących.
Na podstawie: Trabulo i in. 2010.

Model klepek beczki (znany również pod nazwą „tworzenia porów”) oparty na gromadzeniu się peptydów na kształt beczek, w poprzek błony cytoplazmatycznej i tworzeniu porów – przypominających beczkę, w których niepolarne części oddziałują z lipidami błony, a hydrofilowa wewnętrzna powierzchnia tworzy szczeliny (Gazit i in. 1994).

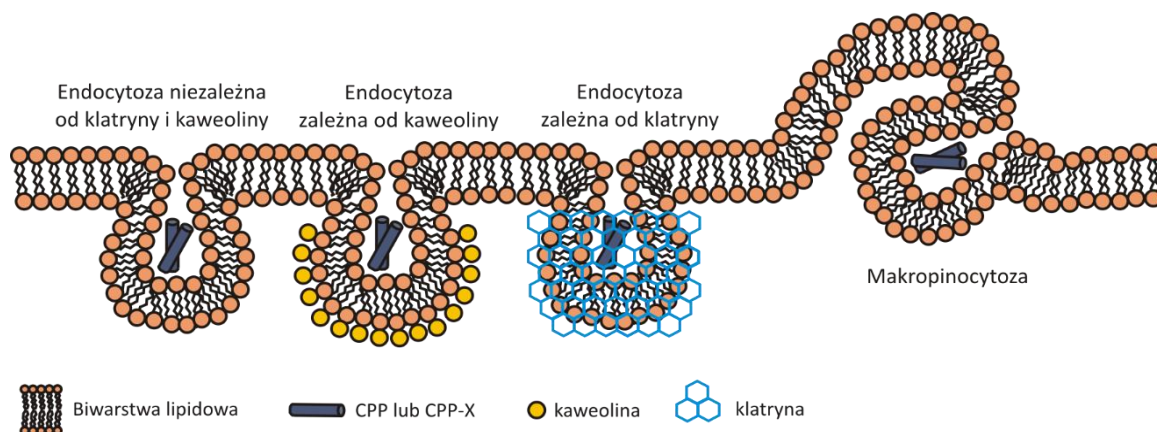
W przypadku modelu porów toroidalnych, część hydrofilowa peptydu oddziałuje z polarnymi grupami fosfolipidów prowadząc do utworzenia tymczasowych, toroidalnych porów w biwarstwie lipidowej w konsekwencji prowadząc do reorganizacji biwarstwy lipidowej (Yeaman i Yount, 2003).

Kolejny model – odwróconych miceli – zakłada oddziaływanie pozytywnie naładowanej części peptydu z fosfolipidami błony, oddziaływaniu z hydrofobową jej częścią, co prowadzi do zgięcia biwarstwy i utworzenia odwróconej miceli. Następuje powtórne zgięcie biwarstwy i peptyd dostaje się do wnętrza komórki (Derossi i in. 1996).

Inny mechanizm to model dywanowy, w którym peptydy szczelnie pokrywając powierzchnię błony, wywierają nacisk, co prowadzi do uszkodzenia konstrukcji błony cytoplazmatycznej (Pouny i in. 1992).

Drugim prawdopodobnym sposobem wnikania CPP do komórek jest endocytoza. Endocytoza jest mechanizmem zależnym od energii i zachodzi we wszystkich komórkach zapewniając wydajne pobieranie cząsteczek do wnętrza komórek. Przyjmuje się, że w transporcie mniejszych cząsteczek, na przykład peptydów o długości do 40 reszt aminokwasowych w łańcuchu peptydowym, obok bezpośredniej transdukcji rolę odgrywa również endocytoza jednak przebiega ona dużo wolniej. W przypadku większych cząsteczek (np. białek) pokonanie bariery błony komórkowej odbywa się na zasadzie endocytozy zależnej od receptorów oraz

makropinocytozy (Cahill, 2010). Do tej pory zaproponowano szereg teorii opisujących prawdopodobny sposób transportu CPP do komórek. Wyróżnia się tutaj, endocytozę niezależną od obecności receptorów błonowych (klatryny, kaweoliny), endocytozę z udziałem klatryny (Richard i in. 2003) i endocytozę z udziałem kaweoliny (Fittipaldi i in. 2003), a także makropinocytozę (Kaplan i in. 2005). Wymienione mechanizmy zostały przedstawione na schemacie poniżej (rys. 3).



Rys. 3 Prawdopodobne mechanizmy translokacji peptydów penetrujących na drodze endocytozy. Na podstawie: Trabulo i in. 2010.

Proces endocytozy CPP składa się z etapu zamknięcia cząsteczki w błonie komórkowej przypominającej pętlę (endocytoza właściwa) oraz z etapu uwolnienia zawartości struktury pęcherzyka endosomalnego. Drugi etap ogranicza degradację przenoszonych cząsteczek w lizosomach przy jednoczesnym umożliwieniu dotarcia cząsteczki do celu molekularnego (Bechara i Sagan, 2013). Endocytoza zależna od receptorów błonowych wykorzystuje kaweolinę bądź klatrynę (rys. 3). Kaweolina okrywająca wklęsnięcia w błonie komórkowej jest odporna na działanie wysokiego pH i niejonowe detergenty. Choć mechanizm endocytozy z udziałem kaweoliny nie został jeszcze dokładnie poznany, przypuszcza się, że kaweolina może uczestniczyć w spajaniu pęcherzyków endosomalnych. Klatryna natomiast opłascza pęcherzyki transportowe i bierze udział w tworzeniu uwypukleń błony komórkowej nazywanych jamkami klatrynowymi (Trabulo i in. 2010).

W celu określenia rodzaju endocytozy, bada się wpływ inhibitorów endocytozy m.in. amiloryd, chlorpromazyna, nokodazol, cytochalazyna D na transport znakowanych fluorescencyjnie peptydów penetrujących. Przyjmuje się, że amiloryd ogranicza makropinocytozę (Doan i in. 2012; Gomez i in. 2010), chlorpromazyna i nokodazol hamują endocytozę zależną od klatryny (Bayer i in. 1998; Doan i in. 2012; Gomez i in. 2010), natomiast cytochalazyna D uniemożliwia makropinocytozę i endocytozę opartą o kaweolinę. Cytochalazyna D prawdopodobnie ogranicza polimeryzację aktyny (Gomez i in. 2010).

Z uwagi na ogromny potencjał wykorzystania CPP w roli nośników, zainteresowano się mechanizmami transportu koniugatów peptydów penetrujących z różnymi związkami. Co ciekawe, zauważono różnice we właściwościach transportu wolnych peptydów penetrujących i ich koniugatów, jak również różnice w zależności od rodzaju przenoszonej cząsteczki przez ten sam nośnik peptydowy (Trabulo i in. 2010). Grupa Lundina i jego współpracowników porównała sposób wnikania kilku koniugatów CPP o kationowym lub amfifilowym charakterze takich jak: penetratyna, M918, transportan, TP10 z PNA. Uzyskane wyniki wskazują na to, że koniugaty PNA z kationowymi peptydami są transportowane głównie na drodze makropinocytozy, natomiast koniugaty z peptydami amfifilowymi na drodze endocytozy zależnej od klatryny (Lundin i in. 2008). Niewykluczone, że transport peptydów penetrujących polega na jednoczesnym wykorzystaniu kilku mechanizmów opisanych wcześniej.

2.4.2 *Transport aktywny za pośrednictwem permeaz peptydowych u grzybów*

Drobnoustroje do pobierania oligopeptydów wykorzystują zlokalizowane w błonie komórkowej białka, permeazy peptydowe. Praca permeaz zależy od gradientu protonów w poprzek błony i aktywności ATPazy – zaobserwowano, że inhibitory metaboliczne takie jak azydek sodu efektywnie hamują transport peptydów do wnętrza komórek grzybowych (Logan i in. 1979; Davies, 1980; Milewski i in. 1991a). Co więcej, badania wykazały, że systemy transportujące peptydy różnią się w zależności od gatunku. Inna jest specyficzność substratowa permeaz peptydowych u *S. cerevisiae*, a inna u *C. albicans* (Yadan i in. 1984; Moneton i in. 1986).

Odkrycie naturalnych związków przeciwgrzybowych o strukturze oligopeptydowej, takich jak tetaina czy nikkomycyna, poznawanie mechanizmu ich transportu do wnętrza komórek, a także izolacja mutantów opornych na te dipeptydy pozwoliła scharakteryzować grzybowe systemy transportujące oligopeptydy.

W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano, że mutanty odporne na nikkomycynę Z utraciły zdolność transportu dipeptydów, w tym tetainy, a tripeptydy były transportowane szybciej, co wskazało na istnienie osobnych systemów transportu dipeptydów i tripeptydów (Yadan i in. 1984). Logan ze współpracownikami doszli do podobnych wniosków badając peptydy zawierające jedną, dwie, trzy i cztery reszty metioniny (Logan i in. 1979). W innych badaniach, mutanty odporne na nikkomycynę Z utraciły zdolność transportu di- i tripeptydów sugerując istnienie wspólnego systemu transportu dla di- i tripeptydów (Moneton i in. 1986). Badania przeprowadzone przez Daviesa potwierdziły te obserwacje (Davies, 1980). Do podobnych wniosków doszedł wcześniej Marder i współpracownicy: mutanty odporne na działanie toksycznego peptydu L-etionilo-L-alaniny wyróżniały się wadliwym transportem innych dipeptydów oraz tripeptydów (Marder i in. 1978). W innych badaniach, Payne i Shallow, na podstawie oporności na toksyczny dipeptyd, tetainę, nikkomycynę lub polioksynę uzyskali

mutanty spontaniczne, które mimo odmiennych mechanizmów działania przeciwgrzybowego związków, charakteryzowały się krzyżową opornością na pozostałe dipeptydy. Zaobserwowana krzyżowa oporność opierała się na uszkodzonym systemie transportu dipeptydów do komórek grzybów (Payne i Shallow, 1985). Podobnie, grupa Milewskiego i współpracowników zaobserwowała, że mutanty odporne na działanie dipeptydu, Nva-FMDP, nie transportowały innych dipeptydów, a transport tripeptydów był zmniejszony. W przypadku mutantów opornych na tripeptyd, Met-Met-FMDP, transport zarówno dipeptydów, tripeptydów i tetrapeptydów był niewykrywalny, bądź bardzo niewielki. Mutanty odporne na tetrapeptyd, Met-Met-Met-FMDP nie transportowały tetrapeptydów, transport tripeptydów był zmniejszony, natomiast transport dipeptydów przebiegał bez zmian (Milewski i in. 1988a).

Badania wykorzystujące mutanty z utraconą zdolnością transportu peptydów wykazały istnienie odrębnych systemów transportu dipeptydów i innych oligopeptydów (Payne i Shallow, 1985). McCarthy wraz ze współpracownikami na podstawie swoich badań stwierdził, że transport peptydów odbywa się przez dipeptydowe permeazy z niskim powinowactwem do oligopeptydów oraz przez oligopeptydowe permeazy z niskim powinowactwem do dipeptydów (McCarthy i in. 1985b). Transport tripeptydów jest zatem wspólny dla obu systemów transportu peptydów z zastrzeżeniem, że niektóre tripeptydy mogą być wydajniej transportowane przez system permeaz przenoszących di- i tripeptydy, inne natomiast przez system permeaz oligopeptydowych. Na tej podstawie stwierdzono, że tripeptydy są najlepszymi nośnikami związków przeciwgrzybowych do komórek *C. albicans* z uwagi na to, że są transportowane przez dwa odrębne systemy permeaz i dzięki temu prawdopodobieństwo zajścia mutacji i wystąpienia oporności jest mniejsza (Milewski i in. 1988a).

Dzięki pracom Basraiego i współpracowników, a także Reuða i Morschhäusera scharakteryzowano systemy transportu peptydów u *C. albicans* oraz zidentyfikowano geny kodujące poszczególne permeazy peptydowe. Pierwszy system, specyficzny przede wszystkim dla di- i tripeptydów (permeazy PTR), zidentyfikowano u prawie wszystkich organizmów, drugi natomiast - dedykowany głównie dla peptydów od czterech do ośmiu aminokwasów w łańcuchu (permeazy OPT) - jedynie u grzybów i roślin (Basrai i in. 1995; Wiles i in. 2006). W komórkach *C. albicans* istnieją dwa odrębne systemy transportu peptydów, natomiast komórki *S. cerevisiae* posiadają tylko permeazy PTR (Perry i in. 1994). Permeazy di- i tripeptydowe kodowane są przez dwa geny, *PTR2* oraz *PTR222*, natomiast permeazy oligopeptydowe przez pięć genów *OPT*, od *OPT1* do *OPT5* (Reuß i Morschhäuser, 2006).

2.4.2.1 Permeazy PTR

Białka należące do rodziny transporterów di-/tripeptydowych (PTR) charakteryzują się kilkoma zakonserwowanymi motywami. Transportery PTR posiadają dwanaście

prawdopodobnych transmembranowych domen rozdzielonych fragmentami hydrofilowymi (Lubkowitz i in. 1997). Do najlepiej scharakteryzowanych transporterów tego typu należą permeazy w komórkach *S. cerevisiae* - ScPtr2 (Perry i in. 1994) i *C. albicans* - CaPtr2 (Basrai i in. 1995).

Rolę permeaz PTR poznano dzięki uzyskaniu i zbadaniu mutanta *S. cerevisiae* pozbawionego genów kodujących permeazy peptydowe (ScPtr2), ale transformowanego genem *PTR2* pochodzącym z *C. albicans*. W konsekwencji zaobserwowano wzrost komórek mutanta w pożywce, w której źródło azotu stanowiły dipeptydy. Jednak po wprowadzeniu plazmidu komórki *S. cerevisiae* nie uzyskiwały wyjściowej zdolności do transportu badanych peptydów, co można tłumaczyć tym, że prawdopodobnie produkt kodowany przez *CaPTR2* nie jest kompatybilny z innymi składnikami wymaganymi do transportu peptydów znajdującymi się w komórkach *S. cerevisiae*. Możliwe również, że *CaPTR2* oraz *ScPTR2* różnią się specyficznością strukturalną transportowanych łańcuchów peptydowych (Basrai i in. 1995).

Co ciekawe, grupa Morschhäusera zaobserwowała wzrost mutanta *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, u którego wymuszono pod kontrolą promotora *ADH1* ekspresję poszczególnych transporterów peptydowych PTR i OPT. Zaobserwowano, że wymuszona ekspresja genu *ptr2* lub *ptr22* sprawia, że mutanty mogą wykorzystywać wszystkie testowane dipeptydy jako substraty (RK, AT, KL, LS, LW, LL, HL, MM, stężenie: 1 mg/mL) co skutkuje nawet lepszym wzrostem mutanta niż szczepu wyjściowego SC5314 (w przypadku dipeptydu: AT, KL, LS, LW, LL, HL). Ponadto odnotowano różnice we wzroście mutantów u których wymuszono pojedyncze geny permeaz di-/tripeptydowych. Wyniki pokazują, że permeaza Ptr2 odgrywa większą rolę w wykorzystaniu LL i MM, natomiast permeaza Ptr22 w wykorzystaniu LW jako źródła azotu (Dunkel i in. 2013).

2.4.2.2 Permeazy OPT

Lubkowitz i współpracownicy przeprowadzili doświadczenia analogiczne do wykonanych przez Basraiego i współpracowników (Basrai i in. 1995), dokonując ekspresji genu *OPT1* pochodzącego z *C. albicans* w mutancie *S. cerevisiae* pozbawionym systemu transportu di-/tripeptydów (*ScPTR2*). Zaobserwowano zdolność uzyskanego mutanta do wzrostu w podłożu zawierającym tetrapeptyd KLLG jako jedyne źródło azotu. Ponadto, otrzymany mutant charakteryzował się wrażliwością wobec toksycznych tetra- i pentapeptydów, jak również zwiększoną prędkością pobierania znakowanego tetrapeptydu, KLG[³H]L. Zauważono również, że na poziom pobierania badanych oligopeptydów u mutanta *S. cerevisiae* wpływał rodzaj źródła azotu wykorzystanego do wzrostu komórek (Lubkowitz i in. 1997).

Grupa Lubkowitza jako pierwsza zidentyfikowała oligopeptydową permeazę u *C. albicans* kodowaną przez gen *OPT1*. Z badań wynika, że wielkość genu sięga 3800 pz,

otwarta ramka odczytu liczy 2349 nukleotydów i zawiera intron o długości 58 nukleotydów. Produkt tego genu zbudowany jest z 783 reszt aminokwasowych i zawiera 12 hydrofobowych regionów, sugerując jego rolę jako błonowego białka transportowego. Badania z 1997 dowodzą również, że białko Opt1 nie należy do rodzin błonowych białek transportowych ABC i PTR (Lubkowitz i in. 1997). Z badań Reuða i współpracowników wynika, że szczep *C. albicans* SC5314 posiada dwa polimorficzne allele genu *OPT1* różniące się 35 nukleotydami, z których pięć skutkuje zmianą sekwencji aminokwasów (Reuß i in. 2004). Przeprowadzone badania udowodniły również, że permeaza kodowana przez gen *OPT1* odgrywa decydującą rolę w pobieraniu peptydów i tym samym wroście *C. albicans* w podłożu zawierającym jako źródło azotu BSA. Inaktywacja genu *OPT1* powodowała oporność mutantów wobec toksycznego peptydu, KLLEth, co wskazuje na to, że Opt1 ma zasadniczy wpływ na transport tego peptydu do komórek. Mimo to, mutant pozbawiony genu *OPT1* był zdolny do wzrostu na podłożu YCB-BSA w takim samym stopniu jak szczep dziki *C. albicans* SC5314 i produkował podobne ilości proteinaz. Dlatego wywnioskowano, że *OPT1* nie jest niezbędny do indukcji *SAP2* i do pobierania peptydów, produktów trawienia BSA (Reuß i in. 2004).

Oprócz permeazy Opt1, *C. albicans* posiada szereg genów kodujących prawdopodobne permeazy oligopeptydowe. Dzięki analizie genomu *C. albicans* SC5314 zidentyfikowano jeszcze siedem innych potencjalnych genów, zlokalizowanych na czterech chromosomach, kodujących potencjalne transportery służące komórkom do pobierania oligopeptydów (od *OPT2* do *OPT8*). Ponumerowano je wraz z malejącą homologią z *OPT1*, jednak funkcjonalne jest pierwsze pięć genów, *OPT1* - *OPT5*. Produkt genu *OPT2* wykazuje 48% podobieństwo do Opt1, a oba allele są identyczne. Gen *OPT3* jest zlokalizowany 3300 pb poniżej genu *OPT2* i jest skierowany w tym samym kierunku. Produkt tego genu jest w 98% identyczny z Opt2, co wskazuje na to, że geny te powstały najprawdopodobniej na drodze tandemowej duplikacji. Szczep SC5314 posiada dwa polimorficzne allele genu *OPT3*, które różnią się 86 nukleotydami z czego osiem powoduje zmianę kodowanej sekwencji aminokwasów. Gen *OPT4* jest zlokalizowany około 47 kb powyżej genu *OPT2* i jest skierowany w przeciwnym kierunku. Szczep SC5314 posiada dwa polimorficzne allele genu *OPT4*, które różnią się 74 nukleotydami, a w konsekwencji trzynaście z nich prowadzi do zmiany kodowanego aminokwasu. Białko Opt4 jest bardzo podobne do białek Opt2 i Opt3, odpowiednio w 93% i 95%. Dwa allele genu *OPT5* są prawdopodobnie identyczne. Białko Opt5 jest w około 80% podobne do białek Opt2, Opt3 oraz Opt4. Pozostałe białka Opt6-Opt8 charakteryzują się niższym podobieństwem do pozostałych białek transporterów oligopeptydów, odpowiednio w 58%, 38%, 32% (Reuß i Morschhäuser, 2006).

Mutanty pozbawione jednego z genów *OPT* rosły w podłożu YCB, zawierającym BSA jako jedyne źródło azotu, na takim samym poziomie jak szczep dziki *C. albicans* SC5314. Zatem usunięcie jednego z genów *OPT* nie wpływa na zmniejszenie lub nie powoduje utraty zdolności

wykorzystywania białek jako źródła azotu. Grupa Morschhäusera zaproponowała, że oligopeptydowe transportery kodowane przed geny *OPT* pełnią częściowo „uśpioną” rolę w pobieraniu peptydów i/lub indukowaniu produkcji proteinaz (Reuß i Morschhäuser, 2006).

W przypadku mutantów pozbawionych pierwszych trzech genów kodujących permeazy *OPT* obserwowano brak wzrostu w podłożu YCB-BSA, tak samo jak w przypadku mutantu *sap2Δ* (bez genu kodującego proteinazę Sap2). Co więcej, brak zdolności do wzrostu mutantu *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* nie był spowodowany brakiem ekspresji *SAP2*. Mutant ten produkował Sap2 i degradował BSA w takim samym stopniu jak szczep dziki. Ekspresja dodatkowej kopii genu *SAP2* nie wpływała na zdolność do wzrostu (Park i Morschhäuser, 2005). Brak możliwości wzrostu potrójnego mutantu *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* wynika z niezdolności komórek do pobierania peptydów, produktów endoproteolitycznego trawienia BSA. Mutant *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* po ponownym wprowadzeniu pojedynczego genu *OPT1*, *OPT2* lub *OPT3*, odzyskiwał zdolność do wzrostu w podłożu YCB-BSA. Co więcej, wymuszona ekspresja genów *OPT1-OPT8* pod kontrolą promotora *ADHI* w mutancie *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* prowadziła do ekspresji wszystkich genów *OPT* za wyjątkiem *OPT6-OPT8* w podłożu YCB-BSA. Z powyższych obserwacji wynika, że przynajmniej jeden z genów od *OPT1* do *OPT5* koduje w pełni funkcjonalną permeazę peptydową. Pozostałe geny nie wpływają na wykorzystanie peptydów jako źródło azotu z uwagi na to, że nie kodują transporterów peptydowych lub też geny te nie są wystarczająco ekspresjonowane *in vitro* (Reuß i Morschhäuser, 2006). Ostatnio, Desai i współpracownicy zaproponowali, że gen *OPT7* koduje transporter glutationu (Desai i in. 2011).

Kolejny eksperyment przeprowadzony w grupie Morschhäusera, wykorzystujący gen GFP pod kontrolą kolejnych promotorów *OPT* wskazał, że w podłożu pełnym, YPD, geny *OPT* oraz *SAP2* są ekspresjonowane na bardzo niskim poziomie lub ich ekspresja w ogóle nie występuje. W podłożu minimalnym, YCB-BSA natomiast, gen *OPT3* ulegał najsilniejszej ekspresji, zaraz potem *OPT1*, a w niewielkim stopniu, ale na poziomie wykrywalności gen *OPT5*. Co ciekawe, ekspresja genu *OPT2* nie miała miejsca, mimo to wprowadzenie genu *OPT2* do mutantu *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* przywracała jego zdolność do wzrostu (Reuß i Morschhäuser, 2006).

Poziom i warunki ekspresji pojedynczych genów *OPT* różnią się. Gdy w podłożu YCB zamiast BSA znajdował się tetrapeptyd LWMR lub pentapeptyd PGKAR, miała miejsce ekspresja genów *OPT1* i *OPT3*, natomiast brak było ekspresji genów *OPT5* oraz *SAP2* (Reuß i Morschhäuser, 2006).

Mutant *opt1Δ opt2Δ opt3Δ opt4Δ opt5Δ* wykazywał większą zdolność do wzrostu niż mutant *sap2Δ*, ponieważ prawdopodobnie posiada zdolność do wykorzystywania produktów degradacji BSA. Może być to spowodowane tym, że geny *OPT6-OPT8* kodują permeazy, które w bardzo niewielkim stopniu transportują produkty proteolitycznego trawienia BSA albo obecne w podłożu krótsze peptydy są pobierane przez transportery di- i tripeptydów lub też komórki

pobierają pojedyncze aminokwasy powstałe w wyniku degradacji BSA, za pomocą permeaz aminokwasowych (Martínez i Ljungdahl, 2005; Reuß i Morschhäuser, 2006).

Co ciekawe, wymuszona ekspresja genu *OPT1* umożliwia wzrost w warunkach, gdy dostępne źródło azotu stanowi dipeptyd RK. Permeazę Opt1 przyjęto jako transporter dedykowany dla oligopeptydów liczących od czterech do ośmiu reszt aminokwasowych (Reuß i Morschhäuser, 2006), natomiast kolejne badania grupy Morschhäusera wykazały, że umożliwia ona transport nie tylko tripeptydów, ale również dipeptydów (Dunkel i in. 2013).

Zaangażowanie permeaz obu rodzajów, Ptr22 i Opt1 w pobieranie dipeptydu RK zaobserwowano przy stężeniu 1 mg/mL tego peptydu w podłożu YCB. Natomiast przy zmniejszonym stężeniu RK, wynoszącym 0,25 mg/mL, nie zaobserwowano wzrostu mutantu *ptr2Δ ptr22Δ* co wskazuje na to, że w zadanych warunkach eksperymentalnych permeaza Ptr22 jest wydajnym transporterem peptydu RK i umożliwia wzrost w warunkach ograniczonej ilości tego źródła azotu (Dunkel i in. 2013).

Co więcej, permeazy różnią się między sobą pod względem specyficzności substratowej również w procesie transportu tripeptydów: LWL, AAP i KFK. Gdy źródło azotu stanowił LWL, wymuszona ekspresja genów *OPT1* i *PTR22* pozwalała na wzrost mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, natomiast w przypadku tripeptydu AAP wzrost był możliwy, gdy miała miejsce wymuszona ekspresja genu *OPT1* lub *PTR22*, ale również w przypadku ekspresji pojedynczego genu *PTR2*. Wzrost w obecności KFK był możliwy po wymuszonej ekspresji pojedynczych genów permeaz OPT i PTR z wyjątkiem genów *PTR2* i *OPT5* (Dunkel i in. 2013).

Wyniki różnych grup badawczych wskazują, że permeazy peptydowe różnią się specyficznością nie tylko jeśli chodzi o długość transportowanego łańcucha peptydowego, ale także o jego sekwencję. W przeciwieństwie do permeaz PTR, które mogą transportować di- i tripeptydy, permeazy OPT charakteryzuje się zwykle jako te odpowiedzialne za transport tetra- i pentapeptydów (McCarthy i in. 1985a).

Badano zdolność szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 oraz mutantów delecyjnych do wzrostu w podłożu minimalnym zawierającym jako źródło azotu jedynie pojedynczy peptyd. Wybrano pentapeptydy: RPPGF i PGKAR, heptapeptydy: RPPGFSP i DRVYIHP oraz oktapeptydy: RPPGFSP i DRVYIHPF. W przeciwieństwie do szczepu dzikiego, mutant *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* nie wykazywał wzrostu w tak skomponowanych podłożach. Poza heptapeptydem DRVYIHP, pozostałe peptydy nie wymagały trawienia przed pobraniem. Dodatek pepstatyny A (inhibitor Sap odpowiedzialnych za zewnątrzkomórkową proteolityczną aktywność *C. albicans*) nie wpływał na wzrost SC5314 (hamował całkowicie wzrost w podłożu YCB-BSA) oraz *sap2Δ* (Reuß i Morschhäuser, 2006). Badania grupy Morschhäusera wykazały, że komórki grzybowe *C. albicans* SC5314 są zdolne do pobierania oligopeptydów o długości nawet do ośmiu aminokwasów.

Biorąc pod uwagę perspektywy wykorzystania nośników peptydowych w projektowaniu proleków należałoby poznać sposoby regulacji permeaz peptydowych, czynniki wpływające na ich ekspresję oraz mechanizmy indukowania oporności na peptydowe proleki.

2.4.2.3 Regulacja działania permeaz peptydowych

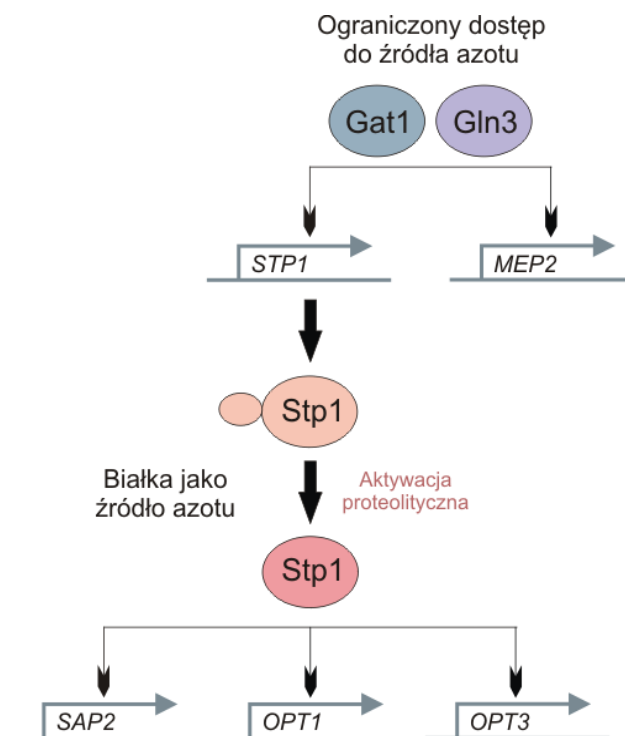
System transportu peptydów w komórkach grzybowych jest regulowany przede wszystkim przez szlaki metabolizmu związków azotu (Basrai i in. 1995), jednak ich działanie może być również zależne od temperatury, pH i obecności glukozy. Island i współpracownicy badając system transportu dipeptydów u *S. cerevisiae*, zaobserwowali, że jest on indukowany przez śladowe ilości aminokwasów. Zauważyli oni również, że obecność niektórych aminokwasów zwiększa wrażliwość *S. cerevisiae* na testowane toksyczne dipeptydy. Za zaobserwowaną wrażliwość mogą być odpowiedzialne zmiany na poziomie transportera, czyli różnice dotyczące regulowania jego aktywności, bądź hydrolizy peptydów przeciwgrzybowych o różnorodnej budowie łańcucha. Zespół Islanda porównał również szybkość transportu trimetioniny hodując *S. cerevisiae* w podłożu z proliną, glutaminianem sodu lub siarczanem amonu. Komórki inkubowane w podłożu z proliną pobierały tripeptyd zdecydowanie szybciej niż te, które miały do dyspozycji glutaminian sodu lub siarczan amonu jako źródło azotu (Island i in. 1987). Jony amonowe prowadzą do represji azotowej i zmniejszenia szybkości transportu peptydów do wnętrza komórek grzybowych. Nisbet i Payne, zaobserwowali, że komórki *S. cerevisiae* hodowane w podłożu z proliną były zdolne do transportu peptydu dziesięciokrotnie szybciej w porównaniu do hodowli w podłożu z siarczanem amonu (Nisbet i Payne, 1979).

Yadan i współpracownicy w swoich badaniach zauważyli, że szybkość pobierania trimetioniny jest zdecydowanie niższa w podłożu bogatym niż w podłożu minimalnym (Yadan i in. 1984). Podobnie grupa Beckera - zaobserwowała, że aktywność polioksyn jest znacznie niższa w podłożu bogatym w peptydy niż w podłożu minimalnym (Becker i in. 1983). Ponadto, wrażliwość na toksyczne tetra- i pentapeptydy wydaje się nie być podatna na źródło azotu dostępne w podłożu czy na indukcję wywołaną obecnością aminokwasów (Basrai i in. 1992).

Island i współpracownicy wysunęli hipotezę, że u podstaw indukowania transporterów dipeptydowych i generowania wrażliwości na toksyczne peptydy niekoniecznie musi znajdować się ogólny wpływ źródła azotu, lecz raczej działanie specyficznego czujnika metabolicznego, który może odpowiadać za natychmiastową syntezę dodatkowej permeazy, bądź niezbędnego składnika już istniejącej permeazy peptydowej lub prowadzić do modyfikacji transportera (Island i in. 1987). Wciąż jednak nie dysponuje się wystarczającą liczbą danych by potwierdzić istnienie zaproponowanego przez badaczy induktora, jak również dokładnie określić rolę składników pokarmowych w regulacji pracy transporterów peptydowych.

Lerner i Goldman zauważyli, że oligopeptydy o długości przynajmniej ośmiu reszt aminokwasowych w łańcuchu wywołują ekspresję proteinaz i zaproponowali, że mogą być one wykrywane przez specyficzne receptory znajdujące się na powierzchni komórki, które uruchamiając szlak sygnałny, prowadzą do ekspresji proteinaz (Lerner i Goldman, 1993). Do zbliżonych wniosków doszli Reuß i Morschhäuser twierdząc, że oligopeptydowe transportery oprócz funkcji jaką pełnią w transporcie peptydów mogą służyć jako czujniki, które w obecności peptydów aktywują szlak prowadzący do indukcji ekspresji *SAP2* (Reuß i Morschhäuser, 2006). Podobny mechanizm rozpoznawania składników pokarmowych został opisany w przypadku innych transporterów występujących w komórkach drożdży m.in. permeazy amonowej Mep2 (Lorenz i Heitman, 1998), transporterów glukozy Snf3 i Rgt2 (Özcan i in. 1996), ogólnej permeazy aminokwasowej Gap1 (Donaton i in. 2003) oraz homologu permeazy aminokwasowej Ssy1 (Klasson i in. 1999). Rola wymienionych transporterów (Rgt2, Snf3, Ssy1) ogranicza się do funkcji sensorów (Reuß i Morschhäuser, 2006).

Regulację pracy permeaz na poziomie ekspresji genów zbadali Morschhäuser i współpracownicy. W obecności wystarczającej ilości łatwo przyswajalnego źródła azotu, jak na przykład soli amonowych lub aminokwasów, ekspresja transporterów (OPT) i enzymów niezbędnych do utylizacji alternatywnych źródeł azotu (*SAP2*) zostaje zahamowana nawet w obecności białek. Za represję tą odpowiada regulacja ekspresji *STP1* w obecności jonu amonowego, glutaminy lub mocznika. Komórki *C. albicans* posiadają dwa transportery, Mep1 i Mep2, odpowiedzialne za transport jonu amonowego. Mep2 bierze udział w pobieraniu preferowanego źródła azotu, jonu amonowego oraz wywołuje zmianę fenotypu. Ekspresja *MEP2* jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne takie jak GATA, Gat1 i Gln3. Wymienione czynniki transkrypcyjne kontrolują również ekspresję proteazy aspartylowej, Sap2, która ma miejsce gdy białka są jedynym dostępnym źródłem azotu. Dokładniej, Gat1 i Gln3 reguluje ekspresję genu *STP1*, który koduje aktywowany proteolitycznie czynnik transkrypcyjny, który z kolei bierze udział w ekspresji genu *SAP2* i genów transporterów oligopeptydowych (Morschhäuser, 2011). Komórki *C. albicans* mogą wykorzystywać białka jako źródło azotu dzięki produkcji proteaz aspartylowych, Sap (Staib, 1965). Aktywność Sap jest niezbędna, aby indukować *SAP2*, również oligopeptydy uzyskane w wyniku aktywności Sap są prawdopodobnie induktorami ekspresji *SAP2* (Staib i in. 2002). Opisany wyżej sposób regulacji genów transporterów oligopeptydowych i innych genów związanych z wykorzystywaniem źródeł azotu przez komórki *C. albicans* został przedstawiony na rys. 4.



Rys. 4 Kontrola ekspresji *MEP2* i *SAP2* przez czynniki transkrypcyjne GATA, Gat1 i Gln3. Na podstawie: Morschhäuser, 2011.

Praca permeaz PTR, szczególnie Ptr2, jest prawdopodobnie regulowana w podobny sposób, a mianowicie w oparciu o Stp1 i Stp2 (Ljungdahl, 2009). Zaobserwowano, że u *S. cerevisiae*, obecność aminokwasów i dipeptydów pozwala na aktywację szlaku sygnałnego, w efekcie umożliwiając komórce pobieranie dipeptydów. Indukcja *PTR2* wymaga aktywności Ssy1 – białka pełniącego rolę detektora zewnątrzkomórkowej puli aminokwasów – a także aktywności ogólnego transportera aminokwasów Gap1. Dodatkowo, ilość i aktywność permeazy *PTR2* jest regulowana przez aktywność ligazy ubikwitynowej UBR1, aktywowanej przez niektóre dipeptydy, która degradowuje białko CUP9, będące transkrypcyjnym represorem genu *PTR2* (Xia i in. 2008).

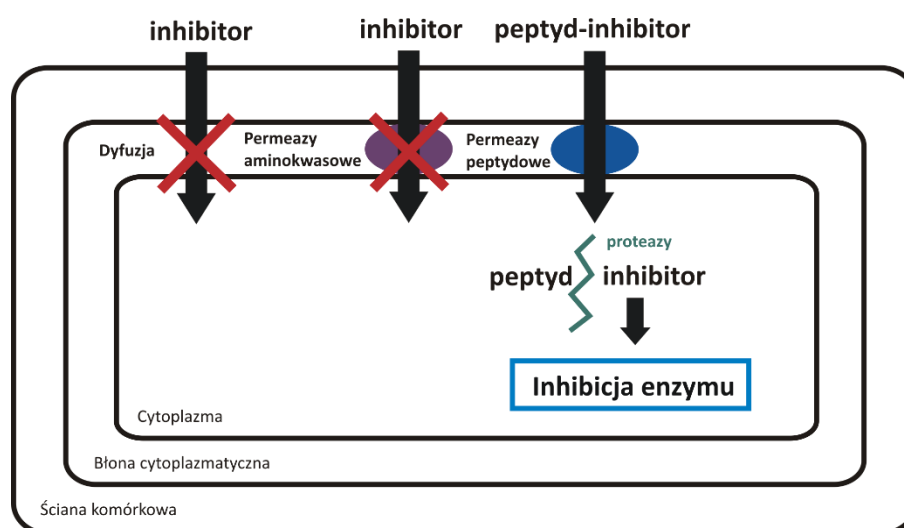
2.4.2.4 Koncepcja peptydowego nośnika inhibitora enzymatycznego

Powszechne występowanie permeaz oligopeptydowych w komórkach drobnoustrojów oraz ich szeroka strukturalna specyficzność zwróciły uwagę na możliwość transportu do wnętrza komórek peptydów o zmodyfikowanych łańcuchach oraz wykorzystania peptydów jako nośników związków, które nie mogą pokonać bariery błony komórkowej. Dzięki odpowiednim nośnikom peptydowym zapewniającym dobrą wydajność transportu, można przenosić związki toksyczne dla komórek, co otwiera możliwość zaprojektowania szeregu potencjalnych leków przeciwgrzybowych. Do takich związków należą inhibitory enzymów zaangażowanych w ważne dla życia komórek grzybów szlaki metaboliczne.

Koncepcja peptydowego nośnika inhibitora enzymatycznego, którą można nazwać koncepcją konia trojańskiego (*warhead delivery, illicit transport* - Ames i in. 1973, *portage transport* - Fickel i Gilvarg, 1973) opiera się na kilku głównych zasadach:

- inhibitor enzymatyczny, często pochodna aminokwasu, nie jest transportowany przez specyficzne permeazy aminokwasowe ani na drodze dyfuzji,
- wbudowanie inhibitora w strukturę peptydu umożliwia jego wydajny transport przez mniej specyficzne permeazy peptydowe,
- koniugat nośnika peptydowego z inhibitorem zaraz po znalezieniu się we wnętrzu komórki zostaje rozczepiony przez wewnątrzkomórkowe permeazy (Logan i in. 1979), w wyniku czego następuje uwolnienie inhibitora. Uwolniony w wyniku hydrolizy aktywny związek nie mogąc opuścić komórki, gromadzi się w jej wnętrzu wywołując pożądany efekt, np. inhibicję ważnego dla życia komórki enzymu.

Zasady koncepcji peptydowego nośnika inhibitora enzymatycznego zostały przedstawione schematycznie na rys. 5.



Rys. 5 Koncepcja nośnika peptydowego inhibitorów enzymatycznych.

Pionierami w badaniach wykorzystujących koncepcję nośnika peptydowego byli Ames wraz ze współpracownikami (Ames i in. 1973) oraz Fickel i Gilvarg (Fickel i Gilvarg, 1973), którzy badali transport peptydów do wnętrza komórek bakteryjnych, *Escherichia coli* oraz *Salmonella typhimurium*, zawierających odpowiednio, *O*-fosforanu histydynolu i pochodne *O*-fosforanu homoseryny. Możliwość wykorzystania peptydów w racjonalnym projektowaniu potencjalnych leków przeciwgrzybowych została zaproponowana przez Lichlitera i jego współpracowników (Lichliter i in. 1976).

Znane są przykłady związków pochodzenia naturalnego – antybiotyków, których mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego jest zgodny z opisaną powyżej koncepcją. Do takich związków wykazujących aktywność przeciwgrzybową należą m.in.: (a) oligopeptydy

zawierające aminokwasowe inhibitory syntazy GlcN-6-P - tetaina (bacylizyna) (Borowski, 1952; Chmara, 1985; Kenig i Abraham, 1976), Lindenbein (Molloy i in. 1972), antybiotyk CB-25-I (Shoji i in. 1989) oraz chlorotetaina (Rapp i in. 1988a); (b) rhizoktycyny – fosfonowe oligopeptydy zawierające inhibitor syntazy treoninowej (Rapp i in. 1988b).

Koncepcję konia trojańskiego wykorzystano między innymi przy konstrukcji syntetycznych oligopeptydów, takich jak: peptydowe pochodne *m*-fluorofenyloalaniny (Kingsbury i in. 1983), peptydowe pochodne 5-fluorocytozyny oraz 5-fluorouracylu (Ti i in. 1980; Kingsbury i in. 1984), tripeptydowe pochodne polioksyn (Naider i in. 1983), a także peptydowe pochodne FMDP (Andruszkiewicz i in. 1987; Andruszkiewicz i in. 1990, Milewski i in. 1991a).

Opierając się na koncepcji nośnika peptydowego zostały zsyntezowane koniugaty peptydów z 5-fluorocytozyną oraz kwasem 5-fluoroorotowym (Ti i in. 1980), a także 5-fluorouracylem (Kingsbury i in. 1984). Dzięki badaniom z zastosowaniem znakowanej radioaktywnie trimetioniny (Met-Met-Met) udowodniono, że koniugaty peptydów ze związkami będącymi analogami pirymidyny dostają się do wnętrza komórek grzybowych *C. albicans* za pomocą permeaz peptydowych (Ti i in. 1980). Propozycja przyłączenia 5-fluorocytozyny do różnych peptydów udowodniła, że przeniesienie związku przeciwgrzybowego do wnętrza komórek *C. albicans* jest możliwe, jednak decydujący jest sposób ich połączenia gwarantujący efektywne rozczepienie przez wewnątrzkomórkowe peptydazy.

McCarthy i współpracownicy zaobserwowali, że hydroliza wiązań peptydowych zależy w większym stopniu od aktywności aminopeptydaz niż od aktywności karboksypeptydaz (McCarthy i in. 1985b). Milewski i współpracownicy doszli do podobnych wniosków badając szybkość hydrolizy peptydów z dołączonym FMDP na N-końcu oraz na C-końcu. Udowodnili również, że hydroliza peptydów zawierająca FMDP na N-końcu nie jest konieczna dla wywołania efektu inhibicji enzymatycznej, podczas gdy cząsteczka FMDP musi zostać uwolniona w przypadku dipeptydów z FMDP na C-końcu (Milewski i in. 1991a). Dzięki badaniom z zastosowaniem znaczonych izotopowo peptydów udowodniono, że w koncepcji nośnika peptydowego inhibitora enzymatycznego i jego przeciwgrzybowej aktywności, większą rolę odgrywa szybkość transportu koniugatu niż jego rozczepienie (McCarthy i in. 1985a).

Koncepcja peptydowych nośników związków przeciwgrzybowych w tym inhibitorów enzymatycznych może odegrać istotną rolę w racjonalnym projektowaniu potencjalnych chemoterapeutyków. Aby możliwe było ustalenie struktury optymalnego nośnika peptydowego, niezbędne jest poznanie substratowej specyficzności permeaz peptydowych, PTR oraz OPT.

Dzięki dotychczasowym badaniom uzyskano wiele informacji na ten temat:

- a) permeazy peptydowe są stereospecyficzne; preferują oligopeptydy zbudowane z reszt aminokwasowych o konfiguracji L. (Davies, 1980; Milewski i in. 1988a); dipeptydy zawierające aminokwasy o konfiguracji D są transportowane w niewielkim stopniu;
- b) poszczególne składowe koniugatu powinny być połączone wiązaniem peptydowym (Davies, 1980),
- c) przez permeazy najwydajniej transportowane są peptydy zawierające w swojej strukturze cząsteczki alaniny lub innych aminokwasów alifatycznych; obecność w łańcuchu peptydowym aminokwasów o charakterze hydrofobowym zwiększa powinowactwo peptydów do systemów transportowych, podczas gdy grupy o charakterze kwasowym lub zasadowym utrudniają transport (Logan i in. 1979; McCarthy i in. 1985b; Milewski i in. 1988a),
- d) wolna N-terminalna grupa aminowa sprzyja wydajnemu transportowi; modyfikacje N-terminalnej grupy α -aminowej takie jak *N*-acetylacja czy *N*-dialkylacja uniemożliwiają transport peptydu (Logan i in. 1979; Davies, 1980; Milewski i in. 1988a),
- e) C-koniec może być w dowolny sposób modyfikowany nie wpływając na szybkość transportu (Davies, 1980); Lichliter i współpracownicy doszli na podstawie swoich badań do przeciwnych wniosków – C-koniec musi zostać wolny, a N-koniec może być dowolnie modyfikowany by transport przebiegał wydajnie (Lichliter i in. 1976),
- f) dopuszczalne są modyfikacje w strukturach bocznych łańcuchów; łańcuchy zawierające analogi aminokwasów są również wydajnie transportowane (Davies, 1980).

2.5 Zjawisko oporności na peptydowe związki przeciwgrzybowe

W przeciwieństwie do antybiotyków i dostępnych leków przeciwgrzybowych, których działanie ukierunkowane jest zazwyczaj na jeden cel molekularny w komórce patogenu, naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe mają złożony mechanizm działania i często oddziałują w kilku miejscach w komórce w celu wywołania zamierzonego efektu. Dzięki takiemu mechanizmowi mikroorganizmom patogennym zdecydowanie trudniej jest uzyskać oporność na skierowany przeciwko nim peptyd przeciwdrobnoustrojowy.

