

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Expresse hmyzích antimikrobiálních peptidů**  
**v bakteriálních buňkách *E. coli***

Bakalářská práce

**Anna Kubovcová**

Školitel: prof. RNDr. Michal Žurovec CSc.  
Odborný konzultant: RNDr. Václav Brož PhD.

České Budějovice 2024

Kubovcová, A., 2024: Exprese hmyzích antimikrobiálních peptidů v bakteriálních buňkách *E. coli*. [Expression of antimicrobial peptides in bacteria cells *E. coli*. Bc. Thesis, in Czech.] – p. 45, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation:**

Numerous antimicrobial peptides have been described in studies on the innate immunity of organisms, with all relevant data available in public databases. This study focuses on the identification and testing of peptides with simple structure and high activity suitable for recombinant production in *E. coli*.

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích

Dne .....

Podpis studenta .....

Kubovcová

This research was supported by European Community's Program Interreg Bayern Tschechische Republik BYCZ01-039.

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli prof. Michalovi Žurovcovi za vedení mé práce, odborné konzultace, věnovaný čas a vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat svému odbornému konzultantovi doktorovi Václavovi Brožovi, který mě trpělivě zaškolil v laboratoři a pomohl mi, kdykoliv jsem potřebovala. Také bych chtěla poděkovat ostatním členům laboratoře za milé a podporující prostředí, ve kterém jsem mohla pracovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat prof. Daliborovi Kodříkovi a doktorovi Filipovi Dyčkovi za pomoc s analýzou výsledků. Samozřejmě bych také chtěla poděkovat italské výzkumné skupině vedené doktorkou Katiou Pane za laskavé poskytnutí jejich expresních vektorů. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům za podporu při studiu.

## Obsah

1	Úvod .....	1
1.1	Antibiotika .....	1
1.2	Antimikrobiální peptidy .....	2
1.2.1	Charakteristika .....	2
1.2.2	Struktura .....	2
1.2.3	Antimikrobiální aktivita a mechanismy působení .....	3
1.2.4	Produkce .....	5
1.2.5	Výhody AMPs .....	6
1.2.6	Nevýhody AMPs .....	8
2	Cíle práce .....	10
3	Materiály a metody .....	11
3.1	Materiály .....	11
3.1.1	Klonovací a expresní systém .....	11
3.2	Výběr peptidů .....	11
3.3	Příprava vektoru s nosným proteinem (ONC) .....	12
3.3.1	Štípání vektoru restrikčními enzymy .....	12
3.4	Příprava vektorů se zvolenými AMPs .....	13
3.4.1	Fosforylace primerů pro O, J, M, MG .....	13
3.4.2	Příprava PSAC .....	13
3.4.3	Ligace .....	14
3.4.4	Transformace DH5 $\alpha$ .....	15
3.4.5	Izolace plazmidů .....	16
3.5	Exprese AMPs .....	16
3.5.1	Transformace plazmidů do bakterií BL21 .....	16
3.5.2	Pěstování bakterií a indukce .....	17
3.5.3	Izolace inkluzních tělísek (IBs) .....	17
3.6	Izolace AMPs .....	18
3.6.1	Rozpouštění rekombinantního proteinu .....	18
3.6.2	Štěpení .....	18
3.6.3	Precipitace a separace ONC .....	19

3.6.4	Odpařování .....	19
3.7	Charakterizace izolovaných peptidů.....	19
3.7.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	19
3.7.2	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	20
3.8	Testování antimikrobiálních účinků .....	20
3.8.1	Příprava na testování .....	20
3.8.2	Disková difúzní metoda.....	21
4	Výsledky.....	22
4.1	Expresí fúzních proteinů .....	22
4.2	Izolace a charakterizace AMPs.....	23
4.3	Testování antimikrobiální aktivity.....	25
5	Diskuse .....	28
6	Závěr.....	32
7	Seznam použité literatury .....	33
8	Přílohy .....	39
8.1	Média .....	39
8.2	Enzymy a reagentie.....	40
8.3	Pufry a chemikálie .....	40
8.4	Pracovní vybavení .....	41
8.5	Sekvence.....	42
8.6	Seznam zkratk.....	45

# 1 Úvod

## 1.1 Antibiotika

Jedním z největších globálních problémů současného zdravotnictví je vznik rezistence patogenů vůči antibiotikům. Přitom tomu není ani sto let, kdy se skotský bakteriolog Alexander Fleming zasloužil o objev a představení první antibiotické látky, penicilinu, což lze považovat za počátek nové éry v dějinách medicíny (Demain & Sanchez, 2009). Od té doby se naše poznatky o látkách působících proti mikroorganismům značně prohloubily. Ačkoliv se v klinické praxi užívá zhruba jen stovka antimikrobiálních léčiv, aktuální celkový počet přírodních antibiotik se odhaduje přibližně na 70 000. V případě od nich odvozených polosyntetických a syntetických sloučenin může jít dokonce o číslo větší než 100 000, přičemž máme poměrně komplexní představu o jejich charakteristice a mechanismech působení (Bérdy, 2015; Spížek et al., 2016).

Definice antibiotických léčiv jako skupiny je relativně obtížná. Většinou se o nich mluví ve smyslu přírodních produktů, kterými jsou sekundární metabolity různých organismů – především *Actinobacteria*, konkrétněji druh *Streptomyces* (Bérdy, 2015), popřípadě sloučeninách od nich odvozených (Demain & Sanchez, 2009). Už jen z podstaty slova „antibiotikum“ lze tyto látky chápat jako baktericidní. Nicméně, dle dnešních definic je termín interpretován v rozšířeném znění, a to jako chemicky různorodé nízkomolekulární (MW <3000 (Bérdy, 2005)) látky přírodního či syntetického původu se schopností inhibovat bakteriální růst – jak baktericidně, tak bakteriostaticky (Yim et al., 2006). Mechanismů takového působení je více. Příkladem může být narušení plazmatické membrány, inhibice syntézy buněčné stěny, nebo inhibice syntézy proteinů a nukleových kyselin (MacGowan & Macnaughton, 2017).

Původcem celého problému s antibiotiky je jejich nadužívání. Díky svým pro lidstvo zásadním účinkům mají široké uplatnění jak ve zdravotnictví, tak i v různých sektorech zemědělství (Wegener, 2003; Bérdy, 2005; Ventola, 2015). Kvůli jejich nadměrné aplikaci napříč odvětvími se začaly šířit multirezistentní kmeny patogenů, proti kterým standardně nasazované léky nejsou efektivní (Wright, 2007; C. A. Arias & Murray, 2009; Aoki & Ueda, 2013). Důsledkem těchto skutečností jsou nejen ztráty na životech, protože lékaři předepisovaná medikace neúčinkuje, ale také snižující se dostupnost antibiotických přípravků, neboť pro farmaceutické firmy přestává jít o výhodnou investici (Projan, 2003; Choffnes et al., 2010; Bérdy, 2012). I přesto stále přetrvává potřeba bránit se bakteriálním nákazám, a proto se celosvětově rozšířil zájem o nalezení nových alternativ antibiotik (Bérdy, 2012; Hutchings

et al., 2019). Takovou mohou být například antimikrobiální peptidy, které jsou v současnosti hojně zkoumány pro svůj velký potenciál (Koczulla & Bals, 2003; Aoki & Ueda, 2013; Munk et al., 2014).

## 1.2 Antimikrobiální peptidy

### 1.2.1 Charakteristika

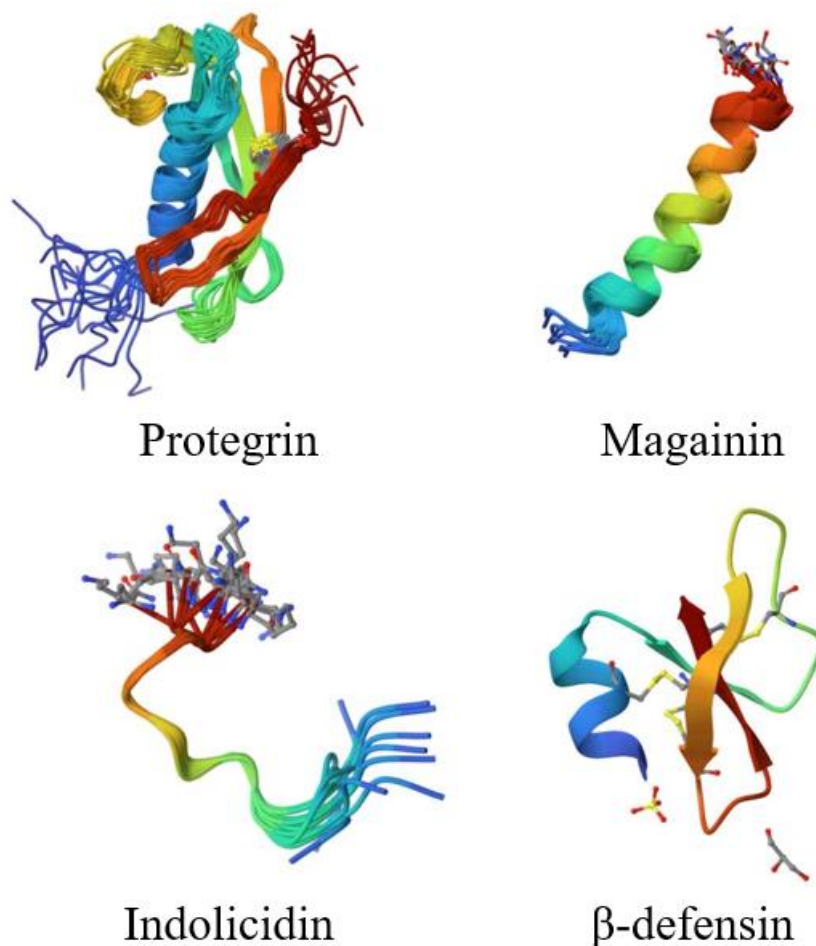
Antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou širokou skupinou malých proteinů, které mají schopnost zabíjet nebo inhibovat růst mikroorganismů – bakterií, virů, plísní, a dokonce i některých eukaryotických parazitů (Hancock, 2001; Aoki & Ueda, 2013). V přírodě jsou přítomné napříč mnohými říšemi života, od rostlin a mikroorganismů až po velké obratlovce (Zasloff, 2002; Koczulla & Bals, 2003; Bérdy, 2005). Někdy se o nich mluví také jako o „host-defense peptides“ (HDPs), protože se podílí na obranném systému organismů, kde jako součást vrozené imunity stojí v první obranné linii v boji proti infekcím (Hancock & Sahl, 2006; Gan et al., 2021).