Peptydy AMP oddziałując z błoną komórkową lub/i z innymi mało specyficznymi celami w komórce utrudniają lub uniemożliwiają patogennym drobnoustrojom wykształcenia mechanizmów oporności. Z uwagi na niskie prawdopodobieństwo wywołania oporności peptydy przeciwdrobnoustrojowe brane są pod uwagę w poszukiwaniu nowych związków aktywnych przeciwbakteryjnie czy przeciwgrzybowo będących alternatywą na antybiotyków. Cecha ta, obok szerokiego spektrum aktywności, złożonego mechanizmu i szybkiego czasu działania stanowi istotne zalety tej grupy związków.

Jednak zjawisko oporności na peptydowe związki przeciwgrzybowe jest prawdopodobne i nie można go zupełnie wykluczyć. Mechanizmy oporności czy choćby mechanizmy pozwalające na ograniczenie aktywności lub ilości AMP mogą polegać na modyfikacji struktur ścian i błon komórkowych, wiązaniu peptydów przez składniki otoczki bakteryjnej, modyfikacji struktury lipopolisacharydów błony komórkowej bakterii gram-ujemnych, redukcji ujemnego ładunku zewnętrznej błony komórkowej, regulacji składu fosfolipidów czyli płynności błony komórkowej, wykrywaniu obecności peptydów w środowisku i regulacji ekspresji genów ukierunkowanej na modyfikację strukturalną produktu ekspresji – celu molekularnego, a także produkcji enzymów gwarantujących efektywną degradację proteolityczną toksycznych peptydów (Bradshaw, 2003; Yeaman i Yount, 2003; Zaiou, 2007). W badaniach Gyurko i współpracowników, badacze uzyskując mutanty odporne na histatynę-5 zaobserwowali, że za zjawisko oporności odpowiadają mutacje w mitochondrialnym DNA prowadzące do zmniejszonej wrażliwości na tę grupę peptydów (Gyurko i in. 2000). Powstawanie oporności wśród mikroorganizmów nie ogranicza się zatem jedynie do zmian w strukturze błony, ale również dotyczy bezpośrednio celi molekularnych takich jak organelle komórkowe.

Jak w przypadku większości substancji toksycznych, prawdopodobne jest wykształcenie mechanizmów oporności również na peptydy zawierające w swojej strukturze aminokwasowe inhibitory enzymatyczne. Oporność może dotyczyć celu molekularnego – w przypadku peptydów-FMDP może obejmować syntazę GlcN-6-P, mechanizmów zapewniających aktywność proleku czyli systemu permeaz, a także hydrolizy koniugatów wewnątrz komórki, co może obejmować zmianę spektrum substratowego permeaz czy ich specyficzności. Zjawisko oporności specyficznej wobec oligopeptydów transportowanych przez permeazy jest dobrze udokumentowane. Jego przejawem jest pojawianie się kolonii komórek opornych wewnątrz stref zahamowanego wzrostu na podłożu agarowym. Stwierdzono to między innymi dla peptydów-FMDP (Milewski i in. 1988a), natomiast molekularna istota tego zjawiska nie została dotychczas poznana.

W celu ominięcia mechanizmów oporności nośniki peptydowe mogłyby prawdopodobnie przenosić dwa lub więcej związków toksycznych o odmiennych mechanizmach działania i celach molekularnych. Obiecujące rezultaty może przynieść również stosowanie terapii kombinowanych, już istniejących leków z nośnikami peptydowymi zawierającymi inhibitor enzymatyczny. Oprócz zmniejszenia prawdopodobieństwa wystąpienia mutacji, istnieje możliwość polepszenia rezultatów tego typu terapii dzięki synergistycznemu działaniu stosowanych chemoterapeutyków.

2.6 Synergizm peptydów przeciwgrzybowych z innymi związkami przeciwgrzybowymi

Naturalne peptydy odpornościowe oraz peptydy penetrujące mogą znaleźć zastosowanie w terapiach kombinowanych umożliwiającących uzyskanie lepszych efektów terapeutycznych przy mniejszych dawkach użytych w leczeniu leków. AMP mogą być stosowane równolegle z innymi lekami, dla uzyskania silniejszej i bardziej wydajnej odpowiedzi immunologicznej układu obronnego organizmu gospodarza.

Warto zwrócić uwagę na wyniki badań wyraźnie ukazujące możliwości jakie niosą za sobą terapie kombinowane z wykorzystaniem związków peptydowych. W latach 90. XX wieku wykazano synergistyczne działanie dipeptydu nikkomycyny Z i leków z grupy azoli: flukonazolu, ketokonazolu i itrokonazolu wobec *C. albicans* (Milewski i in. 1991b; Li i Rinaldi, 1999). Kolejne badania, polegające na określeniu wpływu aktywowanej laktoferyny na aktywność flukonazolu oraz innych triazoli wykazały ich działanie synergistyczne i grzybostatyczne wobec *C. albicans* i *C. glabrata* (Wakabayashi i in. 1998; Naidu i in. 2004). Ponadto badania aktywności peptydu Pep2 o sekwencji FKRRWQWRM będącego fragmentem laktoferyny wykazały znaczne działanie synergistyczne przeciw *C. albicans* w przypadku kombinacji z AmB i mikonazolem (Ueta i in. 2000). Również nowy dodekapeptyd o sekwencji RWRWwflfHWRW-NH₂ najsilniejsze działanie synergistyczne wykazywał z flukonazolem, mniejsze z 5-fluorocytozyną, a w kombinacji peptydu z AmB, zaobserwowano zmniejszenie efektu grzybobójczego (Duggineni i in. 2007; Kuipers i in. 1999). Zastosowanie zsyntezowanych *de novo* peptydów VS2 i VS3 mających doskonałe właściwości grzybobójcze i flukonazolu pozwoliło na uzyskanie efektywniejszego działania przeciwgrzybowego (Maurya i in. 2011). Bardzo ciekawa wydaje się propozycja projektowania koniugatów krótkich peptydów z lipofilowymi związkami takimi jak witamina E i cholesterol w celu zwiększenia aktywności koniugatu, a także uzyskanie synergistycznego działania z innymi lekami np. AmB (Arnusch i in. 2012).

Naturalne peptydy odpornościowe, a w szczególności peptydy penetrujące dają możliwości ograniczenia czy nawet zniesienia oporności wielolekowej komórek grzybowych, zjawiska, który stanowi niezmiernie istotny problem w leczeniu infekcji wywołanych przez grzyby z rodzaju *Candida*. Badania aktywności AmB i itrokonazolu w obecności dwóch peptydów: Pep2 i histatyny-5 pozwoliły na zaobserwowanie obniżonej aktywności pomp wyrzucających ksenobiotyki typu ABC poprzez zmniejszenie ilości ATP w komórce *C. albicans* na drodze tworzenia kanałów anionowych. Stosowanie peptydów takich jak Pep2 i histatyna-5 razem z lekami będącymi substratami pomp CDR1p i CDR2p pozwoli na uniemożliwienie komórce uzyskania wielolekooporności i usunięcia gromadzonego w komórce związku przeciwgrzybowego (Tanida i in. 2005). Kolejną zaproponowaną strategią pozwalającą na ograniczenie zjawiska oporności jest projektowanie inhibitorów pomp typu ABC tzw. TMPM

(ang. *transmembrane peptide mimics*). W badaniach Maurya i współpracowników z szeregu zsyntezowanych TMPM, a dokładniej TMPM8 efektywnie wpływał na aktywność flukonazolu wobec wielolekoopornych komórek *C. albicans* (Maurya i in. 2013).

2.7 Możliwości i ograniczenia wykorzystania AMP i CPP w chemoterapii przeciwgrzybowej

Kationowy charakter AMP i CPP umożliwia oddziaływanie z kwasami nukleinowymi, czy innymi transportowanymi cząsteczkami o ujemnym ładunku, co stwarza możliwość wykorzystania ich jako nośników. Peptydy można zatem łączyć wiązaniami kowalencyjnymi lub oddziaływaniami elektrostatycznymi z transportowaną cząsteczką, której transport przez błonę komórkową bez ich udziału byłby niemożliwy lub mało wydajny.

Mimo niewielkich wielkości, AMP i CPP są w stanie transportować cząsteczki znacznie przekraczające swoje rozmiary (nawet stukrotnie), ułatwiając transfer wysokocząsteczkowych leków i innych białek, a także kwasów nukleinowych np. dsDNA, siRNAs, aptamerów, antysensowych oligonukleotydów (Eiríksdóttir i in. 2004). Zaproponowano dotychczas wiele sposobów transportu tego typu substancji do wnętrza komórek takich jak elektroporacja czy wykorzystanie liposomów. W przeciwieństwie do peptydów penetrujących, niektóre ze znanych metod wprowadzania np. kwasów nukleinowych do komórki wiążą się niestety z niepożądanymi efektami ubocznymi i ograniczeniami w stosowaniu *in vivo*. Nośniki CPP są uważane jako jedyny, obok wektorów wirusowych, sposób transportu substancji do komórek *in vivo* bez naruszania błon biologicznych (Mäe i Langel, 2006; Mi i in. 2000). Do ich zalet należą m.in. wydajny transport w warunkach *in vivo*, możliwość dotarcia do jądra komórkowego, możliwość ich wykorzystania we wszystkich typach komórek, brak immunogeniczności, jak również brak ograniczenia rozmiaru przenoszonego ładunku (Lundberg i Langel, 2003).

Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu CPP jako nośników związków do komórek pojawiły się w latach 90. XX wieku, kiedy zastosowano koniugat penetratyny z antysensowym DNA do regulacji amyloidalnych białek prekursorowych (Allinquant i in. 1995), a także kiedy zastosowano koniugat transportanu z PNA do regulacji receptorów galaninowych (Pooga i in. 1998). Możliwości transportu nanocząstek, białek, liposomów i kwasów nukleinowych zostały wykazane *in vitro* i *in vivo* dla najlepiej scharakteryzowanych peptydów takich jak Tat HIV-1, penetratyny i peptydu Pep-1 (Joliot i Prochiantz, 2004; Heitz i in. 2009).

Oprócz właściwości transportowych, naturalne peptydy odpornościowe oraz peptydy penetrujące stanowią bogate źródło potencjalnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych, jednak ich praktyczne wykorzystanie i wprowadzenie na rynek wiąże się z szeregiem istotnych ograniczeń. Należy tu wymienić przede wszystkim: wrażliwość na degradację proteolityczną, niską biodostępność, charakter białka utrudniający resorpcję z przewodu pokarmowego przy podaniu doustnym, dezaktywacja w surowicy, wrażliwość na pH środowiska, niższa aktywność

w obecności soli oraz kationów magnezu, wapnia i żelaza, toksyczność wobec komórek eukariotycznych, a także możliwość wywołania alergii (Bellamy i in. 1993; Bradshaw, 2003; Gordon i in. 2005).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe posiadają również ograniczenia dotyczące względów ekonomicznych. Przeszkodą są przede wszystkim wysokie koszty produkcji preparatów peptydowych, jak również niska trwałość produktu podczas przechowywania gotowego preparatu (Bradshaw, 2003).

Warto zwrócić uwagę, na fakt, że naturalne peptydy penetrujące są częścią układu odpornościowego mogą być toksyczne wobec komórek eukariotycznych. Cytotoksyczność może być oparta na dezintegracji błon biologicznych, a także wpływanie na funkcjonowanie białek błonowych. Cytotoksyczność zależy przede wszystkim od sekwencji aminokwasowej, struktury drugorzędowej oraz od wypadkowego ładunku peptydu (Lundberg i Langel, 2003).

Istotnym zagadnieniem w aspekcie zastosowania peptydów jako potencjalnych leków jest uzyskanie wysokiego i jednocześnie nietoksycznego dla komórek gospodarza stężenia aktywnego związku w zakażonej tkance. W organizmie producenckim poziom naturalnych peptydów odpornościowych jest ściśle kontrolowany na przykład dzięki magazynowaniu peptydów w granulocytach, jak w przypadku defensyn i katelicydyn czy syntezie nietoksycznych, nieaktywnych form wymagających enzymatycznej aktywacji. Taki mechanizm limitujący stężenie AMP jest wykorzystywany w przypadku katelicydyn (Gordon i in. 2005).

Z uwagi na liczne ograniczenia o różnorodnym charakterze, ale i ogromny potencjał zastosowania AMP i CPP w terapii genowej czy projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych i przeciwdrobnoustrojowych, niezbędne są dalsze badania ukierunkowane na opracowanie nowych metod przechowywania preparatów peptydowych, syntezę bardziej stabilnych analogów związków peptydowych, a także analogów o zwiększonych właściwościach farmakokinetycznych. Włączenie w łańcuch peptydowy niestandardowych aminokwasów pozwoliłoby na zminimalizowanie wpływu degradacji enzymatycznej na aktywność peptydowych leków. Optymalizacja metod otrzymywania i oczyszczania preparatów umożliwiłaby zmniejszenie kosztów produkcji, natomiast biosynteza i zastosowanie technik rekombinantowych mogłoby pozwolić na wielkoskalową produkcję leków peptydowych (Bradshaw, 2003).

Mimo szeregu ograniczeń wykorzystania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w medycynie, niektóre z naturalnych peptydów odpornościowych weszły do badań klinicznych, jednak żaden AMP nie został dotychczas zarejestrowany przez FDA (Fjell i in. 2012, Gordon i in. 2005).

AMP o aktywności przeciwgrzybowej znajdujące się w badaniach klinicznych to między innymi:

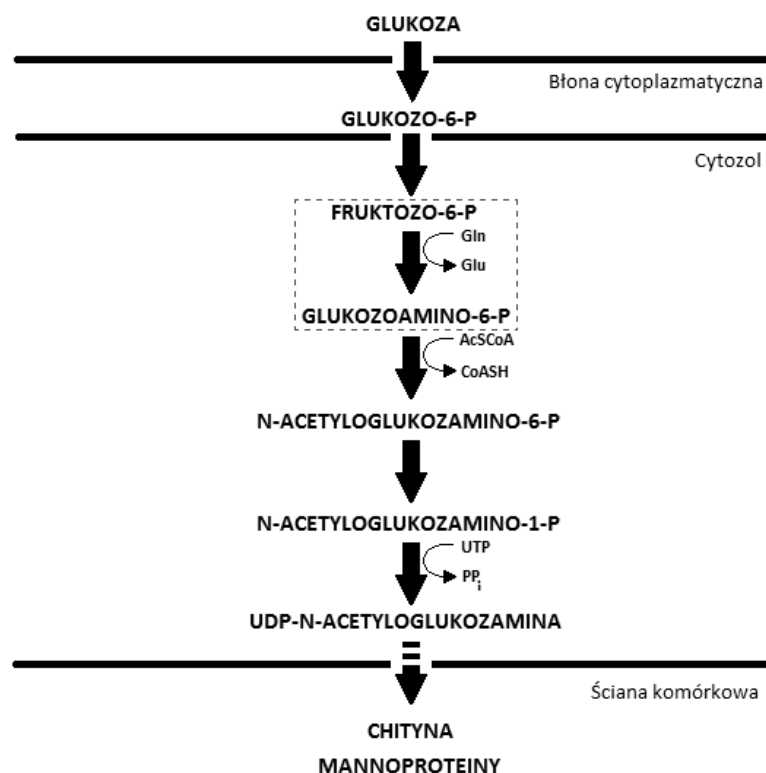
- hLF1-11 (GRRRRSVQWCA, AM-Pharma) to kationowy peptyd, fragment laktoferycyny o długości 11 reszt aminokwasowych. Może znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji grzybowych u pacjentów po przeszczepach krwiotwórczych komórek macierzystych. Znajduje się w II fazie badań klinicznych (NCT00509938). Co więcej hLF1-11 działa przeciwgrzybowo wobec komórek *C. albicans* opornych na flukonazol. Zaobserwowano również synergizm hLF1-11 i flukonazolu (Lupetti i in. 2003).
- PAC-113 (P-113, AKRHHGYKRKFH, Pacgen Biopharmaceuticals) jest syntetycznym peptydem, pochodną histatyny-5 (część 4-15 sekwencji aminokwasowej). Może znaleźć zastosowanie w leczeniu kandydoz jamy ustnej. Znajduje się w IIb fazie badań klinicznych (NCT00659971). Co więcej PAC-113 działa przeciwgrzybowo wobec komórek *C. albicans* i *C. glabrata* opornych na flukonazol (Rothstein i in. 2001).
- CZEN-002 (CKPV-CKPV, Zengen) jest dimerem składającym się z ośmiu aminokwasów, peptydowa pochodna hormonu stymulującego α -melanocyty, α -MSH. Aktywność przeciwgrzybowa CZEN-002 opiera się na innych niż zazwyczaj mechanizmach działania AMP, mianowicie powoduje zwiększenie ilości cAMP (cykliczny adenozylo monofosforan) w komórkach *C. albicans*. Może znaleźć zastosowanie w leczeniu kandydoz pochwy. Ma działanie przeciwzapalne. Znajduje się w IIb fazie badań klinicznych (Cutuli i in. 2000).

2.8 Aminokwasowe inhibitory enzymów występujących w komórkach grzybowych

2.8.1 Analogi glutaminy – inhibitory syntazy *GlcN-6-P*

Inhibitory enzymów zaangażowanych w biosyntezę składników ściany komórkowej grzybów, biorąc pod uwagę ich wykorzystanie w racjonalnej chemioterapii, stanowią obiecującą grupę związków. Selektywność działania inhibitorów może być uzyskana dzięki różnym strategiom m.in. w oparciu o różnice w budowie i właściwościach enzymów grzybowych i ludzkich, uzyskiwanie formy aktywnej dopiero we wnętrzu komórek grzybowych, hamowaniu enzymu występującego jedynie u grzybów lub też transportu potencjalnego inhibitora jedynie do komórek grzybowych.

Ściana komórek grzybowych zbudowana jest głównie z polisacharydów – polimerów mannozy oraz D-glukozy połączonych z białkami (odpowiednio, mannoproteiny i glikany) – jak również z homopolimeru *N*-acetyloglukozoaminy, chityny (Bowman i Free, 2006). Schemat biosyntezy UDP-GlcNAc, prekursora chityny i mannoprotein, został przedstawiony poniżej (rys. 6).



Rys. 6 Schemat szlaku biosyntezy UDP-GlcNAc jako prekursora chityny i mannoprotein, składników ściany komórkowej grzybów.

Wśród chemoterapeutyków przeciwgrzybowych stosowanych w praktyce klinicznej znajdują się pochodne echinokandyn, inhibitory syntazy β -(1,3)-D-glukanu. Spore nadzieje związane są z inhibitorami syntazy chitynowej (polioksyny, nikkomycyny).

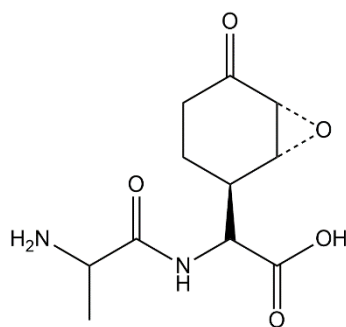
Jednym z najlepiej opisanych enzymów uczestniczących w biosyntezie ściany komórkowej, jednocześnie będącym obiecującym celem molekularnym dla nowych leków przeciwgrzybowych jest syntaza glukozamino-6-fosforanu (L-glutamina: D-fruktozo-6-fosforan amidotransferaza, EC 2.6.1.16). Syntaza GlcN-6-P jest kluczowym enzymem w biosyntezie aminocukrów, katalizuje pierwszy etap szlaku biosyntezy UDP-N-acetyloglukozoaminy, UDP-GlcNAc (oznaczony przerywaną linią na rys. 6). Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę obejmuje transfer grupy aminowej z amidu, L-glutaminy na fruktozo-6-fosforan czyli hydrolizę L-glutaminy, przebiegającą typowo dla amidotransferaz oraz izomeryzację utworzonego fruktozoimino-6-fosforanu do glukozamino-6-fosforanu. Produkt, GlcN-6-P jest przekształcony w kolejnych trzech etapach w UDP-GlcNAc. UDP-GlcNAc jest jednym z głównych substratów w biosyntezie mannoprotein i chityny u grzybów, peptydoglikanu u bakterii oraz glikoprotein u ssaków (Milewski, 2002; Wojciechowski i in. 2005).

Aminocukry występują w makrocząsteczkach zarówno komórek eukariotycznych jak i prokariotycznych, jednak zahamowanie biosyntezy powoduje odmienne skutki. Enzym, syntaza GlcN-6-P występuje również w komórkach ssaków jednak działanie inhibitorów tego enzymu nie

wywołuje efektów toksycznych dla człowieka. Wskutek inhibicji syntazy GlcN-6-P mają miejsce zmiany morfologiczne, aglutynacja i w konsekwencji liza komórek grzybowych (Milewski i in. 1988b; Milewski i in. 1991a). W przypadku komórek ssaków – skutki działania inhibitorów enzymatycznych są niegroźne dzięki dłuższemu cyklowi życiowemu oraz szybszej ekspresji genów kodujących enzymy (Bates i in. 1966).

Dzięki prowadzonym od lat badaniom znane jest spektrum substratowe enzymu. Substratami syntazy GlcN-6-P jest fruktozo-6-fosforan oraz L-glutamina. Z uwagi na udział fruktozo-6-fosforanu w wielu reakcjach enzymatycznych nie wydaje się sensowne zastosowanie inhibitorów syntazy GlcN-6-P będących strukturalnymi analogami tego substratu. Znane są natomiast analogi strukturalne drugiego substratu, L-glutminy, które są specyficznymi inhibitorami enzymu. Nadzieje wiąże się także z analogami stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P (Milewski, 2002).

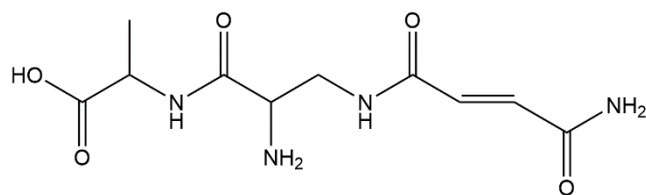
Przykładem inhibitora syntazy GlcN-6-P jest antykapsyna, czyli L-β-(2,3-epoksycykloheksanon-4)-alanina, będąca C-końcowym epoksyaminokwasem antybiotyku tetainy, L-alanylo-L-β-(2,3-epoksycykloheksanon-4)-alaniny (Chmara, 1985). Struktura tetainy została przedstawiona poniżej (rys. 7).



Rys. 7 Wzór strukturalny tetainy (bacylizyny).

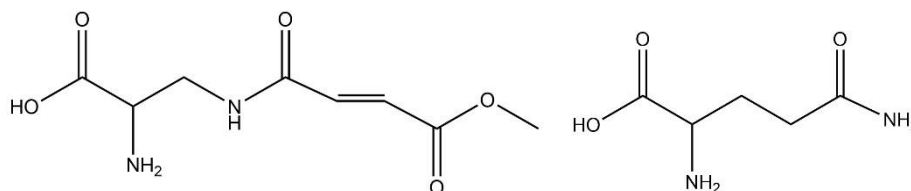
Tetaina (inna nazwa: bacylizyna) jest produkowana przez *Bacillus subtilis* (Kenig i Abraham, 1976) oraz *Bacillus pumilus* (Borowski, 1952). Zsyntezowane dotychczas pochodne tetainy okazały się mniej aktywne niż wyjściowy związek. Tetaina ma szerokie spektrum działania obejmujące bakterie gram-dodatnie i gram-ujemne, a także grzyby z gatunku *C. albicans* (Kenig i Abraham, 1976; Milewski i in. 1983).

Kolejnym związkiem hamującym aktywność syntazy GlcN-6-P jest N-końcowy aminokwas antybiotyku N³-fumaramoilo-L-2,3-diaminopropanylo-L-alaniny, Lindenbein (A 19006, rys. 8), kwas N³-fumaramoilo-L-ε-2,3-diaminopropanowy (FCDP). Uwolniony z koniugatu FCDP działa analogicznie do opisaney wyżej antykapsyny, jest silnym inhibitorem syntazy GlcN-6-P. Lindenbein został wyizolowany z hodowli *Streptomyces collinus* A 19006 (Molloy i in. 1972).



Rys. 8 Wzór strukturalny dipeptydu Lindenbein (A 19006).

W efekcie wieloletnich badań w Katedrze Technologii Leków i Biochemii WCH PG w oparciu o strukturę związku Lindenbein zsyntezowano szereg analogów L-glutminy będących skutecznymi inhibitorami syntazy GlcN-6-P. Najwyższą aktywnością odznaczał się kwas *N*³-(4-metoksyfumarolilo)-L-2,3-diaminopropanowy (FMDP), którego strukturę przedstawiono na rys. 9 (Andruszkiewicz i in. 1987; Milewski i in. 1991a). Z uwagi na strukturalne podobieństwo do L-glutminy, FMDP jest kompetytywnym inhibitorem syntazy GlcN-6-P (rys. 9, po prawej).



Rys. 9 Wzory strukturalne: FMDP (po lewej), L-glutminy (po prawej).

FMDP i jego pochodne takie jak BADP inaktywują syntazę GlcN-6-P, natomiast w niewielkim stopniu hamują wzrost komórek grzybowych *in vitro* co jest spowodowane utrudnionym transportem cząsteczki inhibitora przez błonę komórkową (Andruszkiewicz i in. 1987). Aby rozwiązać ten problem zostały zaproponowane dwie strategie.

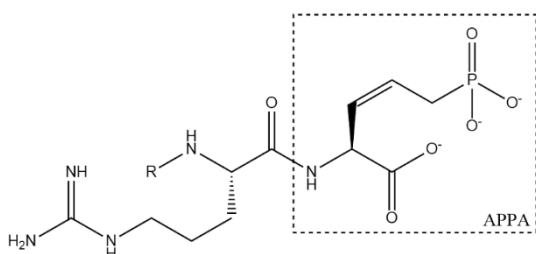
Pierwsza strategia polegała na wykorzystaniu systemów transportu peptydów i włączeniu cząsteczki inhibitora, FMDP do struktury oligopeptydu. Strategia była zgodna z koncepcją peptydowego nośnika inhibitora enzymatycznego (koncepcja konia trojańskiego), opisaną w jednym z poprzednich podrozdziałów (podr. 2.4.2.4). Zaprojektowane i otrzymane di- i oligopeptydy wykazywały wysoką aktywność przeciwgrzybową, szczególnie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP (Andruszkiewicz i in. 1987; Andruszkiewicz i in. 1990).

Druga strategia zakładała zaprojektowanie pochodnych FMDP, które byłyby transportowane na drodze dyfuzji do wnętrza komórek grzybowych. Zgódka i współpracownicy otrzymali amidowe i estrowe pochodne FMDP (Zgódka i in. 2001a; Zgódka i in. 2001b). Większość pochodnych charakteryzowała się wyższymi niż wyjściowy związek wartościami IC_{50} (Zgódka i in. 2001a). Zaobserwowano, że najaktywniejszy z nich, ester acetoksymetylowy FMDP, oprócz dobrej zdolności do inhibicji syntazy GlcN-6-P (IC_{50} zbliżone do IC_{50} FMDP), był transportowany do komórek grzybowych na drodze dyfuzji trzykrotnie szybciej niż FMDP, a także posiadał lepszą aktywność przeciwgrzybową *in vitro* wobec *C. albicans* (Zgódka i in. 2001b).

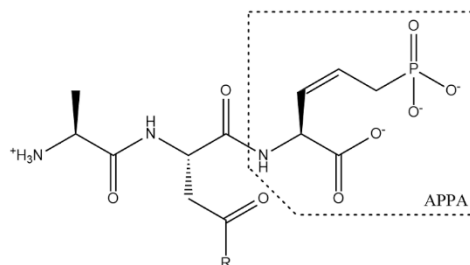
2.8.2 APPA – inhibitor syntazy treoninowej

Ryzoktyny (*ang. Rhizotricines*) należą do grupy fosfonowych antybiotyków o strukturze dipeptydów (rys. 10). Zostały wyizolowane z hodowli *Bacillus subtilis* ATCC 6633, charakteryzując się aktywnością przeciwgrzybową opartą o nieodwracalną inhibicję syntazy treoninowej (Laber i in. 1994; Rapp i in. 1988b). Za inhibicję enzymu odpowiada kwas (Z)-L-2-amino-5-fosfono-3-pentenowy (APPA), który zostaje uwolniony ze struktury antybiotyku dzięki aktywności wewnątrzkomórkowych peptydaz (Kugler i in. 1990; Laber i in. 1994). Opisany mechanizm jest zgodny z założeniami koncepcji konia trojańskiego.

APPA jest również C-końcowym aminokwasem innej grupy antybiotyków, tripeptydów, plumbemycyn (*ang. plumbemycins*, np. plumbemycyna A i B, rys. 11) produkowanych przez *Streptomyces plumbeus*. Ich mechanizm działania jest podobny do ryzoktyn, z uwagi na obecność w strukturze APPA, ale wykazują działanie przeciwbakteryjne (Park i in. 1977a; Park i in. 1977b).



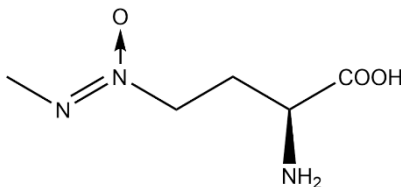
Rys. 10 Wzory strukturalne ryzoktyny A (R=H), B (R=Val), C (R=Ile) i D (R=Leu).



Rys. 11 Wzory strukturalne plumbemycyn A (R=OH) i B (R=NH₂).

2.8.3 Azoksybacylina – inhibitor enzymów szklaku biosyntezy metioniny

Azobacylina została wyizolowana z hodowli *Bacillus cereus* i posiada aktywność przeciwgrzybową skierowaną wobec grzybów z rodzaju *Absidia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Microsporium* i *Trichophyton*. Co więcej azoksybacylina wykazuje aktywność przeciwko szczepom z gatunku *C. albicans* opornym na znane związki przeciwgrzybowe (5-fluorocytozyna, ketokonazol, flukonazol) (Aoki i in. 1994). Struktura azoksybacyliny została przedstawiona poniżej (Rys. 12).



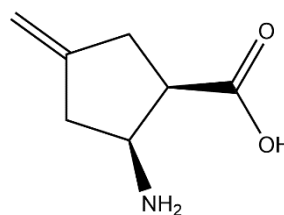
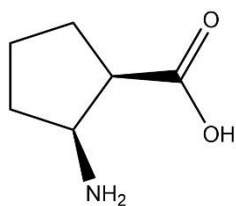
Rys. 12 Wzór strukturalny azoksybacyliny.

Azoksybacilina ogranicza działanie szlaku asymilacji jonów siarczynowych, poprzez hamowanie indukcji reduktazy SO_3^- , co zostało stwierdzone dzięki badaniom stopnia wbudowywania $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-SO}_4$ w struktury białek (Aoki i in. 1995; Aoki i in. 1996).

Azoksybacilina jest pobierana do komórek grzybowych na drodze transportu aktywnego specyficznego dla metioniny (Aoki i in. 1995). Z uwagi na to, że odnotowana obserwacja jest podstawą oporności grupa Aoki zaproponowała szereg pochodnych, estrów, które mimo zachowanej aktywności przeciwgrzybowej, nie są substratami permeaz aminokwasowych dedykowanych dla metioniny (Aoki i in. 1995).

2.8.4 Cispentacyna – inhibitor syntazy Ile-tRNA^{Ile}

Cispentacyna (BU-3201, BMY-28795) została wyizolowana z hodowli *Bacillus cereus* L450-B2. Związek jest cykliczną pochodną β -aminokwasu (Rys. 13) i charakteryzuje się aktywnością skierowaną przeciwko grzybom z gatunku *C. albicans* zarówno *in vitro* (wartości MIC w zakresie 6,3 – 50 $\mu\text{g/mL}$) jak i *in vivo* (infekcje płuc i narządów płciowych myszy), nie wywołując przy tym cytotoksyczności w badanym zakresie stężeń (Konishi i in. 1989; Oki i in. 1989).



Rys. 13 Wzór strukturalny cispentacyny. Rys. 14 Wzór strukturalny ikofungipenu.

Cispentacyna dostaje się do komórek grzybowych dzięki obecnym w błonie komórkowej permeazom aminokwasowym, na drodze procesu zależnego od energii. Dzięki badaniu aktywności cispentacyny w obecności L-Pro i L-Leu i zaobserwowaniu braku transportu cispentacyny w obecności tych aminokwasów udowodniono, że związek ten może być przenoszony przez permeazy specyficzne L-Pro i L-Leu. Grupa Capobianco i współpracowników zaproponowała, że mechanizm działania cispentacyny może być oparty na kilku celach molekularnych (Capobianco i in. 1993). Przyjmuje się, że cispentacyna i jej pochodne są inhibitorami syntazy Ile-tRNA^{Ile} (EC 6.3.4.19), co skutkuje zahamowaniem syntezy białek w konsekwencji prowadząc do śmierci komórek grzybowych (Espinel-Ingroff, 2009; Ziegelbauer i in. 1998).

Co ciekawe, grupa Wakiecia i współpracowników zaobserwowała zmniejszoną wrażliwość szczepów MDR *C. albicans* Gu5 i B4 w porównaniu do wyjściowych szczepów, co wskazuje na

to, że cispentacyna jest substratem dla pomp warunkujących wielolekooporność (Wakieć i in. 2008).

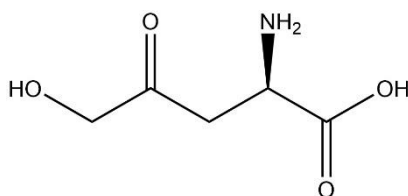
Do grupy analogów cispentacyny należy ikofungipen (BAY 10-8888, PLD-118, rys. 14), który podobnie jak cispentacyna, wykazuje dobre działanie przeciwgrzybowe nie tylko *in vitro*, ale również w leczeniu kandydoz w warunkach *in vivo* (Ziegelbauer i in. 1998; Petraitiene i in. 2005). Co więcej aktywność związku *in vivo* jest dużo wyższa niż w warunkach *in vitro* (Hasenoehrl i in. 2006). Działanie przeciwgrzybowe tego związku opiera się tak jak cispentacyny na hamowaniu aktywności syntazy Ile-tRNA^{Ile} (Ile-tRNA^{Ile}), a otrzymane wartości MIC są zbliżone, w zakresie 4 – 32 µg/mL (Hasenoehrl i in. 2006; Petraitiene i in. 2005). Ikofungipen znajduje się w drugiej fazie badań klinicznych (Hasenoehrl i in. 2006).

2.8.5 *m-FPhe*

Kingsbury i współpracownicy wykorzystali koncepcję nośnika peptydowego w badaniach nad di- i tripeptydami zawierającymi w swojej strukturze D-*m*-fluorofenyloalaninę i L-*m*-fluorofenyloalaninę. Koniugaty z pochodną o konfiguracji L wykazały aktywność przeciwgrzybową wobec *C. albicans* na poziomie 0,5 do 63 µg/mL (w zależności od testowanego szczepu i wybranego nośnika peptydowego). Najniższe wartości MIC otrzymano dla tripeptydu L-*m*-FPhe-L-Ala-L-Ala. Wolna pochodna L-*m*-FPhe, jak również koniugaty zawierające pochodną o formie D, nie wykazały aktywności w badanym zakresie stężeń (do 250 µg/mL). Uzyskana wysoka wartość MIC prawdopodobnie wiąże się ze stereospecyficnością permeaz peptydowych, nieefektywnym rozczepieniem koniugatów wewnątrz komórki i w konsekwencji brakiem uwolnionej prawidłowej formy aktywnego związku (Kingsbury i in. 1983).

2.8.6 RI-331 – inhibitor dehydrogenazy homoserynowej

Związek znany z literatury jako antybiotyk RI-331 (kwas (S)-2-amino-5-hydroksy-4-oksopentanowy, rys. 15) został wyizolowany z hodowli *Streptomyces* spp. (Yamaguchi i in. 1988).



Rys. 15 Wzór strukturalny RI-331.

Yamaguchi i współpracownicy wykazali aktywność przeciwgrzybową RI-331 wobec *C. kefir* (6.25-12.5 µg/mL), *C. glabrata* (50-100 µg/mL), *C. albicans* (100-400 µg/mL, >400

$\mu\text{g/mL}$), *C. tropicalis* (25 $\mu\text{g/mL}$, >400 $\mu\text{g/mL}$), natomiast brak efektu grzybobójczego wobec *C. parapsilosis* (>400 $\mu\text{g/mL}$) (Yamaguchi i in. 1988).

Badacze zaobserwowali również duży wpływ tego związku (15 $\mu\text{g/mL}$) na biosyntezę treoniny, metioniny i izoleucyny i mniejszy wpływ na produkcję histydyny i proliny w komórkach *S. cerevisiae*. Dodatek tych aminokwasów niwelował wpływ RI-331 na wzrost komórek grzybowych. Największy efekt został uzyskany w przypadku obecności homoseryny w podłożu hodowlanym, co pozwoliło na wysunięcie wniosku o inhibicji enzymu, dla którego substratem jest ten aminokwas. RI-331 jest analogiem L-homoseryny i prowadzi do inhibicji dehydrogenazy homoserynowej katalizującej jeden z etapów szlaku biosyntezy aminokwasów (Yamaguchi i in. 1990). Dzięki takiemu mechanizmowi działania RI-331 pozostaje nietoksyczny wobec komórek ssaczy i efektywnie leczy kandydozę wywołaną u myszy (Yamaguchi i in. 1988).

Jako analog aminokwasu, RI-331 może zostać wykorzystany do konstrukcji, zgodnie z koncepcją konia trojańskiego, oligopeptydów o potencjalnie wyższej aktywności przeciwgrzybowej niż wyjściowy antybiotyk.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1 Szczepy drobnoustrojów

W badaniach wykorzystano szczepy referencyjne drożdżaków z rodzaju *Candida*, szereg mutantów szczepu *C. albicans* SC5314 z usuniętymi poszczególnymi genami oraz grupami genów permeaz peptydowych (Reuß i Morschhäuser, 2006), a także wielolekooporne szczepy kliniczne *C. albicans* B4, Gu5 i ich szczepy wyjściowe B3 i Gu4 (Franz i in. 1998; Franz i in. 1999). Szczepy kliniczne zostały wyizolowane odpowiednio na początku terapii – fenotypy wrażliwe (Gu4, B3) oraz na końcu terapii flukonazolem – fenotypy odporne (Gu5, B4). Oporność szczepu Gu5 jest spowodowana nadekspresją pomp wielolekowych należących do rodziny ABC, CDR1p i CDR2p, a oporność szczepu B4 nadekspresją pompy z rodziny MFS, MDR1p (Franz i in. 1998; Franz i in. 1999). Wykorzystane szczepy przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2 Szczepy referencyjne, mutanty delecyjne i szczepy kliniczne wykorzystane w badaniach.

Nazwa	Genotyp	Źródło pochodzenia	Literatura
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Szczep dziki	ATCC, izolat kliniczny	-
<i>C. krusei</i> DSM 6128	Szczep dziki	DSM, izolat kliniczny	-
<i>C. glabrata</i> DSM 11226	Szczep dziki	DSM, izolat kliniczny	-
<i>C. parapsilosis</i> DSM 5784	Szczep dziki	DSM, izolat kliniczny	-
<i>C. albicans</i> SC5314	Szczep dziki	ATCC, izolat kliniczny	-
<i>C. albicans opt1Δ</i>	<i>opt1Δ</i>	mutant szczepu <i>C. albicans</i> SC5314	Reuß i Morschhäuser, 2006
<i>C. albicans opt2Δ opt3Δ</i>	<i>opt2Δ opt3Δ</i>		
<i>C. albicans opt4Δ</i>	<i>opt4Δ</i>		
<i>C. albicans opt5Δ</i>	<i>opt5Δ</i>		
<i>C. albicans opt6Δ</i>	<i>opt6Δ</i>		
<i>C. albicans opt7Δ</i>	<i>opt7Δ</i>		
<i>C. albicans opt8Δ</i>	<i>opt8Δ</i>		
<i>C. albicans opt1-opt5Δ</i>	<i>opt1Δ opt2Δ opt3Δ opt4Δ opt5Δ</i>		
<i>C. albicans ptr2Δ ptr22Δ</i>	<i>ptr2Δ ptr22Δ</i>		
<i>C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ</i>	<i>opt1Δ opt2Δ opt3Δ opt4Δ opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ</i>		
<i>C. albicans</i> B3	Szczep wyjściowy		
<i>C. albicans</i> B4	Nadekspresja MDR1p		
<i>C. albicans</i> Gu4	Szczep wyjściowy		
<i>C. albicans</i> Gu5	Nadekspresja CDR1p i CDR2p		

Mutanta pozbawionego pierwszych pięciu genów *OPT* (*opt1Δ*, *opt2Δ*, *opt3Δ*, *opt4Δ*, *opt5Δ*) oznaczono jako *opt1-opt5Δ*, natomiast mutanta pozbawionego wszystkich funkcjonalnych genów permeaz peptydowych *PTR* i *OPT* (*opt1Δ*, *opt2Δ*, *opt3Δ*, *opt4Δ*, *opt5Δ*, *ptr2Δ*, *ptr22Δ*) oznaczono jako *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*.

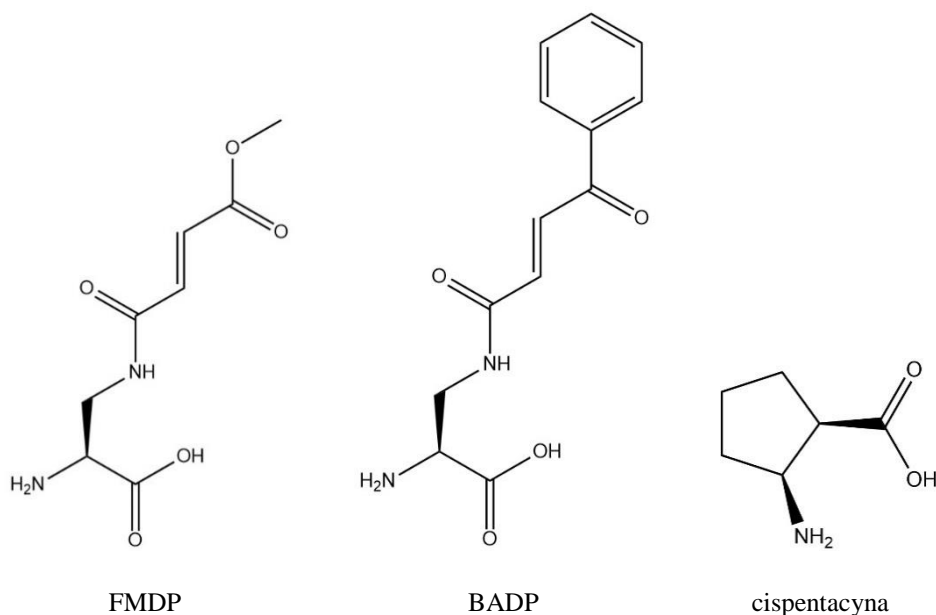
Kolekcję mutantów oraz szczepy kliniczne otrzymano dzięki uprzejmości prof. dr Joachima Morschhäusera (Uniwersytet w Würzburgu, Niemcy). Pozostałe szczepy znajdują się w kolekcji szczepów Katedry Technologii Leków i Biochemii WCH PG.

3.2 Badane związki – aminokwasy, peptydy i związki referencyjne

W badaniach wykorzystano szereg związków należących do jednej z wymienionych niżej grup:

- a) inhibitory enzymatyczne o strukturze aminokwasowej: FM DP, BADP, cispentacyna,
- b) oligopeptydy zawierające od 5 do 10 reszt aminokwasowych, opisywane w literaturze jako peptydy penetrujące: wolne peptydy: P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8 i ich modyfikacje - amidowane na C-końcu: P1N, P2N, P3N, P5N, P6N,
- c) di- lub tripeptydy zawierające jeden z inhibitorów enzymatycznych: Nva-FM DP, Lys-Nva-FM DP,
- d) koniugaty nośników peptydowych z inhibitorami enzymatycznymi (tab. 3, tab. 4):
 - koniugaty peptydów z FM DP na N-końcu: F1, F2, F3, F5, F6, F7, F8,
 - C-amidowane koniugaty peptydów z FM DP na N-końcu: F1N, F2N, F3N, F5N, F6N,
 - koniugaty pentapeptydu P1 i heksapeptydu P5 z BADP na N-końcu: B1, B5,
 - koniugaty heksapeptydu P5 z cispentacyną na N-końcu: wolny peptyd C5, z amidowanym C-końcem C5N i N-acylowanym N-końcem AC5.

FM DP i BADP są analogami L-glutaminy, inhibitorami syntazy GlcN-6-P (Milewski i in. 1988b; Milewski 2002), natomiast cispentacyna jest analogiem L-proliny, inhibitorem syntazy Ile-tRNA^{Ile}. Struktury tych związków przedstawiono na rys. 16.



Rys. 16 Struktury inhibitorów enzymatycznych: FMDP, BADP oraz cispentacyny.

Tab. 3 Charakterystyka peptydów P1-P8 i koniugatów tych peptydów z FMDP wykorzystanych w badaniach.

Oznaczenie	Sekwencja	Liczba aa	Ładunek	Masa molowa
P1	Val-Pro-Met-Leu-Lys	5	+1	587
F1	FMDP-Val-Pro-Met-Leu-Lys	5 + I	+1	785
P2	Lys-Leu-Pro-Val-Met	5	+1	587
F2	FMDP-Lys-Leu-Pro-Val-Met	5 + I	+1	785
P3	Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys	10	+4	1308
F3	FMDP-Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys	10 + I	+4	1506
P5	Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp	6	+3	950
F5	FMDP-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp	6 + I	+3	1148
P6	Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro	6	+1	677
F6	FMDP-Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro	6 + I	+1	875
P7	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	8	+8	1128
F7	FMDP-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	8 + I	+8	1326
P8	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys	9	+9	1172
F8	FMDP-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys	9 + I	+9	1370

Reszty aminokwasowe (aa) obdarzone ładunkiem oznaczono kolorem **czerwonym**. „I” oznacza inhibitor. Ładunek podano dla pH 7.0. Masę molową podano w jednostkach g/mol.

Tab. 4 Charakterystyka koniugatów peptydów P1 i P5 z BADP i cispentacyną.

Oznaczenie	Sekwencja	Liczba aa	Ładunek	Masa molowa
B1	BADP- Val-Pro-Met-Leu-Lys	5 + I	+1	831
B5	BADP-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp	6	+3	1194
C5	cispentacyna-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp	6 + I	+3	1061

Reszty aminokwasowe (aa) obdarzone ładunkiem oznaczono kolorem **czerwonym**. „I” oznacza inhibitor. Ładunek podano dla pH 7.0. Masę molową podano w jednostkach g/mol.

Pentapeptydy P1 i P2, opisane w literaturze jako tzw. „małe peptydy penetrujące” (*ang. small penetrating peptides*), posiadają identyczny skład aminokwasowy, jednak różnią się kolejnością aminokwasów w sekwencji. Charakteryzują się wysokim stopniem penetracji komórek HeLa (odpowiednio $97 \pm 4,3\%$ i $100 \pm 2,3\%$) i bardzo niską cytotoksycznością w stężeniu do 1 mM (Gomez i in. 2007; Gomez i in. 2010). Wersje P1 i P2 z amidowanym C-końcem oznaczono jako P1N i P2N.

Peptyd P3, oznaczony w literaturze skrótem KSL-W jest decapeptydem wykazującym aktywność przeciwko *C. albicans*, obniżając zjadliwość komórek w testach *in vivo* (Semlalia i in. 2011). Wykorzystano również wersję amidowaną na C-końcu – P3N.

Peptyd P5 posiada sekwencję aminokwasową odpowiadającą peptydowi penetrującemu PAF26 (Ac-D-Arg-D-Lys-D-Lys-D-Trp-D-Phe-D-Trp-NH₂, López-García i in. 2000), z tą różnicą, że składa się z L-aminokwasów oraz posiada wolny N- i C-koniec. Heksapeptyd PAF26 (PKF26) został zaprojektowany przez grupę López-García i współpracowników jako związek aktywny przeciwko fitopatogennym gatunkom grzybów m.in. *Neurospora crassa* i *Penicillium digitatum* (López-García i in. 2000; López-García i in. 2007; Muñoz i in. 2006). Peptyd PAF26 jest podobny do penetratyn, jednej z klas peptydów penetrujących, a jego mechanizm działania prowadzący do śmierci komórek grzybowych jest bardzo złożony (Muñoz i in. 2013). W badaniach wykorzystano również wersję peptydu P5 z amidowanym C-końcem (P5N).

Peptyd P6 jest przedstawicielem grupy peptydów penetrujących bogatych w prolinę (*ang. proline-rich CPP*), charakteryzuje się wydajną penetracją do komórek i brakiem cytotoksyczności (Pujals i Giralt, 2008). Dodatkowo zbadano wersję amidowaną na C-końcu – P6N.

Peptydy P7 i P8, o najwyższym wypadkowym ładunku dodatnim, zbudowane wyłącznie z aminokwasów zasadowych, należą do grupy klasycznych peptydów penetrujących, których penetracja błony cytoplazmatycznej przebiega według niewyjaśnionego dotąd mechanizmu. Grupa Futakiego sugeruje, że jest to mechanizm niezależny od energii natomiast grupa Mitchella wręcz przeciwnie – zebrała wyniki wskazujące na zależność transportu polipeptydów od energii (Futaki i in. 2001; Mitchell i in. 2000).

Sekwencje aminokwasowe, wypadkowy ładunek i masy molowe peptydów P1-P8 i ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi przedstawiono w tab. 3 i tab. 4.

Wszystkie zestawione w tabelach związki zostały zsyntezowane przez mgr inż. Marcina Kawczyńskiego (Katedra Chemii Organicznej, WCH PG). Peptydy Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP zostały otrzymane przez prof. dr hab. inż. Ryszarda Andruszkiewicza (Katedra Technologii Leków i Biochemii, WCH PG).

W badaniach dotyczących wyznaczenia początkowej prędkości transportu peptydów do wnętrza komórek grzybowych stosowano peptydy modelowe Ala-Ala, Ala-Ala-Ala i Ala-Ala-Ala-Ala, które zostały zsyntezowane przez firmę *lipopharm.pl*.

W badaniach wykorzystywano również pochodne peptydów i koniugatów znakowane izocyjanianem fluoresceiny, oznaczane jako P5-FITC i F5-FITC. Procedura otrzymania fluorescencyjnych pochodnych została opisana w podrozdziale 3.12.

W niektórych badaniach wykorzystywano amfoterycynę B i flukonazol jako związki referencyjne.

3.3 Inne stosowane odczynniki

BTL, Zakład Enzymów i Peptydów: agar mikrobiologiczny, chlorek sodu, ekstrakt drożdżowy, glukoza bezwodna, pepton kazeinowy

Fluka: Triton X-100

Polskie Odczynniki Chemiczne: azydek sodu, fosforan potasowy I zas., fosforan potasowy II zas., fosforan sodowy I zas., fosforan sodowy II zas., tetraboran sodu

Sigma Aldrich: 3MPA, amfoterycyna B, amiloryd, Calcofluor White M2R, chlorpromazyna, cytochalazyna D, czerwień fenolowa, DMSO, drop-out, FITC, flukonazol, glutaminian sodu, glutation, MOPS, nokodazol, OPA, RPMI-1640 (z L-glutaminą, bez węglanu sodu), TCA, TNBS, Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement w/o Uracil, YNB bez aminokwasów i siarczanu amonu, YNB bez aminokwasów (z siarczanem amonu).

3.4 Sprzęt i materiały laboratoryjne

Aparatura:

- cytometr przepływowy, Calibur, *Becton-Dickinson*
- czytnik mikroplitek, *Victor³V*, *PerkinElmer*
- komora laminarna, *Hcal Force*
- licznik komórek Z1 Coulter[®] Partical Counter, *Beckman Coulter*
- liofilizator, *Labconco*
- MALDI MS - ABI Sciex 5800 TOF/ TOF System with LC-MALDI, *MDS Analytical Technologies*
- mikroskop fluorescencyjny, *Olympus BX60 U-DICT* z kamera *DP50*
- pH-metr, *Elmetron*
- pipety automatyczne, *Eppendorf*
- spektrofotometr, *ThermoSpectronic*, *Genesys 20*
- waga analityczna, *Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Gdańsk*
- waga laboratoryjna, *Radwag*

- wirówka, *Sigma, Polygen*
- wytrząsarka, *Infors*
- zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej *Agilent 1200 Series* sprzężony z detektorem z matrycą fotodiodową (DAD) i detektorem fluorescencyjnym (FLD).

Materiały jednorazowego użytku:

- krążki bibułkowe, jałowe, czyste, *Oxoid*
- filtry membranowe do sterylizacji, PES, 0,2 µm, *Cronus*
- filtry z włókna szklanego, *GF, Whatman LTD.*
- mikropłytki z tworzywa sztucznego, sterylne, 96-studzienkowe, *Medlab*
- płytki Petriego, sterylne, *Medlab*

3.5 Podłoża stosowane w hodowli

W badaniach wykorzystano podłoża płynne i stałe, których skład i sposób przygotowania zestawiono poniżej.

Podłoże YPG

- | | |
|----------------------|--------|
| – glukoza | 20 g/L |
| – ekstrakt drożdżowy | 10 g/L |
| – pepton | 10 g/L |

Składniki rozpuszczano w wodzie destylowanej, a następnie poddano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 atmosfery przez 30 minut.

W celu otrzymania podłoża stałego dodawano agaru mikrobiologicznego (25 g/L).

Podłoże YNB z glutaminianem sodu (YNB-GS), pH 5.4 ± 0.2

- | | |
|---|---------|
| – glukoza | 20 g/L |
| – YNB bez aminokwasów i siarczanu amonu | 1,7 g/L |
| – L-glutaminian sodu | 0,2 g/L |

Podłoże YNB z siarczanem amonu (YNB-SA), pH 5.4 ± 0.2

- | | |
|---|---------|
| – glukoza | 20 g/L |
| – YNB bez aminokwasów, z siarczanem amonu | 6,7 g/L |

Podłoże RPMI-1640 pH 7.0

- | | |
|---|----------|
| – glukoza | 18 g/L |
| – RPMI-1640 bez wodorowęglanu sodu, z L-glutaminą | 10,4 g/L |
| – MOPS | 34,5 g/L |

Składniki rozpuszczano w wodzie destylowanej, w przypadku podłoża RPMI-1640 ustalano pH 7.0 za pomocą 10 mM roztworu NaOH, a następnie sterylnie przepuszczano przez filtr membranowy do jałowej butli.

W celu sporządzenia minimalnego podłoża YNB-SA z agarem (2%) do 80 mL jałowego roztworu glukozy z dodatkiem agaru dodano 20 mL roztworu YNB bez aminokwasów, z siarczanem amonu w ilości jak wyżej tak by skład podłoża odpowiadał płynnemu podłożu minimalnemu YNB-SA.

W procedurze oznaczania aktywności przeciwgrzybowej opisanej w następnym podrozdziale (podrozdział 3.6) dodatkowo wykorzystano zmodyfikowane podłoża: YNB-SA z dodatkiem czerwieni fenolowej (0,0053 g/L)/glutationu (0,001 g/L)/chlorku sodu (6 g/L). Wymienione dodatki, w tych samych ilościach, są składnikami podłoża RPMI-1640. Podłoże YNB zmodyfikowano również poprzez dodatek L-argininy (0,2 g/L)/L-glutaminy (0,3 g/L)/drop-out. Wyznaczono również wartości MIC w podłożu RPMI-1640 bez dodatku buforu MOPS. Wykorzystano również podłoża o różnych wartościach pH: RPMI-1640 o pH 5.0, 5.5 i 6.0, a także YNB-SA o pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 i 6.5.

3.6 Oznaczanie aktywności przeciwgrzybowej *in vitro*

Aktywność przeciwgrzybową peptydów, peptydów-FMDP i ich pochodnych, a także związków kontrolnych określano poprzez wyznaczenie najmniejszego stężenia związku powodującego zahamowanie wzrostu komórek grzybowych w 50% i 80%, odpowiednio MIC₅₀ i MIC₈₀, metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń rekomendowaną przez Instytut ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (CLSI 2002; CLSI 2008; pod nazwą NCCLS do roku 2005), zachowując przy wszystkich oznaczenia opisane w procedurze warunki (wielkość *inoculum*, czas i temperatura inkubacji). Badanie prowadzono w sterylnych 96-studzienkowych mikroplątkach w trzech płynnych podłożach: RPMI-1640, YNB-SA i YNB-GS. W niektórych oznaczeniach stosowano zmodyfikowane podłoża, tak, jak zostało to opisane w poprzednim podrozdziale (podrozdział 3.5).

Po całonocnej hodowli (16-18h) na podłożu stałym YPG (YNB-SA w przypadku mutantów spontanicznych) komórki badanego szczepu zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Po ustawieniu gęstości optycznej zawiesiny OD₆₆₀ na poziomie około 0,1 (co odpowiada 10⁶ komórek w 1 mL zawiesiny), *inoculum* rozcieńczano 50-krotnie, aby uzyskać gęstość komórek wynoszącą 2 x 10⁴ komórek w 1 mL zawiesiny.

Roztwory badanych związków przygotowywano w dwukrotnie stężonych podłożach (2×). Do studzienek pierwszego rzędu mikroplątki dodawano 200 μL przygotowanych roztworów związków, a do studzienek rzędów 2-10 po 100 μL odpowiednich podłoży (2×). Po wykonaniu seryjnych rozcieńczeń, do studzienek 1-10 dodawano po 100 μL uprzednio przygotowanej

zawiesiny komórek. Studzienka 11, do której dodano 100 μL podłoża i 100 μL *inoculum*, stanowiła kontrolę hodowli. Studzienka 12 natomiast, do której dodano 100 μL podłoża i 100 μL sterylnej wody destylowanej, stanowiła kontrolę podłoża. Po dodaniu 100 μL *inoculum* (przygotowanego w wodzie destylowanej) lub wody destylowanej uzyskiwano we wszystkich studzienkach właściwe stężenie składników pożywki. Końcowa gęstość zawiesiny komórek we wszystkich studzienkach kolumn 1-11 wynosiła $10^4/\text{mL}$.

Przedziały stężeń badanych związków zostały dobrane odpowiednio do testowanego szczepu, użytego podłoża, a także zakresów stężeń innych związków w przypadku badań porównawczych.

W badaniach dotyczących wpływu obecności badanego związku (np. *N*-acetylo-D-glukozaminy, inhibitora endocytozy) na zjawisko hamowania wzrostu wywołanego przez peptydy, dany związek dodawany był do wyjściowego podłoża w odpowiednim stężeniu, tak aby uzyskać pożądane stężenie końcowe. Dla inhibitorów endocytozy przyjęto wartości stężeń opisanych w literaturze przez Gomeza i współpracowników: amiloryd: 5 μM , chlorpromazyna: 28 μM , cytochalazyna D: 10 μM , nokodazol: 2 μM (Gomez i in. 2010). Natomiast w przypadku *N*-acetylo-D-glukozaminy (NAG), oznaczenia przeprowadzono z drobnymi modyfikacjami: seryjne rozcieńczenia związków przygotowano w 20 mM wodnym roztworze NAG, a *inoculum* rozcieńczano 50-krotnie w dwukrotnie stężonym podłożu YNB-SA uzyskując końcowe stężenie NAG wynoszące 10 mM.

Płytki inkubowano w temperaturze 30°C. Po 24 h, za pomocą czytnika mikroplatek *Victor³V*, mierzono gęstość optyczną we wszystkich studzienkach przy długości fali $\lambda = 531 \text{ nm}$. Od otrzymanych wartości absorbancji odejmowano wartość absorbancji odpowiadającą kontroli pożywki. Za MIC_{50} oraz MIC_{80} przyjmowano najniższe stężenie związku powodujące odpowiednio 50% i 80% spadek wartości absorbancji w stosunku do kontroli hodowli (wartość absorbancji mniejszą lub równą odpowiednio 50% i 20% wartości absorbancji kontroli hodowli). Jeśli była taka potrzeba, dodatkowo wyznaczano wartości IC_{50} , czyli stężenia danego związku prowadzące do zahamowania wzrostu drobnoustrojów w 50% w porównaniu do kontroli hodowli, na podstawie krzywej $A_{531} = f(c)$. Badania wykonywano przynajmniej w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.7 Określenie wpływu związków na morfologię komórek grzybowych

Badania wpływu obecności peptydów na morfologię komórek *C. albicans* polegały na prowadzeniu równoległych hodowli w obecności związku w odpowiednim podłożu minimalnym – YNB-SA lub YNB-GS – i mikroskopowej obserwacji morfologii komórek.

W tym celu hodowlę nocną (16-18 h) komórek wybranego szczepu *C. albicans* (ATCC 10231, SC5314, *ptr2Δ ptr22Δ*, *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*) w podłożu YPG odświeżano poprzez

rozcieńczenie hodowli w podłożu YPG do gęstości optycznej zawiesiny odpowiadającej 10^6 kom./mL ($OD_{660}=0,1$) i inkubację zawiesiny przez ok. 3 h w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po uzyskaniu przez komórki logarytmicznej fazy wzrostu (gęstość optyczna OD_{660} ok. 0,4), komórki trzykrotnie przemywano jałową wodą destylowaną i ustawiano $OD_{660}=0,1$ w odpowiednim podłożu, YNB-SA lub YNB-GS. Następnie dodawano badany peptyd, Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP tak, by uzyskać stężenie końcowe peptydu w zawiesinie odpowiadające $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

Tak przygotowane próby inkubowano przez 5 h. Do probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 mL przenoszono po 1 mL zawiesiny. Całość odwirowywano (3 min, 5 tys. rpm, 25°C), a następnie usuwano 900 μL supernatantu, i uzupełniano do 1 mL roztworem PBS. Płukanie powtarzano trzykrotnie. Do 100 μL pozostałej zawiesiny dodawano 10 μL roztworu barwnika fluorescencyjnego, Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28) o stężeniu 1,1 mg/mL i dokładnie mieszano (stężenie końcowe barwnika wyniosło $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$). Tak przygotowaną zawiesinę komórek z barwnikiem inkubowano w temp. pokojowej. Po upływie 15 min dodawano 890 μL wody destylowanej i zawiesinę odwirowano (3 min, 5 tys. rpm, 25°C). Następnie usuwano 900 μL supernatantu, i całość uzupełniano do 1 mL roztworem PBS. Czynności te powtarzano pięciokrotnie w celu dokładnego wymycia nadmiaru barwnika. Po ostatnim wirowaniu usuwano 950 μL supernatantu. Przygotowując preparat do badań mikroskopowych dodawano na szkiełko podstawowe 5 μL zawiesiny komórek i nakrywano szkiełkiem nakrywkowym. Czynności wykonywano w ciemnym pomieszczeniu z uwagi na wrażliwość barwnika na światło. Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, przy powiększeniach $60\times$ i $100\times$ z dodatkiem olejku immersyjnego, przy długości światła wzbudzenia $\lambda = 365\ \text{nm}$.

3.8 Generowanie potencjalnych mutantów spontanicznych, opornych na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP

W celu uzyskania mutantów spontanicznych opornych na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP komórki szczepu *C. albicans* SC5314 po nocnej hodowli (16-18 h) na podłożu stałym YPG zawieszano w jałowej wodzie destylowanej uzyskując zawiesinę o gęstości optycznej OD_{660} na poziomie około 0,1 (co odpowiada $\sim 10^6$ komórek w 1 mL zawiesiny). Następnie wykonywano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia. 100 μL zawiesiny komórek odpowiadającej rozcieńczeniu 10^{-2} (o gęstości 10^4 kom./mL) wysiewano powierzchniowo na stałe podłoże YNB-SA. Po wykonaniu posiewu na powierzchnię podłoża agarowego nałożono jałowe krążki bibułkowe, a następnie na każdy krążek наносzono po 10 μL odpowiednich roztworów Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP, o stężeniu 1 mg/mL (10 μg związku/krążek). Izolacji potencjalnych mutantów dokonywano również poprzez powierzchniowy posiew zawiesiny na podłoże agarowe YNB-SA zawierające Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP w stężeniu $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$. Po 48 h inkubacji

hodowli w temp. 30°C uzyskane pojedyncze kolonie (wewnątrz strefy zahamowania wzrostu lub na powierzchni podłoża agarowego) pobierano za pomocą ezy i przesiewano na płytkę z podłożem YNB-SA zawierającym Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP w stężeniu 10 µg/mL. Pasażowanie na podłoże z odpowiednim związkiem wykonywano trzykrotnie. Ostatecznie izolowano po sto potencjalnych mutantów spontanicznych opornych na badany peptyd.

Dla każdego wyizolowanego „mutanta” określano jego wrażliwość na działanie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP. W tym celu wyznaczano wartości MIC zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.6.

Dla wszystkich wyizolowanych „mutantów” wykazujących znacząco obniżoną wrażliwość na działanie peptydów-FMDP przeprowadzano dalszą charakterystykę, która obejmowała określenie wrażliwości mutantów spontanicznych na badane związki przeciwgrzybowe Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP w różnych podłożach: RPMI-1640, YNB-SA i YNB-GS, a także wyznaczenie początkowej szybkości pobierania przez komórki peptydów-FMDP i peptydów modelowych, Ala-Ala, Ala-Ala-Ala i Ala-Ala-Ala-Ala.

3.9 Ocena możliwości indukowania mutacji spontanicznych wywoływanych przez koniugaty FMDP-CPP

W celu sprawdzenia czy działanie koniugatów FMDP-CPP prowadzi do powstawania oporności komórek grzybowych, 100 µL zawiesiny komórek szczepu *C. albicans* ATCC 10231 o gęstości 10⁴ kom./mL wysiewano powierzchniowo na stałe podłoże YNB-SA. Po wykonaniu posiewu na powierzchnię agaru nakładano jałowe krążki bibułkowe, a następnie na każdy krążek наносzono po 10 µL roztworów badanych CPP i FMDP-CPP. Zastosowane stężenia roztworu peptydów wynosiły 1 mg/mL (10 µg związku/krążek) i 4 mg/mL (40 µg związku/krążek). Jako związek referencyjny użyto Nva-FMDP (1 mg/mL, 10 µg związku/krążek). Po 48 h inkubacji w temp. 30°C mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu oraz określano czy pojawiły się kolonie w strefie zahamowania wzrostu utworzonej wokół krążków.

3.10 Określenie właściwości hemolitycznych CPP i FMDP-CPP

Badania właściwości hemolitycznych opierało się na wyznaczeniu EH₅₀, czyli wartości stężenia przy którym zostaje uwolnione 50% hemoglobiny z erytrocytów.

W celu przeprowadzenia badania przygotowywano zawiesinę erytrocytów w soli fizjologicznej (0,9% NaCl) o gęstości około 2 x 10⁷ kom./mL. Gęstość zawiesiny określano za pomocą licznika komórek Coulter. Do probówek typu Eppendorf zawierających po 950 µL zawiesiny erytrocytów dodawano 50 µL wodnych roztworów badanych związków - uzyskując końcowe stężenie od 25 µg/mL do 200 µg/mL, roztworu AmB w DMSO - uzyskując końcowe stężenie od 0,5 µg/mL do 10 µg/mL, wody destylowanej (kontrola negatywna) lub roztworu Tritonu X-100 - uzyskując końcowe stężenie 0,1% obj. (kontrola pozytywna). Tak przygotowane

próby inkubowano w temp. 37°C. Po upływie 30 min zawiesiny odwirowywano (2800 rpm, 5 min, 4°C) i nanoszono po 100 µL supernatantu do kolejnych celek płytki 96-cio studzienkowej, a następnie dokonywano pomiaru absorpcji przy pomocy czytnika mikropłytek *Victor³V* przy długości fali $\lambda = 540$ nm.

W badaniu jako związek kontrolny zastosowano amfoterycynę B (AmB, zakres stężeń: 0,5 µg/mL ÷ 10 µg/mL), jako kontrolę pozytywną użyto roztworu Tritonu X-100 wywołującego 100% hemolizę. Kontrolę negatywną stanowiła zawiesina erytrocytów bez dodatku związku czy Tritonu X-100. Z uwagi na zastosowanie roztworu AmB w DMSO przygotowano również próbę zawierającą 50 µL DMSO. Przyjmując wartość absorbancji próby z Tritonem X-100 jako 100% hemolizy wyznaczono wartości EH_{50} dla badanych związków oraz związku kontrolnego, AmB.

3.11 Wyznaczanie początkowej szybkości transportu peptydów modelowych oraz koniugatów peptydów z FMDP, BADP i cispentacyną do komórek grzybowych

Początkową szybkość transportu peptydów modelowych wyznaczano zmodyfikowaną metodą opisaną wcześniej przez Milewskiego i współpracowników (Milewski i in. 1988a), która polega na oznaczaniu szybkości spadku stężenia peptydów w zawiesinie komórek w określonych odstępach czasu. Stężenia peptydów były oznaczane za pomocą odczynnika otrzymanego przez zmieszanie roztworu TNBS z roztworem tetraboranu sodu w odpowiednim stosunku. Odczyt wyników został zmodyfikowany z uwagi na brak filtra umożliwiającego pomiar absorpcji przy długości fali $\lambda = 420$ nm i dostępność filtra 405 nm w czytniku mikropłytek *Victor³V*. Dzięki zmniejszeniu skali i zastosowaniu mikropłytek można było dokonać szybkiego odczytu absorbancji przygotowanych roztworów w pomijalnie małych odstępach czasu. Oprócz kwestii technicznych istotny był również dobór podłoża.

Po próbach wyznaczania szybkości transportu peptydów po odmładzaniu komórek w podłożach YNB-GS i YNB-SA zdecydowano się na podłoże bogate YPG, które prawdopodobnie zapewnia pełną efektywność permeaz znajdujących się w błonie komórkowej. Z tego też powodu uzyskane wartości początkowej szybkości transportu są dużo wyższe niż uzyskane po prowadzeniu odmładzania w podłożach minimalnych, a co za tym idzie wyraźniejsze stają się różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami referencyjnymi i mutantami. Dlatego też, podłoże YPG zastosowano w przypadku szczepu *C. albicans* ATCC 10231, a także w przypadku porównywania szczepu *C. albicans* SC5314 i jego mutantów delecyjnych. W przypadku porównywania szczepu *C. albicans* SC5314 i jego mutantów spontanicznych zastosowano YNB-SA z uwagi na konieczność utrzymania zaobserwowanej cechy oporności na przeciwgrzybowe di- i tripeptydy. Dodatkowo, po etapie odmładzania i przemywania komórek szczepu dzikiego i mutantów spontanicznych „głodzono” komórki, co zostało dokładniej opisane niżej.

Całoczną hodowlę (16-18 h) komórek odświeżano w odpowiednim podłożu do gęstości optycznej zawiesiny, OD_{660} w przedziale $0,1 \div 0,15$. Hodowlę prowadzono w wytrząsarce (180 rpm), w temp. 30°C , do osiągnięcia OD_{660} ok. 3,0. Po upływie ok. 3 h zawiesinę odwirowywano (3 tys. rpm, 20°C , 5 min) i dwukrotnie przemywano 50 mM buforem fosforanowo-potasowym o pH 5.0. Po ostatnim wirowaniu komórki zawieszano 50 mM buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0 i inkubowano z wytrząsaniem (temp. 30°C , 180 rpm). Po 1 h inkubacji zawiesinę odwirowywano (3 tys. rpm, 20°C , 5 min) i zawieszano w 1% roztworze glukozy w 50 mM buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0 tak by uzyskać OD_{660} zbliżone do wartości 1,0 co odpowiada gęstości komórek około 10^7 kom./mL.

Do trzech kolbek o poj. 50 mL dodawano po 5 mL zawiesiny komórek w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0, a następnie inkubowano w ciepłarni w temp. 30°C z intensywnym wstrząsaniem (180 rpm). Po upływie 15 min, do kontroli hodowli dodawano 50 μL wody destylowanej, do próbki badanej 50 μL roztworu peptydu, a do kontroli transportu 50 μL roztworu azydki sodu o stężeniu 10 mM (końcowe stężenie NaN_3 wynosiło 100 μM).

W badaniu mającym na celu porównanie transportu związków P5, F5, C5 i Ala-Ala-Ala-Ala, końcowe stężenie peptydu wynosiło 50 μM (wyjściowy roztwór miał stężenie 5 mM), natomiast w badaniu mającym na celu porównanie transportu związków Ala-Ala, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Ala-Ala, a także Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP końcowe stężenie peptydu wynosiło 100 μM (wyjściowy roztwór miał stężenie 10 mM).

Zaraz po sporządzeniu powyższych mieszanin (czas 0) pobierano 1 mL i oddzielano komórki od przesączu za pomocą wymuszonej filtracji przez filtry Whatman GF/A z wykorzystaniem zestawu do filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem. W określonych odstępach czasu (punkty czasu w badaniu transportu peptydów modelowych, Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP: 5-25 min, co 5 min; punkty czasu w badaniu transportu CPP, FMDP-CPP i tetrapeptydu modelowego: 10 min, 30 min, 60 min) czynność powtarzano, prowadząc ciągłą inkubację zawiesin w 30°C z wytrząsaniem (180 rpm). W celu oznaczenia stężenia peptydów w przesączach przygotowano krzywą wzorcową.

Do 100 μL próbek uzyskanych przesączy oraz roztworów wzorcowych danego peptydu dodawano po 125 μL odczynnika sporządzonego przez zmieszanie roztworu TNBS (4 mg/mL) z 5% roztworem tetraboranu sodu w stosunku 1 : 4, a następnie inkubowano 30 min w temp. 37°C .

Po przeprowadzonej inkubacji mierzono absorpcję wszystkich próbek przy długości fali $\lambda = 405$ nm przy pomocy czytnika mikropłytek *Victor*³V. Korzystając z zależności absorbancji mieszanin od stężenia peptydu w wodzie (krzywa wzorcową) sporządzono wykresy

przedstawiające zmiany stężenia peptydu w przesączach w czasie inkubacji. Oznaczenia wykonywano przynajmniej w trzech, niezależnych powtórzeniach.

3.12 Otrzymywanie znakowanych fluorescencyjnie P5 i F5

Znakowanie wybranych peptydów, peptydu P5 i jego koniugatu z FMDP, F5 przeprowadzono według procedury opisanej przez firmę *Sigma Aldrich* z kilkoma modyfikacjami. Przed przystąpieniem do otrzymywania znakowanych związków w skali preparatywnej dokonano optymalizacji metody znakowania obejmującej wybór buforu, stężeń roztworów peptydów i FITC, a także proporcji zmieszanych roztworów peptydów i roztworu FITC.

Znakowanie peptydu P5 (Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp) przeprowadzono w buforze węglanowo-sodowym o pH 9.0, natomiast koniugatu peptydu P5 z FMDP na N-końcu, F5 (FMDP-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp) w buforze fosforanowo-sodowym o pH 7.4. Wyniki przeprowadzonych reakcji znakowania peptydów zostały opisane poniżej.

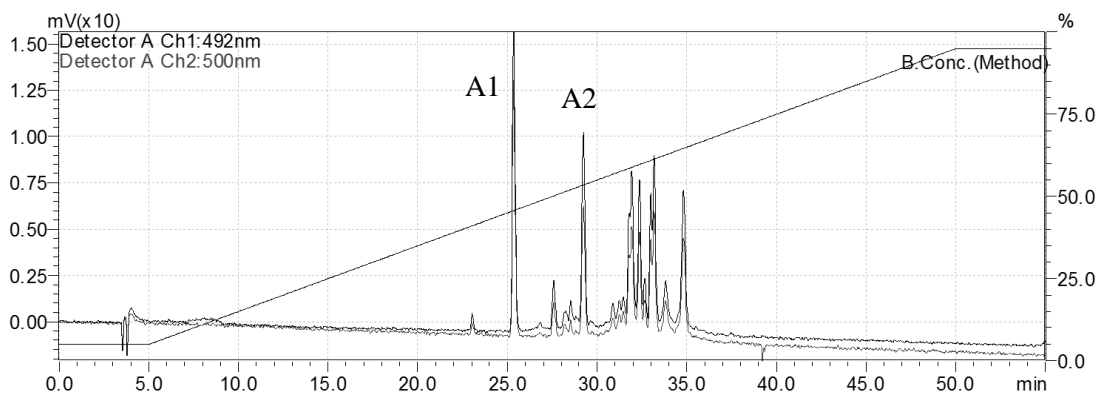
Reakcję znakowania przeprowadzano następująco: roztwór P5/F5 w odpowiednim buforze zmieszano z roztworem FITC (w DMSO) w stosunku molowym 1 : 1,5. Roztwór FITC dodawano porcjami ciągle mieszając, następnie mieszaninę pozostawiono w temp. pokojowej na 8 h ograniczając dostęp światła.

Otrzymane mieszaniny analizowano i oczyszczano za pomocą chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, RP-HPLC z detektorem UV. Wykorzystano kolumnę C18 (kolumna analityczna: Luna 5u, 100A, wymiary: 250 x 4,60 mm, 5 micron, Phenomenex; kolumna preparatywna: Luna 10u, 100A, wymiary: 250 x 10,00 mm, 10 micron, Phenomenex), gradient roztworu acetonitrylu, ACN (+ 0,1% TFA) od 5% do 95% przez 45 min. Detektor UV: w przypadku analizy roztworu białka: $\lambda = 220$ nm lub w przypadku analizy znakowanych produktów: $\lambda = 492$ nm.

Program elucji na kolumnie analitycznej obejmował: pierwsze 5 min: 5% ACN (+ 0,1% TFA), potem przez 45 min: gradient od 5% do 95% ACN (+ 0,1% TFA), przez ostatnie 5 min: 95% ACN (+ 0,1% TFA), z prędkością przepływu eluentu 1 mL/min. Program elucji na kolumnie półpreparatywnej obejmował natomiast: pierwsze 10 min: 5% ACN (+ 0,1% TFA), potem przez 45 min: gradient od 5% do 95% ACN (+ 0,1% TFA), przez ostatnie 5 min: 95% ACN (+ 0,1% TFA) z prędkością przepływu eluentu 3 mL/min.

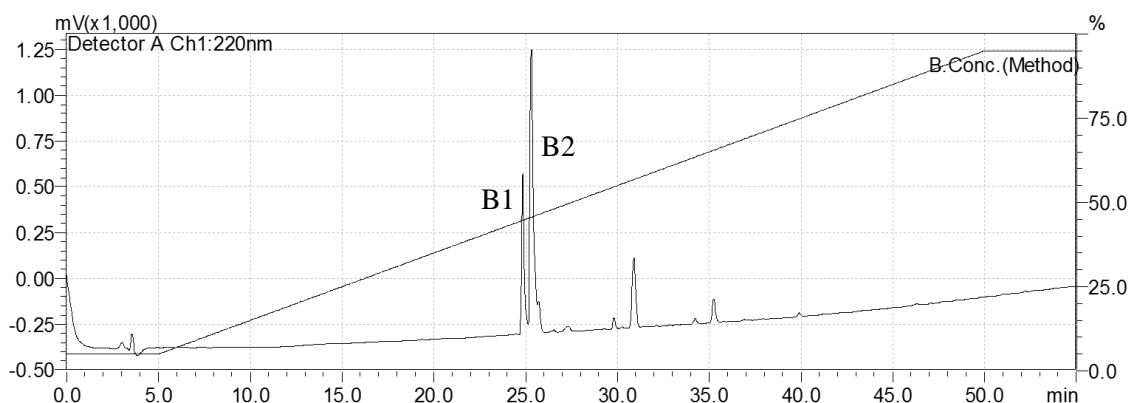
Identyfikację związków przeprowadzano za pomocą spektrometrii mas z jonizacyjną metodą desorpcji laserowej na matrycy (MALDI-TOF) w AIRF (Advanced Instrumentation Research Facility, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, Indie). Oczyszczone roztwory związków poddawano liofilizacji (0,1 mBar, -80°C).

Analiza chromatograficzna mieszaniny poreakcyjnej po reakcji P5 z FITC (rys. 17) wskazała na obecność kilku związków. Analizę MALDI-TOF przeprowadzono dla próbek odpowiadających sygnałom oznaczonym jako A1 i A2. We frakcji A1 o czasie retencji 25,4 min dominowały związki o masach: 1081,97, 1059,98 oraz 950,47 g/mol, a we frakcji A2 – o czasie retencji 29,3 min – występował w przeważającej ilości związek o masie 1339,45 g/mol. Masa molowa peptydu P5 wynosi 950 g/mol, a masa pożądanego produktu FITC-P5 1339,4 g/mol, zatem próbka odpowiadająca sygnałowi A2 zawierała koniugat peptydu P5 z fluoresceiną.



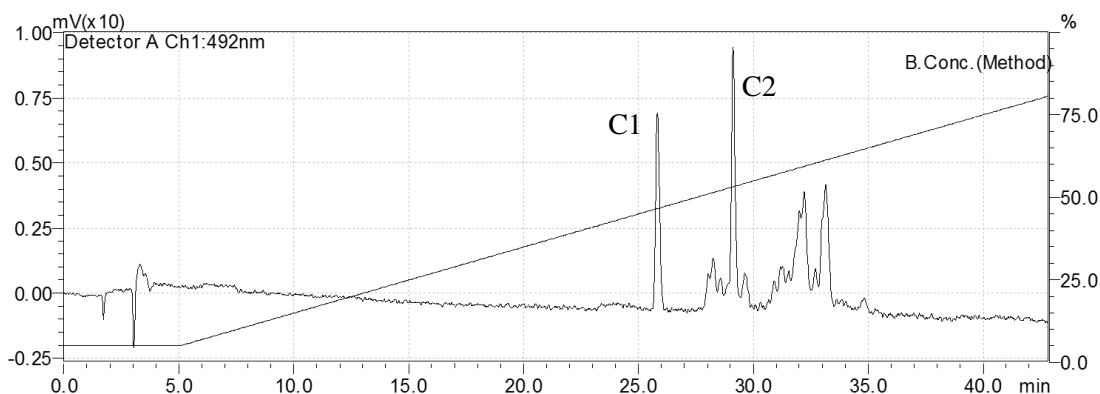
Rys. 17 Chromatogram mieszaniny z rozdziálu RP-HPLC na kolumnie analitycznej po reakcji fluorescencyjnego znakowania peptydu P5. Reakcja znakowania została przeprowadzona w buforze węglanowo-sodowym (pH 9.0). Oznaczono frakcje zebrane do analizy MALDI-TOF uzyskanych produktów rozdziálu.

Analiza chromatograficzna mieszaniny poreakcyjnej po reakcji peptydu F5 z FITC w buforze węglanowo-sodowym o pH 9.0 przyniosła nieoczekiwane rezultaty. W mieszaninie tej nie stwierdzono obecności produktu o masie molowej 1537,4 g/mol odpowiadającej oczekiwanej masie produktu FITC-F5. Z uwagi na uzyskane wyniki, w kolejnym kroku sprawdzono stabilność roztworu koniugatu F5 i przeprowadzono analizę chromatograficzną roztworu peptydu F5 (1 mg/mL) w buforze węglanowo-sodowym (pH 9.0) inkubowanego przez 8h w temp. pokojowej. Na uzyskanym chromatogramie (rys. 18) można zauważyć dwa dominujące sygnały o zbliżonych czasach retencji. Analiza MALDI-TOF zebranych frakcji wykazała obecność substancji o masach molowych: B1: 1134,6 i 1178,6 g/mol, B2: 1148,7 i 1192,8 g/mol. Wartość 1148,7 g/mol odpowiada w przybliżeniu odczekiwanej masie peptydu F5 (1148 g/mol). Wartość 1134,6 odpowiada w przybliżeniu masie możliwego produktu rozkładu peptydu F5 powstałego w wyniku hydrolizy grupy estrowej, czyli związku o masie 1134 g/mol. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysunięcie przypuszczenia o rozkładzie peptydu F5, czy też jego częściowej niestabilności w pH 9.0.



Rys. 18 Chromatogram roztworu peptydu F5 w buforze węglanowo-sodowym o pH 9.0. Rozdział RP-HPLC na kolumnie analitycznej. Oznaczono frakcje zebrane do analizy mas uzyskanych produktów rozdziału.

Na podstawie uzyskanych wyników do reakcji znakowania peptydu F5 postanowiono zastosować bufor o pH zbliżonym do obojętnego, dlatego w przypadku tego związku wybrano bufor fosforanowo-potasowy o pH 7.4. Uzyskany chromatogram mieszaniny poreakcyjnej przedstawiono na rys. 19. Na chromatogramie widać dwa ostre sygnały (oznaczono jako C1, C2) i dwa sygnały o połowę mniejsze. Masy związków zebranych we frakcjach C1 i C2 wynoszą odpowiednio: 1148,6 i 1537,6 g/mol. Optymalizacja warunków fluorescencyjnego znakowania F5 pozwoliła na otrzymanie produktu FITC-F5 o przewidywanej masie 1537,4 g/mol we frakcji C2.

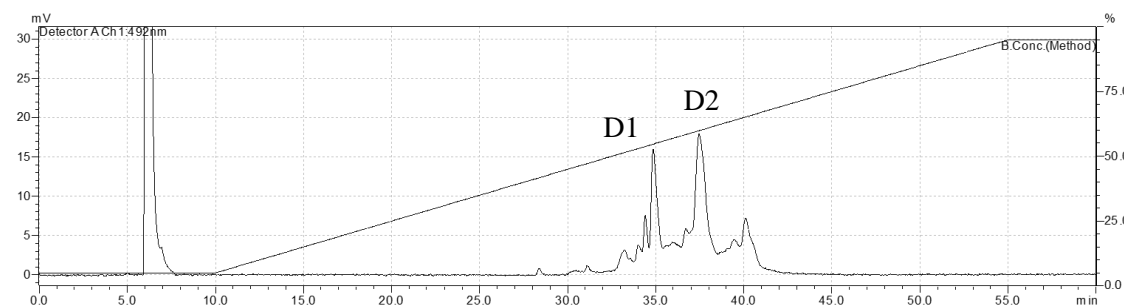


Rys. 19 Chromatogram mieszaniny z rozdziału RP-HPLC na kolumnie analitycznej po reakcji fluorescencyjnego znakowania peptydu F5. Reakcja znakowania została przeprowadzona w buforze fosforanowo-potasowym (pH 7.4). Oznaczono frakcje zebrane do analizy mas uzyskanych produktów rozdziału.

Reakcje otrzymywania FITC-P5 i FITC-F5 wymaganych do przeprowadzenia dalszych badań biologicznych prowadzono w odpowiednim buforze w większej skali, a mieszaniny oczyszczano na kolumnie półpreparatywnej.

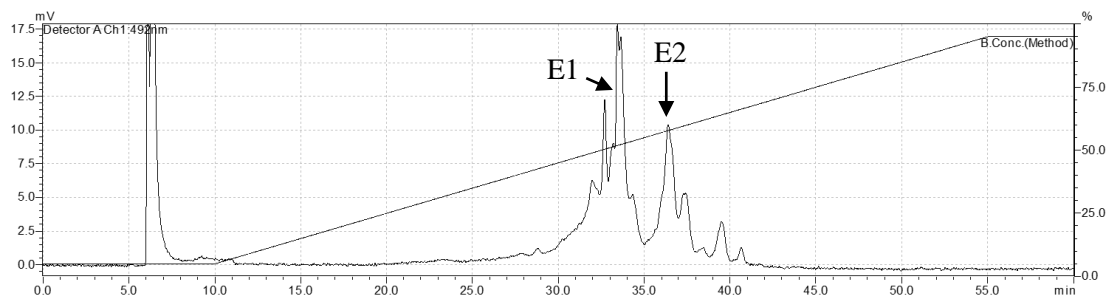
Pierwszy chromatogram (rys. 20) przedstawia analizę mieszaniny otrzymanej w reakcji P5 i FITC w buforze węglanowo-sodowym (pH 9.0). Można zaobserwować dwa wyraźnie dominujące sygnały (oznaczone jako D1 i D2). Masy molowe zebranych frakcji wynoszą

odpowiednio 1339,6 i 1728,6 g/mol. Produkt D1 o masie 1339 g/mol odpowiada pożądanemu produktowi znakowania peptydu P5, FITC-P5.



Rys. 20 Chromatogram mieszaniny z rozdziału RP-HPLC na kolumnie półpreparatywnej po reakcji fluorescencyjnego znakowania peptydu P5. Reakcja znakowania została przeprowadzona w buforze węglanowo-sodowym (pH 9.0). Cyframi oznaczono frakcje zebrane do analizy mas uzyskanych produktów rozdziału.

Drugi chromatogram (rys. 21) otrzymano rozdzielając mieszaninę po reakcji znakowania peptydu F5 w buforze fosforanowo-sodowym (pH 7.4). Można na nim zauważyć kilka intensywnych sygnałów, przy czym jeden E1 o czasie retencji 33,5 min jest dominujący. Masy molowe związków znajdujących się w zebranych frakcjach wynoszą: E1: 1537,97 g/mol, E2: 1339,68 i 1537,78 g/mol. Produkt frakcji E1 o masie 1537 g/mol jest pożądanym produktem znakowania peptydu F5, FITC-F5. We frakcji E2 znajduje się zarówno pożądaný produkt jak i produkt odpowiadający masie koniugatu peptydu P5 z fluoresceiną czyli 1339 g/mol, co może sugerować odłączenie się FMDP podczas reakcji znakowania i zajście reakcji z wolnym peptydem P5.



Rys. 21 Chromatogram mieszaniny z rozdziału RP-HPLC na kolumnie półpreparatywnej po reakcji fluorescencyjnego znakowania peptydu F5. Reakcja znakowania została przeprowadzona w buforze fosforanowo-sodowym (pH 7.4). Cyframi oznaczono frakcje zebrane do analizy mas uzyskanych produktów rozdziału.

W wyniku reakcji znakowania peptydów P5 i F5 otrzymano niewielkie ilości fluorescencyjnych pochodnych prawdopodobnie dlatego, że reakcja została przeprowadzona na gotowych preparatach, a nie na etapie syntezy peptydów na fazie stałej. Uzyskanie małych ilości produktów jest również związane z jakością kolumny wykorzystywanej do końcowego oczyszczania preparatu. Wykorzystując 6 mg odpowiedniego peptydu uzyskano w przypadku FITC-P5: 0,5 mg D1 i 0,7 mg D2, a w przypadku FITC-F5: 0,75 mg E1 i 0,25 mg E2. Dzięki

zastosowaniu proporcji peptydu do FITC wynoszącej 1 : 1,5 można było uzyskać pochodną z przyłączoną jedną cząsteczką fluoresceiny, choć w reakcji otrzymano również produkty o wyższych masach (D2, E1, E2) Z uwagi na reakcję prowadzoną na wolnym peptydzie otrzymane pochodne mimo pożądanej masy mogą różnić się miejscem przyłączenia FITC, z uwagi na to, że peptydy bez osłon grup funkcyjnych posiadają kilka wolnych grup aminowych.

Otrzymane pochodne, FITC-P5 i FITC-F5 zostały wykorzystane do badań nad jakościową oceną szybkości transportu związków do komórek grzybowych *C. albicans* z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej (podrozdział 3.13 i 4.3.13 niniejszej rozprawy) oraz do ilościowej oceny pobierania pochodnych przez komórki grzybowe przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej (podrozdział 3.14 i 4.3.14 niniejszej rozprawy).

3.13 Jakościowa ocena szybkości transportu FITC-P5 i FITC-F5 do komórek grzybowych z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej

Do badań pozwalających na ilościowe określenie możliwości transportu CPP i FMDP-CPP wybrane związki wyznakowano fluoresceiną wg procedury opisanej w podrozdziale 3.12.