AMPs bývají 10–50 aminokyselin dlouhé, i když velikostní vytyčení není zcela pevně dané (Hancock & Sahl, 2006; Munk et al., 2014). Ještě různorodější než ve velikosti, jsou antimikrobiální peptidy z hlediska sekvence a struktury, které pak zodpovídají za jejich spektrum účinků, aktivitu a specifitu (Koczulla & Bals, 2003). Typické jsou svou kationickou povahou způsobenou převahou pozitivně nabitých aminokyselin (arginin, lysin, histidin) nad negativně nabitými (Hancock & Lehrer, 1998; Koczulla & Bals, 2003). Zároveň se ale objevují i anionické peptidy bohaté na aspartát a glutamát (Brogden, 2005). Většina peptidů je amfipatická – nejčastěji 30–70 % molekuly tvoří hydrofobní rezidua, což hraje roli při integraci do cílových membrán (Hancock, 2001; Brogden, 2005; Hancock & Sahl, 2006; Gan et al., 2021).

### 1.2.2 Struktura

Přímo z hlediska struktury pak lze rozlišit čtyři základní skupiny AMPs. V přírodě se nejběžněji vyskytují peptidy ve formě (i)  $\alpha$ -šroubovice, které mívají nejvyšší aktivitu, protože oproti molekulám s jinou strukturou snáze pronikají do membrán a (ii)  $\beta$ -listů, které mohou interagovat s membránovými proteiny zasažených mikroorganismů (Hancock, 2001; Brogden, 2005). Struktury  $\beta$ -listů jsou stabilizovány dvěma až čtyřmi intramolekulárními disulfidickými můstky mezi cysteiny, díky kterým jsou peptidy stabilnější a obtížněji degradovatelné (Hancock & Sahl, 2006). Někdy se objevuje i kombinace uvedených typů

struktur – např.  $\beta$ -listy asociované s  $\alpha$ -šroubovicí (Hancock & Lehrer, 1998). Dalšími formami AMPs pak jsou (iii) rozvětvené šroubovice s doménami bohatými na jednu či více aminokyselin (glycin, prolin, tryptofan, arginin a/nebo histidin), nebo (iv) volné smyčky s jedním disulfidickým můstkem ve své struktuře (Hancock, 1997; Hancock & Sahl, 2006).



**Obr. 1:** Příklady struktur AMPs (Gesell et al., 1997; Hoover et al., 2001; Rozek et al., 2003; Yang et al., 2003).

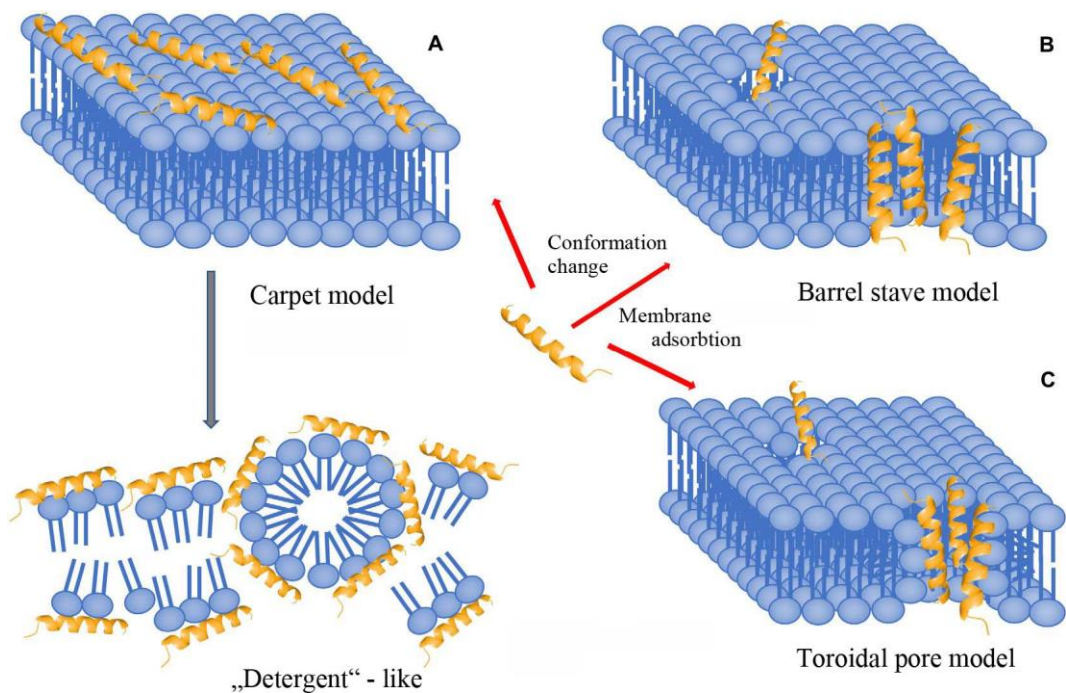
### 1.2.3 Antimikrobiální aktivita a mechanismy působení

Jak již bylo výše zmíněno, antimikrobiální peptidy jsou nepostradatelnou součástí vrozeného imunitního systému (Gan et al., 2021). Vykazují rozsáhlý repertoár mechanismů působení, kterým se odlišují od konvenčních antibiotik (Aoki & Ueda, 2013). AMPs primárně interagují s mikrobiálními membránami, přičemž využívají jejich specifického složení, protože právě to je u buněk mikroorganismů a mnohobuněčných živočichů (zejména savců)



rozdílné (Hancock & Lehrer, 1998; Matsuzaki, 1999). Zatímco vnější vrstva membrány gram-negativních bakterií obsahuje negativně nabitě lipopolysacharidy (LPS) a buněčná stěna kyseliny teichovou, vnější vrstva plazmatické membrány eukaryotních buněk se skládá převážně ze zwitterionických fosfolipidů (fosfatidylcholinu a sfingomyelinu u savců) (Hancock & Lehrer, 1998; Matsuzaki, 1999; Hancock & Sahl, 2006; Pushpanathan et al., 2013). Dalším faktorem je přítomnost cholesterolu v membráně, který omezením fluidity lipidické dvojvrstvy, popřípadě samotnou interakcí s peptidy, snižuje efektivitu antimikrobiálních peptidů (Hancock & Lehrer, 1998; Matsuzaki, 1999; Hancock & Diamond, 2000; Pushpanathan et al., 2013). Díky tomuto rozdílu dokážou AMPs selektivně rozeznat mikroorganismy od svého hostitele a jsou pro ně snadno zacílitelné (Matsuzaki, 1999; Hancock & Diamond, 2000; Koczulla & Bals, 2003). Následná přímá interakce je pak zprostředkována elektrostatickou přitažlivostí mezi kladně nabitými peptidy a záporně nabitými povrchy mikrobů (Koczulla & Bals, 2003; Pushpanathan et al., 2013). Proces podporují také hydrofobní vazby mezi nepolárními aminokyselinami v peptidech a centrální částí lipidické dvojvrstvy (Matsuzaki, 1999).

Klíčovou roli v antimikrobiální aktivitě AMPs hraje jejich schopnost rozrušovat membrány cílových organismů (Hancock & Lehrer, 1998; Koczulla & Bals, 2003). V průběhu let bylo představeno hned několik modelů objasňujících tento proces. Jako příklad lze uvést modely (i) „barrel-stave mechanism“, kdy peptidy vytvoří transmembránový hydrofilní kanál, (ii) „aggregate channel model“, kdy se peptidy shromáždí do neuspořádaných klastrů formujících krátkodobé kanály skrz cílovou membránu umožňující průnik cizorodých látek (včetně dalších molekul AMPs) do buňky a (iii) „carpet-like mechanism“, kdy peptidy ve vrstvě pokryjí buněčný povrch, poruší jeho stabilitu za vzniku toroidálních pórů, a důsledkem toho se buňka zborší (Hancock & Lehrer, 1998; Koczulla & Bals, 2003) (Obr. 2). V každém z případů je prvním krokem navázání peptidu na membránu způsobující změny v její struktuře a permeabilitě (Zasloff, 2002; Hancock & Sahl, 2006). Poté, vlivem narušení, dochází ke ztrátě integrity membrány, rozkladu membránového potenciálu a úniku vnitrobuněčného obsahu (Zasloff, 2002; Koczulla & Bals, 2003; Hancock & Sahl, 2006).



**Obr. 2:** Základní mechanismy působení AMPs na buněčné membrány (Huan et al., 2020).

Dosud popsané modely se vztahují především na kationické peptidy. Jiné AMPs mají schopnost translokace přes mikrobiální membránu bez jejího kritického porušení, kdy následně cílí na procesy, jež jsou pro život buňky zásadní, např. syntézu proteinů a nukleových kyselin; popřípadě indukují pro buňku likvidační procesy, jako je například aktivace enzymů degradujících buněčnou stěnu (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002; Hancock & Sahl, 2006; Pushpanathan et al., 2013). Kromě přímé antimikrobiální aktivity vykazuje řada AMPs také imunomodulační účinky (Pushpanathan et al., 2013; Gan et al., 2021). Interakcí s imunitním systémem hostitele dokážou v případě infekce vyvolat protizánětlivou reakci a dále stimulovat imunitní odpověď (Gan et al., 2021). Některé peptidy dokonce prokázaly schopnost neutralizovat zánětlivou reakci vyvolanou bakteriálními lipopolysacharidy, což je zajímavé z medicánálního hlediska při stavech sepse (Brandenburg et al., 2016). Různorodé mechanismy účinku AMPs podtrhují jejich velký terapeutický potenciál při boji s patogeny rezistentními vůči antibiotikům.