Hodowlę nocną (16-18 h) komórek *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC5314, *C. albicans opt1Δ* lub *C. albicans opt12345ptr222Δ* w podłożu YNB-SA odświeżano poprzez rozcieńczenie hodowli w podłożu YNB-SA do gęstości optycznej zawiesiny odpowiadającej 10^6 kom./mL ($OD_{660}=0,1$) i inkubację zawiesiny przez 5 h w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po uzyskaniu komórek w logarytmicznej fazie wzrostu ustawiano ponownie $OD_{660}=0,1$. W probówce typu Falcon o poj. 50 mL umieszczano 2 mL zawiesiny komórek oraz 20,2 μ L wodnego roztworu FITC-F5 lub FITC-P5 (1 mg/mL, stężenie końcowe 10 μ g/mL). Przygotowywano również kontrolę negatywną zawiesiny komórek bez dodatku badanego związku. Tak przygotowane próbki inkubowano w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po upływie 5 min, 15 min i 30 min zawiesiny odwirowywano (4°C, 6 tys. rpm, 10 min) i przemywano dwukrotnie roztworem PBS (pH 7.4). Dodatkowo wykonywano barwienie komórek jodkiem propidyny (PI). W tym celu po przemyciu komórek do porcji komórek zawieszonych w 50 μ L PBS dodawano 3,2 μ L roztworu PI (50 μ M, stężenie końcowe 3 μ M). Próbki inkubowano w temp. 30°C przez 20 min z wytrząsaniem (200 rpm), a następnie przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS. Tak przygotowane próbki odwirowywano i komórki zawieszano w 30 μ L PBS. Sporządzano preparaty przeżyciowe nanosząc 10 μ L zawiesiny komórek z próbek kontrolnych oraz badanych wybarwionych/niebarwionych PI na szkiełko podstawowe. Podczas całego eksperymentu stosowano osłonę na probówki typu Falcon i typu Eppendorf oraz pracowano przy minimalnym źródle światła. Badania wykonywano w trzech, niezależnych powtórzeniach.

3.14 Ilościowa ocena pobierania FITC-P5 i FITC-F5 przez komórki grzybowe z zastosowaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej

W oznaczeniu tym stosowano znakowane fluorescencyjnie peptydy P5 i F5 otrzymane wg procedury opisanej w podrozdziale 3.12.

Hodowlę nocną (16-18 h) komórek odpowiedniego szczepu (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* SC5314, *C. albicans opt1Δ* lub *C. albicans opt12345ptr222Δ*) w podłożu YNB-SA odświeżano poprzez rozcieńczenie hodowli w podłożu YNB-SA do gęstości optycznej zawiesiny odpowiadającej 10^6 kom./mL ($OD_{660}=0,1$) i inkubację zawiesiny przez 5 h w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po uzyskaniu komórek w logarytmicznej fazie wzrostu ponownie ustawiano $OD_{660}=0,1$. W probówce typu Falcon o poj. 50 mL umieszczano 4 mL zawiesiny komórek oraz $40,4\ \mu\text{L}$ wodnego roztworu FITC-F5 lub FIT-P5 (1 mg/mL, stężenie końcowe $10\ \mu\text{g/mL}$). Przygotowywano również kontrolę negatywną zawiesiny komórek bez dodatku badanego związku. Tak przygotowane próbki inkubowano w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po upływie 30 minut zawiesiny odwirowywano (4°C , 6 tys. rpm, 10 min) i przemywano dwukrotnie roztworem PBS (pH 7.4). Dodatkowo wykonywano barwienie komórek jodkiem propidyny (PI). W tym celu po przemyciu komórek, do porcji komórek zawieszonych w $50\ \mu\text{L}$ PBS dodano $1,54\ \mu\text{L}$ roztworu PI ($50\ \mu\text{M}$, końcowe stężenie $1,49\ \mu\text{M}$). Próbkę inkubowano w temp. 30°C przez 20 min z wytrząsaniem (200 rpm), a następnie przepłukano trzykrotnie roztworem PBS. Tak przygotowane próbki odwirowywano i komórki zawieszano w $400\ \mu\text{L}$ PBS. W celu zliczenia komórek z próbek kontrolnych oraz badanych wybarwionych/niewybarwionych PI umieszczano $200\ \mu\text{L}$ zawiesiny w kuwecie cytometru przepływowego Calibur, tak by ostateczna liczba komórek w zadanej objętości była nie mniejsza niż 5×10^5 . Podczas całego eksperymentu stosowano osłonę na próbki typu Falcon i typu Eppendorf oraz pracowano przy minimalnym źródle światła. Badania wykonywano w trzech, niezależnych powtórzeniach.

Wykonanie eksperymentów 3.12 ÷ 3.14 było możliwe dzięki odbyciu stażu zagranicznego w School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University (New Delhi, Indie) pod opieką prof. Rajendry Prasada. Wyjazd stażowy został sfinansowany w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

3.15 Określenie obecności inhibitora uwolnionego z koniugatu C5 w ekstrakcie bezkomórkowym z wykorzystaniem RP-HPLC

Hodowlę nocną (16-18 h) komórek szczepu *C. albicans* ATCC 10231 w podłożu YPG odświeżano poprzez rozcieńczenie hodowli w podłożu YPG do gęstości optycznej zawiesiny odpowiadającej 10^6 kom./mL ($OD_{660}=0,1$) i inkubację zawiesiny przez ok. 3 h w temp. 30°C z wytrząsaniem (200 rpm). Po uzyskaniu komórek w logarytmicznej fazie wzrostu ($OD_{660}=0,1$), komórki trzykrotnie przemywano wodą destylowaną i ustawiano $OD_{660}=1,0$ w buforze PBS (pH 7.4) odpowiadające $\sim 10^7$ kom./mL. W celu uzyskania ekstraktu bezkomórkowego, zawiesinę komórek poddawano mechanicznej dezintegracji poprzez wytrząsanie z porcją szklanych kulek. Dezintegracja składała się z następujących po sobie naprzemiennie etapów trwających 2 minuty każdy: „worteksowanie” (intensywne mieszanie) i chłodzenie (poprzez umieszczenie w lodzie). Cykl powtarzano pięciokrotnie, a następnie odwirowywano zawiesinę z kulkami (4°C , 10 tys. rpm, 20 min). Uzyskany supernatant przepuszczano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów $0,2\ \mu\text{m}$ w celu usunięcia komórek, które nie uległy dezintegracji. Supernatant – ekstrakt bezkomórkowy umieszczano w lodzie.

W probówce typu Eppendorf umieszczano ekstrakt bezkomórkowy oraz roztwór badanego związku (C, C5, P5, stężenie końcowe związku: $185\ \mu\text{M}$) i prowadzono inkubację przez 30 min w temp. 30°C . Próba kontrolna (wzorec) składała się z porcji buforu (pH 7.0) i roztworu badanego związku. Próba negatywna zamiast roztworu związku zawierała odpowiednią ilość wody. Po inkubacji ekstraktu bezkomórkowego z badanym związkiem do próbek dodawano $200\ \mu\text{L}$ 15% roztworu TCA i umieszczano w temp. 4°C w celu usunięcia z próbki białek. Po upływie 30 min próbki odwirowywano (4°C , 10 tys. rpm, 15 min), a supernatant poddawano reakcji derywatywacji.

W reakcji derywatywacji zastosowano odczynnik składający się z aldehydu ftalowego (OPA) i kwasu 3-merkaptopropanowego (3MPA). Derywatywacja z wykorzystaniem OPA/3MPA pozwala na uzyskanie w bardzo krótkim czasie fluorescencyjnych produktów o wysokiej intensywności, a także ich rozdzielanie w temp. pokojowej. Jest to metoda prosta, a ponadto niezwykle czuła (Dai i in. 2014).

Aby zapewnić najlepsze warunki derywatywacji, odczynnik OPA/3MPA przygotowano zachowując przy tym stosunek molowy OPA : 3MPA równy 1 : 50 (Mengerink i in. 2002), a reakcję derywatywacji przeprowadzono przy zachowaniu proporcji OPA/3MPA : C/C5/P5 większej lub równej 20 : 1 (Molnár-Perl i Vasanits, 1999). Po etapie precypitacji białek, $500\ \mu\text{L}$ supernatantu przenoszono do próbki typu Eppendorf i dodawano $500\ \mu\text{L}$ odczynnika OPA/3MPA o składzie: $100\ \mu\text{L}$ roztworu OPA (MeOH, 5 mg/mL), $354,4\ \mu\text{L}$ buforu boranowego (0,1 M, pH 10.0), $15,6\ \mu\text{L}$ 3MPA, $30\ \mu\text{L}$ roztworu NaOH (5 N). Końcowe pH odczynnika

wynosiło 9.5. Poszczególne składniki odczynnika dodawano według wymienionej wyżej kolejności (Mengerink i in. 2002).

Próbki po reakcji derywatywacji analizowano za pomocą chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) z detektorem DAD i FLD. W tym celu po upływie 7 min (Molnár-Perl i Vasanits, 1999) od dodania odczynnika OPA/3MPA, próbkę przepuszczano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,2 μm i dokonywano nastrzyku w ilości 100 μL na kolumnę C18 (Zorbax Eclipse XDB C-18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm, *Agilent*, 25°C). Jako eluent A zastosowano 50 mM bufor octanowy o pH 5.0, jako eluent B - roztwór acetonitrylu. Program elucji (min/A%): 0/72, 3/72, 27/55, 32/0, 37/0, 39/72, 47/72. Rozdział trwał 47 min, przy prędkości przepływu eluentu: 1 mL/min. Detekcja: DAD - analiza roztworu peptydu: 224 nm, analiza znakowanych produktów: 492 nm, FLD: wzbudzenie: 337 nm, emisja: 454 nm (Mengerink i in. 2002). Zastosowano eluenty i program elucji zgodnie z procedurą opisaną przez Fabiani i współpracowników (Fabiani i in. 2002).

3.16 Określenie obecności wolnego inhibitora uwolnionego z koniugatu C5 po inkubacji komórek z wykorzystaniem RP-HPLC

W celu sprawdzenia czy koniugat C5 nie jest rozcinany zanim wejdzie do wnętrza komórki i nie zostaje uwolniona cispentacyna, przeprowadzono eksperyment podobny do opisanego podrozdział wyżej (podrozdział 3.15). Pominięto etap otrzymywania ekstraktu bezkomórkowego, a odmłodzone, przemyte komórki zawieszano w buforze fosforanowo-potasowym (pH 5.5) ustawiając gęstość optyczną zawiesiny $\text{OD}_{660}=1,0$ odpowiadającą 10^7 kom./mL.

W probówce typu Eppendorf umieszczano zawiesinę komórek oraz roztwór badanego związku (C, C5, P5, stężenie końcowe związku: 185 μM) i prowadzono inkubację przez 30 min w temp. 30°C. Próba kontrolna (wzorzec) składała się z porcji buforu (pH 5.5) i roztworu badanego związku. Próba negatywna zamiast roztworu związku zawierała odpowiednią ilość wody miliQ. Po inkubacji próbki odwirowywano (20°C, 5 tys. rpm, 15 min), a supernatant przepuszczono przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,2 μm w celu usunięcia komórek. Następnie do 500 μL supernatantu dodawano 200 μL 15% roztworu TCA i umieszczano w temp. 4°C w celu usunięcia z próbki białek. Po upływie 30 min próbki odwirowano (4°C, 10 tys. rpm, 15 min), a uzyskany supernatant poddawano reakcji derywatywacji.

W reakcji derywatywacji zastosowano odczynnik składający się z aldehydu ftalowego (OPA) i kwasu 3-merkaptopropanowego (3MPA). Derywatywacja z wykorzystaniem OPA/3MPA pozwala na uzyskanie w bardzo krótkim czasie fluorescencyjnych produktów o wysokiej intensywności, a także ich rozdzielanie w temp. pokojowej. Jest to metoda prosta, a ponadto niezwykle czuła (Dai i in. 2014).

Aby zapewnić najlepsze warunki derywatywacji, odczynnik OPA/3MPA przygotowano zachowując przy tym stosunek molowy OPA : 3MPA równy 1 : 50 (Mengerink i in. 2002), a reakcję derywatywacji przeprowadzono przy zachowaniu proporcji OPA/3MPA : C/C5/P5 większej lub równej 20 : 1 (Molnár-Perl i Vasánits, 1999). Po precypitacji białek, 500 μ L supernatantu przenoszono do probówki typu Eppendorf i dodawano 500 μ L odczynnika OPA/3MPA o składzie: 100 μ L roztworu OPA (MeOH, 5 mg/mL), 354,4 μ L buforu boranowego (0,1 M, pH 10.0), 15,6 μ L 3MPA, 30 μ L roztworu NaOH (5 N). Końcowe pH odczynnika wynosiło 9.5. Poszczególne składniki odczynnika dodawano według wymienionej kolejności (Mengerink i in. 2002).

Próbki po reakcji derywatywacji analizowano za pomocą chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) z detektorem DAD i FLD. W tym celu po upływie 7 min (Molnár-Perl i Vasánits, 1999) od dodania odczynnika OPA/3MPA, próbkę przepuszczano przez filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,2 μ m i dokonywano nastrzyku w ilości 100 μ L na kolumnę C18 (Zorbax Eclipse XDB C-18, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm, *Agilent*, 25°C). Jako eluent A zastosowano 50 mM bufor octanowy o pH 5.0, jako eluent B - roztwór acetonitrylu. Program elucji (min/A%): 0/72, 3/72, 27/55, 32/0, 37/0, 39/72, 47/72. Rozdział trwał 47 min, przy prędkości przepływu eluentu: 1 mL/min. Detekcja: DAD - analiza roztworu peptydu: 224 nm, analiza znakowanych produktów: 492 nm, FLD: wzbudzenie: 337 nm, emisja: 454 nm (Mengerink i in. 2002). Zastosowano eluenty i program elucji zgodnie z procedurą opisaną przez Fabiani i współpracowników (Fabiani i in. 2002).

Analiza próbek z zastosowaniem HPLC opisana w porozdziałach 3.15 i 3.16 została przeprowadzona pod opieką dr Katarzyny Kozłowskiej-Tylingo z Katedry Technologii Leków i Biochemii WCH PG. Oznaczenia zostały wykonane z wykorzystaniem zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) Agilent 1200 Series będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm” (WCH PG), którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

4. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Badane przeze mnie oligopeptydowe związki przeciwgrzybowe zawierały w swojej strukturze jeden z czterech inhibitorów enzymatycznych o strukturze aminokwasowej. Składnikiem aktywnym („warhead”) większości z tych związków był FMDP – silny inhibitor enzymu syntazy GlcN-6-P (EC 2.6.1.16). Występuje on jako C-końcowy aminokwas dipeptydu Nva-FMDP i tripeptydu Lys-Nva-FMDP oraz jako N-końcowy aminokwas w koniugatach z peptydami uznawanymi za tzw. peptydy penetrujące (CPP). Oprócz koniugatów z FMDP na N-końcu wykorzystano również koniugaty peptydu P1 i P5 z innymi inhibitorami enzymatycznymi, BADP i cispentacyną. BADP jest słabszym niż FMDP inhibitorem syntazy GlcN-6-P – charakteryzuje się znacznie niższymi wartościami IC_{50} wobec syntazy GlcN-6-P. Cispentacyna jest cykliczną pochodną β -aminokwasu i charakteryzuje się wysoką aktywnością skierowaną przeciwko grzybom z gatunku *C. albicans* – stwierdzoną zarówno *in vitro* jak i *in vivo* – nie wywołując przy tym cytotoksyczności w badanym zakresie stężeń (Konishi i in. 1989; Oki i in. 1989). Grupa Capobianco i współpracowników zaproponowała, że mechanizm działania cispentacyny jest oparty na kilku celach molekularnych (Capobianco i in. 1993), natomiast przyjmuje się, że cispentacyna i jej pochodne są inhibitorami syntazy Ile-tRNA^{lle} (EC 6.3.4.19), co skutkuje zahamowaniem syntezy białek w konsekwencji prowadząc do śmierci komórek grzybowych (Espinell-Ingroff, 2009). Z uwagi na mało efektywny transport FMDP i BADP do komórek grzybowych, związki te posiadają niewielką aktywność przeciwgrzybową *in vitro* (Milewski, 2002).

Wszystkie koniugaty peptydów z inhibitorami, które były przedmiotem moich badań, aby mogły wykazywać działanie przeciwgrzybowe, muszą wnikać do wnętrza komórek grzybowych, gdzie powinna zostać uwolniona znajdująca się w ich składzie cząsteczka inhibitora enzymatycznego. Pierwszy element opisanego mechanizmu działania może być realizowany na drodze transportu aktywnego za pośrednictwem permeaz peptydowych lub na drodze transportu niezależnego od energii metabolicznej – biernej dyfuzji lub endocytozy. Droga pierwsza jest dedykowana dla oligopeptydów zbudowanych z niewielkiej liczby reszt aminokwasowych (2-8), a druga dla specyficznej grupy peptydów zwanych peptydami penetrującymi (CPP). W swojej pracy badałam peptydy należące do obu grup, ale charakter tych badań dla każdej z tych dwóch kategorii był jakościowo różny. W przypadku peptydów transportowanych przez permeazy zajęłam się głównie zjawiskiem specyficznej oporności *C. albicans* na te związki, natomiast dla peptydów grupy drugiej zajmowałam się głównie identyfikacją czynników determinujących ich aktywność przeciwgrzybową.

4.1 Rola genów *OPT1-8* oraz *PTR2* i *PTR22* we wrażliwości *C. albicans* na di- i tripeptydowe związki przeciwgrzybowe zawierające FMDP

Dysponując komórkami *C. albicans* SC5314 oraz pochodzącymi od tego szczepu mutantami delecyjnymi pozbawionymi poszczególnych genów lub grup genów kodujących permeazy dedykowane do transportu krótkich peptydów (szczególnie dipeptydów), *PTR2*, *PTR22* oraz/lub genów kodujących prawdopodobne permeazy oligopeptydowe: *OPT1*, *OPT2*, *OPT3*, *OPT4*, *OPT5*, *OPT6*, *OPT7*, *OPT8*, a z drugiej strony – uzyskanymi w KTLiB oligopeptydami zawierającymi FMDP o znanej, wysokiej aktywności przeciwgrzybowej: Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP, mogłam przeprowadzić badania porównawcze ukierunkowane na określenie roli w/w genów we wrażliwości *C. albicans* na oligopeptydy przeciwgrzybowe. Najistotniejszymi elementami tych badań było porównanie aktywności peptydów-FMDP wobec mutantów delecyjnych i macierzystego szczepu SC5314 w różnych podłożach oraz ustalenie związku pomiędzy szybkością pobierania oligopeptydów przez komórki, a aktywnością peptydów-FMDP wobec tych komórek.

4.1.1 Aktywność Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP wobec mutantów delecyjnych

Aktywność przeciwgrzybową Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP wyznaczałam w trzech podłożach: (a) buforowanym do pH = 7.0 podłożu RPMI-1640 rekomendowanym przez CLSI do określania aktywności związków przeciwgrzybowych, którego skład odpowiada warunkom fizjologicznym w organizmie gospodarza; (b) podłożu minimalnym YNB z siarczanem amonu jako źródło azotu oraz (c) podłożu minimalnym YNB z glutaminianem sodu jako źródło azotu. Warunki prowadzenia tych oznaczeń opisano w podrozdziale 3.6, warto jedynie wspomnieć, że odczyt wyników oznaczeń prowadzonych w dwóch pierwszych wymienionych podłożach był dokonywany po 24 h inkubacji, a dla podłoża YNB-GS, w którym wzrost komórek *C. albicans* był wolny – po 48 h. Uzyskane wartości MIC₅₀ oraz MIC₈₀ dla szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 oraz szeregu jego mutantów przedstawiono w tabelach poniżej (tab. 5, tab. 6).

Wartości MIC obu peptydów-FMDP wobec szczepu dzikiego SC5314 wyznaczone w podłożach minimalnych YNB były znacząco niższe (32-krotnie) od wartości otrzymanych w podłożu RPMI-1640. Konkretna przyczyna tej różnicy nie jest znana, jednakże warto zauważyć, że pH podłoża RPMI-1640 wynosi 7.0, podczas gdy pH obu podłoży YNB wynosi około 5.0. Ponadto podłoże RPMI-1640 zawiera w swoim składzie zestaw aminokwasów białkowych, których brak jest w podłożach YNB. Oba te czynniki mogą mieć wpływ na efektywność systemów transportu peptydów (Basrai i in. 1992; Davies, 1980; Lubkowith i in. 1997), a w konsekwencji na aktywność peptydowych związków przeciwgrzybowych wykorzystujących permeazy peptydowe w dotarciu do celu molekularnego zlokalizowanego w komórce.

Tab. 5 Aktywność Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i szeregu jego mutantów delecyjnych.

Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
Szczep <i>C. albicans</i>						
SC5314	4	8	0,125	0,25	0,25	0,25
<i>opt1</i> Δ	8	64	0,125	0,5	0,125	0,25
<i>opt2</i> Δ <i>opt3</i> Δ	8	32	0,125	0,25	0,125	0,125
<i>opt4</i> Δ	8	64	0,125	0,125	0,125	0,25
<i>opt5</i> Δ	8	32	0,25	0,25	0,125	0,25
<i>opt6</i> Δ	4	64	0,125	0,25	0,125	0,25
<i>opt7</i> Δ	8	64	0,125	0,25	0,25	0,25
<i>opt8</i> Δ	8	64	0,125	0,25	0,125	0,25
<i>opt1-opt5</i> Δ	8	64	0,125	0,25	0,125	0,25
<i>ptr2</i> Δ <i>ptr22</i> Δ	>>128	>>128	>>16	>>16	>>16	>>16
<i>opt1-opt5</i> Δ <i>ptr2</i> Δ <i>ptr22</i> Δ	>>128	>>128	>>16	>>16	>>16	>>16

Wartości MIC przedstawiono w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Tab. 6 Aktywność Lys-Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i szeregu jego mutantów delecyjnych.

Lys-Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
Szczep <i>C. albicans</i>						
SC5314	4	8	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>opt1</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>opt2</i> Δ <i>opt3</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>opt4</i> Δ	4	16	0,25	0,5	0,125	0,25
<i>opt5</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,5
<i>opt6</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>opt7</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>opt8</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>opt1-opt5</i> Δ	4	16	0,5	0,5	0,125	0,25
<i>ptr2</i> Δ <i>ptr22</i> Δ	>>128	>>128	>>16	>>16	0,125	0,125
<i>opt1-opt5</i> Δ <i>ptr2</i> Δ <i>ptr22</i> Δ	>>128	>>128	>>16	>>16	>>16	>>16

Wartości MIC podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że delecja genów *OPT* kodujących permeazy oligopeptydowe nie miała wpływu na aktywność obu peptydów-FMDP, co może świadczyć o tym, że peptydy te nie są transportowane przez permeazy

oligopeptydowe. Natomiast delecja genów *PTR* skutkowała utratą wrażliwości na działanie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP (w tym drugim przypadku w dwóch z trzech podłoży wykorzystywanych w badaniach), co wskazuje, że permeazy di-/tripeptydowe kodowane przez te geny są odpowiedzialne za transport badanych peptydów-FMDP. Brak pojedynczych mutantów *ptr2Δ* i *ptr22Δ* uniemożliwił jednoznaczną identyfikację konkretnej permeazy zaangażowanej w transport badanych peptydów, jednakże niedawne badania Morschhäusera i współpracowników wykazały, że pojedyncze permeazy Ptr2 i Ptr22 różnią się specyficznością (Dunkel i in. 2013).

Całkowitą utratę wrażliwości na działanie peptydów-FMDP stwierdzono dla mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, co było zgodne z oczekiwaniami.

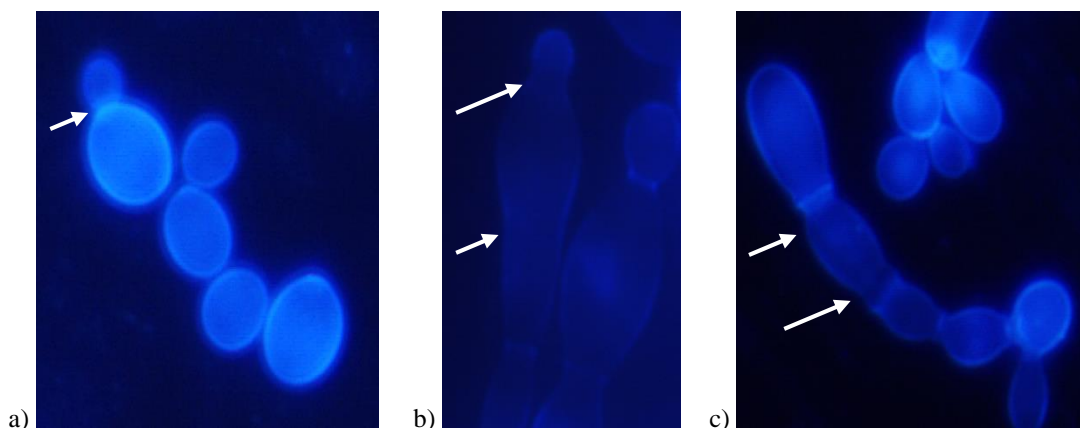
Zaskakującym wynikiem jest zachowanie wrażliwości na działanie Lys-Nva-FMDP (ale nie na Nva-FMDP) mutantu *ptr2Δ ptr22Δ* w podłożu, w którym źródło azotu stanowi glutaminian sodu (YNB-GS). Przyczyna tego zjawiska nie jest znana. Nie można wykluczyć, że w warunkach panujących w tym podłożu, w komórkach nieposiadających genów *PTR2* i *PTR22* następuje nadekspresja któregoś z genów kodujących jedną z permeaz oligopeptydowych, np. genu *OPT1*. W swoich badaniach, grupa Morschhäusera zwróciła uwagę na rolę jaką odgrywa permeaza Opt1p we wzroście komórek grzybowych w podłożu zawierającym tripeptyd LWL lub KFK (Dunkel i in. 2013), co oznacza, że może ona transportować tripeptydy zawierające aminokwasy zasadowe. Weryfikacja tej hipotezy będzie możliwa po przeprowadzeniu badań poziomu ekspresji genów, np. za pomocą RT-PCR.

4.1.2 Wpływ Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP na morfologię komórek szczepu *C. albicans* SC5314 i wybranych mutantów delecyjnych

Wewnątrz komórek *C. albicans*, uwolniony z koniugatu FMDP inaktywuje enzym, syntazę GlcN-6-P, prowadząc do zahamowania syntezy składników grzybowej ściany komórkowej, chityny i mannoпротеin (Milewski i in. 1988b; Milewski i in. 1991a). W rezultacie objawia się to aglutynacją komórek i utratą zdolności do tworzenia sept (przegród) pomiędzy komórką macierzystą a potomną zbudowanych z chityny (Milewski i in. 1991a). Dzięki przeprowadzeniu barwienia fluorescencyjnego z użyciem Calcofluor White, wiążącego się specyficznie z chityną, możliwe było zaobserwowanie zmian w morfologii komórek szczepu SC5314 oraz wybranych mutantów delecyjnych po inkubacji komórek w obecności peptydów-FMDP w stężeniu 10 µg/mL przez 5 h według procedury opisanej w podrozdziale 3.7.

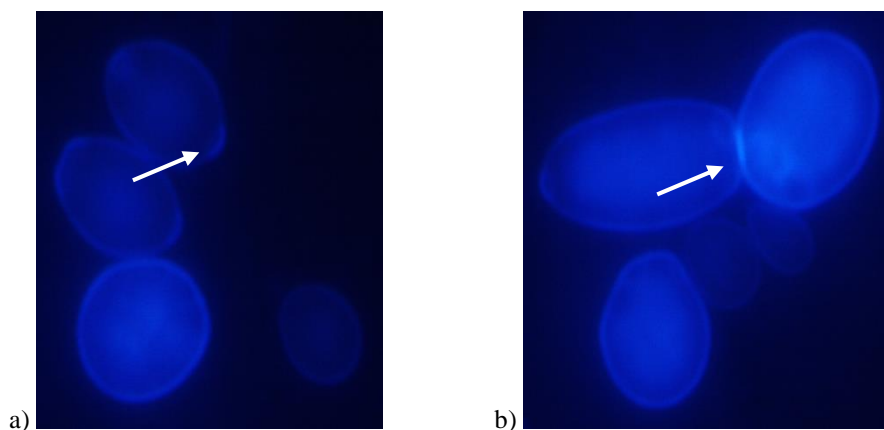
Komórki szczepu dzikiego SC5314 po inkubacji z Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP są zdeformowane oraz mają nieregularne kształty (fot. 1: b, c). Niektóre komórki są wydłużone i połączone z komórkami macierzystymi. Zahamowanie tworzenia przegród uniemożliwia rozłączenie komórki macierzystej i potomnej. W obecności zarówno di- jak i tripeptydu komórki

zlepiają się ze sobą tworząc agregaty, czego nie można zaobserwować w przypadku komórek po inkubacji w pożywce bez związku (fot. 1: a).



Fot. 1 Wybarwione komórki SC5314 po inkubacji w pożywce YNB-GS: a) bez związku, b) w obecności Nva-FMDP, c) w obecności Lys-Nva-FMDP.

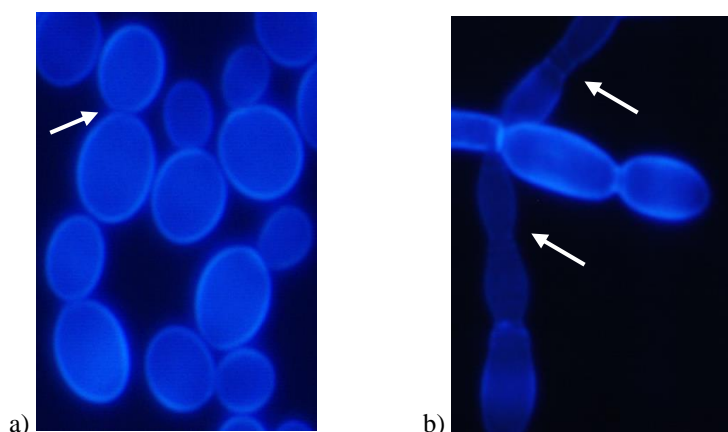
Mutant *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* w badaniach oceny wrażliwości (MIC) pozostawał całkowicie oporny na działanie Nva-FMDP oraz Lys-Nva-FMDP we wszystkich rodzajach podłoży (podr. 4.1.1, tab. 5, tab. 6). Oporność ta została potwierdzona w tym badaniu. Komórki inkubowane w obecności peptydów w obu podłożach YNB-SA i YNB-GS zachowują owalne kształty i są zdolne do podziału. Można zaobserwować tworzenie się sept (fot. 2: a, b).



Fot. 2 Wybarwione komórki *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* po inkubacji z Lys-Nva-FMDP: a) w pożywce YNB-SA, b) w pożywce YNB-GS.

Stosunkowo zaskakującym wynikiem uzyskanym w oznaczeniach aktywności *in vitro* była wrażliwość mutanta *ptr2Δ ptr22Δ* na Lys-Nva-FMDP w podłożu zawierającym glutaminian sodu (GS) jako źródło azotu, podczas gdy wykazywał on oporność na ten tripeptyd w podłożu YNB-SA oraz w podłożu RPMI-1640 i okazał się całkowicie oporny na Nva-FMDP w trzech wykorzystanych podłożach (podr. 4.1.1, tab. 5, tab. 6). Wyniki te znalazły potwierdzenie w obserwacji mikroskopowej. W przypadku mutanta *ptr2Δ ptr22Δ*, deformację kształtu komórek i tworzenie agregatów zaobserwowano wyraźnie tylko w efekcie inkubacji komórek w obecności

Lys-Nva-FMDP w podłożu YNB-GS, podczas gdy w podłożu z SA komórki zachowały prawidłowy kształt (fot. 3: a, b). Obserwację, że mutant *ptr2Δ ptr22Δ* pozostaje wrażliwy na toksyczny tripeptyd jedynie w podłożu, w którym źródło azotu stanowi glutaminian sodu można prawdopodobnie wytłumaczyć aktywacją w tych warunkach innych permeaz peptydowych, prawdopodobnie typu OPT (Dunkel i in. 2013).



Fot. 3 Wybarwione komórki *ptr2Δ ptr22Δ* po inkubacji z Lys-Nva-FMDP:
a) w pożywce YNB-SA b) w pożywce YNB-GS.

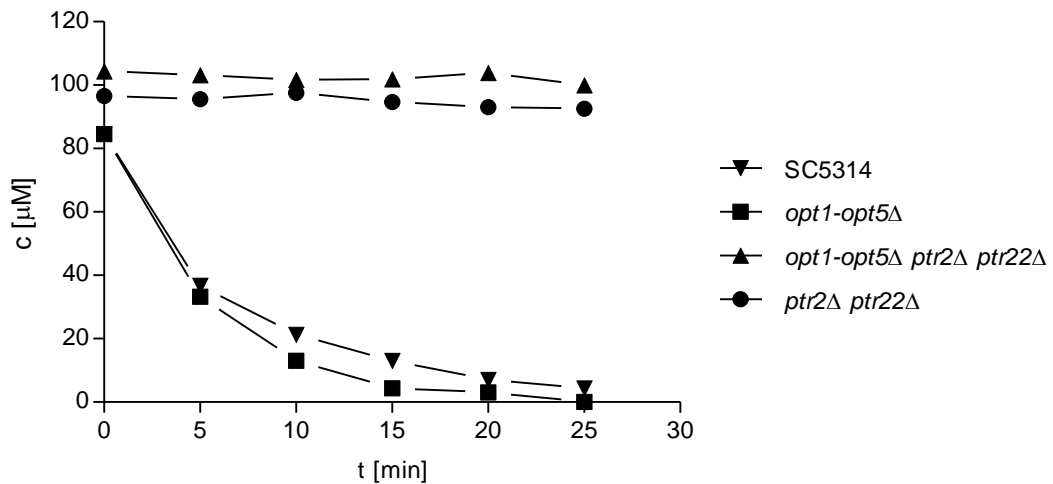
Uzyskane wyniki są zgodne z otrzymanymi wartościami MIC dla szczepu wyjściowego i mutantów delecyjnych. Potwierdzono wrażliwość szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 oraz całkowitą oporność mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* na testowane peptydy-FMDP, a także wrażliwość mutantu *ptr2Δ ptr22Δ* na toksyczny tripeptyd, Lys-Nva-FMDP w podłożu YNB-GS.

4.1.3 Analiza jakościowa i ilościowa transportu oligopeptydów do komórek mutantów delecyjnych

W celu stwierdzenia, czy zaobserwowane różnice we wrażliwości mutantów delecyjnych na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP mogą być konsekwencją zdolności do pobierania oligopeptydów z podłoża za pośrednictwem określonych permeaz, przeprowadziłam porównanie szybkości pobierania peptydów modelowych, Ala-Ala, Ala-Ala-Ala oraz Ala-Ala-Ala-Ala przez komórki grzybowe szczepu dzikiego *C. albicans* S5314 oraz szeregu jego mutantów delecyjnych: *opt1Δ*, *opt2Δ*, *opt3Δ*, *opt4Δ*, *opt5Δ*, *opt6Δ*, *opt7Δ*, *opt8Δ*, *opt1-opt5Δ*, *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, *ptr2Δ ptr22Δ*, pozbawionych genów kodujących permeazy PTR i/lub OPT. Stężenie początkowe peptydów modelowych podczas tych oznaczeń wynosiło 100 μ M. W celu oszacowania szybkości początkowych pobierania tych peptydów przez komórki zmierzono zmiany stężenia oligopeptydów modelowych.

Na poniższym rysunku (rys. 22) umieszczono przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężenia modelowego dipeptydu w zawiesinach komórek szczepu dzikiego i trzech mutantów delecyjnych. Szybkości początkowe tych procesów wyznaczano wykreślając styczne do krzywych w czasie 0-5 min. Można zaobserwować bardzo zbliżoną szybkość pobierania Ala-

Ala w przypadku komórek SC5314 i mutantu *opt1-opt5Δ*. Komórki mutantów *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* oraz *ptr2Δ ptr22Δ* nie były zdolne do pobierania dipeptydu.

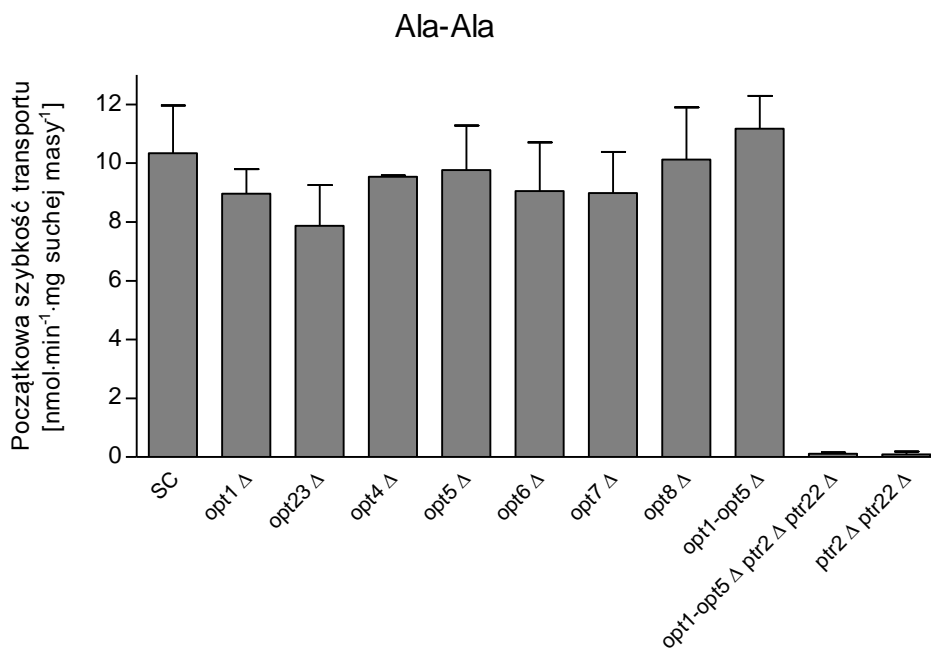


Rys. 22 Wykres zależności stężenia peptydu Ala-Ala od czasu dla wybranych szczepów, szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i mutantów delecyjnych: *opt1-opt5Δ*, *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, *ptr2Δ ptr22Δ* w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0.

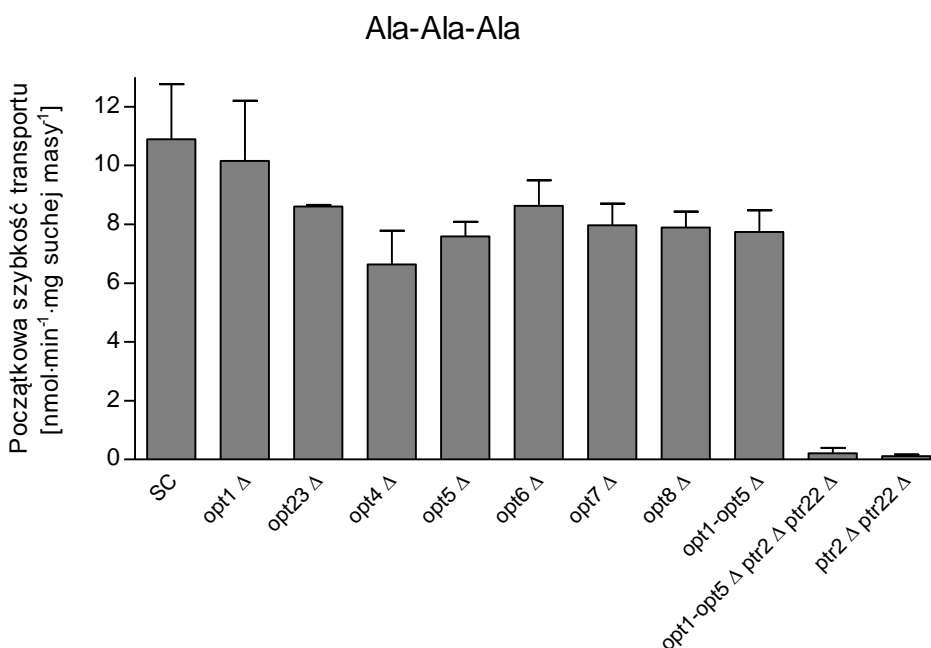
Podobne oznaczenia wykonano dla wszystkich rodzajów komórek i trzech rodzajów peptydów modelowych. Każde oznaczenie wykonywano co najmniej trzykrotnie. Zestawienie wyznaczonych wartości szybkości początkowych \pm SD przedstawiono w postaci wykresów słupkowych (rys. 23-25). Dane wyrażono w nmol/min/mg suchej masy.

Przeprowadzenie równoległych prób w obecności inhibitora metabolicznego, azydku sodu pozwoliło potwierdzić, że pobieranie badanych peptydów przez komórki odbywa się na drodze transportu aktywnego.

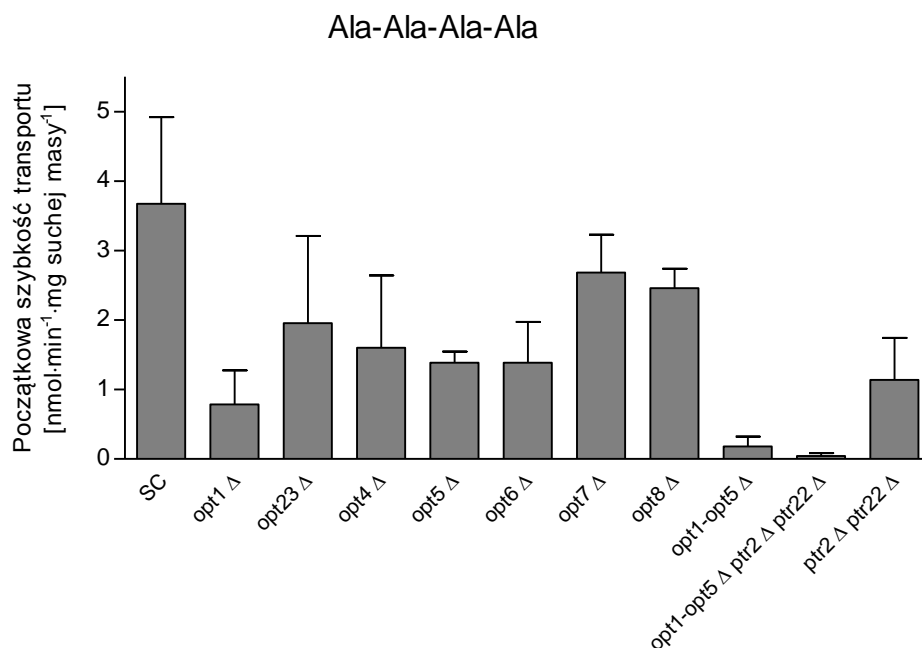
Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że mutanty *ptr2Δ ptr22Δ* oraz *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* nie transportują dipeptydu Ala-Ala (rys. 23) i tripeptydu Ala-Ala-Ala (rys. 24), podczas gdy pozostałe badane mutanty pobierają te peptydy ze zbliżoną szybkością, która nie różni się zasadniczo od szybkości ich pobierania przez komórki SC5314. Wynika z tego, że transport peptydów Ala-Ala i Ala-Ala-Ala jest realizowany przez komórki zawierające geny *PTR2* i *PTR22*, natomiast brak genów *OPT* nie ma wpływu na ten transport. Wyniki wcześniejszych badań Basraiego i in. oraz Dunkela i in., wskazały, że permeazy Ptr2 i/lub Ptr22 odgrywają kluczową rolę w transporcie di- i tripeptydów (Basrai i in. 1995; Dunkel i in. 2013). Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają te wnioski. Ponadto, Davies i Moneton wraz ze współpracownikami zwrócili uwagę na istnienie wspólnego systemu transportu di- i tripeptydów (Davies, 1980; Moneton i in. 1986).



Rys. 23 Wykres słupkowy przedstawiający wartości początkowej szybkości transportu Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego i mutantów delecyjnych w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0. Na wykresie naniesiono odchylenia standardowe.



Rys. 24 Wykres słupkowy przedstawiający wartości początkowej szybkości transportu Ala-Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego i mutantów delecyjnych w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0. Na wykresie naniesiono odchylenia standardowe.



Rys. 25 Wykres słupkowy przedstawiający wartości początkowej szybkości transportu Ala-Ala-Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego i mutantów delecyjnych w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0. Na wykresie naniesiono odchylenia standardowe.

Warto zwrócić uwagę na zależność szybkości początkowych transportu oligopeptydów alaninowych od wielkości tych peptydów: szybkości te zmniejszają się wraz ze wzrostem długości łańcucha peptydowego.

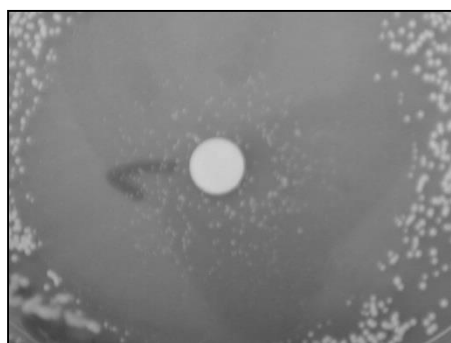
W przypadku tetrapeptydu Ala-Ala-Ala-Ala można zauważyć, że jest on pobierany przez komórki SC5314, mutanty pozbawione genów od *OPT2* do *OPT8* oraz mutantu *ptr2Δ ptr22Δ* (rys. 25). Natomiast mutanty, u których usunięto gen *OPT1*, czyli *opt1Δ*, *opt1-opt5Δ* i *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* utraciły zdolność do pobierania tetrapeptydu. Uzyskane wyniki wskazują zatem na istotną rolę permeazy Opt1 kodowanej przez gen *OPT1* w transporcie (Ala)₄, choć pomiędzy wspomnianymi szczepami można zauważyć niewielkie różnice w szybkości transportu związku. Szczególnie dotyczy to mutantów *opt1Δ* i *opt1-opt5Δ*, co można wytłumaczyć niewielkim wpływem pozostałych permeaz oligopeptydowych OPT2-OPT5 na proces pobierania badanego peptydu. Warto zwrócić uwagę na dane dotyczące mutantu pozbawionego genów permeaz di- i tripeptydowych oraz oligopeptydowych *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*. Komórki mutantu nie są zdolne do transportu peptydów modelowych, co sugeruje brak w komórkach *C. albicans* systemów transportu peptydów innych niż PTR2/PTR22 oraz OPT1/OPT2/OPT3, a geny *OPT6*, *OPT7*, *OPT8* i *OPT9* nie kodują permeaz peptydowych. Do podobnych wniosków doszli również Morschhäuser i współpracownicy (Dunkel i in. 2013; Reuß i Morschhäuser, 2006).