#### 1.2.4 Produkce

Aby mohly peptidy podstoupit řádné testování před případným uvedením do praxe, je potřeba vyvinout adekvátně výnosnou a ekonomicky nenáročnou technologii produkce. Izolace AMPs z přírodních zdrojů má jen malý výtěžek, a tak není výhodná pro rozsáhlé

experimentování a aplikaci ani z ekonomického hlediska (Hancock & Lehrer, 1998; Li, 2009). Kvůli této skutečnosti byly v posledních desetiletích zdokonalovány metody uplatňující moderní postupy. Výrobu antimikrobiálních peptidů lze tedy rozdělit do dvou hlavních směrů: (i) syntézy *de novo* a (ii) rekombinantní exprese (Hancock & Lehrer, 1998; Aoki & Ueda, 2013; Gan et al., 2021). Metoda chemické (nebo enzymatické) syntézy bývá považována za praktičtější přístup (Gan et al., 2021). Nejčastěji užívaným typem pro výrobu menších peptidů (<50 aminokyselin) je tzv. „solid-phase peptide synthesis“ (SPPS) (Goodwin et al., 2012; Gan et al., 2021). Spočívá v uchycení C-terminální aminokyseliny peptidu k pevnému polymerickému nosiči (pryskyřici) a postupným přidáváním dalších aminokyselin dochází k prodlužování řetězce. Nakonec je nově syntetizovaný peptid odštěpen od nosiče (Gan et al., 2021). Nespornou výhodou chemické syntézy je možnost zhotovení poměrně libovolného designu peptidu a následná velká čistota produktu. Nevýhodou je ovšem vysoká cena a zátěž pro životní prostředí (Li, 2009; Goodwin et al., 2012; Gan et al., 2021).

Modely využívající rekombinantní expresi jsou obecně vnímány jako pracnější, zato finančně méně nákladné než chemická syntéza (Li, 2009; Gan et al., 2021). Expresní systémy se nabízí různé, nejčastěji je volena produkce formou fúzního proteinu v bakteriálních buňkách – typicky *E. coli* (Piers et al., 1993; Li, 2009). Výrobu v prokaryotických organismech ovšem komplikuje toxicita pro hostitelské buňky (Hancock & Sahl, 2006). Z tohoto důvodu bývá do fúzního proteinu přidávána část s nosným proteinem, který má vliv na rozpustnost peptidu, nebo iniciuje formaci inkluzních tělísek (Li, 2009; Vidovic et al., 2009; Aoki & Ueda, 2013; Gan et al., 2021). Výsledný protein s AMP tak není toxický pro hostitelské buňky a je chráněn před proteázami (Li, 2009). Oblast nosného proteinu také obvykle obsahuje afinitní purifikační značku, např. His-tag, díky které lze získat protein s relativně vysokou čistotou i touto metodou produkce. Ve fúzním proteinu je pak klíčové štěpné místo mezi nosným proteinem a AMP, protože umožňuje tyto dvě domény po expresi a purifikaci proteinu od sebe oddělit (Hancock & Lehrer, 1998). Oba přístupy k výrobě antimikrobiálních peptidů mají svá pozitiva a negativa. Při volbě metodiky je tedy potřeba zvážit vícero faktorů. Většinou rozhoduje velikost peptidů, účel produkce, dostupné vybavení či kapitál (Gan et al., 2021).

### 1.2.5 Výhody AMPs

Studium antimikrobiálních peptidů je zajímavé v mnoha ohledech a pomáhá prohloubit představu o přínosech spojených s jejich případným uvedením do klinické, zemědělské či průmyslové praxe. Vzhledem ke svým vlastnostem a projevům má nasazení

AMPs mnoho pozitiv. Jak již bylo uvedeno výše, disponují širokým spektrem působnosti proti různým mikroorganismům – od virů a bakterií, přes plísně až po některé parazity (Hancock, 2001; Aoki & Ueda, 2013). Tato všestrannost je doplněna efektivitou někdy již v mikro-molárních koncentracích a značnou rychlostí účinku, což je užitečné při boji s infekcí (Koczulla & Bals, 2003). Další výhodou antimikrobiálních peptidů je jejich původ. Jelikož se přirozeně vyskytují jako složka imunitního systému u majoritní většiny organismů, volbou vhodného peptidu lze dosáhnout vysoké snášenlivosti hostitelským organismem (Pushpanathan et al., 2013). Nespornou výhodou jsou také jejich imunomodulační schopnosti, kdy dokážou stimulovat buňky k imunitní odpovědi a pomáhají s regulací zánětlivých procesů (Pushpanathan et al., 2013; Gan et al., 2021).

O AMPs je často referováno jako o slibné alternativě antibiotik, protože pravděpodobnost vzniku mikrobiální rezistence je v jejich případě mnohem nižší (Hancock, 2001). Důvodem jsou jejich mechanismy působení, které cílí primárně na mikrobiální membránu za doprovodu dalších efektů (Hancock & Lehrer, 1998; Matsuzaki, 1999; Koczulla & Bals, 2003). Zároveň přispívá jejich rychlost účinkování, která znemožněním další reprodukce mikrobů brání vývinu rezistence z generace na generaci (Mor, 2000). Ve skutečnosti ale nemusí být AMPs uplatněny rovnou jako samostatně fungující prostředky. Na poli medicíny mohou být přínosné už jen svým synergickým účinkem se známými konvenčními antibiotiky, kdy zvyšují účinnost léčby (Gan et al., 2021). Synergické působení se však nevztahuje jen na jiné léky, objevuje se také při kombinovaném nasazení více peptidů (např. defensinů), kdy poskytuje ještě silnější širokospektrální ochranu (Hancock & Diamond, 2000; Mor, 2000).

V dnešní době genového inženýrství, pokročilých molekulárních metod a biotechnologií poskytuje flexibilní design peptidů příležitost pro vývoj nových, efektivnějších antimikrobiálních látek nebo terapeutik s vyšší specifitou (Aoki & Ueda, 2013; Der Torossian Torres & De La Fuente-Nunez, 2019). Kromě využití v medicíně mohou najít AMPs i jiná uplatnění. Nabízí se například biochemická ochrana povrchů, kosmetika, potravinářství či zemědělství, neboť jsou známé peptidy s insekticidními vlastnostmi, tudíž by mohly posloužit k rozvoji bio-insekticidů (Hancock & Lehrer, 1998; Hof et al., 2001; Zasloff, 2002; Gan et al., 2021; Zhang et al., 2023). Díky svému potenciálu řešit různé výzvy moderní společnosti jsou antimikrobiální peptidy perspektivním směrem pro výzkum.

### 1.2.6 Nevýhody AMPs

Ve skutečnosti je ovšem cesta AMPs do praxe dlouhá a plná překážek. Tak jako mají mnoho slibných přínosů, je třeba vzít v potaz i řadu nevýhod a úskalí která je nutné před jejich uvedením na trh překonat. Jedním ze zásadních aspektů bývá souhra mezi pozitivně nabitými peptidy a negativně nabitými cílovými membránami, která je základem jejich antimikrobiální aktivity (Koczulla & Bals, 2003; Pushpanathan et al., 2013). Tato interakce je citlivá na změny iontové síly (Hof et al., 2001; Zasloff, 2002; Koczulla & Bals, 2003). Hof a kolektiv upozorňují na to, že většina pokusů s AMPs je prováděna v pufrech s nízkým obsahem iontů (Hof et al., 2001). Případné fyziologické prostředí, kde by se měla interakce odehrávat, je ale co se týče iontového složení velmi rozdílné. Pochybnosti vyvolává také citlivost peptidů na soli, které rovněž snižují jejich účinnost (Hof et al., 2001; Aoki & Ueda, 2013). Tento problém by mohly pomoci vyřešit AMPs mořských organismů, které jsou obecně mnohem méně citlivé na změny iontové síly (Hof et al., 2001).

Další komplikací je náchylnost peptidů k proteolytické degradaci (Koczulla & Bals, 2003; Hancock & Sahl, 2006; Gan et al., 2021). Tento úkaz může být na jednu stranu prospěšný ve smyslu bezpečnostního profilu AMPs, protože by nemuselo docházet k jejich akumulaci a indukci systémové imunitní odpovědi. Na druhou stranu se tím snižuje jejich terapeutická použitelnost, protože by bylo potřeba vyšší a častější dávkování (Hof et al., 2001; Aoki & Ueda, 2013). Vzhledem k jejich proteinové povaze je ale nutné zvážit i případnou imunogenost (Hof et al., 2001; Koczulla & Bals, 2003). Při lokální povrchové aplikaci nebo kontaktu s trávicím traktem by nemuselo docházet k vážnějším potížím, protože reakce na cizorodé peptidy zde není tak silná. V krevním řečišti už je ale situace jiná. Krátké bioaktivní peptidy se zde běžně nevyskytují a když, tak je jejich množství poměrně striktně regulováno. Při nárustu koncentrace AMPs v krvi by tak mohlo docházet k dráždění mastocytů, které uvolní histamin, což může vyvolat anafylaxi (Hof et al., 2001). Na základě těchto předpokladů se názory na terapeutickou aplikaci antimikrobiálních peptidů různí. V každém případě by ale neměly být zanedbány hemolytické vlastnosti, které řada peptidů vykazuje (Aoki & Ueda, 2013). Stejně tak někteří autoři poukazují na možnou toxicitu pro samotné buňky hostitelského organismu (Koczulla & Bals, 2003; Hancock & Sahl, 2006; Gan et al., 2021).