4.2 Charakterystyka fenotypu komórek *C. albicans* izolowanych z kolonii wyrastających wewnątrz stref zahamowanego wzrostu

We wcześniejszych publikacjach różnych autorów dotyczących przeciwgrzybowych oligopeptydów transportowanych przez permeazy peptydowe wskazywano na zjawisko pozornej lub rzeczywistej oporności specyficznej *C. albicans* na te związki, przejawiające się w postaci kolonii drożdżaków wyrastających wewnątrz stref zahamowanego wzrostu (Andruszkiewicz i in. 1990; Milewski i in. 1988a; Payne i Shallow, 1985; Yadan i in. 1984). Z badań prowadzonych w KTLiB WCH PG na początku lat 90-tych ubiegłego wieku wynikało, że kolonie *C. albicans* uzyskane z hodowli komórek poddanej działaniu Nva-FMDP izolowano z częstotliwością $55:10^5$, w przypadku tripeptydu Met-Met-FMDP – $3:10^5$, natomiast w przypadku tetrapeptydu Met-Met-Met-FMDP z częstotliwością $12:10^5$ (Milewski i in. 1988a). Za częstotliwość spontanicznych mutacji występujących naturalnie w środowisku u wszystkich organizmów żywych przyjmuje się $1:10^6$ - $1:10^8$, jednak w dużej populacji komórek poddanych działaniu czynnika selekcyjnego mutacje mogą zachodzić częściej, by zapewnić przeżycie komórek dzięki wygenerowaniu oporności (Dworecka-Kaszak, 2010). Nie wiadomo jednak czy rzeczywiście komórki izolowane z kolonii posiadają cechę oporności, a jeśli tak, to czy ma ona trwały charakter będący konsekwencją mutacji konkretnego genu.

Podjęłam badania ukierunkowane na wyjaśnienie tych wątpliwości, polegające na charakterystyce fenotypu komórek *C. albicans* izolowanych z kolonii wewnątrz stref zahamowanego wzrostu w wyniku działania Nva-FMDP (fot. 4) i Lys-Nva-FMDP.

Kolonie, które wyrosły na płytkach zawierających przeciwgrzybowy di- lub tripeptyd były trzykrotnie pasażowane na podłożu stałym YNB-SA zawierającym ten sam badany związek ($10 \mu\text{g/mL}$), a następnie do dalszych badań pasażowane na podłożu bez związku. Potencjalne mutanty spontaniczne hodowano w podłożu minimalnym YNB z SA, aby uniemożliwić powrót do stanu wyjściowego i zanik oporności. Procedurę opisano w podrozdziale 3.8 niniejszej rozprawy.



Fot. 4 Pojedyncze kolonie mutantów spontanicznych uzyskane w strefie wokół krążka z Nva-FMDP ($15 \mu\text{g}$).

4.2.1 *Oporność mutantów spontanicznych szczepu C. albicans SC5314 na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP*

Określenie oporności na badane związki zostało przeprowadzone według procedury opisanej w podrozdziale 3.6 w jednym podłożu, YNB-SA, z uwagi na dużą liczbę potencjalnych mutantów i przesiewowy charakter pierwszych oznaczeń.

Znacząca większość otrzymanych kolonii charakteryzowała się identyczną lub bardzo zbliżoną do szczepu wyjściowego *C. albicans* SC5314 wrażliwością na peptydy-FMDP. Podczas badań prowadzonych w KTLiB WCH PG na początku lat 90-tych ubiegłego wieku zaobserwowano, że niektóre z kolonii *C. albicans* wyrosłych z komórek poddanych działaniu di-, tri- i tetrapeptydu zawierającego FMDP nie rosły w kolejnym pasażu na podłożu z badaniem związkiem. Ponadto, zdolność do wzrostu na podłożu ze związkiem zanikała po dwukrotnym pasażu komórek w podłożu pełnym (Zieniawa i in. 1991, dane niepublikowane). Podobne rezultaty otrzymali Payne i Shallow izolując mutanty spontaniczne odporne na peptydowe analogi bacylizyny, polioksyny i nikkomycyny. Większość z uzyskanych metodą krążkową potencjalnych mutantów traciło uprzednio nabytą oporność (Payne i Shallow, 1985).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach, z 200 wyizolowanych kolonii potencjalnych mutantów spontanicznych (po 100 dla każdego peptydu przeciwgrzybowego) sześć z nich charakteryzowało się opornością na badane związki, Nva-FMDP i/lub Lys-Nva-FMDP. Dla obu grup izolatów, u których zidentyfikowano oporność na badane związki w podłożu YNB-SA, po dziesięciu pasażach w podłożu YNB-SA, wyznaczono wartości MIC we wszystkich trzech podłożach (RPMI-1640, YNB-SA, YNB-GS). Wyniki zestawiono w tabelach poniżej (tab. 7, tab. 8). Izolaty odporne na Nva-FMDP oznaczono „n”, natomiast izolaty odporne na Lys-Nva-FMDP oznaczono „ln”. W tabelach przedstawiono również wartości MIC uzyskane dla szczepu wyjściowego, *C. albicans* SC5314.

Na podstawie otrzymanych wyników można zaobserwować zdecydowanie wyższe wartości MIC uzyskane dla mutantów spontanicznych w podłożu YNB-SA w porównaniu do szczepu dzikiego, *C. albicans* SC5314. Izolaty grup „n” i „ln” mimo, że zostały wyizolowane z podłoża zawierającego odpowiednio Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP charakteryzują się opornością na oba badane peptydy, Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP, przy czym izolaty n1 i n2 są bardziej wrażliwe na tripeptyd niż dipeptyd, natomiast izolaty ln4 i ln5 są w bardzo zbliżonym stopniu odporne na oba związki. Co ciekawe izolat ln6 jest bardziej odporny na Nva-FMDP niż na Lys-Nva-FMDP mimo, że zakładano, że będzie bardziej wrażliwy na Nva-FMDP, z uwagi na to, że został wyizolowany z podłoża zawierającego tripeptyd.

Tab. 7 Aktywność Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i potencjalnych mutantów spontanicznych.

Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
<i>C. albicans</i>						
n1	128	>128	>>16	>>16	0,125	0,25
n2	16	128	>>16	>>16	0,125	1
n3	64	128	>16	>16	0,063	0,25
ln4	8	64	>>16	>>16	1	1
ln5	16	4	>>16	>>16	0,5	1
ln6	64	>128	>>16	>>16	0,25	0,25
SC5314	4	8	0,125	0,25	0,25	0,25

Wartości MIC przedstawiono w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Tab. 8 Aktywność Lys-Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i potencjalnych mutantów spontanicznych w trzech rodzajach podłoża.

Lys-Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
<i>C. albicans</i>						
n1	128	>128	16	>16	0,25	0,25
n2	8	64	16	>16	0,25	0,25
n3	64	128	8	>16	0,125	0,25
ln4	8	64	>>16	>>16	0,5	0,5
ln5	16	64	>>16	>>16	1	1
ln6	64	>128	16	>16	0,25	0,25
SC5314	4	8	0,25	0,25	0,25	0,25

Wartości MIC przedstawiono w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Krzyżowa oporność komórek na różne peptydy została już wcześniej zaobserwowana przez Payna i Shallowa, którzy badali mutanty spontaniczne niewrażliwe na tetainę, nikkomycynę i polioksynę (Payne i Shallow, 1985). Podobnie grupa Milewskiego otrzymała mutanty spontaniczne odporne na toksyczny tripeptyd Met-Met-FMDP, które charakteryzowały się również opornością na pozostałe badane peptydy-FMDP, w tym Nva-FMDP (Milewski i in. 1988b).

Oporność otrzymanych mutantów spontanicznych prawdopodobnie jest związana z brakiem transportu badanych związków, di- i tripeptydów przez permeazy PTR, Ptr2 i/lub Ptr22. Możliwe, że zaszły zmiany w obrębie genów, jednak bardziej prawdopodobnie mutacja polega na zmianie sposobu regulacji pracy permeaz PTR.

Wartości MIC wobec mutantów spontanicznych oznaczane w podłożu RPMI-1640 są wyższe niż dla szczepu dzikiego, jednak w większości przypadków nie przekraczają maksymalnego stężenia stosowanego w doświadczeniu.

Warto zwrócić uwagę na brak wyraźnych różnic w otrzymanych wartościach MIC między izolatami a szczepem dzikim w przypadku podłoża YNB-GS. Jak wspomniano w podrozdziale 4.1, prawdopodobnie w obranych warunkach doświadczalnych następuje ekspresja genów permeaz peptydowych innych niż *PTR2* i *PTR2*, takich jak *OPT1*. Produkt tego genu, permeaza Opt1 odpowiada nie tylko za transport oligopeptydów, ale może również odpowiadać za transport di- i tripeptydów (Dunkel i in. 2013). Warto przywołać tutaj obserwacje dotyczące badań poświęconych mutantom delecyjnym (podr. 4.1). Mutant *ptr2Δ ptr22Δ* choć pozbawiony genów *PTR2* i *PTR22* charakteryzował się wrażliwością na tripeptyd Lys-Nva-FMDP w jednym podłożu, właśnie YNB-GS.

Przedstawione powyżej wyniki sugerują również duży wpływ rodzaju podłoża na powstawanie i utrzymywanie się wyraźnej oporności na badane toksyczne peptydy-FMDP. Aby ocenić trwałość cechy oporności zaobserwowanej dla sześciu mutantów spontanicznych w podłożu minimalnym YNB-SA, przeprowadzono pasażowanie komórek w podłożu bogatym, zawierającym oligopeptydy (YPG). Po dziesiątym pasażu oznaczono wartości MIC w trzech rodzajach podłoża. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej (tab. 9, tab. 10). Mutanty po pasażowaniu oznaczono „ ‘ ”, a wyniki odbiegające od uzyskanych przed pasażowaniem (tab. 7, tab. 8) oznaczono pogrubioną czcionką.

Tab. 9 Aktywność Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i potencjalnych mutantów spontanicznych (po 10 pasażach w podłożu YPG).

Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
<i>C. albicans</i>						
n1'	128	>128	>>16	>>16	0,25	0,5
n2'	16	128	>16	>16	0,25	0,5
n3'	16	64	0,5	8	0,063	0,125
ln4'	2	4	0,125	0,125	0,125	1
ln5'	4	4	0,125	0,125	0,25	1
ln6'	64	>128	>>16	>>16	0,125	0,25
SC5314	4	8	0,125	0,25	0,25	0,5

Wartości MIC przedstawiono w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Tab. 10 Aktywność Lys-Nva-FMDP wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i potencjalnych mutantów spontanicznych (po 10 pasażach w podłożu YPG).

Lys-Nva-FMDP	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
<i>C. albicans</i>						
n1'	128	>128	16	>16	0,125	0,25
n2'	8	128	8	>16	0,125	0,25
n3'	16	64	1	16	0,125	0,5
ln4'	2	4	0,25	0,5	0,5	1
ln5'	4	4	0,25	0,5	1	1
ln6'	128	>128	16	>16	0,125	0,25
SC5314	4	8	0,25	0,25	0,25	0,5

Wartości MIC przedstawiono w µg/mL.

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Dane przedstawione w tab. 9 i tab. 10 wskazują, że połowa z wyselekcjonowanych izolatów (potencjalnych mutantów spontanicznych) po dziesięciu pasażach w podłożu YPG, bogatym w peptydy, traciło cechę oporności na oba peptydy-FMDP, Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP. Warto zwrócić uwagę na izolaty n1, n2 i ln6, w przypadku których otrzymano zbliżone wartości MIC do tych sprzed pasażowania. Izolaty te charakteryzują się dużo trwalszą cechą oporności i można z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, że są one rzeczywistymi mutantami, tzn. w ich genomie nastąpiła zmiana, w wyniku której nabyły trwałą cechę fenotypową w postaci oporności na Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP, z tym zastrzeżeniem, że cecha ta nie ujawnia się w podłożu YNB-GS.

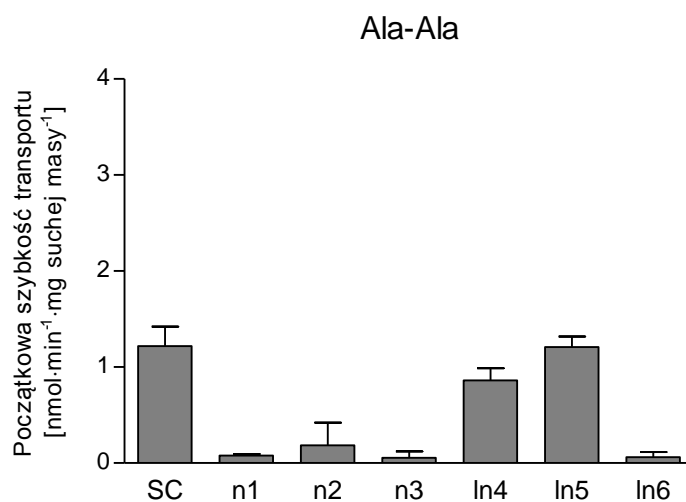
4.2.2 Początkowa szybkość pobierania Nva-FMDP, Lys-Nva-FMDP i peptydów modelowych przez komórki mutantów spontanicznych

Po określeniu stopnia oporności na badane peptydy-FMDP, Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP w trzech rodzajach podłoża, a także określeniu trwałości cechy oporności po dziesięciokrotnym pasażowaniu komórek w podłożu YPG dokonano dalszej charakterystyki sześciu uzyskanych izolatów przypuszczalnych mutantów i wyznaczono początkowe szybkości transportu peptydów modelowych i peptydów-FMDP do ich komórek.

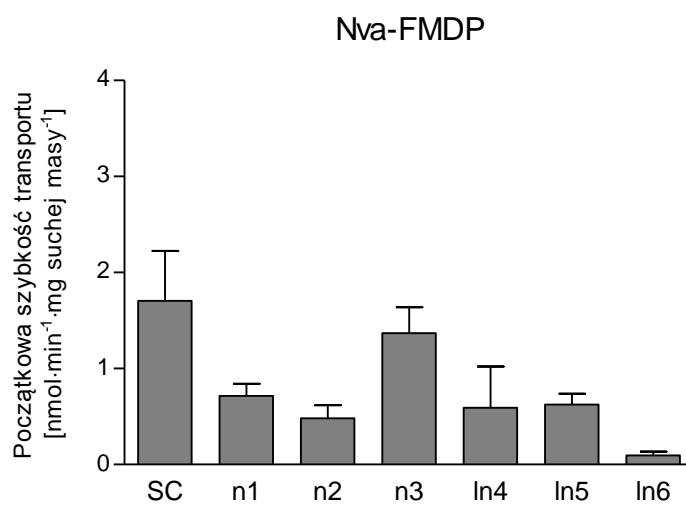
Podczas odmładzania komórek izolatów zastosowano podłoże YNB-SA, aby uniemożliwić utratę cechy oporności badanych komórek. Komórki po inkubacji w podłożu minimalnym były dodatkowo „głodzone” poprzez 1-godziną inkubację w buforze potasowo-fosforanowym o pH 5.0 w temp. 30°C, co powinno stymulować komórki do pobierania badanego związku, oczywiście o ile posiadają odpowiednie aktywne permeazy.

Wartości wyznaczonych szybkości początkowych przedstawiono na wykresach poniżej (rys. 26 - rys. 30). Z uwagi na zastosowane podłoże (podłoże minimalne YNB), wartości

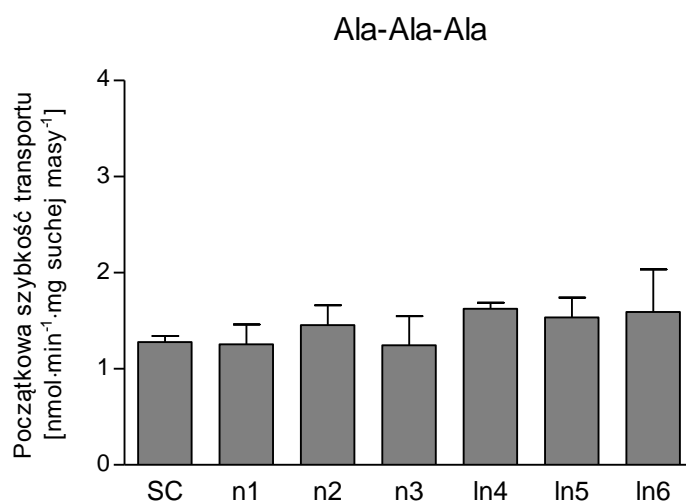
początkowych szybkości transportu peptydów modelowych przez komórki izolatów różnią się od wartości uzyskanych dla mutantów delecyjnych (podłoże bogate YPG). Dotyczy to również szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314.



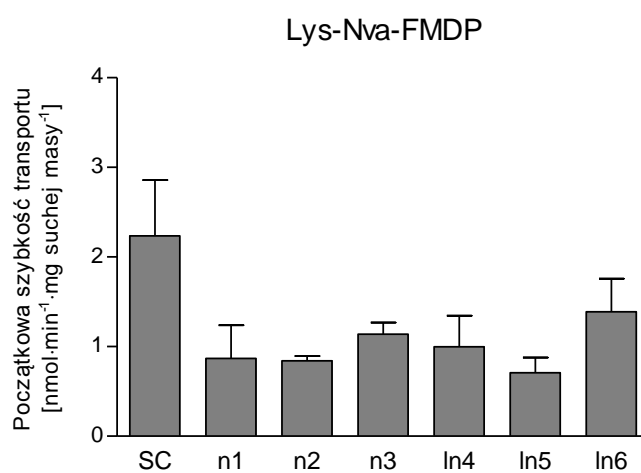
Rys. 26 Szybkości początkowe transportu Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego (SC) i izolatów.



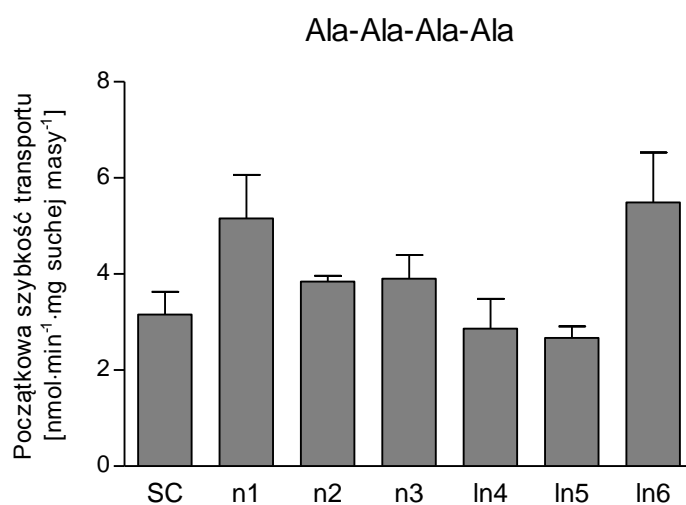
Rys. 27 Szybkości początkowe transportu Nva-FMDP do komórek szczepu dzikiego (SC) i izolatów.



Rys. 28 Szybkości początkowe transportu Ala-Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego (SC) i izolatów.



Rys. 29 Szybkości początkowe transportu Lys-Nva-FMDP do komórek szczepu dzikiego (SC) i izolatów.



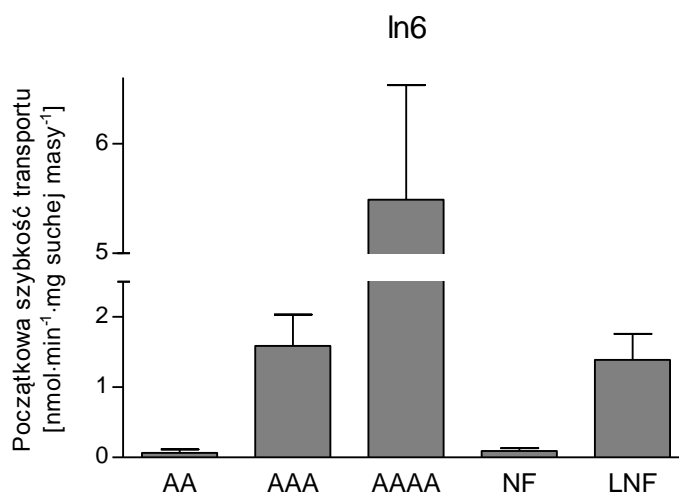
Rys. 30 Szybkości początkowe transportu Ala-Ala-Ala-Ala do komórek szczepu dzikiego (SC) i izolatów.

Dane przedstawione na rys. 26 wskazują na to, że komórki izolatów n1, n2, n3 i ln6 wykazują jedynie śladową zdolność do transportu Ala-Ala, podczas gdy w przypadku komórek ln4 oraz ln5 zdolność ta jest porównywalna ze zdolnością szczepu SC5314.

Dość nieoczekiwanie, znacząca redukcja zdolności do transportu dipeptydu modelowego nie znajduje całkowitego potwierdzenia w postaci analogicznej redukcji zdolności do transportu dipeptydu Nva-FMDP (rys. 26, rys. 27). Redukcję tej zdolności do poziomu porównywalnego z wartością uzyskaną dla Ala-Ala stwierdzono jedynie w przypadku izolatu ln6; u izolatów n1 i n2 stopień redukcji był dużo mniejszy, natomiast izolat n3 transportował Nva-FMDP z szybkością prawie identyczną jak SC5314.

Żaden z badanych izolatów nie wykazywał istotnie zredukowanej zdolności do transportu tripeptydu modelowego Ala-Ala-Ala (rys. 28), natomiast u wszystkich można było zaobserwować zredukowaną o 30-50% zdolność do transportu tripeptydu Lys-Nva-FMDP. Z kolei zdolność do transportu modelowego tetrapeptydu Ala-Ala-Ala-Ala dla większości izolatów była podobna jak szczepu SC5314, a w przypadku izolatów n1 i ln6 o około 30% większa.

W podsumowaniu wyników badań opisanych w tym paragrafie, za najbardziej jednoznaczne uznać można dane dotyczące izolatu ln6. Wykazuje on bardzo silnie zredukowaną zdolność do transportu dipeptydów, nieco zredukowaną zdolnością do transportu tripeptydu Lys-Nva-FMDP, przy niezmienionej szybkości pobierania Ala-Ala-Ala i zwiększonej szybkości pobierania Ala-Ala-Ala-Ala (rys. 31).



Rys. 31 Porównanie początkowych szybkości transportu Ala-Ala (AA), Ala-Ala-Ala (AAA), Ala-Ala-Ala-Ala (AAAA), Nva-FMDP (NF), Lys-Nva-FMDP (LNF) do komórek mutantu spontanicznego ln6.

Biorąc pod uwagę fakt, że izolat ln6 jest prawdopodobnie rzeczywistym mutantem (podr. 4.2.1), można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że zmiana w jego genomie dotyczy systemu transportu di- i tripeptydów PTR. Zmiana ta może polegać na mutacji skutkującej

uniczynnieniem jednego z genów – *PTR2* lub *PTR22* – lub mutacji w genie regulatorowym. Wydaje się, że ta druga możliwość jest bardziej prawdopodobna z uwagi na stwierdzoną większą szybkość pobierania Ala-Ala-Ala-Ala, co może być spowodowane zwiększoną aktywnością systemu transportu oligopeptydów OPT. Redukcja efektywności pobierania dipeptydów i niektórych tripeptydów z jednoczesnym zwiększeniem pobierania tetrapeptydów przez komórki In6 potwierdza sugerowane we wcześniejszych publikacjach powiązanie pomiędzy systemami PTR i OPT, także pod względem mechanizmów regulacyjnych. Otrzymane wyniki potwierdzają również, że permeazy OPT mogą także transportować tripeptydy.

We wcześniejszych badaniach Yadan i współpracownicy zaobserwowali związek oporności komórek na nikkomycynę Z z zakłóconym transportem innych dipeptydów jak tetaina, natomiast tripeptydy były transportowane szybciej (Yadan i in. 1984). Grupa badawcza Mardera zwróciła uwagę na wadliwy transport dipeptydów i tripeptydów przez komórki mutantów odporne na L-etionilo-L-alaninę (Marder i in. 1978). Podobne wyniki uzyskał Milewski wraz ze współpracownikami. Spontaniczne mutanty odporne na Nva-FMDP charakteryzowały się osłabionym transportem dipeptydów, natomiast w przeciwieństwie do obserwacji Yadana, szybkość pobierania badanych tripeptydów była mniejsza (Milewski i in. 1988b).

W przypadku izolatów n1 i n2, które są prawdopodobnie tak jak In6, trwałymi mutantami, związek pomiędzy ich trwałą opornością na peptydy-FMDP a ewentualną mutacją skutkującą zmianami w systemach transportu peptydów jest dużo mniej oczywisty, niż w przypadku In6. Trzy pozostałe izolaty, n3, In4 i In5 raczej nie są rzeczywistymi mutantami, a stwierdzona oporność na działanie peptydów-FMDP ma charakter przejściowy. Natomiast pozostałych 194 izolatów pobranych z kolonii wyrastających wewnątrz stref zahamowanego wzrostu (podr. 4.2.1) w ogóle nie wykazało rzeczywistej oporności.

Wyniki moich badań wskazują zatem, że tylko bardzo niewielka część tzw. „mutantów spontanicznych” izolowanych z kolonii wyrastających wewnątrz stref zahamowanego wzrostu przez peptydy-FMDP to mutanty rzeczywiste. Identyfikacja zmian genetycznych w genomie trzech wyizolowanych rzeczywistych mutantów pozwoli określić charakter tych zmian. Badania takie zostaną wykonane w niedalekiej przyszłości w KTLiB WCH PG.

4.3 Peptydy penetrujące i ich koniugaty z inhibitorami enzymów jako potencjalne związki przeciwwgrzybowe

4.3.1 Racjonalne projektowanie koniugatów CPP z inhibitorami enzymatycznymi

Z uwagi na ograniczenia towarzyszące działaniu przeciwwgrzybowych oligopeptydów zawierających inhibitory enzymatyczne warta rozważenia wydaje się możliwość konstrukcji bardziej efektywnych potencjalnych antymykotyków, opartych na połączeniu cząsteczek inhibitora z nośnikami molekularnymi wnikałymi do komórki bezpośrednio, bez udziału permeaz peptydowych. Taki charakter mają peptydy penetrujące (CPP). W grupie badawczej

KTLiB, której jestem członkiem powstała koncepcja konstrukcji koniugatów CPP z FMDP i BADP (inhibitory syntazy GlcN-6-P) oraz cispentacyną (inhibitor syntazy Ile-tRNA^{Ile}). Projektując struktury tych koniugatów przyjęto założenie, że jako nośniki inhibitorów zostaną zastosowane oligopeptydy opisane w literaturze jako CPP, zbudowane z 5 – 10 reszt aminokwasów o konfiguracji L, a inhibitory zostaną przyłączone do ich N- lub C-końca wiązaniem peptydowym. Przeprowadziłam badania aktywności biologicznej kilkanastu takich koniugatów i ich wyjściowych peptydów, otrzymanych w KChOrg WCH PG (podr. 3.2).

4.3.2 Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i ich koniugatów z FMDP, BADP i cispentacyną wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231

Aktywność przeciwgrzybowa została określona poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia badanych związków hamującego wzrost komórek szczepu *C. albicans* ATCC 10231 (parametr MIC₅₀, MIC₈₀) w trzech rodzajach podłoży: RPMI-1640, YNB-SA i YNB-GS. W badaniach, jako związek kontrolny został wykorzystany dipeptyd, Nva-FMDP (NF). Sekwencje peptydów i ich koniugatów z inhibitorami enzymów przedstawiono w tab. 11. Uzyskane wartości MIC przedstawiono w tab. 12.

Tab. 11 Sekwencje peptydów P1-P8 i ich koniugatów z FMDP, BADP i cispentacyną (C) wykorzystanych w badaniach.

	Sekwencja
P1	Val-Pro-Met-Leu-Lys
P2	Lys-Leu-Pro-Val-Met
P3	Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys
P5	Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp
P6	Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro
P7	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
P8	Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys
F1	FMDP-Val-Pro-Met-Leu-Lys
F2	FMDP-Lys-Leu-Pro-Val-Met
F3	FMDP-Lys-Lys-Val-Val-Phe-Trp-Val-Lys-Phe-Lys
F5	FMDP-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp
F6	FMDP-Val-Arg-Leu-Pro-Pro-Pro
F7	FMDP-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg
F8	FMDP-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys
B1	BADP-Val-Pro-Met-Leu-Lys
B5	BADP-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp
C5	C-Arg-Lys-Lys-Trp-Phe-Trp

Reszty aminokwasowe (aa) oznaczono kolorem **czzerwonym**.

Uzyskane wyniki wskazują na brak aktywności peptydów P1, P2, P5, P6, P7 i P8 we wszystkich trzech rodzajach podłoża. Jedynym peptydem, który wykazuje aktywność wobec komórek grzybowych jest dekapeptyd P3. Jego aktywność jest w nieznacznym stopniu zależna od rodzaju stosowanego podłoża. Według danych literaturowych peptyd P3, opisywany w literaturze jako KSL-W, należy do grupy peptydów penetrujących (CPP) i zmniejsza wirulencję *C. albicans in vivo*, uniemożliwiając adhezję komórek i hamując ich wzrost (Semlalia i in. 2011). W przypadku peptydów P1, P2, P6, P7 i P8, również sklasyfikowanych do grupy CPP, nie stwierdzono aktywności wobec *C. albicans*, co jest zgodne z literaturą (Gomez i in. 2010; Pujals i Giralt, 2008).

López-García i współpracownicy badali peptyd określany jako PAF26 lub PKF26, o sekwencji jak P5, jednak peptyd ten miał zmodyfikowane końce – acylowany N-końiec i amidowany C-końiec i został zbudowany z D-aminokwasów. Dla tego związku uzyskano MIC₉₅ w 20% podłożu Dixon (4% ekstrakt maltozowy, 0,6% Bacto Pepton, 1% glukoza, 1% Tween-80) wobec komórek *C. albicans* ATCC 14053 wynoszący 30 µM co odpowiada 29,7 µg/mL (López-García i in. 2007). W odróżnieniu do PAF26, wyniki oznaczania MIC peptydu P5 wskazują na brak jego aktywności w podłożach RPMI-1640, a także w podłożach YNB. Wyznaczenie MIC zostało również przeprowadzone w 20% podłożu Dixona jednak nie uzyskano otrzymanych przez López-García i współpracowników wartości MIC. Niezgodność wynika prawdopodobnie z konfiguracji aminokwasów w łańcuchu i/lub braku modyfikacji końców peptydu.

Koniugaty peptydów P1, P2, P3, P5 i P6 z FMDP na N-końcu peptydu, czyli F1, F2, F3, F5 i F6 charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwgrzybową w podłożach minimalnych – YNB-SA i YNB-GS – i brakiem aktywności w podłożu RPMI-1640 (tab. 12). Warto zwrócić uwagę na koniugaty F7 i F8, w których nośnikiem FMDP jest odpowiednio oktaarginina i nonalizyna. Dla tych koniugatów otrzymano podobne wartości MIC w podłożach minimalnych, jednak tylko dla koniugatu peptydu zbudowanego z reszt argininy stwierdzono aktywność w podłożu RPMI-1640. Koniugat F7 wykazał na podobnym poziomie (200 µg/mL) działanie przeciwgrzybowe w podłożach RPMI-1640 i YNB-SA, natomiast wyższe (6,3 µg/mL) w drugim podłożu minimalnym z GS. Warto zwrócić uwagę, że wartości MIC związku kontrolnego, Nva-FMDP, są 32-64 razy wyższe w podłożu RPMI-1640 niż w podłożach minimalnych YNB.

Tab. 12 Aktywność peptydów („P”), ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi (FMDP – „F”, BADP – „B”, cispentacyna – „C”), cispentacyny (C) i Nva-FMDP (NF) wobec *C. albicans* ATCC 10231

	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
P1	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3	100	100	25	50	25	50
P5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P6	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P7	>>400	>>400	>>400	>>400	>>400	>>400
P8	>>400	>>400	>>400	>>400	>>400	>>400
F1	>>100	>>100	0,4	0,8	0,05	0,05
F2	>>100	>>100	0,4	0,8	0,1	0,1
F3	>>100	>>100	3,1	6,3	1,6	1,6
F5	>>100	>>100	1,6	3,1	0,2	0,4
F6	>>100	>>100	12,5	12,5	0,4	0,8
F7	200	400	200	400	6,3	6,3
F8	>>400	>>400	400	400	6,3	12,5
B1	>>100	>>100	>>100	>>100	6,3	12,5
B5	>>200	>>200	>>100	>>100	100	100
C5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
C	32	32	16	32	2	4
NF	4	8	0,125	0,25	0,125	0,125

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Podłoże RPMI-1640 jest używane w standardowym oznaczaniu aktywności przeciwgrzybowej metodą rekomendowaną przez Instytut ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (CLSI, 2002; CLSI 2008; pod nazwą NCCLS do roku 2005). Jego skład odzwierciedla zawartość substancji małocząsteczkowych w surowicy krwi ludzkiej, w tym aminokwasów białkowych. Warto również zwrócić uwagę na uzyskanie nieznacznie niższych wartości MIC w podłożu YNB-GS niż w podłożu YNB-SA. Różnica aktywności w dwóch minimalnych podłożach jest najbardziej widoczna w przypadku koniugatu peptydu bogatego w prolinę – F6. Różnice w aktywności zarówno w podłożu RPMI-1640 jak i podłożach minimalnych mogą wynikać z wpływu rodzaju dostępnego źródła azotu obecnego w podłożach na transport peptydu do komórek i w następstwie jego działanie przeciwgrzybowe. Zaobserwowano, że skład podłoża ma nieodłączony związek z pracą permeaz peptydowych (Basrai i in. 1992; Davies, 1980; Lubkowitz i in. 1997). Różnice te mogą wynikać z przyswajalności danego źródła azotu i aktywacji różnego typu mechanizmów

odpowiedzialnych za metabolizm azotu. Glutaminian sodu może uaktywniać permeazy aminokwasowe, a tym samym wpływać na mechanizmy regulujące transport peptydów do wnętrza komórek grzybowych (Martínez i Ljungdahl, 2005).

Na podstawie wartości MIC wyznaczonych w podłożach YNB można zauważyć znaczące podwyższenie aktywności koniugatów CPP z FMDP w porównaniu z odpowiednimi wolnymi nośnikami – CPP. Można przypuszczać, że zwiększenie aktywności związane jest z obecnością cząsteczki inhibitora enzymatycznego, FMDP, który po przedostaniu się do wnętrza komórki zostaje proteolitycznie odłączony i wpływa na aktywność syntazy GlcN-6-P. Badane CPP mogą służyć jako nośniki dla FMDP w celu zapewnienia jego przeciwgrzybowego działania.

Zastanawiające są wyniki uzyskane dla P3 i F3. W podłożu RPMI-1640 wolny CPP wykazuje aktywność przeciwgrzybową (P3, MIC₅₀= 100 µg/mL, IC₅₀= 60,1 µg/mL), natomiast po dołączeniu do N-końca FMDP, traci ją (F3, MIC₅₀ >> 100 µg/mL, IC₅₀ >>100 µg/mL), co wskazuje na to, że przypuszczalnie za aktywność przeciwgrzybową P3 odpowiadają aminokwas czy aminokwasy znajdujące się na N-końcu peptydu. W przypadku dołączenia cząsteczki FMDP następuje zablokowanie N-końca łańcucha peptydowego i utrata aktywności w badanym zakresie stężeń. W podłożach minimalnych można natomiast zaobserwować znacznie niższe wartości MIC koniugatu F3 w porównaniu do wolnego deka-peptydu, co jak przypuszczam może być związane z odmiennymi mechanizmami działania P3 i F3 i tym samym innego oddziaływania składników podłoża na aktywność przeciwgrzybową tych związków.

Podobnie jak w przypadku związków „F”, zaobserwowano brak aktywności badanych koniugatów z BADP (B1 i B5) w podłożu RPMI-1640. Co więcej, uzyskane wyniki wskazują na brak aktywności tych koniugatów w obranym zakresie stężeń również w podłożu YNB-SA. Koniugaty, B1 i B5 wykazują aktywność przeciwgrzybową jedynie w podłożu YNB-GS, przy czym dla koniugatu B1 uzyskano niższe wartości MIC. Warto zwrócić uwagę na zdecydowanie mniejszą aktywność tych związków w porównaniu z ich odpowiednikami zawierającymi FMDP, czyli F1 i F5. Różnica ta może wynikać z faktu, że FMDP jest dużo silniejszym inhibitorem syntazy GlcN-6-P niż BADP, natomiast oba związki z uwagi na ich mało efektywny transport do komórek grzybowych posiadają niewielką aktywność przeciwgrzybową *in vitro* (Milewski, 2002). Nie ulega wątpliwości, że zarówno w przypadku FMDP jak i BADP, dołączenie inhibitora syntazy GlcN-6-P do peptydów nośnikowych daje w efekcie związki o aktywności przeciwgrzybowej wyższej niż aktywność wolnych inhibitorów.

Dość nieoczekiwane wyniki uzyskano dla cispentacyny (C) i jej koniugatu z heksapeptydem (C5). Zaobserwowano znaczną aktywność wolnego inhibitora, C w porównaniu do koniugatu C5, który okazał się nieaktywny w trzech testowanych podłożach w badanym zakresie stężeń (do 100 µg/mL). Dołączenie inhibitora do N-końca sekwencji aminokwasowej heksapeptydu skutkuje obniżeniem aktywności inhibitora, co może być

związane z brakiem hydrolizy koniugatu we wnętrzu komórki grzybowej lub brakiem wydajnego transportu tego koniugatu do komórki. Aby sprawdzić postawione hipotezy zostały przeprowadzone badania obejmujące ocenę możliwości transportu C5 do komórek grzybowych oraz możliwość hydrolizy koniugatu we wnętrzu komórki, co zostało omówione w dalszych podrozdziałach niniejszej rozprawy (podr. 4.3.12, podr. 4.3.15).

Warto zwrócić uwagę na wartości MIC uzyskane dla peptydów grupy P i F amidowanych na C-końcu (PxN, FxN), które przedstawiono poniżej w tab. 13.

Peptydy P3 i P3N wykazują podobną aktywność przeciwgrzybową we wszystkich badanych podłożach. Modyfikacja nie wpłynęła na działanie przeciwgrzybowe peptydu penetrującego P3, ani na aktywność pozostałych peptydów w podłożach RPMI-1640 i YNB-SA. W podłożu YNB-GS, dwa peptydy: P5N i P6N wykazały niewielką aktywność przeciwgrzybową. Wyraźny wpływ amidowania C-końca peptydu na wartości MIC można zaobserwować w przypadku koniugatów F. Uzyskano zdecydowanie wyższe wartości MIC dla grupy związków FxN w porównaniu z ich odpowiednikami z wolnym C-końcem, szczególnie w podłożu YNB-SA. Ta różnica jest dość zaskakująca, jako że peptydy penetrujące często stosowane są w formie C-amidowanej. Obniżona aktywność koniugatów FxN w porównaniu z ich odpowiednikami F poddaje w wątpliwość, czy rzeczywiście peptydy P1, P2, P5 i P6 mają charakter CPP. Warto zwrócić uwagę na wyższe wartości MIC uzyskane dla związku F3N w porównaniu do F3 z wolnym C-końcem w podłożach minimalnych. Nie zaobserwowano również aktywności amidowanej wersji F3 w podłożu RPMI-1640. Podobnie, w przypadku koniugatu P5 z cispentacyną, wprowadzenie modyfikacji końców peptydu: acylowanie N-końca (AC5) i amidowanie C-końca (C5N), nie poprawiło aktywności przeciwgrzybowej koniugatu C5. Warto przypomnieć tutaj wyniki badań dotyczących specyficzności permeaz peptydowych u *C. albicans* opisanych w podrozdziale 2.4.2.4 niniejszej rozprawy. Lichliter i współpracownicy zauważyli, że badane przez nich peptydy posiadające wolny C-koniec były pobierane efektywniej niż te o zmodyfikowanym C-końcu (Lichliter i in. 1976).

Tab. 13 Aktywność peptydów z amidowanym C-końcem („PxN”), ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi (FMDP – „F”, cispentacyna – „C”), acylowanym koniugatem C5 (AC5) i Nva-FMDP (NF) wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	RPMI-1640		YNB-SA		YNB-GS*	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
P1N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P2N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
P3N	100	100	100	100	25	50
P5N	>>100	>>100	>>100	>>100	100	>100
P6N	>>100	>>100	>>100	>>100	50	100
F1N	>>100	>>100	12,5	12,5	1,6	1,6
F2N	>>100	>>100	100	100	6,25	12,5
F3N	>>100	>>100	25	50	100	100
F5N	>>100	>>100	50	>100	3,1	3,1
F6N	>>100	>>100	>>100	>>100	50	100
C5N	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
AC5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
NF	4	8	0,125	0,25	0,125	0,125

Wartości podano w µg/mL.

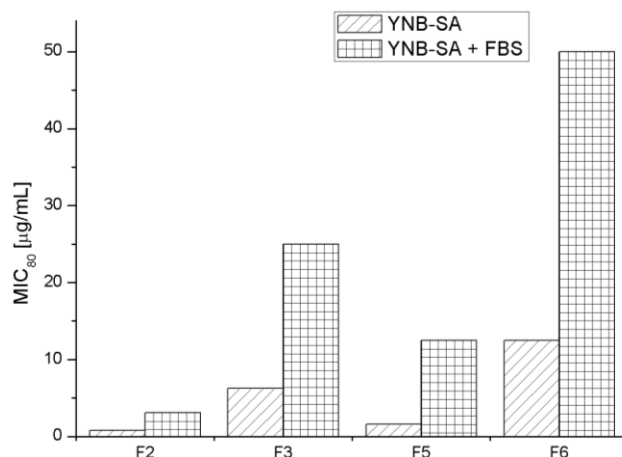
>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

4.3.3 Wpływ obecności surowicy w podłożu na aktywność przeciwgrzybową koniugatów

Zastosowana w doświadczeniu płodowa surowica bydlęca (FBS) stanowi bogate źródło substancji odżywczych, takich jak białka, np. BSA. Dane przedstawione na rys. 32 wskazują, że obecność surowicy w ilości 10% obj. wpłynęła na aktywność badanych związków – uzyskano wyraźnie wyższe wartości MIC niż w podłożu bez dodatku surowicy. W przypadku peptydów F2, F3 i F5 były to wartości 8 razy wyższe, a dla F6 – 4 razy wyższe. Stopień obniżenia aktywności w obecności surowicy jest niższy niż w przypadku obecności zestawu aminokwasów – drop-out (podr. 4.3.9). W przypadku Nva-FMDP nie zaobserwowano znaczącej zmiany w wyznaczonych wartościach MIC (w obu podłożach, z/bez FBS, MIC₈₀ wyniósł 0,125 µg/mL). Aktywność tego dipeptydu nie jest zatem zależna od obecności innych peptydów i białek w pożywce, których źródłem jest FBS.



Rys. 32 Wartości MIC₈₀ FMDP-CPP uzyskane w podłożu YNB-SA i YNB-SA z dodatkiem surowicy wobec *C. albicans* ATCC 10231.

4.3.4 Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów FMDP-peptydów i BADP-peptydów wobec szczepu *C. albicans* SC5314 i jego mutantów delecyjnych

Badania z wykorzystaniem mutantów delecyjnych szczepu *C. albicans* SC5314 miały na celu sprawdzenie czy aktywność koniugatów peptydów penetrujących z FMDP/BADP jest uzależniona od obecności zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej permeaz peptydowych typu PTR i OPT. Wykorzystano mutanty pozbawione pojedynczych genów kodujących permeazy peptydowe, a także mutanty z usuniętymi grupami genów czy wszystkimi najistotniejszymi genami permeaz PTR i OPT: *opt1*Δ, *opt2*Δ *opt3*Δ, *opt4*Δ, *opt5*Δ, *opt1-opt5*Δ, *opt1-opt5 ptr2*Δ *ptr22*Δ i *ptr2*Δ *ptr22*Δ (Reuß i Morschhäuser, 2006).

Badania aktywności koniugatów F3, F5 i peptydu penetrującego P3 wobec zestawu mutantów delecyjnych pozwoliły na zaobserwowanie znaczących różnic pomiędzy szczepami. Testowane koniugaty F3 i F5 okazały się być nieaktywne wobec dwóch mutantów: *opt1-opt5*Δ i *opt1-opt5 ptr2 ptr22*Δ. Mutant *ptr2 ptr22*Δ pozostał wrażliwy na działanie F3 i w mniejszym stopniu na działanie F5 (tab. 14). Można zatem zauważyć, że brak aktywności badanych koniugatów może być związany z brakiem genów permeaz OPT: *OPT1*, *OPT2*, *OPT3*, *OPT4* i *OPT5* w komórkach *C. albicans*. Dla decapeptydu P3 uzyskano bardzo podobne wartości MIC dla wszystkich badanych szczepów, stąd można przypuszczać, że mechanizm działania przeciwgrzybowego P3 nie jest zależny od obecności permeaz peptydowych PTR i OPT.

Tab. 14 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w podłożu YNB-SA wobec mutantów delecyjnych *C. albicans* SC5314: *opt1-opt5Δ*, *ptr2Δ ptr22Δ* i *opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ*.

	SC5314		<i>opt1-5Δ</i>		<i>ptr2Δ ptr22Δ</i>		<i>opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ</i>	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	3,1	12,5	>>100	>>100	3,1	12,5	>>100	>>100
F5	1,6	12,5	>>100	>>100	3,1	>100	>>100	>>100
P3	25	50	25	50	25	50	25	50
NF	0,125	0,25	0,125	0,25	>>16	>>16	>>16	>>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

Z uwagi na stwierdzony brak aktywności koniugatów F3 i F5 wobec mutantów *opt1-opt5Δ* i *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, w kolejnym kroku sprawdzono wpływ braku konkretnych genów lub grupy genów *OPT* na oporność wobec badanych związków (tab. 15).