Poslední hlavní překážkou uvedení AMPs do praxe je jejich nákladná produkce (Koczulla & Bals, 2003; Hancock & Sahl, 2006; Gan et al., 2021). Složité procesy syntézy a purifikační metody zvyšují výrobní náklady natolik, že se jejich příprava zatím vyplatí spíše jen pro laboratorní účely než v masovém průmyslovém měřítku. Jak již bylo naznačeno, v této

otázce záleží na typu peptidů a účelu produkce. U krátkých peptidů v menším množství bývá volena chemická syntéza, kde je nákladné hlavně vybavení laboratoře, chemikálie a samotné aminokyseliny potřebné ke generování (Gan et al., 2021). V případě delších peptidů nebo při výrobě ve velkém měřítku se většinou doporučuje jít cestou rekombinantní DNA exprimované v živých systémech a využití fermentace. Zde mohou být drahé počátky výzkumu, které zahrnují genetické inženýrství, pořízení vybavení a složek kultivačních médií. Ovšem po optimalizaci produkce a purifikace peptidů lze dosáhnout efektivní a relativně levné výroby AMPs, která má potenciál i pro průmyslové využití (Li, 2009; Gopal & Kumar, 2013; Gaglione et al., 2019).

Přes zmíněné nevýhody nabízí antimikrobiální peptidy v budoucnu široké uplatnění. Rozvojem metodologických postupů manipulace s malými molekulami se rozšiřují možnosti pro cenově dostupnou produkci. Zároveň roste potřeba zavádění nových antimikrobiálních látek s různorodými účinky, aby se zamezilo hrozící zdravotnické krizi (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS), 2022). V současných studiích se výzkumné týmy soustředí například na zdokonalení vlastností peptidů nebo optimalizaci procesu výroby (M. Arias et al., 2018; Lee et al., 2018; Roca-Pinilla et al., 2020). V řadě prací je využívána možnost přípravy fúzních proteinů bakteriemi ve formě inkluzních tělísek (IBs). Tento přístup se uplatňuje i v případě AMPs, které je tak možné levně produkovat v bakteriálních buňkách, pro které by jinak byly toxické. Předkládaná bakalářská práce vychází ze studie italské výzkumné skupiny, která se zabývala designem nosného proteinu a jeho uplatněním při produkci toxických peptidů (Pane et al., 2016). Cílem práce bylo zavedení produkce malých AMPs hmyzího původu s využitím fúzního proteinu s nosným proteinem Onkonázou. Její výhodou je, že zprostředkovává ukládání ve formě IBs a umožňuje snadnou separaci vzniklého peptidu.

## 2 Cíle práce

1. Příprava rekombinantních konstruktů a jejich exprese v *E. coli*.
2. Izolace antimikrobiálních peptidů.
3. Testování antimikrobiálních účinků izolovaných peptidů.

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Klonovací a expresní systém

**Tab. I:** Použité kmeny bakterií a vektory.

Název	Popis	Zdroj / Kat. č.
DH5 $\alpha$	Chemicky kompetentní klonovací <i>E. coli</i>	–
One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	Chemicky kompetentní expresní <i>E. coli</i>	Invitrogen / C601003
pET-22b(+)	Expresní vektor	Novagen

Ostatní materiál (pufry, chemikálie, enzymy, antibiotika, molekulární markery, pracovní kity a přístrojové vybavení) jsou vzhledem k rozsahu uvedeny v sekci 0.

### 3.2 Výběr peptidů

Antimikrobiální peptidy byly vybírány z Antimicrobial Peptide Database (APD) (Wang et al., 2016). Na základě poznatků z italské studie (Pane et al., 2016) a vlastních preferencí byla stanovena následující kritéria výběru. Zvolené peptidy (viz Tab. II):

1. nesměly obsahovat sled aminokyselin Asp-Pro (DP) nebo Asp-Cys (DC) ve své sekvenci
2. musely začínat aminokyselinami prolinem (P), nebo cysteinem (C)
3. musely vykazovat co nejvyšší účinnost (dle AC uvedené v databázi)
4. měly být v ideálním případě hmyzího původu

Dále byl pro potřeby této práce doplněn požadavek, aby byl alespoň některý z vybraných peptidů komerčně dostupný jako možnost porovnání v závěrečném testování.



**Tab. II:** Zvolené AMPs.

Název	Zkratka	MW / počet reziduí	Sekvence	Původ (Zdroj / Kat. č.)
Omiganan (komerční)	Ok	1779.15 / 12	ILRWPWWPWRRK-NH2	Syntetický (MedChemExpress / HY-105048)
Omiganan	O	1877.27 / 13	PILRWPWWPWRRK	Syntetický
Jelleine-I	J	954.18 / 8	PFKLSLHL	Včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Melitin	M	2887.55 / 26	PIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQ	Včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Melitin (var. 2)	MG	2847.49 / 26	GIGAVLKVLTTGLPALISWI KRKRQQ	Včela medonosná ( <i>Apis mellifera</i> )
Psacothasin	PSAC	3 479.96 / 34	CIAKGNGCQPSGVQGNCC SGHCHKEPGWVAGYCK	<i>Psacothea hilaris</i>

### 3.3 Příprava vektoru s nosným proteinem (ONC)

Expresní vektor byl štědrý dar od italské výzkumné skupiny (Pane et al., 2016). Jeho základem byl komerčně dostupný vektor pET-22b(+). Do něj byl vložen konstrukt s genem Onkonázy (ONC), která slouží jako nosný protein. Dále byl inkorporován His-tag, linker sekvence (GTGDP) a gen peptidu odvozeného od lidského Trombinu (GKY20). Konstrukt zároveň obsahuje restrikční místa KpnI a BamHI v linker sekvenci a SacI za vloženým genem peptidu, což umožňuje snadnou výměnu za gen jiného peptidu. Postup přípravy vektoru je popsán ve výše referované studii.

#### 3.3.1 Štípání vektoru restrikčními enzymy

Expresní vektor byl štípan restrikčními enzymy dle postupu v Tab. III. V závislosti na počátku sekvence zvolených AMPs bylo vektor nutné rozštěpit „linker“ sekvenci dvěma odlišnými enzymy. Pro zaklonování peptidů začínající na C-konci prolinem byl vektor štěpen enzymy BamHI–SacI. Pro zaklonování peptidů začínající na C-konci jinou aminokyselinou byl vektor štěpen enzymy KpnI–SacI.

**Tab. III:** Restrikční reakční směs (100 µl).

Složka	Objem (µl)
Pufr „FastDigest“ (10×)	10
Vektor s konstruktem (ONC-GKY20)	25
KpnI / BamHI	5
SacI	5
ddH <sub>2</sub> O	55

Výsledné vzorky byly vizualizovány na gelu na horizontální elektroforéze (1,25%, 100 V, 1× TAE pufr). Proužky s rozštípnutým vektorem byly vyříznuty žiletkou a přečištěny pomocí kitu Expin™ Combo GP. Přečištění bylo provedeno přesně podle návodu v sadě. Koncentrace takto získaných vektorů byla ověřena spektrofotometricky na Nanodropu (vektor KpnI–SacI: c = 63ng/µl; vektor BamHI–SacI c = 59 ng/µl).

### 3.4 Příprava vektorů se zvolenými AMPs

Primery pro peptidy Omiganan (O), Jelleine-I (J) a Melitin (M a MG) byly nasyntetizovány společností Merck.

#### 3.4.1 Fosforylace primerů pro O, J, M, MG

Aby se zvýšila úspěšnost ligace v kroku 3.4.3, byly primery pro O, J, M a MG nejprve fosforylovány (Tab. IV). Reakční směs byla inkubována po dobu cca 30 min při 37 °C a následně inaktivována zahřátím na 95 °C, 5 min.

**Tab. IV:** Fosforylační reakční směs (10 µl).

Složka	Objem (µl)
Ligační pufr (10×)	1
Primer F (O / J / M / MG)	1
Primer R (O / J / M / MG)	1
T4 Polynukleotidová Kináza	1
ddH <sub>2</sub> O	6

#### 3.4.2 Příprava PSAC

Peptid Psacothasin (PSAC) byl příliš dlouhý pro přímou syntézu. Tento problém byl vyřešen pomocí PCR dvou navržených oligonukleotidů s přesahem (Tab. V). Sekvence oligonukleotidů včetně vyznačené oblasti vzájemného nasedání jsou uvedeny v sekci 0.

**Tab. V:** Reakční směs PCR (300  $\mu$ l).

Složka	Objem ( $\mu$ l)
F primer	30
R primer	30
DreamTaq PCR MasterMix (2 $\times$ )	150
ddH <sub>2</sub> O	90

**Tab. VI:** Program amplifikace pomocí PCR.

Fáze	Čas	Teplota (°C)	Počet opakování
Denaturace	2 min	94	1
Denaturace	30 s	94	30
Nasedání primerů	30 s	55	
Polymerace	45 s	72	
Polymerace	1 min	72	1
Konec reakce	–	4	–

Část PCR produktů byla pro kontrolu analyzována na horizontální gelové elektroforéze (1,25%, 100 V, 1 $\times$  TAE pufr). Po ověření úspěšnosti PCR byly ostatní produkty přečištěny pomocí kitu Expin™ Combo GP. Přečištění bylo provedeno přesně dle návodu výrobce. Získaná DNA byla spektrometricky změřena Nanodropem ( $c = 96$  ng/ $\mu$ l) a restriktivně štípána enzymy KpnI a SacI.

**Tab. VII:** Restriktivní reakční směs (100  $\mu$ l).

Složka	Objem ( $\mu$ l)
Pufr „FastDigest“ (10 $\times$ )	10
Přečištěný PCR produkt	25
KpnI	5
SacI	5
ddH <sub>2</sub> O	55

Po štípání restriktivními enzymy byl produkt opět přečištěn kitem Expin™ Combo GP. Byl dodržen postup přesně podle návodu v sadě. Následně byla výsledná koncentrace spektrometricky zkontrolována Nanodropem ( $c = 54$  ng/ $\mu$ l). Tento DNA produkt byl použit v ligační směsi v kroku 3.4.3.

### 3.4.3 Ligace

Vektory nesoucí konstrukt se zvolenými AMPs byly zkompletovány ligací plazmidů z kroku 3.3.1 a primerů z kroků 3.4.1 a 3.4.2. Ligační pufr byl před použitím ponechán, aby

zvolna rozmrzl na ledu, a poté důkladně protřepán. Celkové složení ligační reakce je v Tab. VIII.

**Tab. VIII:** Ligační reakční směs (20  $\mu$ l).

<b>Složka</b>	<b>O</b>	<b>J</b>	<b>M</b>	<b>MG</b>	<b>PSAC</b>
Insert (primer)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Vektor (KpnI+SacI)	–	–	–	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
Vektor (BamHI+SacI)	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l	–	–
Ligační pufr (10 $\times$ )	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
T4 DNA ligáza	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	–

Ligační směs byla inkubována přes noc při pokojové teplotě.

#### 3.4.4 Transformace DH5 $\alpha$

Transformace byla provedena do chemicky kompetentních buněk DH5 $\alpha$ . Alikvóty buněk po 200  $\mu$ l byly vyndány z -80  $^{\circ}$ C a ponechány na ledu, aby rozmrzly. Následně byly rozděleny po 100  $\mu$ l do předchlazených mikrozkušavek a bylo přidáno 10  $\mu$ l ligační směsi z bodu 3.4.3. Mikrozkušavky s buňkami byly inkubovány 15–20 minut na ledu. Následoval tepelný šok 42  $^{\circ}$ C po dobu 50 s a okamžité vrácení na led na 60 s. Poté bylo přidáno 500  $\mu$ l LB média a dáno třepat na 200 rpm 37  $^{\circ}$ C 45 min. Připravené buňky byly sterilně vysety na LB agarové misky obsahující Ampicilin (100  $\mu$ g/ml). Misky byly po zaschnutí zavřeny, obráceny dnem vzhůru a inkubovány ve 37  $^{\circ}$ C po dobu 16–20 hodin. Jednotlivé kolonie bakterií byly poté překřížkovány na nové selekční LB agarové misky a ponechány v inkubátoru ve 37  $^{\circ}$ C do druhého dne.

Následující den byl odebrán vzorek bakterií z každé překřížkované kolonie a rozpuštěn v ddH<sub>2</sub>O. Suspenze byla inkubována v 95  $^{\circ}$ C po dobu 10 min. Následovalo okamžité zchlazení na ledu. Suspenze byla použita jako templát do kontrolní PCR (Tab. IX).

**Tab. IX:** Reakční směs colony PCR (10 µl).

Složka	Objem (µl)
T7 primer (Forward)	0,5
Reverzní testovací primer	0,5
Bakteriální suspenze	1
DreamTaq Green PCR MasterMix (2×)	5
ddH <sub>2</sub> O	3

**Tab. X:** Program PCR.

Fáze	Čas	Teplota (°C)	Počet opakování
Denaturace	2 min	94	1
Denaturace	30 s	94	30
Nasedání primerů	30 s	53	
Polymerace	45 s	72	
Polymerace	1 min	72	1
Konec reakce	–	4	–

Výsledky PCR byly ověřeny elektroforeticky na agarózovém gelu (1,25%, 100 V, 1× TAE pufr). Pozitivní kolonie byly dále použity pro přípravu tekutých kultur v kroku 3.4.5.

### 3.4.5 Izolace plazmidů

Pro izolaci byly použity 3 ml kultury, která byla kultivována přes noc (37 °C, 200 rpm) v selekčním LB médiu. Izolace plazmidů byla provedena dle návodu pracovního kitu Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep. Úspěšnost izolace byla ověřena sekvenováním (Eurofins). Získaná plasmidová DNA byla použita v kroku 3.5.1.

## 3.5 Exprese AMPs

### 3.5.1 Transformace plazmidů do bakterií BL21

Postup transformace byl totožný jako v bodě 3.4.4, akorát v tomto kroku byly využity jiné akceptorové buňky – chemicky kompetentní *E. coli* BL21 (DE3). Následovala opět kontrolní colony PCR shodná s krokem 3.4.4 a výsledky byly ověřeny na horizontální gelové elektroforéze (1,25%, 100V, 1× TAE pufr).

### 3.5.2 Pěstování bakterií a indukce

Selekční TB médium (viz 3.1.2) bylo inokulováno přes noc rostoucí kulturou bakterií z bodu 3.5.1. Suspenze byla kultivována, než bylo dosaženo  $OD_{600} = 0,8-1$ . Poté byla indukována exprese IPTG (1mM). Následná inkubace probíhala při 37 °C, 200 rpm po dobu 16 h. Médium bylo rozděleno po 2 ml do mikrozkušavek a sklizeno odstředěním (4 °C,  $5000 \times g$ , 20 min). Získané sedimenty byly opláchnuty dH<sub>2</sub>O a ihned zamraženy v -80 °C.

### 3.5.3 Izolace inkluzních tělísek (IBs)

Izolace IBs byla provedena dle diplomové práce Bc. T. Staškové (Stašková, 2012) v následující úpravě. Všechny pufrů a technické vybavení jsou uvedeny v kapitole 8.

1. Bakteriální sedimenty z kroku 3.5.2 (ze 2 ml suspenze) byly vyndány z -80 °C a nechány rozmraznout na ledu.
2. Ke vzorkům bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru (250 µl lysozymu, doplněno B1 pufrům do 25 ml). Sonikace 2 kola po 40 s, 60 % výkonu, na ledu. Doplněno 1500 µl lyzačního pufru a dáno míchat na kruhovou třepačku na 45–60 min za pokojové teploty. Stočeno na vychlazené odstředivce (4 °C,  $16\ 000 \times g$ , 15 min). Supernatant byl odstraněn.
3. K sedimentům bylo přidáno 500 µl „DNase“ pufru. Sonikace 2 kola po 40 s, 60 % výkonu, na ledu. Doplněno 1500 µl „DNase“ pufru a dáno míchat na kruhovou třepačku na 60 min za pokojové teploty. Stočeno na vychlazené odstředivce (6 °C,  $16\ 000 \times g$ , 15 min). Supernatant byl odstraněn.
4. K sedimentům bylo přidáno 500 µl B2 pufru. Sonikace 2 kola po 30–45 s, 60 % výkonu, na ledu. Doplněno 1500 µl B2 pufru a dáno míchat na kruhovou třepačku na 10 min za pokojové teploty. Stočeno na vychlazené odstředivce (8 °C,  $16\ 000 \times g$ , 15 min). Supernatant byl odstraněn. Tento krok (4.) byl proveden celkem 3krát.
5. K sedimentům bylo přidáno 500 µl B3 pufru. Sonikace 2 kola po 30 s, 60 % výkonu, na ledu. Doplněno 1500 µl B3 pufru a dáno míchat na kruhovou třepačku na 10 min za pokojové teploty. Stočeno na vychlazené odstředivce (8 °C,  $15\ 000 \times g$ , 15 min). Supernatant byl odstraněn. Tento krok (5.) byl proveden celkem 3krát.
6. Po posledním odsátí supernatantu byly sedimenty IBs opatrně opláchnuty dH<sub>2</sub>O, zbaveny zbytků dH<sub>2</sub>O a dány zamrazit do -80 °C.

Pro kontrolní účely byl u některých vzorků v posledním opakování 5. kroku odebrána 200 µl alikvóta (1/10 objemu) do nových mikrozkuvek. Z praktických důvodů tak bylo učiněno po míchání na kruhové třepačce, kdy byly vzorky ještě ve formě suspenze. Alikvóty pak byly centrifugovány stejně jako standardní vzorky a ošetřeny, jako je popsáno v 6. kroku.

Alikvóty byly analyzovány na vertikální gelové elektroforéze – 10% tricin SDS-PAGE (130 V, 1 h 50 min), čímž byla ověřena úspěšnost indukce bakterií a efektivita čištění inkluzních tělísek.

## 3.6 Izolace AMPs

### 3.6.1 Rozpouštění rekombinantního proteinu

Aby bylo možné oddělit AMPs od rekombinantních proteinů, bylo potřeba izolovaná IBs nejprve renaturovat. Po testování rozpouštění proteinů ve 20%, 40% a 80% kyselině mravenčí a 0,1M kyselině octové (pH 2, upraveno HCl) se pro tento účel nejvíce osvědčila 40% kyselina mravenčí (FA).

Sedimenty IBs byly vyndány z -80 °C a ponechány, aby rozmrzly na ledu. Ke každému bylo přidáno 200 µl 40% FA. Následujících 30 min byly sedimenty nechány na ledu rozpouštět za občasného šetrného protřepání. Po uplynulé době byly vzorky stočeny na odstředivce (4 °C, 16 000 g, 5 min). Supernatanty byly odpipetovány do nových mikrozkuvek (2 ml) a nechány na ledu (frakce 1). Zbylé sedimenty podstoupily další kolo rozpouštění s rozdílem, že u některých vzorků stačilo už jen 100 µl 40% FA. Po stočení byly supernatanty (frakce 2) přepipetovány k frakci 1. Takto připravené vzorky (supernatanty f. 1+2) byly vysušeny na koncentrátoru. Odpařování probíhalo pouze za pokojové teploty. Zároveň bylo každých 15 min přerušeno, aby mohly být vzorky zchlazeny na ledu. Trvání tohoto kroku bylo pro různé vzorky individuální; obecně byly vysušeny, dokud nebyly zbaveny kyseliny (~90 min).