Tab. 15 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w podłożu YNB-SA wobec mutantów delecyjnych *C. albicans* SC5314: *opt1Δ*, *opt2Δ opt3Δ*, *opt4Δ* i *opt5Δ*.

	<i>opt1Δ</i>		<i>opt2Δ opt3Δ</i>		<i>opt4Δ</i>		<i>opt5Δ</i>	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	6,3	>100	12,5	>100	3,1	>100	6,3	>100
F5	3,1	>100	>>100	>>100	3,1	>100	3,1	>100
NF	0,125	0,5	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

Mutant *opt2Δ opt3Δ* jako jedyny spośród tej grupy okazał się być oporny na działanie F5 (MIC₅₀>>100 µg/mL). Koniugat F3 wykazał działanie przeciwgrzybowe na podobnym poziomie wobec mutantów *opt1Δ*, *opt2Δ opt3Δ*, *opt4Δ* i *opt5Δ* pozbawionych kluczowych genów permeaz peptydowych *OPT*. Zebrane wyniki wskazują, że brak genów *OPT2* i/lub *OPT3* odgrywają większą rolę w oporności *opt1-opt5Δ* na F5 niż pozostałe geny *OPT*, natomiast podobną w oporności na F3.

Zaobserwowany brak wrażliwości związany z nieobecnością genów *OPT* może wskazywać na powiązanie wrażliwości na badane związki ze zdolnością do transportu tych związków przez permeazy oligopeptydowe *OPT*. Wynik ten potwierdza hipotezę sformułowaną w poprzednich podrozdziałach (m.in. podr. 4.3.4), że koniugaty F3 i F5 są transportowane do komórek *C. albicans* przez permeazy peptydowe, a nie wnikają w sposób charakterystyczny dla CPP, czyli niezależny od białek transportowych. Analogiczna sytuacja dotyczy koniugatów F1,

F2 i F6, a także grupy koniugatów o amidowanym C-końcu peptydu, dla których nie zaobserwowano działania przeciwgrzybowego do 100 µg/mL wobec mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* w podłożu YNB-SA (MIC >> 100 µg/mL).

Odmienne wyniki otrzymano dla koniugatów, w których nośnikiem FMDP jest oktaarginina (F7) i nonalizyna (F8). Otrzymane wartości zestawiono w tab. 16. Zarówno w podłożu RPMI-1640 jak i YNB-GS uzyskano zbliżone wartości MIC dla związku F7 wobec obu testowanych szczepów, co wskazuje na brak wpływu obecności permeaz peptydowych na aktywność koniugatu oktaargininy z FMDP. Jednak jego aktywność jest zależna od rodzaju źródła azotu. W podłożu YNB-SA zaobserwowano brak aktywności wobec szczepu SC5314 w zakresie do 400 µg/mL (MIC >> 400 µg/mL). Dla koniugatu F8 otrzymano kilkukrotnie wyższe wartości MIC wobec mutantu delecyjnego w podłożu YNB-GS niż wobec szczepu dzikiego SC5314, co wskazuje na brak lub nieznaczny udział permeaz peptydowych w przenoszeniu F8 do wnętrza komórki, jednak podobnie jak w przypadku F7, na działanie koniugatu nonalizyny ma wpływ źródło azotu znajdujące się w pożywce.

Tab. 16 Aktywność CPP, FMDP-CPP i Nva-FMDP w podłożu RPMI-1640 i YNB-GS wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i jego mutantu delecyjnego *opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ*.

		SC5314		<i>opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ</i>	
		MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
RPMI-1640	F7	100	400	50	100
	F8	>>400	>>400	>>400	>>400
	NF	4	8	>>128	>>128
YNB-GS*	F7	3,1	12,5	6,3	12,5
	F8	3,1	12,5	25	50
	NF	0,25	0,25	>>16	>>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

*Inkubację w podłożu YNB-GS prowadzono przez 48 h.

Przy oznaczaniu aktywności przeciwgrzybowej P3 i F3 w podłożu RPMI-1640 zaobserwowano utratę aktywności peptydu penetrującego po dołączeniu cząsteczki inhibitora na N-końcu peptydu. Podobnie, w ocenie wrażliwości mutantów delecyjnych na P3 i F3 wykazano brak wpływu permeaz peptydowych na działanie wolnego peptydu penetrującego, podczas gdy aktywność koniugatu była wyraźnie zależna od obecności genów *OPT*. Odmianą sytuację można zaobserwować w przypadku P3 i F3 o zmodyfikowanym C-końcu. Związki P3N i F3N wykazują zbliżone działanie wobec szczepu dzikiego SC5314 i mutantu delecyjnego *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* w podłożu YNB-SA (tab. 17). Amidowanie C-końca peptydu prawdopodobnie wpłynęło na sekwencję koniugatu uniezależniając mechanizm przenikania związku do wnętrza komórki grzybowej od obecności permeaz peptydowych. Zastanawiające jest zatem czy podstawą

aktywności F3N jest obecność inhibitora FMDP czy aktywność wolnego peptydu P3N. Ta kwestia została omówiona w podrozdziale 4.3.7 niniejszej pracy.

Tab. 17 Aktywność P3N, F3N i Nva-FMDP w podłożu YNB-SA wobec szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i jego mutantu delecyjnego *opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ*.

	SC5314		<i>opt1-5Δ ptr2Δ ptr22Δ</i>	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
P3N	100	100	100	100
F3N	100	100	100	100
NF	0,25	0,25	>>16	>>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

Jak wspomniano wcześniej, permeazy OPT są kodowane przez pięć genów *OPT1-OPT5*, przy czym pierwsze trzy prawdopodobnie odgrywają największą rolę w transporcie peptydów (Reuß i Morschhäuser, 2006). W opinii Morschhäusera i współpracowników, brak możliwości wzrostu potrójnego mutantu *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* w podłożu YCB-BSA wynika z niezdolności komórek do pobierania peptydów pochodzących z endoproteolitycznego trawienia BSA, a wprowadzenie genu *OPT2* do mutantu *opt1Δ opt2Δ opt3Δ* przywracało jego zdolność do wzrostu (Park i Morschhäuser, 2005; Reuß i Morschhäuser, 2006). Badania grupy prof. Morschhäusera wykazały również, że komórki grzybowe *C. albicans* SC5314 są zdolne do pobierania oligopeptydów o długości do ośmiu reszt aminokwasowych (Reuß i Morschhäuser, 2006). Badany peptyd penetrujący P3 jest decapeptydem, jednak jak wspomniano jego mechanizm działania jest niezależny od pracy permeaz peptydowych, dlatego zachowuje on aktywność wobec mutantów delecyjnych *opt1-opt5Δ* i *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, podczas gdy peptyd F3 różniący się od P3 obecnością FMDP na N-końcu peptydu jest nieaktywny wobec tych szczepów. Brak aktywności peptydu F3 może być spowodowany obecnością inhibitora I mechanizmem transportu do komórki opartym na permeazach peptydowych zatem przeprowadzone badania wskazują, że peptyd o długości jedenastu reszt aminokwasowych może być również substratem dla permeaz oligopeptydowych OPT.

4.3.5 Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów wobec klinicznych wielolekoopornych szczepów *C. albicans*

Wykonano badania mające na celu określenie aktywności peptydów i ich koniugatów z inhibitorami wobec wielolekoopornych, klinicznych szczepów *C. albicans* Gu4, B3 (fenotypy wrażliwe) oraz Gu5, B4 (fenotypy odporne). Oporność szczepu Gu5 jest oparta o nadekspresję pomp wielolekowych typu ABC: CDR1p i CDR2p, natomiast oporność szczepu B4 wynika z nadekspresji MDR1p, pompy typu MFS (Franz i in. 1998; Franz i in. 1999).

Wcześniejsze badania aktywności dipeptydów i tripeptydów z wbudowanym FMDP na C-końcu wobec komórek grzybowych *C. albicans* oraz *S. cerevisiae* z nadekspresją pomp wielolekowych typu ABC, Cdr1p pochodzących z *C. albicans* wykazały, że peptydy-FMDP nie są substratami pomp i w konsekwencji nie są ‘wyrzucane’ przez pompy poza komórkę. Ponadto, wyniki badań wskazały na szczególną nadwrażliwość wielolekoopornych szczepów z nadekspresją białek Cdr1p i Cdr2p na badane peptydy-FMDP (Milewski i in. 2001; Wakieć i in. 2008). W podłożu RPMI-1640 uzyskano 16 razy niższe wartości MIC dla szczepu Gu5 niż dla szczepu Gu4, podczas gdy dla B3 i B4 wartości MIC były zbliżone (Wakieć i in. 2008). Zaobserwowana nadwrażliwość związana jest prawdopodobnie ze zwiększeniem transbłonowego gradientu protonowego spowodowanego pracą pomp wyrzucających leki, co skutkuje bardziej efektywnym transportem krótkich peptydów-FMDP przez system permeaz peptydowych napędzanych siłą powstałego gradientu.

Uzyskane przeze mnie wyniki aktywności koniugatów peptydów penetrujących F3 i F5 przedstawione w tab. 18 wskazują na brak różnic między parami szczepów. Obserwacja ta dotyczy również związku kontrolnego – Nva-FDMP. Wartości MIC uzyskane dla tego dipeptydu nie są zgodne z wcześniejszymi wynikami Wakiecia i in., co prawdopodobnie związane jest z rodzajem stosowanego podłoża. W swoich badaniach Wakieć i in. zastosowali podłoże RPMI-1640, podczas gdy w moich badaniach użyłam podłoża minimalnego YNB-SA. Podłoże to zostało zastosowane z powodu braku aktywności koniugatów w podłożu RPMI-1640. Prawdopodobnie pH i/lub składniki podłoża YNB-SA mają wpływ na aktywność koniugatów peptydów o różnej długości z FMDP. Jako związek kontrolny dla szczepów klinicznych wybrano flukonazol. Otrzymane wartości MIC odnoszące się do wrażliwości szczepów klinicznych na flukonazol są zgodne z danymi literaturowymi (Franz i in. 1999).

Tab. 18 Aktywność FMDP-CPP, flukonazolu (FLC) i Nva-FMDP (NF) w YNB-SA wobec wrażliwych (Gu4, B3) i wielolekoopornych (Gu5, B4) klinicznych szczepów *C. albicans*.

	Gu4		Gu5		B3		B4	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	3,1	25	6,25	>100	3,1	25	3,1	12,5
F5	1,6	50	3,1	>100	3,1	25	1,6	12,5
FLC	1	1	>>128	>>128	0,5	0,5	32	32
NF	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli
> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

4.3.6 Aktywność przeciwgrzybowa peptydów i koniugatów wobec innych grzybów z rodzaju *Candida*

Aktywność FMDP-CPP określono również wobec innych niż *C. albicans* grzybów z rodzaju *Candida* mianowicie *C. glabrata* DSM II 226, *C. parapsilosis* DSM 5784 i *C. krusei* DSM 6128. Oznaczenie wykonano w podłożu YNB-SA (tab. 19). Dodatkowo dla porównania w tabeli zamieszczono ponownie wyniki uzyskane dla szczepu *C. albicans* ATCC 10231.

Tab. 19 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w YNB-SA wobec *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*.

	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. glabrata</i> DSM II 226		<i>C. parapsilosis</i> DSM 5784		<i>C. krusei</i> DSM 6128	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F1	0,4	0,8	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
F2	0,4	0,8	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
F3	3,1	6,3	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
F5	0,8	1,6	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
F6	12,5	12,5	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100	>>100
NF	0,125	0,25	8	8	4	4	>>16	>>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

Uzyskane wartości MIC wskazują na brak aktywności badanych FMDP-CPP na inne niż *C. albicans* komórki grzybowe z rodzaju *Candida*. Kontrolny peptyd Nva-FMDP powoduje zatrzymanie wzrostu grzybów z gatunku *C. glabrata* DSM II 226 i *C. parapsilosis* DSM 5784 przy wyższym stężeniu niż w przypadku *C. albicans*, natomiast wobec *C. krusei* DSM 6128 wykazuje brak aktywności.

Różnice w aktywności Nva-FMDP i koniugatów mogą być spowodowane ewentualnym istnieniem odmiennych mechanizmów transportu związków peptydowych do komórek grzybowych różnych gatunków grzybów z rodzaju *Candida*. Niestety brak jest danych literaturowych dotyczących tej kwestii dla drożdżaków innych niż *C. albicans*.

4.3.7 Wpływ obecności *N*-acetylo-*D*-glukozaminy w podłożu na aktywność przeciwgrzybową peptydów i ich koniugatów z FMDP i BADP

Zdecydowana większość badanych koniugatów posiada w swoim składzie inhibitor syntazy GlcN-6-P, FMDP w przypadku F1, F2, F3, F5, F6, F7 i F8 lub BADP w przypadku B1 i B5. Zahamowanie aktywności syntazy GlcN-6-P uniemożliwia biosyntezę składników ściany komórkowej grzybów, chityny i mannoprotein, z uwagi na brak endogennych cząsteczek glukozamino-6-fosforanu, czyli produktu reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P. GlcN-6-P jest przekształcany w kolejnych etapach w UDP-GlcNAc czyli UDP-*N*-acetylo-*D*-

glukozaminę. Ostatni etap przeprowadzany przez inny enzym, syntazę chityny, odpowiada za przyłączanie fragmentów NAG z UDP-GlcNAc do rosnącego łańcucha polimeru chityny. Z danych literaturowych wiadomo, że obecność w podłożu hodowlanym NAG w odpowiednim stężeniu chroni komórki grzybowe przed grzybobójczym działaniem inhibitorów syntazy GlcN-6-P (Milewski i in. 1983).

W moich badaniach sprawdziłam, czy podobne zjawisko występuje dla koniugatów peptydów z FMDP lub BADP. Z uwagi na aktywność badanych koniugatów w różnych podłożach minimalnych, w tym oznaczeniu w przypadku koniugatów z FMDP, zastosowano podłoże YNB-SA, natomiast w przypadku koniugatów F7 i F8 oraz koniugatów z BADP podłoże YNB-GS. Wyniki zestawiono w tabelach poniżej (tab. 20, tab. 21).

Uzyskane wartości MIC badanych koniugatów peptydów penetrujących, F3, F5 i F6, a także peptydu kontrolnego Nva-FMDP odpowiadają lub znacznie przekraczają najwyższe stężenia związków zastosowanych podczas eksperymentu, co wskazuje na powiązanie aktywności koniugatów peptydów i dipeptydu Nva-FMDP z inhibicją syntazy GlcN-6-P wywołaną przez odłączy od cząsteczki FMDP (tab. 20). Również w przypadku koniugatów oktaorganiny i nonalizyny z FMDP zaobserwowano brak działania badanych związków w obecności NAG w podłożu YNB-GS (tab. 21). Przeciwgrzybowe działanie związków grupy F opiera się zatem na inhibicji syntazy GlcN-6-P.

Tab. 20 Aktywność koniugatów peptydów z FMDP i Nva-FMDP w YNB-SA oraz YNB-SA z dodatkiem NAG wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-SA		YNB-SA + NAG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F2	0,4	0,8	12,5	25
F3	3,1	6,3	100	>100
F5	1,6	3,1	>>100	>>100
F6	12,5	12,5	>>100	>>100
NF	0,125	0,25	16	>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

Tab. 21 Aktywność koniugatów peptydów z FMDP i Nva-FMDP w YNB-GS oraz YNB-GS z dodatkiem NAG wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-GS*		YNB-GS* + NAG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F7	6,3	6,3	>>400	>>400
F8	6,3	12,5	>>400	>>400
NF	0,25	0,25	16	>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Wartości MIC uzyskane dla koniugatów peptydów amidowanych na C-końcu w obecności NAG w podłożu YNB-GS podobnie jak w przypadku koniugatów z wolnym C-końcem wskazują na przeciwgrzybowe działanie oparte o inhibicję enzymu (tab. 22). Odmienne wyniki uzyskano dla związku F3N. Jego działanie jest niezależne od obecności NAG i prawdopodobnie opiera się na mechanizmie niezależnym od obecności permeaz peptydowych, co było już sugerowane w poprzednich podrozdziałach, m.in. w podr. 4.3.4.

Tab. 22 Aktywność koniugatów amidowanych na C-końcu peptydów z FMDP i Nva-FMDP w YNB-GS oraz YNB-GS z dodatkiem NAG wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-GS*		YNB-GS* + NAG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F1N	1,6	1,6	>>25	>>25
F2N	6,25	12,5	>>25	>>25
F3N	100	100	100	100
F5N	3,1	3,1	>>25	>>25
F6N	50	100	>>400	>>400
NF	0,25	0,25	16	>16

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

W przypadku koniugatów z BADP, można wyciągnąć podobne wnioski analizując wartości MIC uzyskane dla koniugatu B1 (tab. 23). Otrzymane wartości są zbliżone do najwyższego stężenia związku zastosowanego podczas eksperymentu. Wartości MIC są 8 razy wyższe niż w podłożu bez NAG, zatem aktywność przeciwgrzybowa koniugatu B1 jest konsekwencją obecności w cząsteczce inhibitora syntazy GlcN-6-P, BADP. Co ciekawe, nie uzyskano zwiększenia wartości MIC w przypadku koniugatu B5 (IC₅₀ = 81,3 µg/mL, z NAG: IC₅₀ = 75,9 µg/mL), który również zawiera w swojej sekwencji ten inhibitor, podczas gdy aktywność koniugatu F5 jak przedstawiono wyżej (tab. 20) jest konsekwencją obecności FMDP.

Tab. 23 Aktywność koniugatów peptydów z BADP i Nva-FMDP (NF) w YNB-GS oraz YNB-GS z dodatkiem NAG wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-GS*		YNB-GS* + NAG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
B1	6,3	12,5	50	100
B5	100	100	100	100
NF	0,125	0,125	16	>16

Wartości podano w µg/mL.

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

* - w przypadku podłoża YNB-GS inkubacja była prowadzona przez 48 h

Uzyskane wyniki potwierdzają, że działanie przeciwgrzybowe koniugatów F1, F2, F3, F5, F6 i B1 jest konsekwencją zahamowania aktywności syntazy GlcN-6-P. Stanowią także pośredni dowód na to, że koniugaty po wniknięciu do komórek są hydrolizowane, w wyniku czego zostaje uwolniony inhibitor syntazy GlcN-6-P.

4.3.8 Wpływ obecności inhibitorów endocytozy na aktywność przeciwgrzybową P3N wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231

Aktywność przeciwgrzybowa peptydów P3 i P3N została zaobserwowana we wszystkich trzech wykorzystanych w badaniach podłożach. Co więcej peptydy wykazały aktywność wobec mutantu szczepu SC5314 pozbawionego wszystkich istotnych permeaz peptydowych wskazując na brak powiązania ich mechanizmu działania z tymi transporterami Dlatego w kolejnym kroku podjęto próbę sprawdzenia czy związek P3N przedostaje się do komórki grzybowej na drodze endocytozy. W tym celu, poprzez wyznaczenie wartości MIC, określono wpływ wybranych inhibitorów endocytozy (amiloryd, chlorpromazyna, cytochalazyna D, nokodazol) na efekt grzybobójczy P3N. Z literatury wiadomo, że amiloryd ogranicza makropinocytozę (Doan i in. 2012; Gomez i in. 2010), chlorpromazyna i nokodazol hamują endocytozę zależną od klatryny (Bayer i in. 1998; Doan i in. 2012; Gomez i in. 2010), natomiast cytochalazyna D uniemożliwia makropinocytozę i endocytozę opartą o kaweolinę (Gomez i in. 2010).

Dzięki przeprowadzonym badaniom zaobserwowano brak wpływu obecności wybranych inhibitorów endocytozy (w przyjętych wartościach stężeń, tab. 24, według Gomez i in. 2010) na aktywność przeciwgrzybową związku P3N w podłożu RPMI-1640. Otrzymano takie same wartości MIC dla peptydu bez dodatku i z dodatkiem inhibitorów endocytozy (tab. 24).

Tab. 24 Aktywność peptydu P3N (P3 z amidowanym C-końcem) w podłożu RPMI-1640 w obecności wybranych inhibitorów endocytozy wobec *C. albicans* ATCC 10231.

Badany związek /+ inhibitor endocytozy	Stężenie inhibitora [μ M]	RPMI-1640	
		MIC ₅₀	MIC ₈₀
P3N	0	200	200
P3N + amiloryd	5	200	200
P3N + chlorpromazyna	28	200	200
P3N + cytochalazyna D	10	200	200
P3N + nokodazol	2	200	200

W tabeli podano zastosowane stężenia poszczególnych inhibitorów [μ M]. Stężenia związków zostały dobrane na podstawie danych literaturowych (Gomez i in. 2010). Wartości MIC podano w μ g/mL.

Prawdopodobnie badany peptyd o amidowanym C-końcu nie wnika do komórki grzybowej dzięki endocytozie, a jest transportowany na drodze bezpośredniego przenikania przez barierę błony komórkowej (model klepek beczki, model porów toroidalnych, model odwróconych miceli, model dywanowy). Zaproponowane do tej pory teorie dotyczące mechanizmów transportu peptydów penetrujących do komórek grzybowych zostały opisane w części teoretycznej niniejszej rozprawy (podroz. 2.4).

W celu jednoznacznego wykluczenia endocytozy jako mechanizmu wnikania peptydu P3N do komórek grzybowych należałoby określić możliwość transportu znakowanego fluorescencyjnie peptydu do komórek po uprzedniej inkubacji zawiesiny z inhibitorem endocytozy z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i/lub cytometrii przepływowej. Prace w tym zakresie będą kontynuowane w KTLiB WCH PG.

4.3.9 Poszukiwanie przyczyn różnic aktywności koniugatów w różnych podłożach

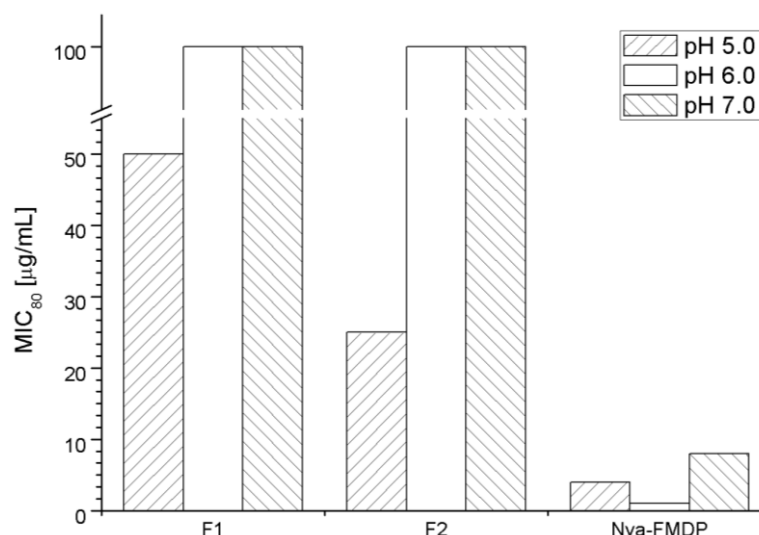
Stwierdzona wysoka aktywność koniugatów FMDP-CPP w podłożach minimalnych, YNB-SA i YNB-GS, oraz brak ich aktywności w podłożu RPMI-1640 wobec *C. albicans* ATCC 10231 była zaskakująca. Podjęłam próbę wyjaśnienia przyczyn tych różnic. Określiłam wpływ pH podłoża RPMI-1640 i podłoża YNB-SA, a także poszczególnych składników podłoża RPMI-1640 na aktywność badanych związków.

Podłoże RPMI-1640 jest podłożem syntetycznym, którego skład jest zbliżony do warunków fizjologicznych. W porównaniu do podłoża minimalnych, podłoże RPMI-1640 zawiera czerwień fenolową jako wskaźnik pH, glutation, zestaw aminokwasów, chlorek sodu oraz jest buforowane kwasem 3-(*N*-morfolino)-propensulfonowym (MOPS). Podłoża różnią się również wartością pH. Podłoże RPMI-1640 ma pH 7.0, natomiast podłoża minimalne YNB mają pH ok. 5.4.

W celu wyjaśnienia różnic w aktywności badanych związków sporządzono podłoża RPMI-1640 o pH 5.0 oraz o pH 6.0, podłoże RPMI-1640 bez buforu MOPS, szereg podłoży

YNB-SA o pH od 4.0 do 6.5, a także podłoże YNB-SA z dodatkiem czerwieni fenolowej (0,0053 g/L), glutationu (0,001 g/L) lub chlorku sodu (6 g/L) oraz podłoże YNB z dodatkiem pojedynczych aminokwasów, L-argininy (0,2 g/L), L-glutamininy (0,3 g/L), a także zestawu aminokwasów (drop-out). Wyznaczono również wartości MIC w podłożu bogatym w peptydy (YPG). Wyniki uzyskane dla koniugatów peptydów z FMDP przedstawiono na wykresach i tabelach poniżej.

W badaniu aktywności w podłożu RPMI-1640 o różnych wartościach pH, zaobserwowano różnice w otrzymanych wartościach MIC w przypadku związków F1 i F2, a także niewielką zmianę aktywności dipeptydu kontrolnego – Nva-FMDP (rys. 33). Przy pH 5.0, czyli pH zbliżonym do pH podłoża minimalnego, aktywność przeciwrzybowa peptydów F1 i F2 wyrażona przez MIC₈₀ wynosiła odpowiednio 50 i 25 µg/mL, podczas gdy w podłożu RPMI-1640 o wyższych wartościach pH, tj. pH 6.0 i pH 7.0 wartości MIC były niewyznaczalne w zakresie do 100 µg/mL (>> 100 µg/mL).



Rys. 33 Wartości MIC₈₀ F1, F2 i Nva-FMDP uzyskane w RPMI-1640 o pH 5.0, pH 6.0 i pH 7.0.

W kolejnym etapie sprawdzono czy poszczególne składniki podłoża RPMI-1640 dodawane do podłoża YNB-SA – takie jak glutation, chlorek sodu czy czerwien fenolowa – mają wpływ na aktywność badanych związków. Dodatkowo przygotowano podłoże RPMI-1640 bez dodatku buforu MOPS aby sprawdzić czy może obecność buforu wpływa na wartości MIC FMDP-CPP. Wyniki zestawiono w tab. 25-27.

Uzyskane wartości MIC w podłożu YNB-SA z dodatkiem glutationu czy chlorku sodu (tab. 25) są zbliżone do wartości uzyskanych z podłożu YNB-SA bez tych składników. Glutation oraz chlorek sodu w ilości w jakiej występują w podłożu RPMI-1640 nie wpływają na aktywność badanych FMDP-CPP oraz związku kontrolnego Nva-FMDP.

Tab. 25 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w YNB-SA, YNB-SA z glutationem i YNB-SA z chlorkiem sodu wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-SA		YNB-SA + glutation		YNB-SA + NaCl	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	3,1	6,3	12,5	12,5	6,3	6,3
F5	1,6	3,1	3,1	3,1	1,6	1,6
NF	0,125	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5

Wartości podano w µg/mL.

Również dodatek czerwieni fenolowej, wskaźnika pH zawartego w podłożu RPMI-1640, do podłoża YNB-SA, a także badanie przeprowadzone w podłożu RPMI-1640 pozbawionym MOPS nie wykazało istotnego wpływu tych czynników na wartości MIC badanych związków (tab. 26, tab. 27). W obecności i nieobecności czerwieni fenolowej w podłożu minimalnym peptydy mają zbliżoną aktywność. W przypadku kontrolnego dipeptydu brak buforu MOPS skutkuje zmniejszoną aktywnością Nva-FMDP wobec komórek grzybowych – uzyskane wartości MIC były ośmiokrotnie wyższe niż dla podłoża buforowanego MOPS (tab. 27), zatem buforowanie podłoża RPMI-1640 jest kluczowe dla aktywności badanego związku.

Tab. 26 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w YNB-SA i YNB-SA z czerwiecią fenolową wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-SA		YNB-SA + czerwień fenolowa	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	3,1	6,3	3,1	12,5
F5	1,6	3,1	1,6	3,1
NF	0,125	0,25	0,25	0,5

Wartości podano w µg/mL.

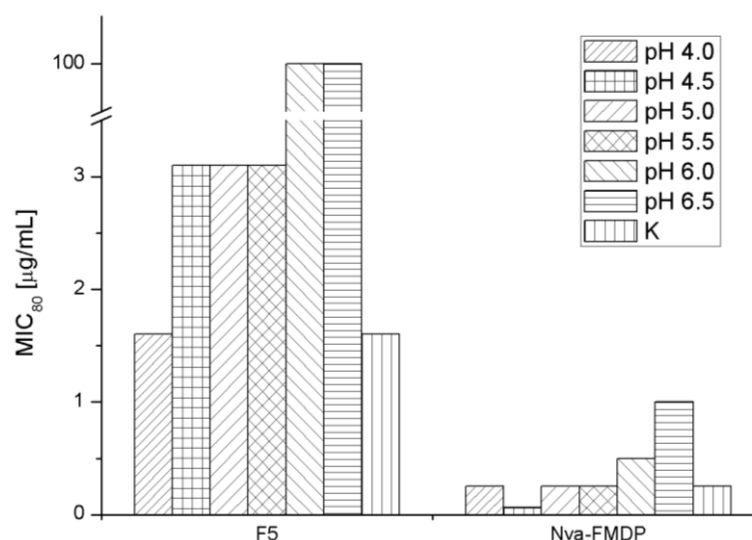
Tab. 27 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w RPMI-1640 i RPMI-1640 bez dodatku MOPS wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	RPMI-1640		RPMI-1640 bez MOPS	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F2	>>100	>>100	>>100	>>100
F3	>>100	>>100	>>100	>>100
F5	>>100	>>100	>>100	>>100
F6	>>100	>>100	>>100	>>100
NF	4	8	32	64

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

Wykonano również badanie wpływu pH podłoża minimalnego YNB-SA na aktywność wybranego FMDP-CPP – F5. Można zauważyć gwałtowne zmniejszenie aktywności badanego koniugatu w podłożu o pH 6.0 i 6.5 (rys. 34). W badanym zakresie stężeń, w podłożu o pH 6.0 i 6.5 związek F5 nie wykazał aktywności. Również w przypadku związku kontrolnego, Nva-FMDP w podłożu YNB-SA o pH 6.5 uzyskano najwyższą wartość MIC. Ten wynik wskazuje na istotną rolę pH pożywki w aktywności koniugatów, a podobny efekt dla Nva-FMDP sugeruje możliwość, że koniugaty, podobnie jak Nva-FMDP są transportowane przez permeazy peptydowe.



Rys. 34 Wartości MIC₈₀ F5 i Nva-FMDP uzyskane w podłożach YNB-SA od pH 4.0 do 6.5 wobec *C. albicans* ATCC 10231. Kontrola (K) stanowi MIC wyznaczony w podłożu YNB-SA (pH ok. 5.2).

Dodatkowo określono wpływ pojedynczych aminokwasów (L-arginina, L-glutamina – aminokwasów obecnych w podłożu RPMI-1640 w najwyższym stężeniu) oraz zestawu aminokwasów (drop-out) dodanych do podłoża minimalnego YNB na aktywność badanych FMDP-CPP. Wyniki zestawiono w tab. 28.

Tab. 28 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w podłożu YNB-SA, YNB z dodatkiem L-Arg i L-Gln oraz w podłożu YNB z dodatkiem zestawu aminokwasów (drop-out) wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YNB-SA		YNB + L-Arg + L-Gln		YNB + drop-out	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	3,1	6,3	3,1	6,3	100	>100
F5	1,6	3,1	6,3	12,5	>>100	>>100
NF	0,125	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń

Aktywność badanych peptydów F3 i F5 w podłożu z dodatkiem zestawu aminokwasów w formie drop-out jest wyraźnie niższa niż w podłożu z siarczanem amonu lub dodatkiem L-Arg i L-Gln jako źródła azotu. Warto przypomnieć, że brak aktywności badanych koniugatów peptydów penetrujących z FMDP zaobserwowano również w podłożu RPMI-1640. Przyczyną niskiej aktywności lub braku aktywności w podłożu z drop-out i RPMI-1640 może być obecność zestawu aminokwasów. Podłoże YNB z dodatkiem drop-out ma pH zbliżone do pH podłoża YNB-SA (pH ok. 5.2), natomiast podłoże RPMI-1640 ma pH 7.0. Można zatem wywnioskować, że wartość pH w tym przypadku nie ma znaczącego wpływu na aktywność przeciwgrzybową badanych koniugatów F3 i F5, nadrzędny wpływ ma natomiast obecność zestawu aminokwasów i innych peptydów w pożywce. Związek kontrolny Nva-FMDP zachowuje aktywność w obu podłożach, przy czym aktywność w podłożu YNB z drop-out jest identyczna jak w YNB-SA. Ponieważ aktywność tego peptydu w RPMI-1640 była 64-krotnie niższa niż w YNB-SA, może to oznaczać, że w przypadku Nva-FMDP pH podłoża ma wpływ na jego aktywność przeciwgrzybową. Warto podkreślić, że Nva-FMDP jest dipeptydem transportowanym do komórek grzybowych dzięki permeazom peptydowym PTR, natomiast koniugaty F3 i F5 należą do pochodnych oligopeptydów i zawierają odpowiednio jedenaście i siedem reszt aminokwasowych. Bardzo możliwe, że badane koniugaty są transportowane przez inny niż PTR system transportu peptydów, prawdopodobnie permeazy oligopeptydowe OPT.

Z uwagi na zaobserwowany brak aktywności badanych związków FMDP-CPP w podłożu YNB z drop-out wykonano również badanie w podłożu bogatym YPG, zawierającym Bacto Pepton, czyli produkty proteolizy białek, w tym aminokwasy i peptydy (tab. 29).

Tab. 29 Aktywność FMDP-CPP i Nva-FMDP w YPG wobec *C. albicans* ATCC 10231.

	YPG	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F3	>>100	>>100
F5	>>100	>>100
NF	0,063	0,125

Wartości podano w µg/mL.

>> - wartości MIC niewyznaczalne w obranym zakresie stężeń, wartość absorbancji przy najwyższym stężeniu badanego związku zbliżona do wartości absorbancji kontroli hodowli

Zaobserwowano brak aktywności badanych koniugatów FMDP-CPP, podczas gdy dipeptyd Nva-FMDP, uzyskał wyższą aktywność niż w podłożu RPMI-1640. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że obecność mieszaniny aminokwasów w RPMI-1640 lub peptydów w podłożu YPG prawdopodobnie uniemożliwia wywołanie efektu grzybobójczego przez testowane koniugaty peptydów (uważanych za penetrujące) z FMDP. Taki efekt nie byłby jednak możliwy, gdyby zastosowane nośniki oligopeptydowe miały faktyczny charakter CPP,

gdyż ani obecność aminokwasów, ani peptydów nie ma wpływu na transport CPP do komórek. Tak więc już na podstawie wyników oznaczeń aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* można wysunąć hipotezę, że peptydy P1, P2, P5, P6, P7, P8 i ich koniugaty z FMDP nie mają charakteru CPP, także w wersji amidowanej na C-końcu. Prawdopodobnie są one transportowane do komórek *C. albicans* za pośrednictwem systemu transportu oligopeptydów OPT. Powiązanie transportu aktywnych związków peptydowych ze składem podłoża został już wcześniej opisany. Udowodniono, że systemy transportu peptydów u drożdży są regulowane przez metabolizm związków będących źródłem azotu i stymulowane dodatkiem śladowych ilości pojedynczych aminokwasów (Basrai i in. 1992; Island i in. 1987). Przymuszczalnie zależności te dotyczą jedynie transporterów di-/tripeptydowych, a nie oligopeptydowych pobierających tetra- i pentapeptydy (Basrai i in. 1992).

Uzyskanie kolejnych przesłanek umożliwiających weryfikację sformułowanej powyżej hipotezy dotyczącej przypuszczalnej drogi transportu koniugatów było możliwe dzięki przeprowadzeniu kolejnych eksperymentów.

4.3.10 Ocena możliwości powstawania mutacji spontanicznych w obecności peptydów i koniugatów peptydów-FMDP

Generowanie potencjalnych mutantów spontanicznych, opornych na peptydy przeciwgrzybowe transportowane przez permeazy peptydowe jest zjawiskiem znanym, badanym także przeze mnie (podr. 4.2).

Doświadczenie mające na celu sprawdzenie czy badane koniugaty indukują powstawanie oporności w komórkach *C. albicans* ATCC 10231 polegało na stwierdzeniu obecności strefy zahamowania wzrostu, a także pojedynczych kolonii w tej strefie. Dipeptyd, Nva-FMDP został użyty jako kontrola pozytywna. Test przeprowadzono na stałym podłożu YNB-SA. Obserwacje zostały zestawione w tab. 30.

Wokół krążków, na które naniesiono roztwory peptydów z grupy P nie zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu, co jest zgodne z uzyskanymi wartościami MIC w podłożu minimalnym YNB-SA, gdzie stwierdzono brak aktywności badanych związków. Peptyd P3 jako jedyny spośród grupy tych peptydów wykazał działanie przeciwgrzybowe przy stężeniu wynoszącym 50 µg/mL, jednak wokół krążka, na który naniesiono 10 µg tego związku nie zaobserwowano strefy zahamowanego wzrostu, prawdopodobnie z uwagi na zastosowane zbyt niskie stężenie peptydu. Wykonując test dla koniugatów peptydów penetrujących z FMDP i dipeptydu, Nva-FMDP, otrzymano strefy zahamowania wzrostu – największe dla peptydów: Nva-FMDP, F1 i F2. Nie stwierdzono kolonii wewnątrz stref zahamowania wzrostu przez F1, F2 i F3, natomiast wewnątrz strefy zahamowania wzrostu przez F5 zaobserwowano kilka kolonii. Dużą liczbę kolonii (ponad 3 razy więcej, niż w strefie wokół krążka z roztworem F5) stwierdzono wewnątrz strefy zahamowania wzrostu uzyskanej przez działanie Nva-FMDP. Warto

w tym miejscu przypomnieć, że Nva-FMDP jest transportowany do komórek przez permeazy PTR, natomiast koniugaty F1, F2, F3 i F5 prawdopodobnie przez permeazy OPT.

Brak indukowania spontanicznych „mutantów” opornych przez peptydy F1, F2 i F3 jest bez wątpienia cechą korzystną biorąc pod uwagę ich potencjalne zastosowanie w terapii infekcji grzybowych.

Tab. 30 Strefy zahamowania wzrostu i obecność mutantów spontanicznych uzyskane dla FMDP-CPP i Nva-FMDP na stałym podłożu YNB-SA.

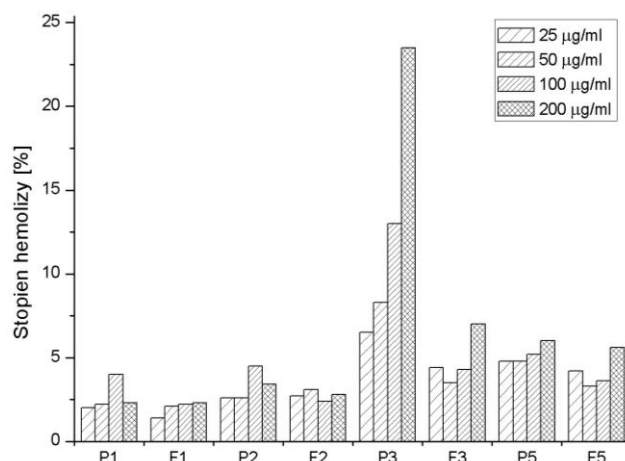
Związek	Stężenie [mg/mL]	Zawartość związku na krążku [µg]	Strefa zahamowania wzrostu [mm]	Obecność pojedynczych kolonii w strefie
P1	4	40	0	-
P2	4	40	0	-
P3	1	10	0	-
P5	4	40	0	-
F1	4	40	35	-
F1	1	10	30	-
F2	1	10	30	-
F3	4	40	23	-
F3	1	10	12	-
F5	4	40	22	+
F5	1	10	15	+
NF	1	10	40	+++

‘+’ oznacza obecność kolonii na obszarze strefy zahamowania wzrostu.

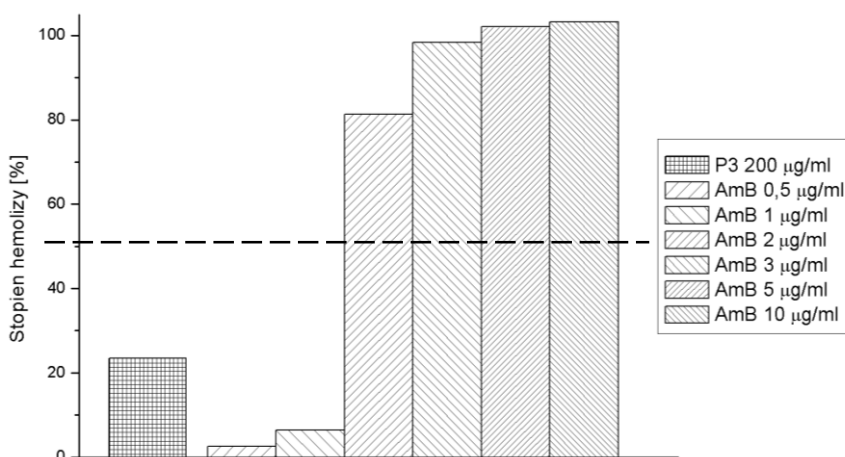
4.3.11 Właściwości hemolityczne peptydów i koniugatów

Ocena właściwości hemolitycznych CPP i FMDP-CPP polegała na wyznaczeniu parametru EH₅₀. Z uwagi na aktywność przeciwgrzybową związków P3, F1, F2, F3 i F5 oznaczenie parametru EH₅₀ tych związków było najbardziej istotne.

Spośród badanych związków tylko dekapeptyd penetrujący P3 wywołał hemolizę przy najwyższym testowanym stężeniu tj. 200 µg/mL na poziomie 23,5%, podczas gdy związek kontrolny AmB przy stężeniu niższym, 3 µg/mL, wywołał prawie 100% wypływ hemoglobiny z erytrocytów. W przypadku AmB stwierdzono wysoki stopień hemolizy, w wyraźny sposób zależny od stężenia, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Yu i in. 1998). Dla AmB uzyskano EH₅₀ = 1,59 µg/mL. Pozostałe badane związki, peptydy penetrujące i ich koniugaty z FMDP nie wykazały aktywności hemolitycznej - stopień hemolizy nie przekroczył 15% przy najwyższym badanym stężeniu tj. 200 µg/mL. Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach poniżej (rys. 35, rys. 36).



Rys. 35 Stopień hemolizy wywołanej przy danym stężeniu CPP i FMDP-CPP [%].

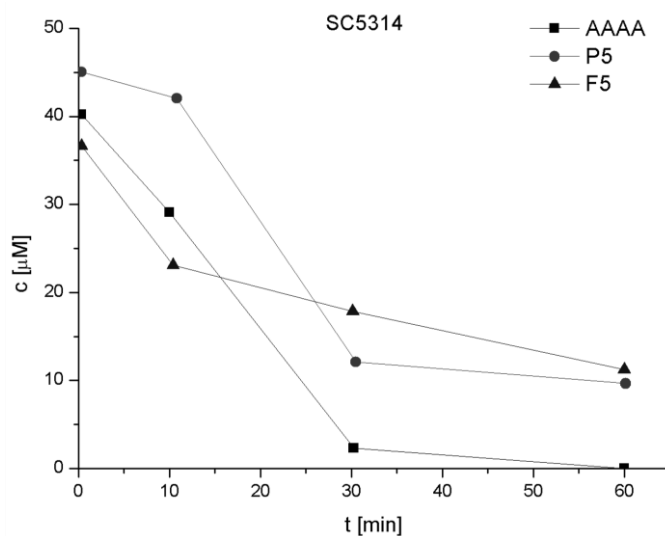


Rys. 36 Stopień hemolizy wywołany przez peptyd penetrujący P3 (200 µg/mL) i związek referencyjny AmB w badanym zakresie stężeń [%]. Przerzywną linią zaznaczono 50% stopień hemolizy.

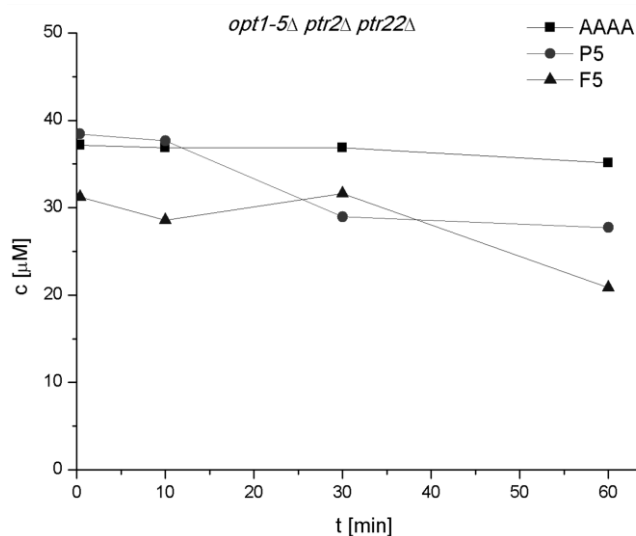
4.3.12 Kinetyka pobierania tetrapeptydu modelowego oraz koniugatów heksapeptydu P5 z FMDP i cispentacyną do komórek grzybowych

Z uwagi na różnice w zaobserwowanej aktywności przeciwgrzybowej peptydów z grupy P i ich koniugatów z inhibitorami enzymatycznymi, kolejny etap badań został poświęcony ocenie szybkości ich transportu do komórek grzybowych. Zbadano heksapeptyd P5, jego koniugat z FMDP (F5), a także z cispentacyną (C5). Tetrapeptydu modelowego Ala-Ala-Ala-Ala użyto jako związku kontrolnego.

Wyznaczono początkową szybkość transportu heksapeptydu P5 i heptapeptydu F5. W celu dokonania charakterystyki porównawczej obu związków badanie wykonano wobec komórek grzybowych *C. albicans* SC5314 oraz jego mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* pozbawionego genów kodujących permeazy peptydowe PTR i OPT. Otrzymane wyniki przedstawiono jako zależność zmian stężenia badanego peptydu w czasie trwania inkubacji zawiesiny komórek z roztworem badanego peptydu (rys. 37, rys. 38).