Aby se předešlo nechtěné formylaci proteinů, doba inkubace ve 40% FA při pokojové teplotě nikdy nepřesáhla 2 hodiny (Zheng & Doucette, 2016). Navíc, jak již bylo popsáno, většina úkonů, u kterých to bylo možné, byla prováděna na ledu. Pokud nebylo ihned přistoupeno k dalšímu kroku izolace AMPs (3.6.2), vzorky byly uloženy do -80 °C.

### 3.6.2 Štěpení

Pokud byly vzorky před použitím skladovány v -80 °C, byly ponechány na ledu rozmrznout. Sediment utvořený na dně mikrozkuvek po kroku 3.6.1 byl za šetrného

protřepávání hydrolyzován v 600 µl 0,1M kyseliny octové (pH 2, upraveno HCl). Po úspěšném rozpuštění byly mikrozkušavky dány na 24 h do vodní lázně o teplotě 60 °C. Právě v tomto bodě byla využita v kyselinách termolabilní vazba mezi Asp-Pro nebo Asp-Cys. Rozpad nestabilní vazby byl ověřen až po kroku 3.6.4, aby nebylo plýtváno AMPs, které se do té doby nepodařilo na gelu prokázat v důsledku molekulové hmotnosti.

### 3.6.3 Precipitace a separace ONC

Klíčem k oddělení zbytků fúzních proteinů od odštěpených peptidů byla neutralizace roztoků. Využilo se zde vlastností nosného proteinu Onkonázy (ONC), která je citlivá na pH. Neutralizací roztoků hydroxidem amonným na pH 7 bylo docíleno vysrážení proteinů obsahujících ONC a zároveň zachování peptidů v nativním stavu. Po přidání NH<sub>4</sub>OH byly vzorky šetrně protřepávány po dobu 5 min a následně promíchávány na kruhové třepačce po dobu 25 min.

Separace byla provedena odstředěním (4 °C, 16 100 g, 25 min). Stočené sedimenty byly využity na 10% tricínovou SDS-PAGE (130 V, 1 h 45 min) k ověření úspěšnosti štěpení. Supernatanty byly přepipetovány do nových mikrozkušavek.

### 3.6.4 Odpařování

Kyselina octová a hydroxid amonný byly ze supernatantů z kroku 3.6.3 odstraněny odpařením. Exsikace probíhala bez zahřívání a trvala kolem 90 minut. Bělavé sedimenty zbylé po vysušení byly uloženy do -80 °C.

## 3.7 Charakterizace izolovaných peptidů

### 3.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

První metoda zvolená k ověření produkce AMPs byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography – HPLC). Této analýze byly podrobeny pouze vzorky s předpokládaným obsahem Omigananu, protože jiné peptidy neobsahují ve své sekvenci dostatek vhodných aromatických kyselin, popřípadě neměly dostatečnou úspěšnost odštěpování peptidů z rekombinantních proteinů. Pro srovnání byly změřeny i vzorky sedimentů s nosným proteinem z bodu 3.6.3. Analýza byla provedena panem prof. D. Kodříkem z laboratoře fyziologie hmyzu Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR. Vzorky mu byly poskytnuty ve vysušené formě z kroku 3.6.4. Byl zhotoven fluorescenční záznam ve vlnových délkách 280 a 348 nm, které byly v podstatě



totožné. V průběhu měření byly sbírány frakce o objemu 1–2 ml. Získané frakce byly zamraženy v -80 °C. Obdržené tabulky z měření byly zanalyzovány a zpracovány do grafu – viz kapitola 4.2.

### 3.7.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Druhá metoda zvolená k ověření produkce AMPs byla hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS). Tato analýza byla provedena primárně na vybraných frakcích z HPLC, kde byl předpoklad zastoupení Omigananu. Dodatečně byly takto zkontrolovány i další vzorky Omigananu a Jelleinu-I z bodu 3.6.4. Měření bylo provedeno panem doktorem F. Dyčkou z laboratoře proteomiky na katedře chemie Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích. Obdržené výsledky potvrdily přítomnost velkého množství AMPs ve vzorcích. Výstupní graf je přiložen v kapitole 4.2.

## 3.8 Testování antimikrobiálních účinků

### 3.8.1 Příprava na testování

Na základě hodnocení velikosti sedimentů z kroku 3.6.3 a elektroforetogramů PAA gelů, kde byly analyzovány, bylo vypočteno přibližné množství peptidů obsažené v sedimentu po odpaření supernatantů v kroku 3.6.4. Podle toho bylo dále dopočteno, kolik takových vzorků je potřeba nanést na disky, aby bylo dosaženo aktivní koncentrace (AC) jednotlivých peptidů. Totéž bylo vypočteno pro komerčně zakoupený Omiganan. Údaje o AC peptidů byly čerpány z APD (Wang et al., 2016) a jsou pro přehlednost zaznamenány v Tab. XI.

**Tab. XI:** Minimální inhibiční koncentrace peptidů pro *E. coli*.

<b>Antimikrobiální peptid</b>	<b>Aktivní koncentrace</b>
Omiganan (i komerční)	0,8 µM/ml
Jelleine-I	2,5 µg/ml
Psacothasin	12–25 µM

Pro snazší aplikaci na disky byly peptidy rozpuštěny sterilní ddH<sub>2</sub>O. Veškeré úkony v tomto a následujícím kroku práce byly prováděny za maximálně sterilních podmínek.

Samotné disky o průměru 5,5 mm byly připraveny vyražením ze silného filtračního papíru. Následně byly před použitím sterilizovány suchým režimem autoklávu ve skleněných

Petriho miskách. Osvědčilo se disky v miskách rovnou rovnoměrně rozmístit, aby byla pozdější manipulace omezena na minimum.

Testování probíhalo na LB agarových miskách bez přídavku antibiotik. Jako modelové bakterie k testování byly vybrány chemicky kompetentní *E. coli* BL21 (DE3), které byly napěstovány v tekuté kultuře v LB médiu (opět bez antibiotik).

Dále byly připraveny chemikálie figurující v testování – 40% kyselina mravenčí a 0,1M kyselina octová (pH 2, upraveno HCl), a také antibiotikum ampicilin (c = 0,1 µl/ml) sloužící jako standardizovaná kontrola.

### 3.8.2 Disková difúzní metoda

Na připravené LB agarové misky bylo sterilně nanášeno 55 µl předpěstované bakteriální kultury ( $OD_{600} = \sim 0,8$ ). Misky byly ponechány zaschnout.

Mezitím bylo na sterilní disky aplikováno zvolené množství peptidové suspenze, kyseliny či antibiotika. Aby disky nasály celý aplikovaný objem, bylo na ně nanášeno maximálně 30 µl peptidické suspenze. Přehled připravených disků je zaznamenán v Tab. XII. Disky byly nechány krátce zaschnout a poté umístěny na výše popsané LB agarové misky.

**Tab. XII:** Testovací disky.

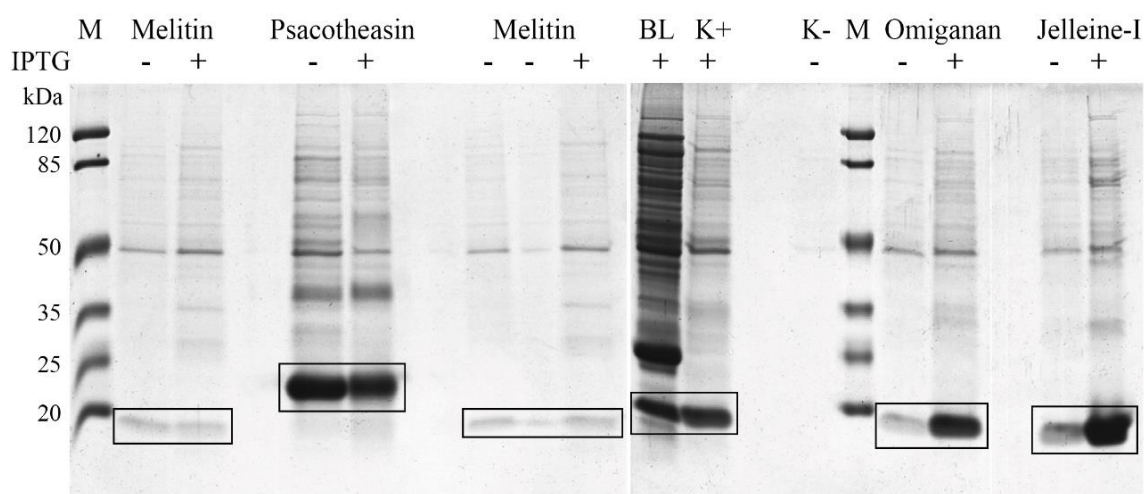
Typ	Obsah účinné složky	Četnost
Omiganan komerční	18 ng/disk	4×
Omiganan 100 % AC	~18 ng/disk	1×
Omiganan 50 % AC	~9 ng/disk	1×
Jelleine-I 100 % AC	~25 ng/disk	2×
Jelleine-I 50 % AC	~12,5 ng/disk	2×
Psacothasin 50 % AC	~250 ng/disk	2×
0,1M kyselina octová (pH 2, upraveno HCl)	15 µl/disk	1×
40% kyselina mravenčí	15 µl/disk	1×
Ampicilin	10 µg/disk	3×

Misky byly inkubovány dnem vzhůru ve 37 °C po dobu 20 hodin. Následně byly výsledky fotograficky zdokumentovány a vyhodnoceny.