Rys. 37 Zmiany stężenia peptydu (AAAA, P5, F5) w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0 podczas inkubacji zawiesiny komórek *C. albicans* SC5314.



Rys. 38 Zmiany stężenia peptydu (AAAA, P5, F5) w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0 podczas inkubacji zawiesiny komórek *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*

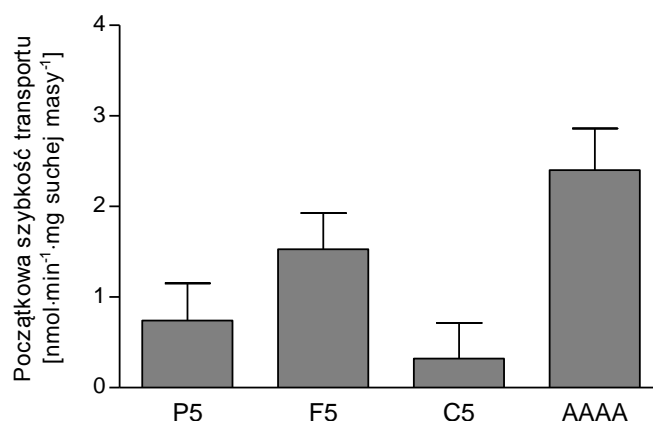
Na podstawie uzyskanych wyników można zaobserwować, że szczep *C. albicans* SC5314 jest zdolny do pobierania peptydu P5 i jego koniugatu z FMDP, czyli F5 (rys. 37), natomiast mutant pozbawiony wszystkich istotnych permeaz peptydowych, *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, nie transportuje tych związków z taką samą szybkością (rys. 38). W przypadku *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* można zauważyć niewielkie zmniejszenie stężenia badanych peptydów w ciągu 60 minut inkubacji, natomiast w przypadku szczepu wyjściowego spadek jest zdecydowanie bardziej wyraźny i można go zaobserwować już po 10 minutach inkubacji (rys. 37). Peptyd modelowy,

tetrapeptyd Ala-Ala-Ala-Ala, jest wydajnie transportowany przez komórki szczepu dzikiego, natomiast nie jest transportowany przez komórki mutantu *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* (rys. 37, rys. 38).

Otrzymane wyniki podkreślają rolę permeaz peptydowych w transporcie badanych związków, heksapeptydu P5 oraz jego koniugatu F5. Różnice między szczepami w możliwości transportu F5 są zgodne z otrzymanymi wynikami dotyczącymi aktywności przeciwgrzybowej koniugatu. W celu uzupełnienia badań dotyczących możliwości transportu P5 i F5 przez komórki grzybowe *C. albicans* przeprowadzono jakościową ocenę szybkości transportu znakowanych fluorescencyjnie pochodnych tych związków do komórek z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (podr. 4.3.13) oraz ilościowej oceny pobierania pochodnych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej (podr. 4.3.14).

Cispentacyna charakteryzuje się dobrą aktywnością przeciwgrzybową, jednak koniugat peptydu P5 z tym inhibitorem nie wykazuje takiej aktywności (podr. 4.3.2, tab. 12). Podjęłam zatem próbę wyjaśnienia braku aktywności przeciwgrzybowej koniugatu heksapeptydu P5 z cispentacyną, C5, poprzez zbadanie możliwości transportu tego koniugatu do komórek grzybowych.

W celu porównania możliwości transportu związków na wykresie poniżej zestawiono wartości początkowych szybkości transportu P5, F5, C5 i Ala-Ala-Ala-Ala (rys. 39).



Rys. 39 Porównanie początkowych szybkości transportu P5, F5, C5 i Ala-Ala-Ala-Ala (AAAA) przez komórki *C. albicans* ATCC 10231 w 1% roztworze glukozy w buforze fosforanowo-potasowym o pH 5.0.

Zaobserwowano, że spośród badanych związków najwydajniej transportowany jest peptyd modelowy Ala-Ala-Ala-Ala, a z grupy peptydów penetrujących i ich koniugatów najszybciej pobierany jest koniugat z FMDP. Jak wspomniano wyżej związki P5 i F5 są również wydajnie pobierane przez komórki szczepu *C. albicans* SC5314, podobnie przez komórki szczepu ATCC 10231. Koniugat z cispentacyną wyróżnia się najniższą szybkością transportu, co może

prowadzić do obniżenia się ilości koniugatu gromadzonego w komórkach i braku działania przeciwwgrzybowego.

W celu uzupełnienia badań mających na celu znalezienie przyczyny braku aktywności koniugatu peptydu penetrującego P5 z cispentacyną podjęłam się określenia możliwości uwalniania inhibitora, cispentacyny, z koniugatu C5 dzięki analizie ekstraktów bezkomórkowych i przesączy pohodowlanych z wykorzystaniem przedkolumnowej reakcji derywatywacji i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (podr. 4.3.15).

4.3.13 Jakościowa ocena akumulacji FITC-P5 i FITC-F5 w komórkach grzybowych z zastosowaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej

W celu lokalizacji znakowanych fluorescencyjnie peptydu P5 i koniugatu F5, a także oceny szybkości transportu związków wykorzystano ich pochodne z fluoresceiną otrzymane według procedury opisanej w podrozdziale 3.12. W badaniach wykorzystano szczepy *C. albicans* ATCC 10231 oraz *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*.

Z uwagi na to, że podczas procesu przygotowywania komórek do badania integralność ściany i błony komórkowej mogła zostać zakłócona, zastosowano jako kontrolę barwnik wiążący się z kwasami nukleinowymi, jodek propidyny (PI).

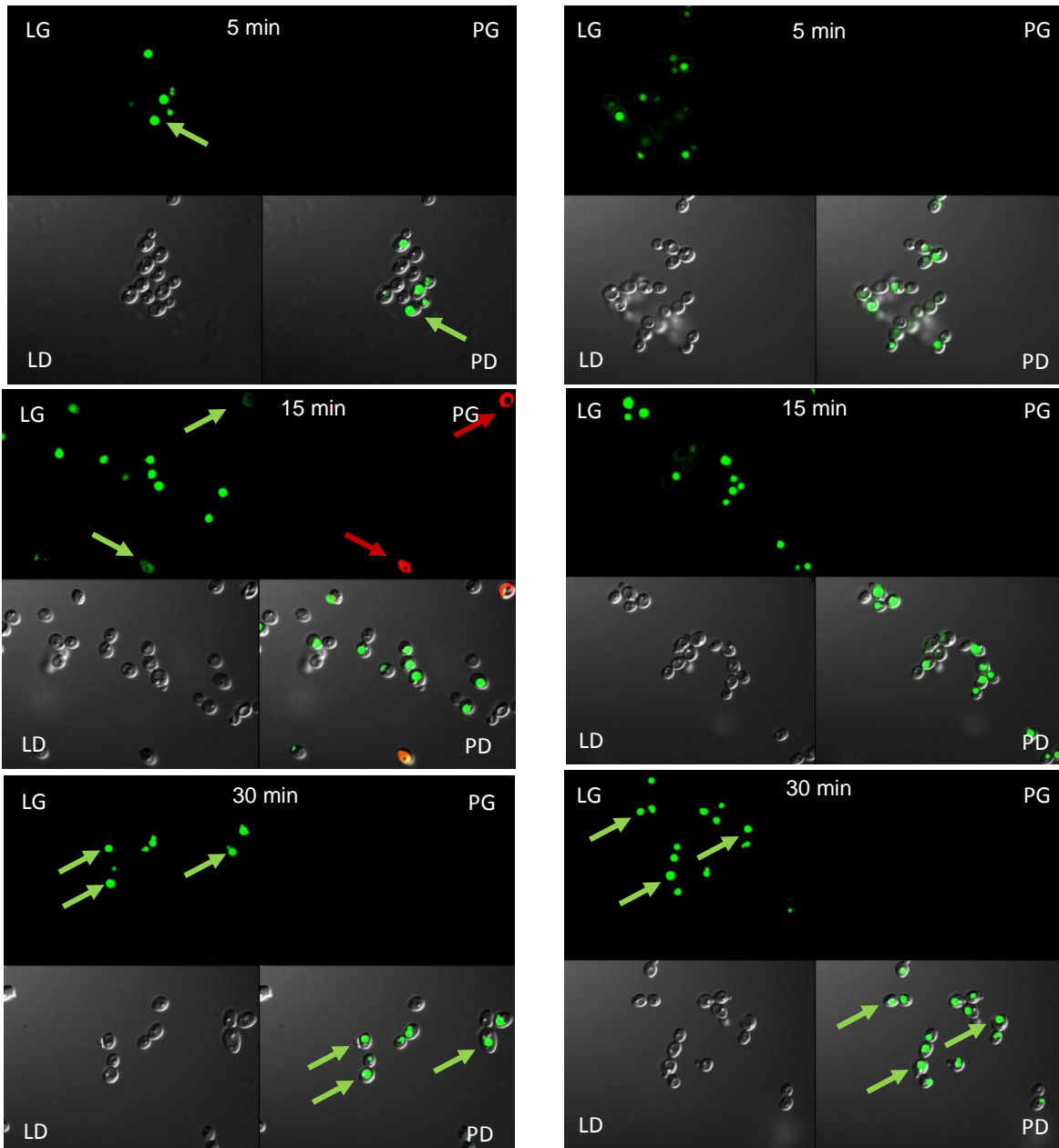
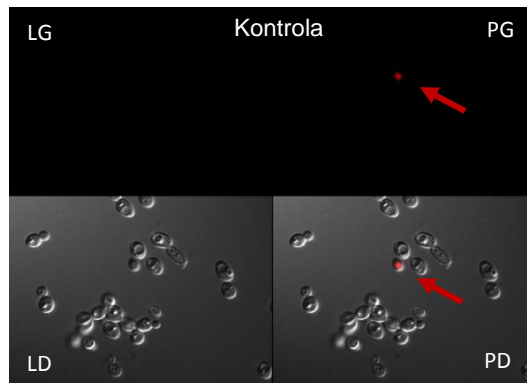
Akumulację FITC-P5 i FITC-F5 w komórkach szczepu *C. albicans* ATCC 10231 i komórkach mutanta delecyjnego *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* przedstawiono na zdjęciach poniżej (fot. 5, fot. 6). Niektóre komórki, w których obecny był związek fluorogeny (FITC-P5, FITC-F5, PI) oznaczono strzałkami. Fluoresceina i jej pochodne fluoryzują na zielono, natomiast kompleksy PI z DNA na czerwono.

Z poczynionych obserwacji (fot. 5) wynika, że oba wyznakowane fluorescencyjnie związki, FITC-P5 i FITC-F5 są transportowane do komórek grzybowych *C. albicans* ATCC 10231 i akumulowane w tych komórkach. W ciągu pierwszych 5 minut następuje akumulacja związków w wakuolach. Po 30 minutach badane związki dostały się do zdecydowanej większości komórek mimo braku dezintegracji błony komórkowej (brak komórek wybarwionych PI). Dla komórek kontrolnych nie uzyskano fluorescencji w przypadku długości fali odpowiadających zarówno FITC jak i PI (jedna komórka fluoryzująca na czerwono oznaczona została strzałką). Transport badanych CPP i FMDP-CPP wyznakowanych fluoresceiną zachodzi bardzo wydajnie. Warto zauważyć, że fluorescencyjnie znakowane P5 i F5 nie mają wpływu na integralność grzybowej błony komórkowej (brak obecności PI w komórkach). Na zdjęciu po lewej stronie (15 min) można zauważyć komórki (oznaczone strzałkami), do których wniknęły oba fluorogenne związki: FITC-P5 i PI, z uwagi na przerwanie integralności błony, prawdopodobnie podczas etapu przygotowania próbek.

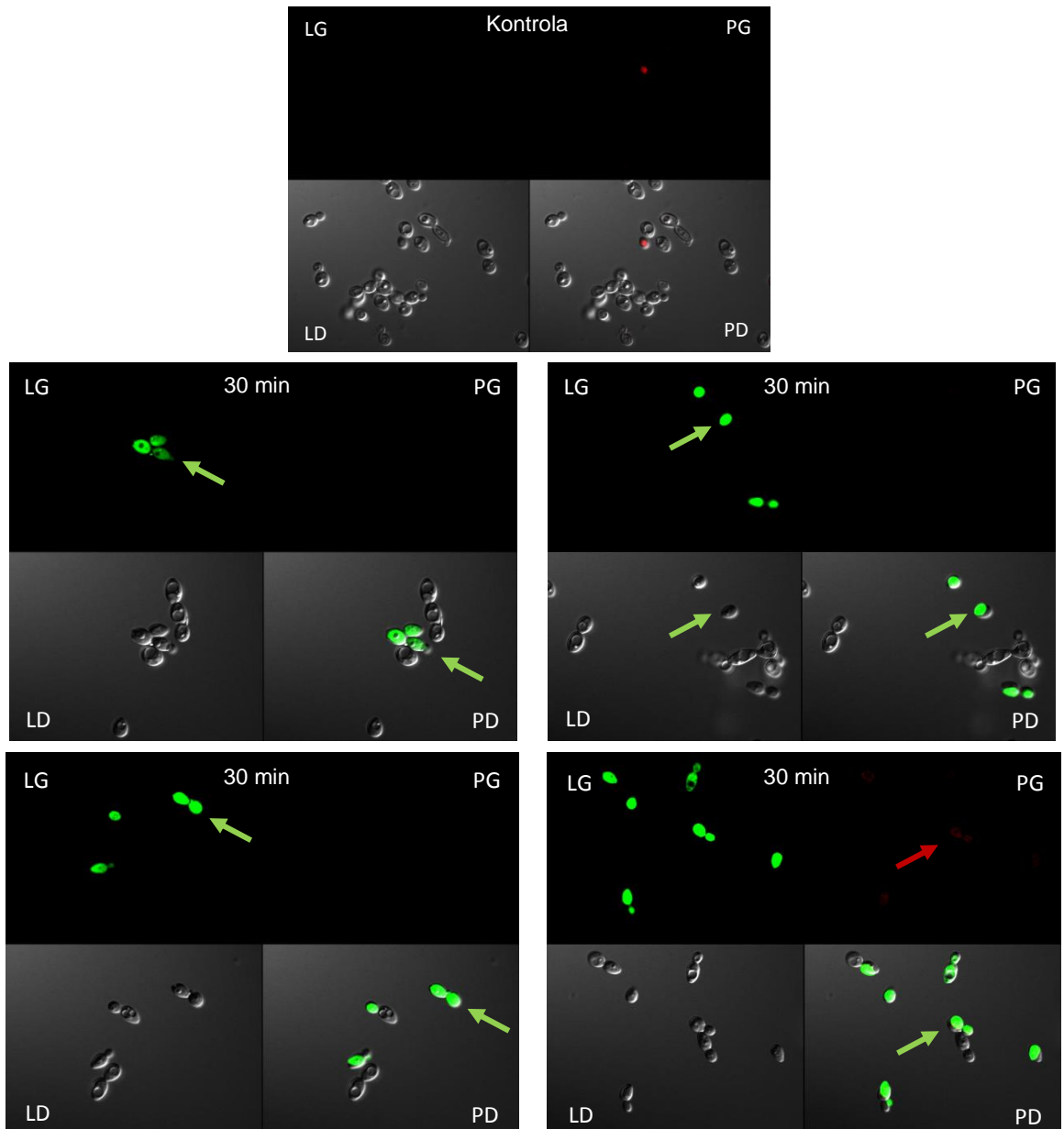
Dość nieoczekiwanie obecność FITC-P5 i FITC-F5 stwierdzono również po 30 min inkubacji w komórkach mutanta delecyjnego *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* (fot. 6), co wskazuje na

możliwość przedostania się testowanych pochodnych do komórki grzybowej mimo nieobecności transporterów peptydowych typu PTR i OPT. Oczywiście informacje uzyskane w tym eksperymencie mają jedynie charakter jakościowy, nie można było zatem porównać ilości zakumulowanych związków w obu typach komórek.

López-García i inni badali możliwość transportu do komórek grzybowych *S. cerevisiae* peptydu PAF26 (PKF26) o sekwencji odpowiadającej P5, jednakże złożonego z D-aminokwasów, a ponadto acetylowanego na N-końcu i amidowanego na C-końcu (López-García i in. 2002). W badaniach wykorzystujących FITC-PAF26 zauważono jedynie 20% wydajność transportu związku do komórek drożdżowych *S. cerevisiae* (López-García i in. 2010). Różnice w otrzymanych wynikach mogą być związane przede wszystkim z różnicą gatunkową (Payne i Smith, 1994), a także wynikać z różnic w budowie i stereochemii badanych peptydów.



Fot. 5 Zestaw fotografii przedstawiający proces akumulacji FITC-P5 (po lewej) i FITC-F5 (po prawej) w komórkach *C. albicans* ATCC 10231 po 5, 15 i 30 min inkubacji. Lewy górny panel (LG) przedstawia obraz przez filtr dedykowany FITC; prawy górny panel (PG) przedstawia obraz przez filtr dedykowany PI; lewy dolny panel (LD) przedstawia obraz bez filtru; prawy dolny panel (PD) przedstawia obraz uzyskany przez nałożenie trzech paneli (LG, PG i LD).



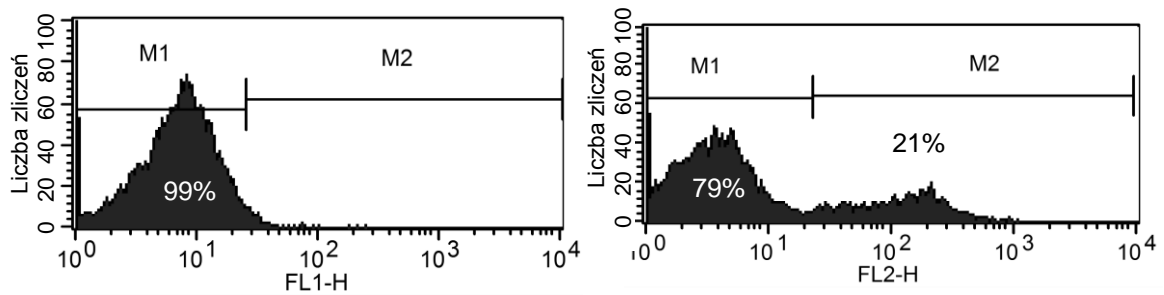
Fot. 6 Zestaw fotografii przedstawiający proces akumulacji FITC-P5 (po lewej) i FITC-F5 (po prawej) do komórek mutantu delecyjnego *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* po 30 min inkubacji. Lewy górny panel (LG) przedstawia obraz przez filtr dedykowany FITC; prawy górny panel (PG) przedstawia obraz przez filtr dedykowany PI; lewy dolny panel (LD) przedstawia obraz bez filtra; prawy dolny panel (PD) przedstawia obraz uzyskany przez nałożenie trzech paneli (LG, PG i LD).

4.3.14 Ilościowa ocena pobierania FITC-P5 i FITC-F5 przez komórki grzybowe z zastosowaniem fluorescencyjnej cytometrii przepływowej

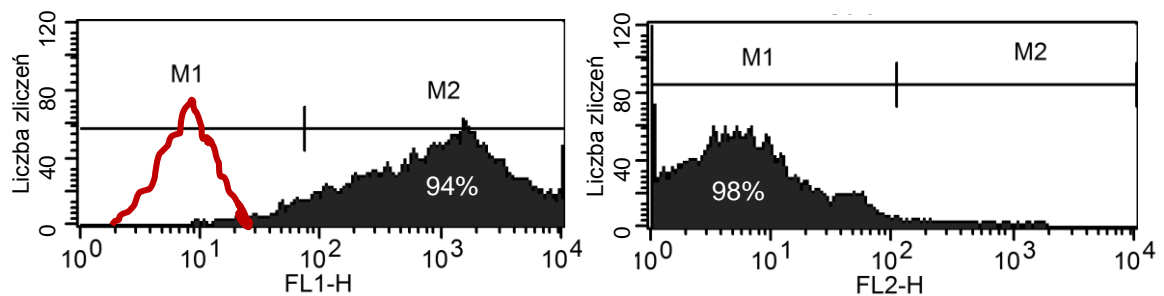
Doświadczenia z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwoliły na ocenę liczby komórek grzybowych zdolnych do akumulacji znakowanych fluorescencyjnie peptydów P5 i F5. Jako znacznik fluorescencyjny zastosowano fluoresceinę, którą wprowadzono do peptydu poprzez ich reakcję z izocyjanianem fluoresceiny jak opisano w podrozdziale 3.12. W badaniach wykorzystano szczep *C. albicans* ATCC 10231 oraz *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*. Z uwagi na to, że

podczas procesu przygotowywania komórek do badania, integralność błony komórkowej mogła zostać zakłócona, zastosowano w ramach kontroli barwnik wiążący się z kwasami nukleinowymi, jodek propidyny (PI). Przerwanie integralności błony komórkowej umożliwiłoby również FITC-CPP dostęp do komórki. Histogramy prób kontrolnych nałożono na histogramy prób badanych i oznaczono kolorem czerwonym.

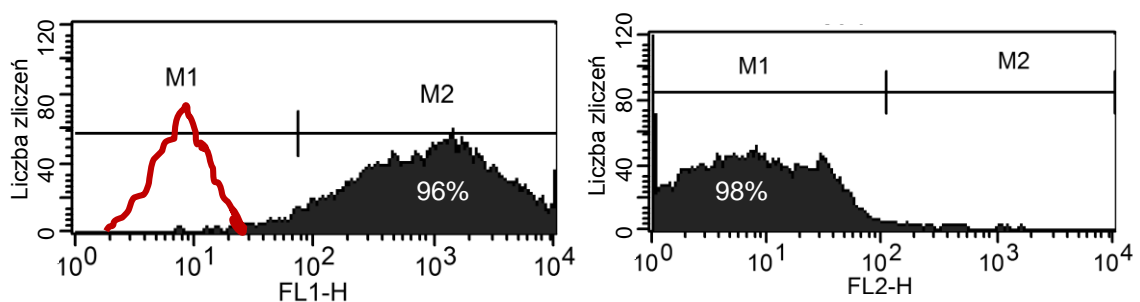
a) Eksperyment z komórkami *C. albicans* ATCC 10231



Rys. 40 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby kontrolnej: zawiesiny *C. albicans* ATCC 10231 wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.



Rys. 41 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby badanej: zawiesiny *C. albicans* ATCC 10231 po inkubacji z FITC-P5 wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.



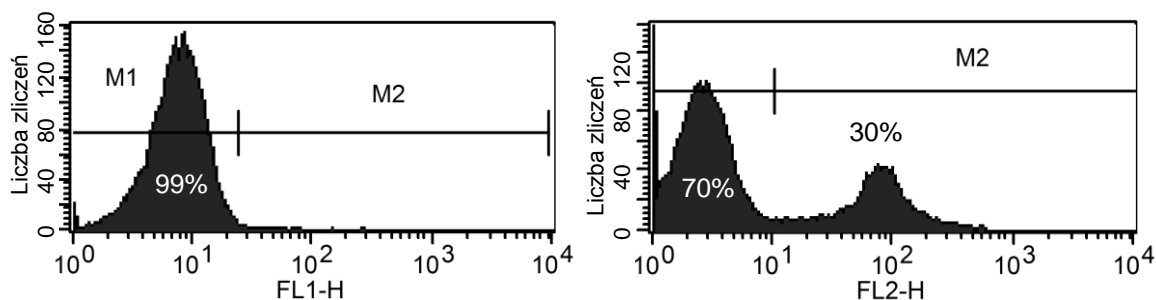
Rys. 42 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby badanej: zawiesiny *C. albicans* ATCC 10231 po inkubacji z FITC-F5 wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.

Na przedstawionych histogramach komórek kontrolnych (rys. 40) można zauważyć wyraźną subpopulację komórek kontrolnych, która charakteryzuje się brakiem fluorescencji odpowiadającej FITC (FL1) – obszar M1, odpowiada 99% całej populacji. Niektóre z komórek,

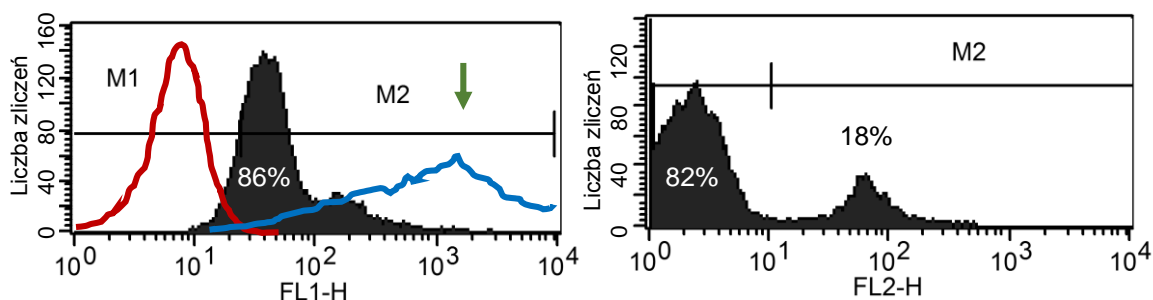
których integralność błony komórkowej została zakłócona zostały zabarwione związkiem fluorogennym PI (FL2) – obszar M2, odpowiada 21% całej populacji.

Na histogramach komórek poddanych działaniu FITC-P5 lub FITC-F5 (rys. 41, rys. 42) można zaobserwować wysoką fluorescencję wykrytą na detektorze FL1 (odpowiadającym FITC, obszar M2) w porównaniu do próby kontrolnej (oznaczonej na czerwono). Otrzymanie histogramu w obszarze M2 świadczy o obecności znakowanych peptydów FITC-P5 i FITC-F5 w komórkach *C. albicans*. Transport zachodzi wydajnie i zdecydowana większość komórek zawiera związek fluorogenny, FITC-P5 i FITC-F5, co stanowi odpowiednio 94% i 96% populacji. Na histogramach FL2 można zauważyć przewagę (98%) populacji komórek w obszarze M1, co oznacza brak fluorescencji odpowiadającej PI. Fluorescencja komórek w obu przypadkach nie jest związana z przepuszczalnością błony komórkowej co potwierdzone jest przez brak lub niewielką ilość sygnałów na detektorze FL2.

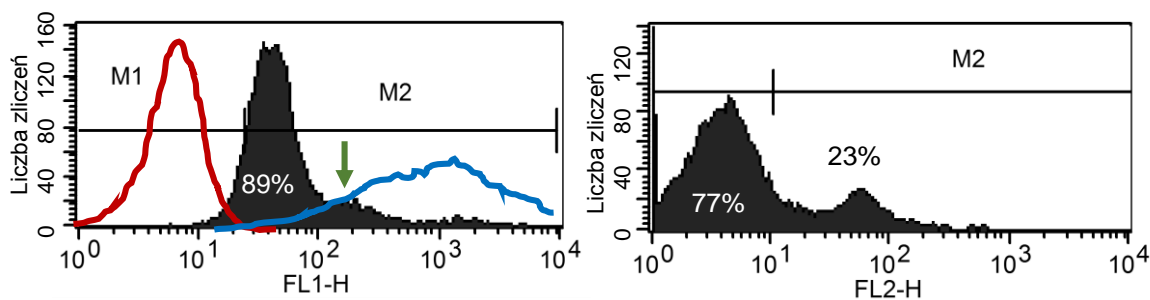
b) Eksperyment z komórkami *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*



Rys. 43 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby kontrolnej: zawiesiny *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.



Rys. 44 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby badanej: zawiesiny *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* po inkubacji z FITC-P5 wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.



Rys. 45 Histogramy FL1 i FL2 uzyskane dla próby badanej: zawiesiny *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* po inkubacji z FITC-F5 wybarwionej PI. Detektor fluorescencji FL1 odpowiada FITC, natomiast detektor FL2 - PI.

Analizując wyniki tego eksperymentu przedstawione na rys. 43-45 trzeba wziąć pod uwagę, że podczas jego wykonywania nastąpiło naruszenie ciągłości błony cytoplazmatycznej u stosunkowo dużej części populacji komórek (18-30%, barwienie PI).

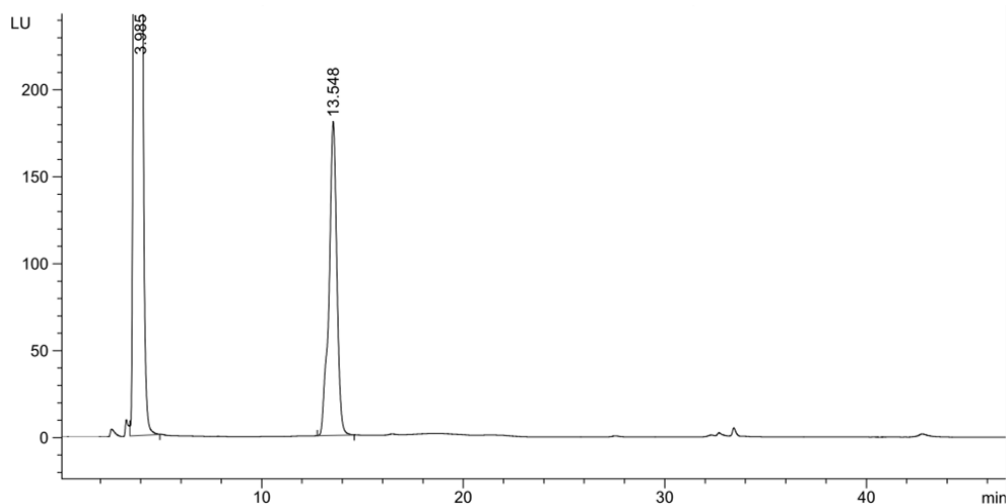
Na histogramach prób zawiesiny komórek *C. albicans opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* po inkubacji z FITC-P5 i FITC-F5 (rys. 44, rys. 45) stwierdzono obecność subpopulacji komórek wybarwionych fluoresceiną, jednak o dużo niższej fluorescencji niż dla komórek *C. albicans* ATCC 10231 (naniesiono na histogram kolorem niebieskim). Warto zwrócić uwagę na niewielkie subpopulacje o wyższej fluorescencji w obszarze M2 oznaczonych zieloną strzałką (rys. 44, rys. 45). Uwzględniając również sporą ilość komórek z naruszoną błoną (18%, 23%), które mogą zawyżać ocenę stopnia akumulacji FITC-P5 i FITC-F5, można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że komórki mutanta delecyjnego akumulują mniej wydajnie badane związki, FITC-P5 i FITC-F5, w porównaniu z komórkami ATCC 10231. Ta różnica jest najprawdopodobniej związana z mniejszą prędkością transportu znakowanych peptydów do wnętrza komórek mutanta i w konsekwencji uzyskaniu niejednorodnie wyznakowanej populacji komórek. Z oczywistych względów penetracja peptydów do komórek mutanta nie może odbywać się za pośrednictwem permeaz, więc obserwowane zakumulowane peptydy musiały wnikać do komórek na drodze transportu biernego, właściwego dla CPP. Jest to jednak w tym przypadku transport mało efektywny.

4.3.15 Analiza możliwości hydrolizy koniugatu C5

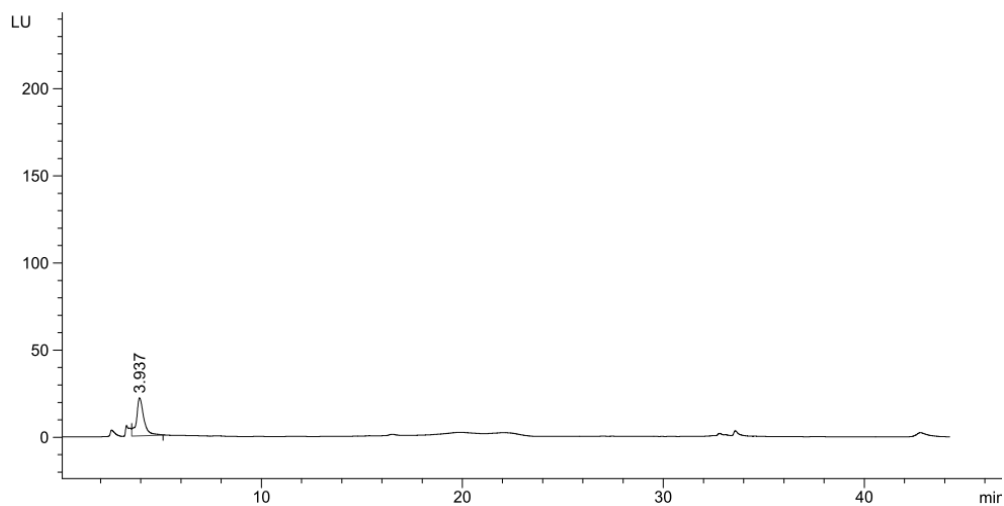
W celu znalezienia przyczyny braku aktywności przeciwgrzybowej koniugatu heksapeptydu P5 z cispentacyną wykonano serię eksperymentów polegających na określeniu możliwości uwolnienia inhibitora ze struktury koniugatu w ekstrakcie bezkomórkowym oraz w supernatancie po inkubacji zawiesiny komórek z C5. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji przedkolumnowej derywatywacji i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Procedury przeprowadzonych doświadczeń zostały przedstawione w podrozdziałach 3.15 i 3.16.

Dzięki przeprowadzonej reakcji derywatywacji było możliwe uzyskanie sygnału pochodzącego od pochodnej aminokwasu - kwasu (1*R*,2*S*)-2-aminocyklopentanowego (cispentacyny) i potwierdzenie ewentualnej obecności tego związku w badanych próbkach. Odpowiednich sygnałów nie uzyskano dla peptydu P5 i koniugatu C5. Zastosowane warunki derywatywacji i rozdziału umożliwiły jednak zidentyfikowanie obecności cispentacyny.

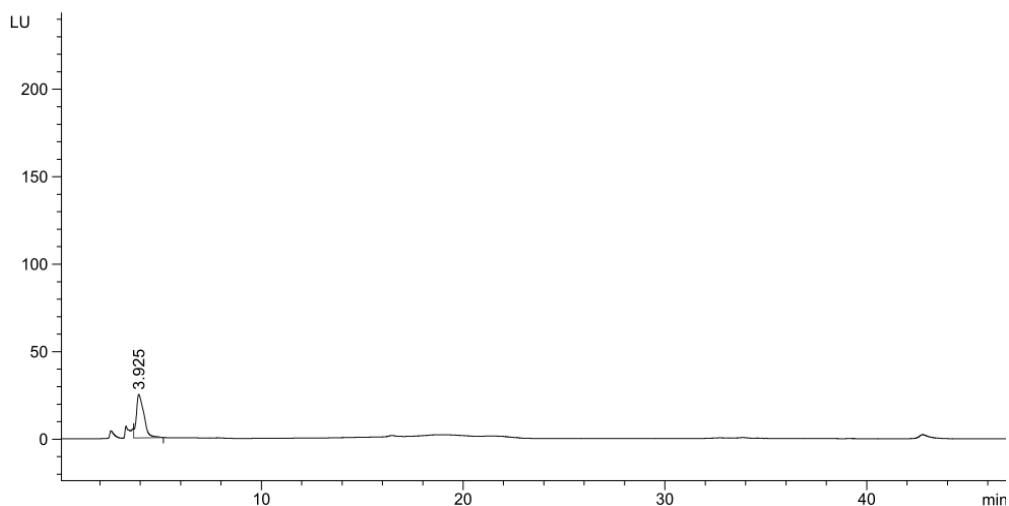
Chromatogramy próbek roztworu wzorcowych (C, C5, P5) po reakcji derywatywacji zamieszczono poniżej (rys. 46, rys. 47, rys. 48).



Rys. 46 Chromatogram próbki będącej roztworem *cis*-pentacyny (C) po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.



Rys. 47 Chromatogram próbki będącej roztworem koniugatu C5 po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.

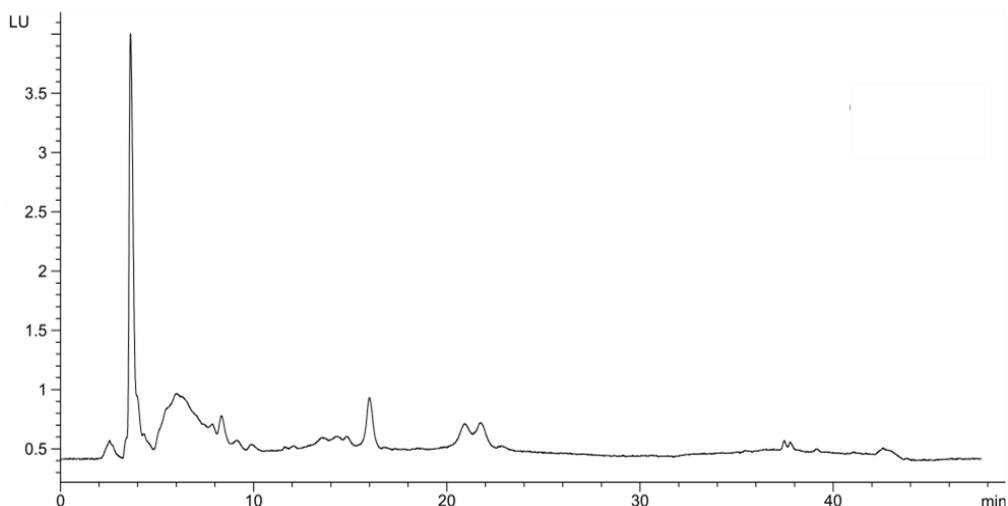


Rys. 48 Chromatogram próbki będącej roztworem peptydu P5 po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.

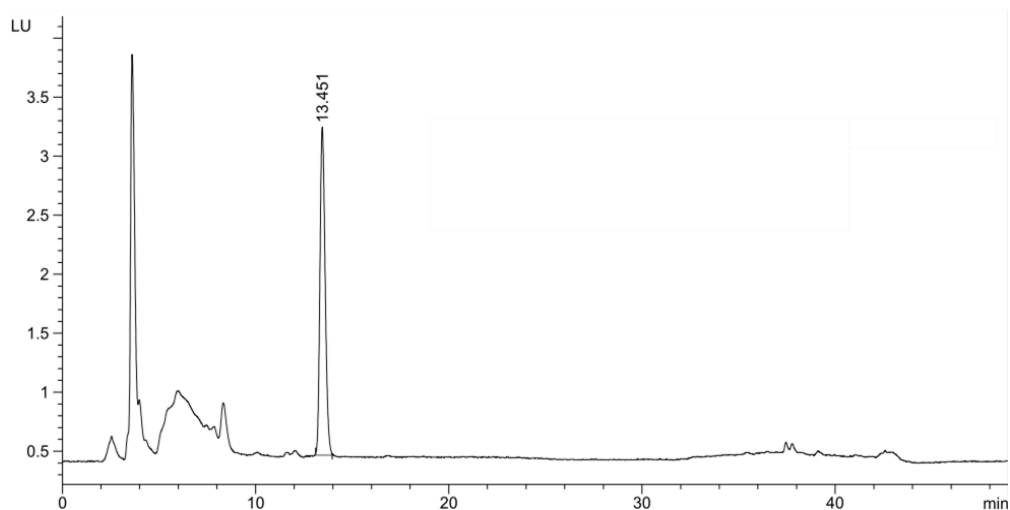
4.3.15.1 Próba oceny możliwości hydrolizy peptydu C5 w ekstrakcie bezkomórkowym

Koniugat C5 po dostaniu się do wnętrza komórki dla wywołania efektu przeciwgrzybowego, powinien zostać rozcięty przez wewnątrzkomórkowe permeazy, aby uwolnić cząsteczkę inhibitora, cispentacynę, dlatego sprawdzono czy aktywność ekstraktu bezkomórkowego uzyskanego z komórek grzybowych umożliwia uwolnienie inhibitora.

Analizie HPLC poddano próbkę ekstraktu bezkomórkowego z komórek *C. albicans* inkubowaną z peptydem C5. Na uzyskanym chromatografie (rys. 49) nie widać sygnału odpowiadającego cispentacynie. Sygnał taki jest natomiast obecny na chromatografie próbki zawierającej ekstrakt bezkomórkowy i cispentacynę (rys. 50).



Rys. 49 Chromatogram próbki będącej roztworem koniugatu C5 po 30 minutowej inkubacji z ekstraktem bezkomórkowym, po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.

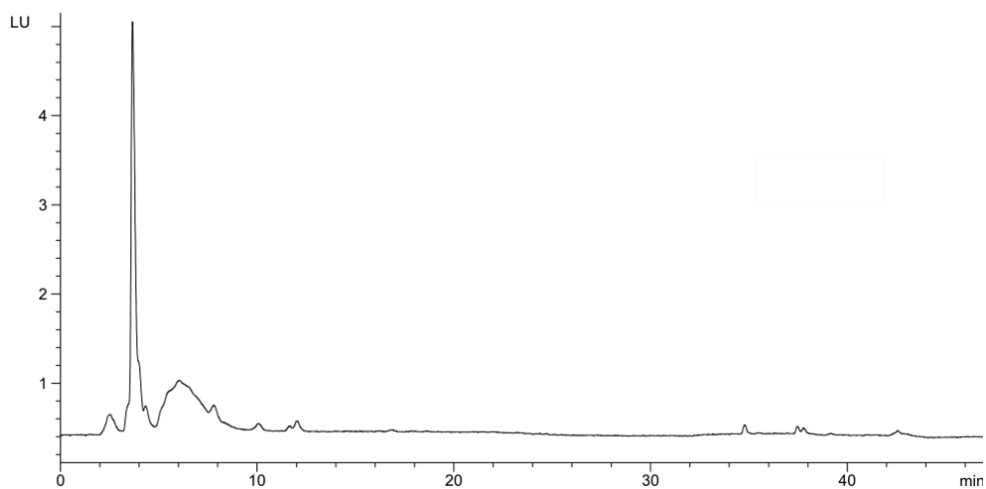


Rys. 50 Chromatogram próbki będącej roztworem cispentacyny (C) po 30 minutowej inkubacji z ekstraktem bezkomórkowym, po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.

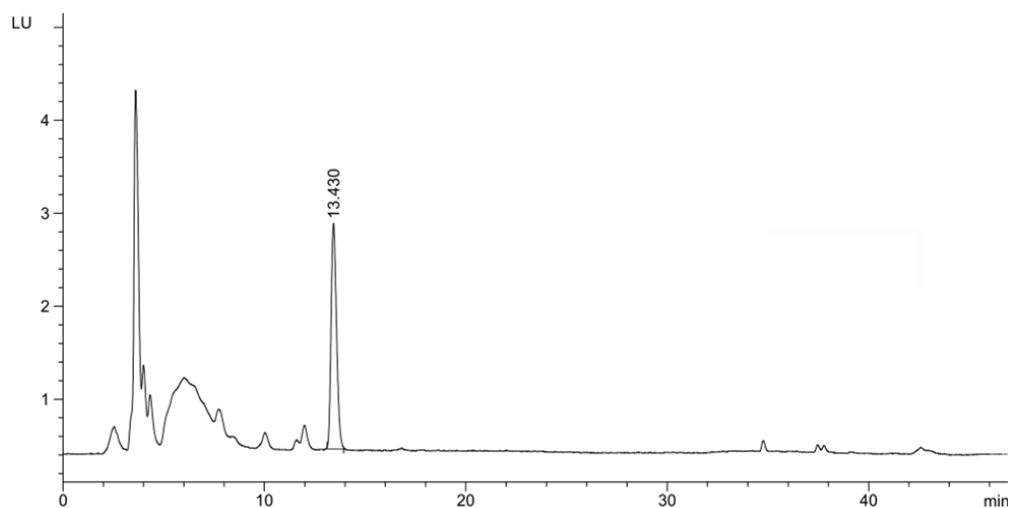
Wyniki te wskazują, że koniugat C5 nie ulega prawdopodobnie hydrolizie pod wpływem enzymów znajdujących się w ekstrakcie bezkomórkowym, a przynajmniej takiej, w wyniku której następuje uwolnienie cispentacyny.

4.3.15.2 Próba oceny możliwości pozakomórkowej hydrolizy peptydu C5

W tym eksperymencie sprawdzano, czy peptyd C5 może być hydrolizowany przez enzymy proteolityczne wydzielane przez komórki *C. albicans* ATCC 10231. Analizie HPLC poddano supernatant otrzymany po odwirowaniu zawiesiny komórek inkubowanych z peptydem C5. Podobnie jak w poprzednim eksperymencie, nie stwierdzono obecności sygnału odpowiadającego cispentacynie (rys. 51). Sygnał taki występował na chromatogramie supernatantu otrzymanego po odwirowaniu zawiesiny komórek inkubowanych z cispentacyną (rys. 52).



Rys. 51 Chromatogram próbki będącej roztworem koniugatu C5 po 30 minutowej inkubacji z ekstraktem bezkomórkowym, po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.



Rys. 52 Chromatogram próbki będącej roztworem cispentacyny (C) po 30 minutowej inkubacji z ekstraktem bezkomórkowym, po inkubacji z TCA i reakcji derywatywacji.

Wyniki tych eksperymentów wskazują, że cispentacyna nie jest uwalniana z C5 przez enzymy proteolityczne *C. albicans* ATCC 10231. Oporność na hydrolizę w połączeniu ze stwierdzonym wcześniej niskim transportem tego peptydu do komórek decyduje o niskiej aktywności koniugatu C5 wobec *C. albicans*.

PODSUMOWANIE

Analiza wyników uzyskanych w wyniku badań umożliwia sformułowanie następujących najważniejszych wniosków:

1. Peptydy Ala-Ala, Ala-Ala-Ala, Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP są transportowane do wnętrza komórek *C. albicans* przez permeazy systemu PTR.
2. Permeaza systemu OPT kodowana przez gen *OPT1* odpowiada za transport peptydu modelowego Ala-Ala-Ala-Ala. Peptydy uważane za CPP oraz ich koniugaty z FMDP (FMDP-VPMLK, FMDP-KLPVM, FMDP-KKVVFVVKFK, FMDP-RKKKFW, FMDP-VRLPPP, FMDP-KKKKKKKK) są transportowane do komórek *C. albicans* za pośrednictwem permeaz systemu OPT.
3. Brak lub nieznaczny transport oligopeptydów wykazany u mutantów *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ* wskazuje, że permeazy Ptr2, Ptr22 oraz Opt1-Opt5 są jedynymi permeazami, dzięki którym komórki mogą pobierać te peptydy ze środowiska.
4. Wrażliwość mutantów *ptr2Δ ptr22Δ* na Lys-Nva-FMDP w podłożu zawierającym glutaminian sodu jako źródło azotu aminokwasów sugeruje, że permeazy OPT mogą być również zaangażowane w pobieranie tripeptydów, co potwierdza wcześniejsze obserwacje (Milewski i in. 1988; Dunkel i in. 2013).
5. Składniki podłoża, szczególnie rodzaj źródła azotu mają zasadniczy wpływ na ekspresję genów permeaz peptydowych.
6. Znakomita większość (97%) komórek izolowanych z kolonii wyrastających wewnątrz stref wzrostu zahamowanego w wyniku działania Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP nie wykazuje trwałego obniżenia wrażliwości na działanie tych oligopeptydów. Trzy spośród sześciu izolatów wykazujących pozornie cechę trwałego osłabienia wrażliwości na działanie Nva-FMDP i Lys-Nva-FMDP, odzyskiwało tę wrażliwość w wyniku wielokrotnego pasażowania w podłożu bogatym w oligopeptydy. Trwała oporność trzech izolatów, mogąca być wynikiem mutacji, prawdopodobnie jest związana z brakiem transportu di- i tripeptydów przez permeazy PTR, Ptr2 i/lub Ptr22. Przyczyną oporności może być mutacja w obrębie genów *PTR* lub *PTR22* albo któregoś z genów regulatorowych.
7. Koniugaty oligopeptydów uważanych za należące do kategorii CPP z N-końcowym FMDP wykazują dużo silniejsze działanie przeciwgrzybowe wobec *C. albicans* w podłożach minimalnych w porównaniu do odpowiednich wyjściowych peptydów (bez przyłączonego FMDP).
8. Wyższa aktywność koniugatów w porównaniu z peptydami nośnikowymi jest konsekwencją zahamowania biosyntezy chityny, co wskazuje na hamowanie syntazy GlcN-6-P przez FMDP uwolniony z koniugatów wewnątrz komórek *C. albicans*.

9. Obecność w podłożu oligopeptydów lub mieszaniny aminokwasów obniża aktywność koniugatów.
10. Jeden z badanych koniugatów, FMDP-(Arg)₈, wykazuje aktywność wobec *C. albicans* w podłożu RPMI-1640, a aktywność ta nie zależy od obecności permeaz peptydowych, co sugeruje wnikanie tego koniugatu do komórek jako peptydu penetrującego.
11. Pozostałe badane koniugaty wykazują brak lub niewielką aktywność wobec mutantów delecyjnych pozbawionych permeaz peptydowych oraz w podłożu RPMI-1640, co neguje ich działanie i zastosowanie jako CPP. Z drugiej strony, za pomocą mikroskopii konfokalnej i cytometrii przepływowej wykazano niewielką akumulację fluorescencyjnej pochodnej koniugatu F5 w komórkach mutantu delecyjnego *opt1-opt5Δ ptr2Δ ptr22Δ*, jednak dużo mniejszą niż w komórkach typu dzikiego. Można zatem przypuszczać, że koniugaty te transportowane są do komórek głównie za pośrednictwem permeaz systemu OTP, najprawdopodobniej przez Opt1 i tylko w niewielkim stopniu w inny sposób, niezależny od błonowych białek transportowych.
12. Aktywność peptydu P3 (KSL-W) okazała się być niezależna od składu i pH podłoża, a także od rodzaju źródła azotu w podłożu. Peptyd P3 był również aktywny wobec mutantów delecyjnych pozbawionych permeaz peptydowych, a także w obecności inhibitorów endocytozy. Wykazano, że mechanizm wnikania P3 jest niezależny od obecności w komórce permeaz peptydowych i nie jest prawdopodobnie oparty o endocytozę, zatem jego działanie przeciwgrzybowe przypuszczalnie nie wiąże się z celem molekularnym znajdującym się we wnętrzu komórki.
13. Dołączenie FMDP jako reszty N-końcowej peptydu P3 (F3) niweluje jego działanie biologiczne. Koniugat FMDP-KKVFWVKFK będący undekapeptydem jest najprawdopodobniej transportowany do komórek *C. albicans* przez permeazy systemu OPT, dla których dotychczas sugerowano zdolność transportu oligopeptydów o długości do ośmiu reszt aminokwasowych (Reuß i Morschhäuser, 2006). Koniugat o zmodyfikowanym C-końcu peptydu wykazywał natomiast aktywność przeciwgrzybową zbliżoną do wyjściowego peptydu P3.
14. Koniugaty FMDP z oligopeptydami uważanymi za CPP nie wykazują aktywności wobec innych niż *C. albicans* szczepów z rodzaju *Candida*, natomiast ich aktywność wobec wielolekoopornych klinicznych szczepów *C. albicans* z nadekspresją pomp CDR1/CDR2 lub MDR1 jest taka sama lub zbliżona do aktywności wobec szczepów nie wykazujących fenotypu oporności wielolekowej.
15. Badane oligopeptydy (poza KSL-W) oraz ich koniugaty z FMDP nie wykazują działania hemolitycznego.

16. Działanie badanych koniugatów o długości od 7 do 11 reszt aminokwasowych nie indukowało tworzenia kolonii komórek pozornie opornych, tak jak ma to miejsce w przypadku działania Nva-FMDP lub Lys-Nva-FMDP.
17. Koniugaty peptydów z BADP wykazywały słabą aktywność przeciwgrzybową, jedynie w podłożu minimalnym YNB-GS.
18. Koniugat heksapeptydu P5 z cispentacyną (C5) nie wykazywał aktywności przeciwgrzybowej. Przyczyną braku aktywności jest brak transportu koniugatu do komórek grzybowych, a także brak uwalniania inhibitora po dotarciu związku do wnętrza komórki grzybowej.
19. Wersje badanych koniugatów amidowane na C-końcu nie były bardziej aktywne od ich wolnych odpowiedników.

Wykorzystanie peptydów jako nośników związków przeciwgrzybowych, dla których bariera grzybowej błony komórkowej jest trudna lub niemożliwa do pokonania, jak w przypadku inhibitorów enzymatycznych, stanowi obiecującą strategię projektowania nowych potencjalnych leków przeciwgrzybowych, jednak wymaga wielu badań pozwalających na zaproponowanie optymalnych struktur nośników spełniających wszystkie oczekiwania wobec tego typu nośników przy zastosowaniu nie tylko *in vitro*, ale w szczególności *in vivo*.

LITERATURA

- Abes S., Turner J.J., Ivanova G.D., Owen D., Williams D., Arzumanov A., Clair P., Gait M.J., Lebleu B. 2007. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Research* 35: 4495-4502
- Ajesh K., Sreejith K. 2009. Peptide antibiotics: An alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides* 30: 999-1006
- Albini A., Benelli R., Giunciuglio D., Cai T., Mariani G., Ferrini S., Noonan D.M. 1998. Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 273: 15895-15900
- Allinquant B., Hantraye P., Maillieux P., Moya K., Bouillot C., Prochiantz A. 1995. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth *in vitro*. *Journal of Cellular Biology* 128: 919-927
- Ames B.N., Ferro-Luzzi Ames G., Young J.D., Tsuchiya D., Lecocq J. 1973. Illicit transport: the oligopeptide permease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 456-458
- Andruszkiewicz R., Chmara H., Milewski S., Borowski E. 1987. Synthesis and Biological Properties of *N*-(4-Methoxyfumaroyl)-*L*-2,3-diaminopropanoic Acid Dipeptides, a Novel Group of Antimicrobial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 30: 1715-1719
- Andruszkiewicz R., Milewski S., Zieniawa T., Borowski E. 1990. Anticandidal Properties of *N*-(4-Methoxyfumaroyl)-*L*-2,3-diaminopropanoic Acid Oligopeptides. *Journal of Medicinal Chemistry* 33: 132-135
- Aoki Y., Kongoh M., Nakamura M., Fujii T., Yamazaki T., Shimada H., Arisawa M. 1994. A new methionine antagonist that has antifungal activity: mode of action. *The Japanese Journal of Antibiotics* 40: 127-132
- Aoki Y., Kamiyama T., Fujii T., Yamamoto M., Ohwada J., Arisawa M. 1995. Design of an antifungal methionine inhibitor not antagonized by methionine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18: 1267-1271
- Aoki Y., Yamamoto M., Hosseini-Mazinani S.M., Koshikawa N., Sugimoto K., Arisawa M. 1996. Antifungal azoxybacilin exhibits activity by inhibiting gene expression of sulfite reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 127-132
- Arnusch C.J., Ulm H., Josten M., Shadkchan Y., Oshero N., Sahl H-G, Shai Y. 2012. Ultrashort Peptide Bioconjugates Are Exclusively Antifungal Agents and Synergize with Cyclodextrin and Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 1-9
- Bachman S.P., Patterson T.F., López-Ribot J. 2002. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2228-2230
- Basrai M.A., Zhang H-L., Miller D., Naider F., Becker J.M. 1992. Toxicity of oxalysine and oxalysine-containing peptides against *Candida albicans*: regulation of peptide transport by amino acids. *Journal of General Microbiology* 138: 2353-2362
- Basrai M.A., Lubkowitz M.A., Perry J.R., Miller D., Krainer E., Naider F., Becker J.M. 1995. Cloning of a *Candida albicans* peptide transport gene. *Microbiology* 141: 1147-1156
- Bates C.J., Adams W.R., Handschumacher R.E. 1966. Control of the Formation of Uridine Diphospho-N-acetyl-hexosamine and Glycoprotein Synthesis in Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry* 241: 1705-1712
- Bayer N., Schober D., Prchla R., Murphy F., Blaas D., Fuchs R. 1998. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *Journal of Virology* 72: 9645-9655
- Bechara C., Sagan S. 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* 587: 1693-1702
- Becker J.M., Covert N.L., Shenbagamurthi P., Steinfeld A.S., Naider F. 1983. Polyoxin D Inhibits Growth of Zoopathogenic Fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 926-929

- Bellamy W., Wakabayashi H., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Tomita M. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology* 182: 97-105
- Bendifallah N., Rasmussen F.W., Zachar V., Ebbesen P., Nielsen P.E., Koppelhus U. 2006. Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjugate Chemistry* 17: 750-758
- Besson F., Peypoux F., Michel G., Delcambe L. 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Antibiotics* 31: 284-288
- Bian J., Popovic Z.B., Benejam C., Kiedrowski M., Rodriguez L.L., Penn M.S. 2007. Effect of cell-based intercellular delivery of transcription factor GATA4 on ischemic cardiomyopathy. *Circulation Research* 100: 1626-1633
- Borowski E. 1952. Isolation of pure tetaine from strain of *Bacillus pumilus*. *Bulletin of the State Institute of Marine and Tropical Medicine in Gdańsk* 4: 310-318
- Bowman S.M., Free S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28: 799-808
- Bradshaw J.P. 2003. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *Biodrugs* 17: 233-240
- Brogden K.M. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews* 3: 238-250
- Cahill K. 2010. Cell-penetrating peptides, electroporation and drug delivery. *IET Systems Biology* 4: 367-378
- Capobianco J.O., Zakula D., Coen M.L., Goldman R.C. 1993. Anticandida activity of cispentacin. The active transport by amino acid permease and possible mechanisms of action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190: 1037-1044
- Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 1184-1202
- Chandrasekar P.H., Sobel J.D. 2006. Micafungin: A New Echinocandin. *Clinical Infectious Diseases* 42: 1171-1178
- Chapman T., Kinsman O., Houston J. 1992. Chitin Biosynthesis in *Candida albicans* Grown *In Vitro* and *In Vivo* and Its Inhibition by Nikkomycin Z. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 1909-1914
- Chen S.C-A, Playford E.G., Sorrell T.C. 2010. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Current Opinion in Pharmacology* 10: 522-530
- Chmara H. 1985. Inhibition of Glucosamine Synthase by Bacilysin and Anticapsin. *Journal of General Microbiology* 131: 265-271
- Cutuli M., Cristiani S., Lipton J.M., Catania A. 2000. Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *Journal of Leukocyte Biology* 67: 233-239
- Dai Z., Wu Z., Jia S., Wu G. 2014. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 964: 116-127
- Davies M.D. 1980. Peptide Uptake in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* 121: 181-186
- Dähn U., Hagenmaier H., Höhne H., König W.A., Wolf G., Zähler H. 1976. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitin-synthese bei Pilzen. *Archives of Microbiology* 107: 143-160
- De Lucca A.J., Walsh T.J. 1999. Antifungal peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1-11
- Denning D.W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362: 1142-1151
- Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 10444-10450

- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., Prochiantz A. 1996. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry* 271: 18188-18193
- Desai P.R., Thakur A., Ganguli D., Paul S., Morschhäuser J., Bachhawat A.K. 2011. Glutathione utilization by *Candida albicans* requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual member of the oligopeptide transporter family. *Journal of Biological Chemistry* 286: 41183-41194
- Doan N.-D., Létourneau M., Vaudrym D., Doucet N., Folch B., Vaudry H., Fournier A., Chatenet D. 2012. Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Journal of Controlled Release* 163: 256-265
- Donaton M.C., Holsbeeks I., Lagatie O., Van Zeebroeck G., Crauwels M., Winderickx J., Thevelein J.M. 2003. The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 50: 911-929
- Duchardt F., Fotin-Mleczek M., Schwarz H., Fischer R., Brock R. 2007. A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic* 8: 848-866
- Duggineni S., Srivastava G, Kundu B., Kumar M., Chaturvedi A.K., Shukla P.K. 2007. A novel dodecapeptide from a combinatorial synthetic library exhibits potent antifungal activity and synergy with standard antimycotic agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 73-78
- Dunkel N., Hertlein T., Franz R., Reuß O., Sasse C., Schäfer T., Ohlsen K., Morschhäuser J. 2013. Roles of Different Peptide Transporters in Nutrient Acquisition in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 12: 520-528
- Dworecka-Kaszak B. 2010. Genetyczne podstawy oporności wielolekowej u grzybów. *Mikologia Lekarska* 17: 73-78
- Eiríksdóttir E., Myrberg H., Hansen M., Langel Ü. 2004. Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Drug Design Reviews* 1: 161-173
- El-Andaloussi S., Johansson H.J., Lundberg P., Langel Ü. 2006. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *Journal of Gene Medicine* 8: 1262-1273
- El-Andaloussi S., Lehto T., Mäger I., Rosenthal-Aizman K., Oprea I.I. I in. Simonson O.E., Sork H., Ezzat K., Copolovici D.M., Kurrikoff K., Viola J.R., Zaghoul E.M., Sillard R., Johansson H.J., Said Hassane F., Guterstam P., Suhorutsenko J., Moreno P.M., Oskolkov N., Hälldin J., Tedebark U., Metspalu A., Lebleu B., Lehtio J., Smith C.I., Langel Ü. 2011. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 39: 3972-3987
- Elliott G., O'Hare P. 1997. Intercellular Trafficking and Protein Delivery by a Herpes virus Structural Protein. *Cell* 88: 223-233
- Elmqvist A., Langel Ü. 2005. *In vitro* uptake and stability study of pVEC and its all-D analog. *Biological Chemistry* 384: 387-393
- Elmqvist A., Lindgren M., Bartfai T., Langel Ü. 2001. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Experimental Cell Research* 269: 237-244
- Endo A., Kakiki K., Misato T. 1970. Mechanism of Action of the Antifungal Agent Polyoxin D. *Journal of Bacteriology* 104: 189-196
- Epanand R.M., Vogel H.J. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462: 11-28
- Ernst M.E., Klepser M.E., Wolfe E.J., Pfaller M.A. 1996. Antifungal Dynamics of LY 303366, an Investigational Echinocandin B Analog, Against *Candida* ssp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 26: 125-131
- Espinel-Ingroff A. 2009. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Revista Iberoamericana de Micología* 26: 15-22
- Fabiani A., Versari A., Parpinello G.P., Castellari M., Galassi S. 2002. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate. *Journal of Chromatographic Science* 40: 14-18

- Fairbrother W.J., Christinger H.W., Cochran A.G., Fuh G., Keenan C.J., Quan C., Shriver S.K., Tom J.Y.K., Wells J.A., Cunningham B.C. 1998. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 37: 17754–17764
- Fang B., Jiang L., Zhang M., Ren F.Z. 2013. A novel cell-penetrating peptide TAT-A1 delivers siRNA into tumor cells selectively. *Biochimie* 95: 251-257
- Fickel T.E., Gilvarg C. 1973. Transport of Impermeant Substances in *E. coli* by Way of Oligopeptide Permease. *Nature New Biology* 241: 161-163
- Fittipaldi A., Ferrari A., Zoppe M., Arcangeli C., Pellegrini V., Beltram F., Giacca M. 2003. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *Journal of Biological Chemistry* 278: 34141-34149
- Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E.H., Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews* 11: 37-51
- Frankel A.D., Pabo C.O. 1988. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189-1193
- Franz R., Kelly S.L., Lamb D.C., Kelly D.E., Ruhnke M., Morschhäuser J. 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 3065-3072
- Franz R., Ruhnke M., Morschhäuser J. 1999. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses* 42: 453-458
- Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y. 2001. Arginine-rich peptides, an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 5836-5840
- Ganguly S., Chaubey B., Tripathi S., Upadhyay A., Neti P.V., Howell R.W., Pandey V.N. 2008. Pharmacokinetic analysis of polyamide nucleic-acid-cell penetrating peptide conjugates targeted against HIV-1 transactivation response element. *Oligonucleotides* 18: 277-286
- Gazit E., Lee W.J., Brey P.T., Shai Y. 1994. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33: 10681-10692
- Gomez J.A., Chen J., Ngo J., Hajkova D., Yeh I-J., Gama V., Miyagi M., Matsuyama S. 2010. Cell-Penetrating Penta-Peptides (CPP5s): Measurement of Cell Entry and Protein-Transduction Activity. *Pharmaceuticals* (Basel) 3: 3594-3613
- Gomez J.A., Gama V., Yoshida T., Sun W., Hayes P., Leskov K., Boothman D., Matsuyama S. 2007. Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides. *Biochemical Society Transactions* 35: 797-801
- Gordon Y.J., Romanowski E.G., McDermott A.M. 2005. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Current Eye Research* 30: 505-515
- Green M., Loewenstein P.M. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179-1188
- Gyurko C., Lendenmann U., Troxler R.F., Oppenheim F.G. 2000. *Candida albicans* Mutants Deficient in Respiration Are Resistant to the Small Cationic Salivary Antimicrobial Peptide Histatin 5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 348-354
- Hasenoehrl A., Galić T., Ergović G., Maršić N., Skerlev M., Mittendorf J., Geschke U., Schmidt A., Schoenfeld W. 2006. *In Vitro* Activity and *In Vivo* Efficacy of Icofungipen (PLD-118), a Novel Oral Antifungal Agent, against the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3011-3018
- Hällbrink M., Florén A., Elmquist A., Pooga M., Bartfai T., Langel Ü. 2001. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1515: 101-109
- Heitz F., Morris M., Divita G. 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology* 157: 195-206

- Horn D.L., Neofytos D., Anaissie E.J., Fishman J.A., Steinbach W.J., Olyaei A.J., Marr K.A., Pfaller M.A., Chang C-H., Webster K.M. 2009. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases* 48: 1695-703
- Holm T., Netzereab S., Hansen M., Langel Ü., Hallbrink M. 2005. Uptake of cell-penetrating peptides in yeasts. *FEBS Letters* 579: 5217-5222
- Island M.D., Naider F., Becker J.M. 1987. Regulation of dipeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae* by micromolar amino acid concentrations. *Journal of Bacteriology* 169: 2132-2136
- Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A. 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 1864-1868
- Joliot A., Prochiantz, A. 2004. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nature Cell Biology* 6: 189-196
- Jung H.J., Park Y., Hahm K.S., Lee D.G. 2006. Biological activity of Tat (47–58) peptide on human pathogenic fungi. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 222-228
- Kanafani Z.A., Perfect J.R. 2008. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases* 46: 120-128
- Kaplan I.M., Wadia J.S., Dowdy S.F. 2005. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of Controlled Release* 102: 247-253
- Kasprzak L., Milewski S., Gumieniak J., Borowski E. 1992. The influence of serum proteins on biological activity of anticandidal peptides containing N^3 -(4-methoxyfumaryl)-L-2,3-diaminopropanoic acid. *Journal of Chemotherapy* 4: 88-94
- Kenig M., Abraham E.P. 1976. Antimicrobial Activities and Antagonists of Bacilysin and Anticapsin. *Journal of General Microbiology* 94: 37-45
- Kingsbury W.D., Boehm J.C., Mehta R.J., Grappel S.F. 1983. Transport of Antimicrobial Agents Using Peptide Carrier Systems: Anticandidal Activity of m-Fluorophenylalanine-Peptide Conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry* 26: 1725-1729
- Kingsbury W.D., Boehm J.C., Mehta R.J., Grappel S.F., Gilvarg C. 1984. A novel peptide delivery system involving peptidase activated prodrugs as antimicrobial agents. Synthesis and biological activity of peptidyl derivatives of 5-fluorouracil. *Journal of Medicinal Chemistry* 27: 1447-1451
- Klasson H., Fink G.R., Ljungdahl P.O. 1999. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Molecular Cell Biology* 19: 5405-5416
- Konishi M., Nishio M., Saitoh K., Miyaki T., Oki T., Kawaguchi H. 1989. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physicochemical properties, and structure. *Journal of Antibiotics* 42: 1749-1755
- Kugler M., Loeffler W., Rapp C., Kern A., Jung G. 1990. Rhizoctin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Archives of Microbiology* 153: 276-281
- Kuipers M.E., De Vries H.G., Eikelboom M.C., Meijer D.K.F., Swart P.J. 1999. Synergistic Fungistatic Effects of Lactoferrin in Combination with Antifungal Drugs against Clinical *Candida* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2635-2641
- Kurtz M.B., Abruzzo G., Flattery A., Bartizal K., Marrinan J.A., Li W., Milligan J., Nollstadt K., Douglas C.M. 1996. Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infection and Immunity* 64: 3244-3251
- Laber B., Lindell S.D., Pohlenz H.-D. 1994. Inactivation of *Escherichia coli* threonine synthase by D,L-Z-2-amino-5-phosphono-3-pentenoic acid. *Archives of Microbiology* 161: 400-403
- Laverdiere M., Lalonde R.G., Baril J.G., Sheppard D.C., Park S., Perlin D.S. 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:705-708
- Lee C.H., Kim S., Hyun B., Suh J.W., Yon C., Kim C., Lim Y., Kim C. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation, and biological activity. *Journal of Antibiotics* 47: 1402-1405

- Lerner C.G., Goldman R.C. 1993. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *Journal of General Microbiology* 139: 1643-1651
- Li R.K., Rinaldi M.G. 1999. *In vitro* Antifungal Activity of Nikkomycin Z in Combination with Fluconazole or Itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1401-1405
- Lichter W.D., Naider F., Becker J.M. 1976. Basis for the Design of Anticandidal Agents from Studies of Peptide Utilization in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10: 483-490
- Lim Y., Suh J.-W., Kim S., Hyun B., Kim C., Lee C.H. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics* 47: 1406-1416
- Ljungdahl P.O. 2009. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochemical Society Transactions* 37: 242-247
- Loeza-Ángeles H., Sagrero-Cisneros E., Lara-Zárate L., Villagómez-Gómez E., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. 2008. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnology Letters* 30: 1713-1719
- Logan D.A., Becker J.M., Naider F. 1979. Peptide Transport in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* 114: 179-186
- Lorenz M.C., Heitman J. 1998. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 17: 1236-1247
- López-García B., González-Candelas L., Pérez-Payá E., Marcos J.F. 2000. Identification and Characterization of a Hexapeptide with Activity Against Phytopathogenic Fungi That Cause Postharvest Decay in Fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 837-846
- López-García B., Pérez-Payá E., Marcos J.F. 2002. Identification of Novel Hexapeptides Bioactive against Phytopathogenic Fungi through Screening of a Synthetic Peptide Combinatorial Library. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2453-2460
- López-García B., Ubhayasekera W., Gallo R.L., Marcos J.F. 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356: 107-113
- Lubkowitz M.A., Hauser L., Breslav M., Naider F., Becker J.M. 1997. An oligopeptide transport gene from *Candida albicans*. *Microbiology* 143: 387-396
- Lundberg P., Langel Ü. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *Journal of Molecular Recognition* 16: 227-233
- Lundberg P., El-Andaloussi S., Sützlü T., Johansson H., Langel Ü. 2007. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *The FASEB Journal* 21: 2664-2671
- Lundin P., Johansson H., Guterstam P., Holm T., Hansen M., Langel Ü., El-Andaloussi S. 2008. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 19: 2535-2542
- Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M.M., Dogterom-Ballering H., Brouwer C.P., Senesi S., Van Dissel J.T., Nibbering P.H. 2003. Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 262-267
- Lyon G., Karatela S., Sunay S., Adiri Y. 2010. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the Candida Surveillance Study. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1270-1275
- Maget-Dana R., Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87: 151-174
- Marder R., Rose B., Becker J.M., Naider F. 1978. Isolation of a Peptide Transport-Deficient Mutant of Yeast. *Journal of Bacteriology* 36: 1174-1177
- Martínez P., Ljungdahl P.O. 2005. Divergence of Stp1 and Stp2 Transcription Factors in *Candida albicans* Places Virulence Factors Required for Proper Nutrient Acquisition under Amino Acid Control. *Molecular and Cellular Biology* 25: 9435-9446
- Matejuk A., Leng Q., Begum M.D., Woodle M.C., Scaria P., Chou S.-T., Mixson A.J. 2010. Peptide-based Antifungal Therapies against Emerging Infections. *Drugs Future* 35: 197-231

- Maurya I.K., Pathak S., Sharma M., Sanwal H., Chaudhary P., Tupe S., Deshpande M., Chauhan V.S., Prasad R. 2011. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* 32: 1732-1740
- Maurya I.K., Thota C.K., Verma S.D., Sharma J., Rawal M.K., Ravikumar B., Sen S., Chauhan N., Lynn A.M., Chauhan V.S., Prasad R. 2013. Rationally designed transmembrane peptide mimics of the multidrug transporter protein Cdr1 act as antagonists to selectively block drug efflux and chemosensitize azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry* 288: 16775-16787
- Mäe M., Langel Ü. 2006. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Current Opinion in Pharmacology* 6: 509-514
- Mäe M., El-Andaloussi S., Lundin P., Oskolkov N., Johansson H.J., Guterstam P., Langel Ü. 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release* 134: 221-227
- McCarthy P.J., Newman D.J., Nisbet L.J., Kingsbury W.D. 1985a. Relative Rates of Transport of Peptidyl Drugs by *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28: 494-499
- McCarthy P.J., Nisbet L.J., Boehm J.C., Kingsbury W.D. 1985b. Multiplicity of Peptide Permeases in *Candida albicans*: Evidence from Novel Chromophoric Peptides. *Journal of Bacteriology* 162: 1024-1029
- McCarthy P.J., Troke P.F., Gull K. 1985c. Mechanism of Action of Nikkomycin and the Peptide Transport System of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* 131: 775-780
- Mengerink Y., Kutlán D., Tóth F., Csámpai A., Molnár-Perl I. 2002. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-*L*-cysteine reagents High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study. *Journal of Chromatography A* 949: 99-124
- Mi Z., Mai J., Lu X., Robbins P.D. 2000. Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Therapy* 2: 339-347
- Michel N., Osen W., Gissmann L., Schumacher T.N.M., Zentgraf H., Müller M. 2002. Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* 294: 47-59
- Milewski S., Chmara H., Borowski E. 1983. Growth inhibitory effect of antibiotic tetaine on yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology* 135: 130-136
- Milewski S., Andruszkiewicz R., Borowski E. 1988a. Substrate specificity of peptide permeases in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* 50: 73-78
- Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., Zaremba M., Borowski J. 1988b. Antifungal peptides with novel specific inhibitors of glucosamine 6-phosphate synthase. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 14: 461-465
- Milewski S., Andruszkiewicz R., Kasprzak L., Mazerski J., Mignini F., Borowski E. 1991a. Mechanism of Action of Anticandidal Dipeptides Containing Inhibitors of Glucosamine-6-Phosphate Synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 36-43
- Milewski S., Mignini F., Borowski E. 1991b. Synergistic action of nikkomycin X/Z with azole antifungals on *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* 137: 2155-2161
- Milewski S., Mignini F., Prasad R., Borowski E. 2001. Unusual Susceptibility of a Multidrug-Resistant Yeast Strain to Peptidic Antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 223-228
- Milewski S. 2002. Glucosamine-6-phosphate synthase - the multi-facets enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1597: 173-192
- Mitchell D.J., Kim D.T., Steinman L., Fathman C.G., Rothbard J.B. 2000. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* 56: 318-325
- Molloy B.B., Lively D.H., Gale R.M., Gorman M., Boeck L.D., Higgins G.E., Kastner R.E., Huckstep L.L., Neuss N. 1972. New Dipeptide Antibiotic from *Streptomyces collinus*, Lindenbein. *The Journal of Antibiotics* 25: 137-140
- Molnár-Perl I., Vasanits A. 1999. Stability and characteristics of the *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-*L*-cysteine reagents and their amino acid

- derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 835: 73-91
- Moneton P., Sarthou P., Le Goffic F. 1986. Transport and Hydrolysis of Peptides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 132: 2147-2153
- Morschhäuser J. 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587: 240-248
- Morschhäuser J. 2011. Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* 301: 390-394
- Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt J.S., Turner J.J., Barnes P.J., Sproat B.S., Gait M.J., Lindsay M.A. 2007. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjugate Chemistry* 18: 1450-1459
- Muñoz A., López-García B., Marcos J.F. 2006. Studies on the Mode of Action of the Antifungal Hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3847-3855
- Muñoz A., Marcos J.F., Read N.D. 2012. Concentration-dependent mechanisms of cell penetration and killing by the *de novo* designed antifungal hexapeptide PAF26. *Molecular Microbiology* 85: 89-106
- Muñoz A., Harries E., Contreras-Valenzuela A., Carmona L., Read N.D., Marcos J.F. 2013. Two Functional Motifs Define the Interaction, Internalization and Toxicity of the Cell-Penetrating Antifungal Peptide PAF26 on Fungal Cells. *PLoS ONE* 8: e54813. doi:10.1371/journal.pone.0054813
- Nageic M., Nageic E., Baltisburger J., Well G., Lester R., Dickson R. 1997. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9807-9817
- Naider F., Shenbagamurthi P., Steinfeld A.S., Smith H.A., Boney C., Becker J.M. 1983. Synthesis and Biological Activity of Tripeptidyl Polyoxins as Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24: 787-796
- Naidu A.S., Fowler R.S., Martinez C., Chen J., Tulpinski J. 2004. Activated lactoferrin and fluconazole synergism against *Candida albicans* and *Candida glabrata* vaginal isolates. *Journal of Reproductive Medicine* 49: 800-807
- Nakase I., Tanaka G., Futaki S. 2013. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Molecular BioSystems* 9: 855-861
- Nekhotiaeva N., Elmquist A., Rajarao G.K., Hallbrink M., Langel Ü., Good L. 2004. Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB Journal* 18: 394-396
- Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 29: 464-472
- Nijnik A., Hancock R.E.W. 2009. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal* 2:e1. doi: 10.3134/ehjt.09.001
- Nisbet T.M., Payne J.W. 1979. Peptide Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Characteristics of Transport System Shared by Di- and Tripeptides. *Journal of General Microbiology* 115: 127-133
- Nosanchuk J. D. 2006. Current Status and Future of Antifungal Therapy for Systemic Mycoses. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 1: 75-84
- Oehlke J., Scheller A., Wiesner B., Krause E., Beyermann M., Klauschenz E., Melzig M., Bienert M. 1998. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta* 1414: 127-139
- Oki T., Hirano M., Tomatsu K., Numata K.-I., Kamei H. 1989. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. II. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities. *Journal of Antibiotics* 42: 1756-1760
- Özcan S., Dover J., Rosenwald A.G., Wöfl S., Johnston M. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 93: 12428-12432

- Palm C., Netzereab S., Hällbrink M. 2006. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* 27: 1710-1716
- Park B.K., Hirota A., Sakai H. 1977a. Studies on new antimetabolite produced by microorganism. 3. Structure of plumbemycin-A and plumbemycin-B, antagonists of l-threonine from *Streptomyces plumbeus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 41: 573-579
- Park B.K., Hirota A., Sakai H. 1977b. Studies on new antimetabolite N-1409. *Agricultural and Biological Chemistry* 41: 161-167
- Park J.N., Morschhäuser J. 2005. Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 4: 1328-1342
- Payne J.W., Shallow D.A. 1985. Studies on drug targeting in the pathogenic fungus *Candida albicans*: peptide transport mutants resistant to polyoxins, nikkomycins and bacilysin. *FEMS Microbiology Letters* 28: 55-60
- Payne J.W., Smith M.W. 1994. Peptide Transport by Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology* 36: 1-80
- Perlin D.S. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates* 10: 121-130
- Perry J.R., Basrai M.A., Steiner H.-Y., Naider F., Becker J.M. 1994. Isolation and Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* Peptide Transport Gene. *Molecular and Cellular Biology* 14: 104-115
- Petraitiene R., Petraitis V., Kelaher A.M., Sarafandi A.A., Mickiene D., Groll A.H., Sein T., Bacher J., Walsh T. J. 2005. Efficacy, Plasma Pharmacokinetics, and Safety of Icofungipen, an Inhibitor of *Candida* Isoleucyl-tRNA Synthetase, in Treatment of Experimental Disseminated Candidiasis in Persistently Neutropenic Rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2084-2092
- Pfaller M.A., Diekema D.J. 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 133-163
- Pooga M., Soomets U., Hällbrink M., Valkna A., Saar K., Rezaei K., Kahl U., Hao J.X., Xu X.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hokfelt T., Bartfai T., Langel Ü. 1998. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*. *Nature Biotechnology* 16: 857-861
- Pooga M., Kut C., Kihlmark M., Hällbrink M., Fernaeus S., Raid R., Land T., Hallberg E., Bartfai T., Langel Ü. 2001. Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB Journal* 15: 1451-1453
- Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y. 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31: 12416-12423
- Pujals S., Giralt E. 2008. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 473-484
- Rapp C., Jung G., Katzer W., Loeffler W. 1988a. Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an antifungal dipeptide with an unusual chlorine-containing amino acid. *Angewandte Chemie* 100: 1801-1802
- Rapp C., Jung G., Kugler M., Loeffler W. 1988b. Rhizocitins - new phosphono-oligopeptides with antifungal activity. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1988:655-661
- Reuß O., Vik Å., Kolter R., Morschhäuser J. 2004. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341: 119-127
- Reuß O., Morschhäuser J. 2006. A family of oligopeptide transporters is required for growth of *Candida albicans* on proteins. *Molecular Microbiology* 60: 795-812
- Richard J.P., Melikov K., Vivès E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., Lebleu B. 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *Journal of Biological Chemistry* 278: 585-590
- Roberts W., Selitrennikoff C.P. 1990. Zeamatin, an antifungal protein made from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* 136: 1771-1778
- Rothstein D.M., Spacciapoli P., Tran L.T., Xu T., Roberts F.D., Dalla Serra M., Buxton D.K., Oppenheim F.G., Friden P. 2001. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1367-1373

- Scheller A., Wiesner B., Melzig M., Bienert M., Oehlke J. 2000. Evidence for an amphipathicity independent cellular uptake of amphipathic cell-penetrating peptides. *European Journal of Biochemistry* 267: 6043-6049
- Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. 1999. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285: 1569-1572
- Semlalia A., Leungb K.P., Curta S., Rouabhia M. 2011. Antimicrobial decapeptide KSL-W attenuates *Candida albicans* virulence by modulating its effects on Toll-like receptor, human β -defensin, and cytokine expression by engineered human oral mucosa. *Peptides* 32: 859-867
- Shoji J., Hino H., Sakazaki R., Kato T., Hattori T., Matsumoto K., Tawara K., Kikuchi J., Terui Y. 1989. Isolation of CB-25-I, an antifungal antibiotic, from *Serratia plymuthica*. *Journal of Antibiotics* 42: 869-874
- Soomets U., Lindgren M., Gallet X., Hällbrink M., Elmquist A., Balaspiri L., Zorko M., Pooga M., Brasseur R., Langel Ü. 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochimica et Biophysica Acta* 1467: 165-176
- Sorensen K.N., Wanstrom A.A., Allen S.D., Takemoto J.Y. 1998. Efficacy of syringomycin E in a murine model of vaginal candidiasis. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 51: 743-749
- Staib F. 1965. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 4: 187-193
- Staib P., Kretschmar M., Nichterlein T., Hof H., Morschhäuser J. 2002. Host versus *in vitro* signals and intrastrain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. *Molecular Microbiology* 44: 1351-1366
- Steinstraesser L., Kraneburg U.M., Hirsch T., Kesting M., Steinau H-U., Jacobsen F., Al-Benna S. 2009. Host Defense Peptides as Effector Molecules of the Innate Immune Response: A Sledgehammer for Drug Resistance? *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3951-3970
- Takesako K., Ikai K., Haruna F. 1991. Aureobasidins, a new antifungal antibiotics: taxonomy, fermentation, isolation, and properties. *Journal of Antibiotics* 44: 919-924
- Tanida T., Okamoto T., Ueta E., Yamamoto T., Osaki T. 2005. Antimicrobial peptides enhance the candidacidal activity of antifungal drugs by promoting the efflux of ATP from *Candida* cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 94-103
- Ti J.S., Steinfeld A.S., Naider F., Gulumoglu A., Lewis S.V., Becker J.M. 1980. Anticandidal Activity of Pyrimidine-Peptide Conjugates. *Journal of Medical Chemistry* 23: 913-918
- Torchilin V.P., Levchenko T.S., Rammohan R., Volodina N., Papahadjopoulos-Sternberg B., D'Souza G.G. 2003. Cell transfection *in vitro* and *in vivo* with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 1972-1977
- Trabulo S., Cardoso A., Mano M., Pedroso de Lim M. 2010. Cell-Penetrating Peptides - Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* 3: 961-993
- Tseng Y.L., Liu J.J., Hong R.L. 2002. Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Molecular Pharmacology* 62: 864-872
- Ueta E., Tanida T., Osaki T. 2000. A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *Journal of Peptide Research* 57: 240-249
- Wakabayashi H., Abe S., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H. 1998. Inhibition of Hyphal Growth of Azole-Resistant Strains of *Candida albicans* by Triazole Antifungal Agents in the Presence of Lactoferrin-Related Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1587-1591
- Wakieć R., Gabriel I., Prasad R., Becker J.M., Payne J.W., Milewski S. 2008. Enhanced Susceptibility to Antifungal Oligopeptides in Yeast Strains Overexpressing ABC Multidrug Efflux Pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 4057-4063
- Wang G., Li X., Wang Z. 2008. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37: 933-937
- Weidt G., Utermöhlen O., Zerrahn J., Reimann J., Deppert W., Lehmann-Grube F. 1994. CD8⁺ T lymphocyte-mediated antiviral immunity in mice as a result of injection of recombinant viral proteins. *Journal Immunology* 153: 2554-2561

- White T.C. 1997. The Presence of an R467K Amino Acid Substitution and Loss of Allelic Variation Correlate with an Azole-Resistant Lanosterol 14 α Demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1488-1494
- Wiles A.M., Naider F., Becker J.M. 2006. Transmembrane Domain Prediction and Consensus Sequence Identification of the Oligopeptide Transport Family. *Research in Microbiology* 157: 395-406
- Wojciechowski M., Milewski S., Mazerski J., Borowski E. 2005. Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug design. *Acta Biochimica Polonica* 52: 647-653
- Vivès E., Brodin P., Lebleu B. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16010-16017
- Xia Z., Turner G.C., Hwang C-S., Byrd C., Varshavsky A. 2008. Amino Acids Induce Peptide Uptake via Accelerated Degradation of CUP9, the Transcriptional Repressor of the PTR2 Peptide Transporter. *Journal of Biological Chemistry* 283: 28958-28968
- Yadan J.C., Gonneau M., Sarthou P., Le Goffic F. 1984. Sensitivity to Nikkomycin Z in *Candida albicans*: Role of Peptide Permeases. *Journal of Bacteriology* 160: 884-888
- Yamaguchi H. 1997. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptides antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 672-676
- Yamaguchi H., Uchida K., Hiratani T., Nagate T., Watanabe N., Omura S. 1988. RI-331, a new antifungal antibiotic. *Annals of the New York Academy of Sciences* 544: 188-190
- Yamaguchi M., Yamaki H., Shinoda T., Tago Y., Suzuki H., Nishimura T., Yamaguchi H. 1990. The mode of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331. *The Journal of Antibiotics* 43: 411-416
- Yeaman M.R., Yount N.Y. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* 55: 27-55
- Yu B.G., Okano T., Kataoka K., Kwon G. 1998. Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *Journal of Controlled Release* 53: 131-136
- Zaiou M. 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *Journal of Molecular Medicine* 85: 317-329
- Ziegelbauer K., Babczinski P., Schönfeld W. 1998. Molecular Mode of Action of the Antifungal β -Amino Acid BAY 10-8888. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2197-2205
- Zgódka D., Jędrzejczak R., Milewski S., Borowski E. 2001a. Amide and Ester Derivatives of N³-(4-Methoxyfumaroyl)-(S)-2,3-diaminopropanoic Acid: The Selective Inhibitor of Glucosamine-6-phosphate Synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9: 931-938
- Zgódka D., Milewski S., Borowski E. 2001b. A diffusible analogue of N³-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid with antifungal activity. *Microbiology* 147: 1955-1959
- Zhu W.L., Shin S.Y. 2009. 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
- Zorko M., Langel Ü. 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 529-545
- Inne:
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne P.A.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third edition (M27-A3). Wayne P.A.
- DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. Knox C., Law V., Jewison T., Liu P., Ly S., Frolkis A., Pon A., Banco K., Mak C., Neveu V., Djoumbou Y., Eisner R., Guo A.C., Wishart D.S. *Nucleic Acids Research*. 2011 Jan; 39 (Database issue):D1035-41. PMID: 21059682

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje naukowe:

1. Szweda P., Schiemann M., Frankowska A., Kot B., Zalewska M. 2014. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative non-antibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76: 355-362, doi: 10.1292/jvms.13-0177
2. Szweda P., Schiemann M., Kotłowski R., Gorczyca G., Zalewska M., Milewski S. 2012. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 1157-1174, doi: 10.1007/s00253-012-4484-3
3. Szweda P., Schiemann M., Milewski S., Frankowska A., Jakubczak A. 2012. Biofilm Production and Presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis in the Eastern Poland. *Polish Journal of Microbiology* 61: 65-69, doi: brak

Monografie i drugi zwarte:

1. Schiemann M. 2013. Wykorzystanie strategii konia trojańskiego w projektowaniu związków przeciwrzybowych. *Dokonania Młodych Naukowców cz. XI, nauki przyrodnicze, tom I*, 155-163, ISBN: 978-83-63058-28-9. Druk w czasopiśmie elektronicznym „Dokonania Młodych Naukowców”, ISSN: 2300-4436

Doniesienia konferencyjne:

1. Pawlak D., Schiemann M., Andruszkiewicz R. Synthesis and biological activity of N³-(4-metoxymetabolit)-L-2,3-diaminopropanoic acids (FMDP) glycolamides and lactamides. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 12-14.05.2014, Korytnica k/Szydłowa
2. Kawczyński M.T., Schiemann M., Kreczko J., Maćkiewicz Z.W., Milewska M., Milewski S. Novel antifungal peptide-inhibitor conjugates. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, 12-14.05.2014, Korytnica k/Szydłowa
3. Schiemann M., Biofilm formation and its regulation in *Staphylococcus aureus*. XIV Conference "Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology" DIAGMOL, publikacja w materiałach konferencyjnych, str. 108-111, ISBN: 978-83-7583-510-6, 19.10.2013, Warszawa
4. Schiemann M., Morschhäuser J., Milewski S. Peptide Permeases in *Candida albicans*, 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 11-15.06.2012, Berlin, Abstrakt ukazał się w czasopiśmie naukowym: *Mycoses*, 55 (suppl.4): 177, 2012
5. Schiemann M., Szweda P., Frankowska A., Milewski S. Badanie obecności i organizacji operonu *icaADBC* wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z gruczołu mlekowego krów z mastitis, XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, P-VIII-325, abstrakt na nośniku (CD), 5-8.09.2012, Lublin
6. Schiemann M., Szweda P., Jakubczak A. Comparison of genotypic and phenotypic methods used to evaluate the ability to form biofilm by *Staphylococcus* spp., II International Student Conference of Biotechnology, XII National Academic Seminar of Biotechnology Students, 19-21.11.2010, Wrocław

Granty i stypendia:

1. Kierownik projektu - Grant w konkursie PRELUDIUM4 nr 2012/07/N/NZ7/01775, Narodowe Centrum Nauki, 2013-2015. *Jednoetapowa synteza pochodnych O-2-izocefamów i N-2-izocefamów posiadających ugrupowanie retroamidowe/ tioretroamidowe lub fosfonowe/tiofosfonowe - potencjalnych antybiotyków beta-laktamowych oraz inhibitorów beta-laktamaz.*
2. Wykonawca - grant w konkursie OPUS3, Narodowe Centrum Nauki, 2013-2016. *Nowa strategia konstrukcji proleków przeciwgrzybowych na bazie peptydów penetrujących.*
3. Stypendium na wyjazd stażowy z funduszy strukturalnych POKL.04.01.01-00-368/09 „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii”. 15.02-15.05.2013. *Antifungal action of cell penetrating peptides-FMDP conjugates.* School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, Indie
4. Stypendium naukowe z funduszy strukturalnych POKL.04.01.01-00-368/09 „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii”. Rok akademicki 2013/2014.

Manuskrypty w przygotowaniu lub wysłane do redakcji:

1. Skwarecki A.S., Milewski S., Schiemann M., Milewska M.J. Antimicrobial molecular nanocarrier-drug conjugates. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* – wysłane do redakcji
2. Schiemann M., Szweda P., Morschhauser J., Milewski S. Molecular basis of *Candida albicans* resistance to antifungal oligopeptides – w przygotowaniu do druku