## 4 Výsledky

### 4.1 Exprese fúzních proteinů

Bylo připraveno 5 konstruktů obsahujících námi zvolené antimikrobiální peptidy – Omiganan, Jelleine-I, Melitin, Melitin (var. 2) a Psacothasin. Expresní bakterie *E. coli* BL21 (DE3) byly s těmito konstrukty transformovány. Po indukci exprese byla elektroforeticky ověřena produkce fúzních proteinů ve formě inkluzních tělísek (IBs) (Obr. 3).

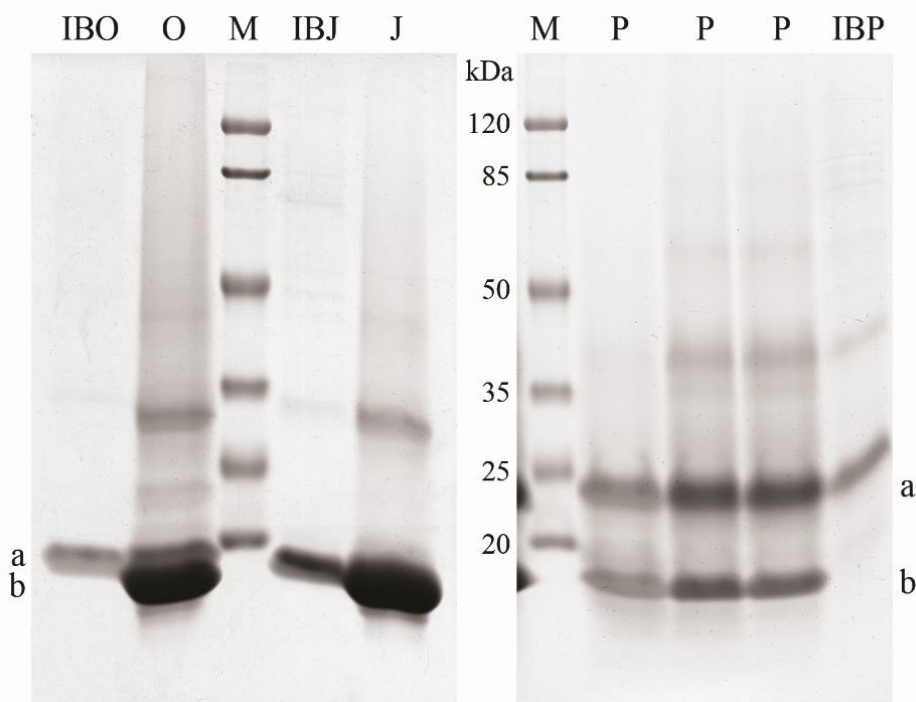


**Obr. 3:** Indukce expresních bakterií. **IPTG - -** neindukovány; **IPTG + -** indukovány; **M** – Protein MW marker; **BL** – lyzát buněk; **K+** – pozitivní kontrola (buňky s vektorem od italské výzkumné skupiny (Pane et al., 2016)); **K-** – negativní kontrola (buňky bez vektoru); **Rámečky** – inkluzní tělíčka s jednotlivými AMPs.

Z obrázku je patrné, že bakterie nedokázaly produkovat ani jednu z variant Melitinu. Na základě dalších pokusů o zaklonování a indukci, které skončily se stejným výsledkem, byl tento antimikrobiální peptid v obou jeho variantách z následujících experimentů a testování vyloučen. V případě Psacothasinu se objevil nečekaný úkaz, kdy míra exprimovaných inkluzních tělísek byla vyšší u buněk bez provedené indukce IPTG. Opakované napěstování bakterií a indukování tento výsledek potvrdilo. Buňky s plazmidy pro produkci Omigananu a Jelleinu-I byly však v expresi IBs úspěšné. Porovnání vzorku indukovaného bakteriálního lyzátu a pozitivní kontroly, což je tentýž vzorek po procesu izolace IBs (krok 3.5.3), navíc demonstruje efektivitu čištění.

## 4.2 Izolace a charakterizace AMPs

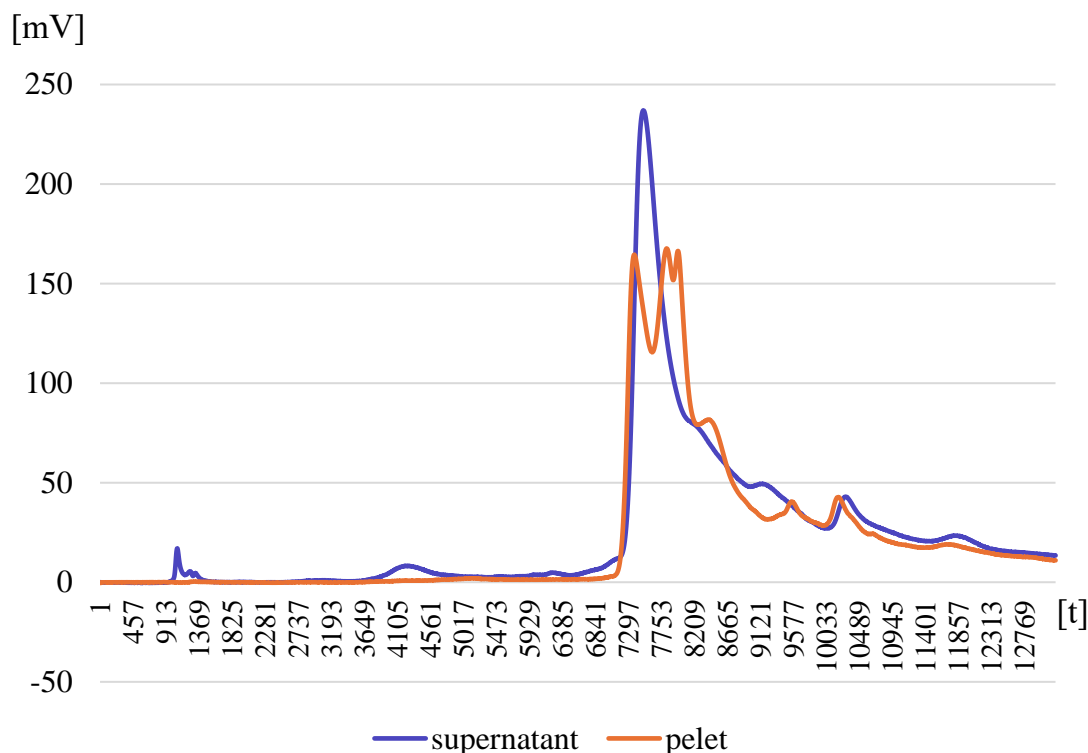
Jak bylo popsáno v metodické části práce, získaná inkluzní tělíska byla rozpuštěna a uvolněné proteiny byly štěpeny za specifických podmínek. Úspěšnost tohoto procesu byla ověřena opět elektroforeticky, což je zachyceno na Obr. 4.



**Obr. 4:** Štěpení proteinů 0,1M kyselinou octovou (pH 2, upraveno HCl) ve vodní lázni (60 °C) po dobu 24 hodin. **IBO** – aliquot IBs s peptidem Omigananem před štěpením; **O** – separované proteiny po odštěpení Omigananu; **M** – proteinový MW marker; **IBJ** – aliquot IBs s peptidem Jelleinem-I před štěpením; **J** – separované proteiny po odštěpení Jelleinu-I; **IBP** – aliquot IBs s peptidem Psacothasinem před štěpením; **P** – separované proteiny po odštěpení Psacothasinu; **a** – neštěpený fúzní protein; **b** – zbytek fúzního proteinu po odštěpení peptidu.

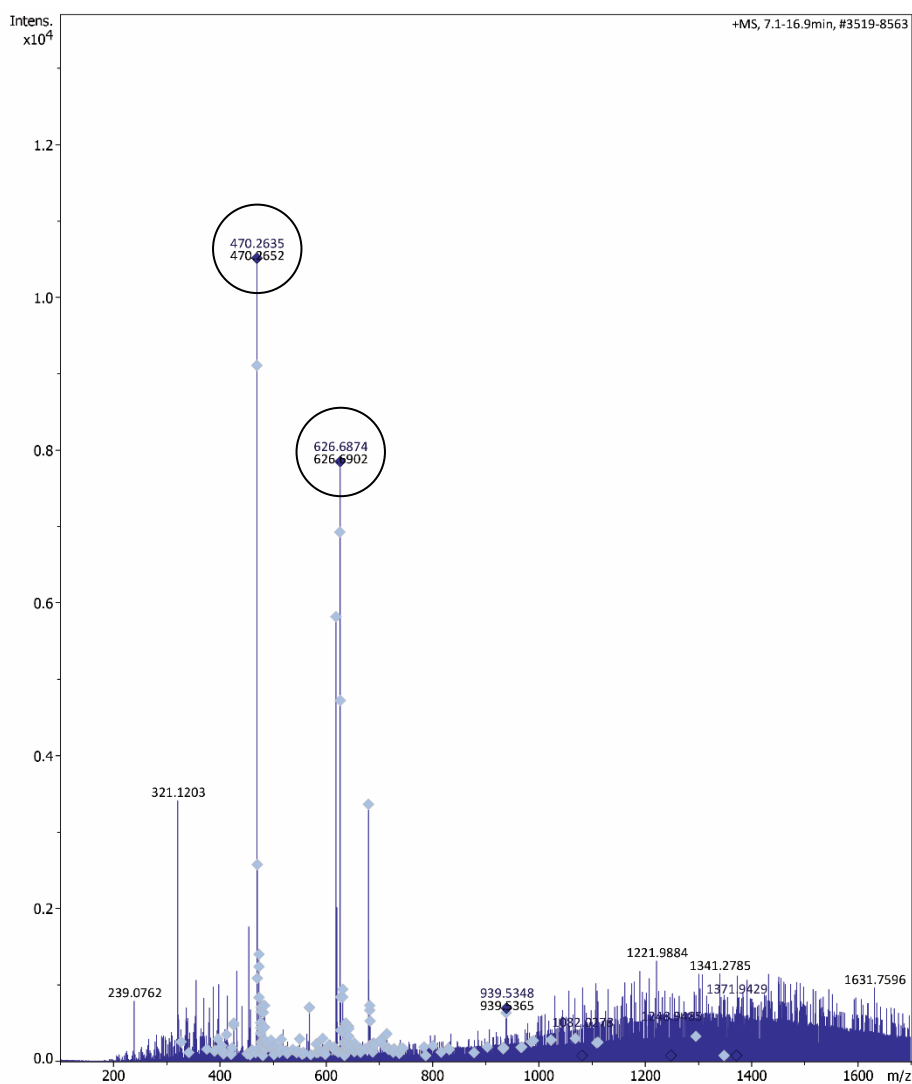
Na základě elektroforetogramu gelu lze říct, že štěpení s využitím termolabilní vazby mezi Asp-Pro bylo v případě fúzních proteinů obsahujících Omiganan a Jelleine-I vcelku úspěšné. Znázorňuje to posun vůči neštěpenému fúznímu proteinu, který vykazuje většina proteinů. Tento jev je způsoben ztrátou části s AMP během štěpení, takže zbývající protein je menší a na gelu pak doputuje dál, protože je kratší. Štěpení rekombinantního proteinu s Psacothasinem nedosáhlo tak pozitivního výsledku. Zdařilost štěpení byla odhadnuta na přibližně 50 %.

Vzhledem k výsledkům vertikální gelové elektroforézy, kde byly zkontrolovány post-separační sedimenty, byla předpokládána přítomnost AMPs v supernatantu. Jako první metoda k ověření této hypotézy byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography – HPLC), kde byla porovnána křivka gradientové eluce proteinů z peletu a ze supernatantu. Výsledky jsou vyneseny v grafu na Obr. 5.



**Obr. 5:** Graf z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (fluorescenční záznam 280 nm). Srovnání gradientové eluce supernatantu a sedimentu separovaných po štěpení fúzních proteinů obsahujících Omiganan.

Této analýze byly podrobeny pouze vzorky Omigananu, protože vykazovaly vysokou úspěšnost odštěpování peptidu z rekombinantního proteinu. Zároveň byla zohledněna vhodnost sekvence – Omiganan obsahuje dostatek aromatických aminokyselin potřebných k zaznamenání fluorescence, což není případ Jelleinu-I. V průběhu měření byly sbírány frakce. Na základě jednoho dominantního vrcholu křivky supernatantu vznikl předpoklad, že se jedná o izolovaný antimikrobiální peptid Omiganan. Frakce s tímto peptidem byla tedy ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS). Obdržený graf je přiložen jako Obr. 6.

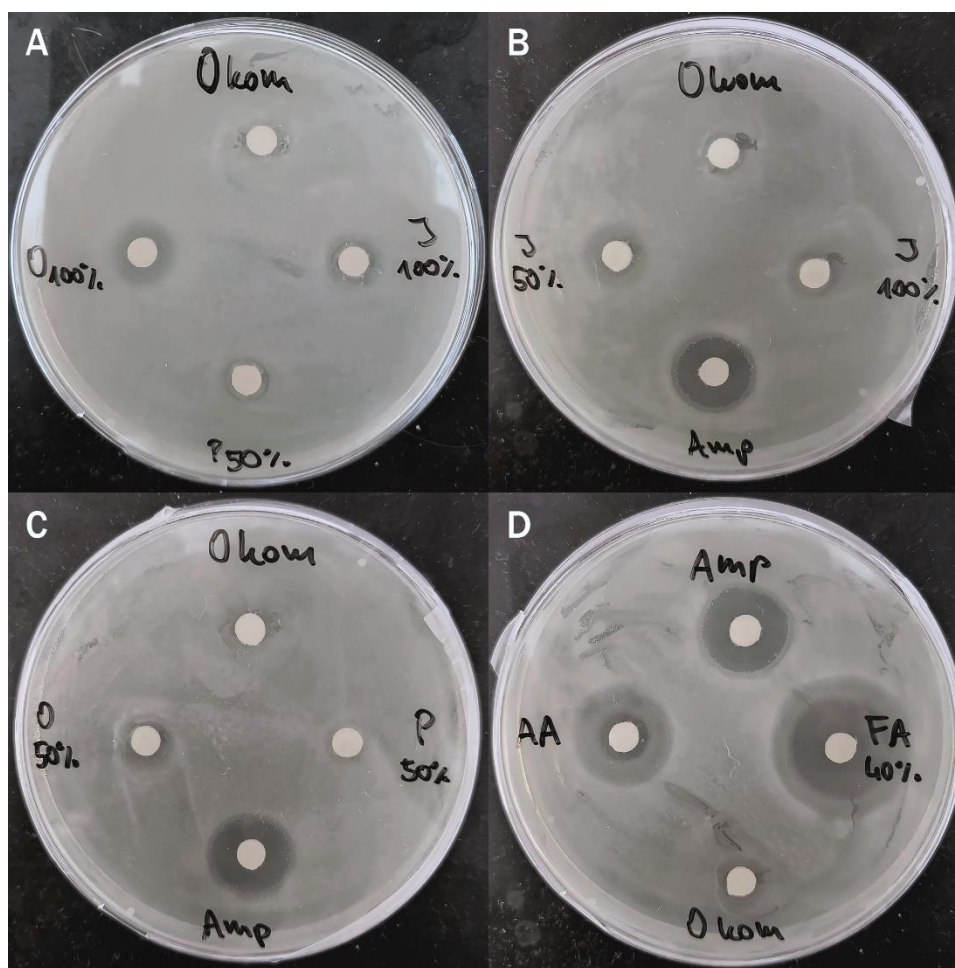


**Obr. 6:** Graf výsledků analýzy izolovaného peptidu Omiganan pomocí hmotnostní spektrometrie. Detekovaný peptid Omiganan je znázorněn dvěma vyznačenými vrcholy.

Antimikrobiální peptid Omiganan byl skutečně detekován. V grafu je reprezentován dvěma vrcholy, protože mohl obsahovat 3 nebo 4 náboje. Ostatní nízká maxima byla popsána jako úlomky nosného proteinu ONC nebo samotného peptidu. Dále byly v malé míře rozpoznány kontaminanty z kultivačních médií a kontaminanty způsobené manipulací.

### 4.3 Testování antimikrobiální aktivity

Po obdržení pozitivních výsledků z hmotnostní spektrometrie byly vyrobené peptidy připraveny na testování jejich antimikrobiální aktivity na bakterii *E. coli*. Pro tento úkol byla zvolena disková difúzní metoda, kde průměr inhibiční zóny kolem disku je úměrný aktivitě testované látky. Kvůli nedostatku AMPs nemohl být experiment proveden v rozsahu hodném statistické evaluace, avšak pro subjektivní porovnání je přiložen Obr. 7.



**Obr. 7:** Testování antimikrobiální aktivity vyprodukovaných AMPs diskovou difúzní metodou (1,5% LB agarové misky; disky průměru 5,5 mm; *E. coli* BL21 (DE3); inkubace 20 h). **O kom** – komerční Omiganan (AC/disk); **O** – Omiganan; **J** – Jelleine-I; **P** – Psacothasin; **Amp** – ampicilin (10 µg/disk); **AA** – 0,1M kyselina octová (pH 2, upraveno HCl) (15 µl/disk); **FA 40%** – 40% kyselina mravenčí (15 µl/disk); **50%** – aplikováno 50 % AC daného peptidu / disk; **100%** – aplikováno 100 % AC daného peptidu / disk.

Komerčně zakoupený Omiganan překvapivě nevykazoval vysokou aktivitu. Vlastní experimentálně vyprodukovaný Omiganan měl proti němu viditelně efektivnější působení. Své antimikrobiální účinky projevil i rekombinantní Jelleine-I. To neplatilo v případě Psacothasinu, zde byly inhibiční zóny kolem disků sotva patrné. Díky tomu může být Psacothasin považován za kontrolní peptid, takže antimikrobiální působení ostatních peptidů nemůže být zaměněno za efekt kyselin používaných během procesu výroby. Kyselina octová a mravenčí totiž také měly zjevný vliv na bakteriální buňky. Ze vzorků však byly zcela

odpařeny, a tudíž by na výsledek testu vliv mít neměly. Disky s ampicilinem byly přidány jako standardizovaná kontrola funkčnosti testování – průměr inhibičních zón přesáhl hranici pro stanovení citlivosti dle očekávání.



## 5 Diskuse

V době rozšiřující se rezistence patogenů vůči antibiotikům se staly antimikrobiální peptidy (AMPs) jednou z nadějí při hledání nových terapeutických možností. Jejich přirozené vlastnosti jako schopnost cílit a narušovat mikrobiální membrány nebo potenciál pro synergické působení se stávajícími antibiotiky činí z AMPs slibné kandidáty na vývoj nových antimikrobiálních látek (Mataraci & Dosler, 2012; Naghmouchi et al., 2012; Nuding et al., 2014). V předkládané práci byla zavedena výroba malých AMPs hmyzího původu prostřednictvím fúzního proteinu s nosným proteinem Onkonázou. K tomuto cíli vedlo několik kroků – od práce s databází, přes přípravu vektorů a jejich expresi v buňkách *E. coli*, až k izolaci AMPs z fúzních proteinů a jejich testování antimikrobiální aktivity.

Vzhledem k tomu, že databáze jako „Antimicrobial Peptide Database“ obsahují informace o tisících přírodních antimikrobiálních produktech (Wang et al., 2016), bylo potřeba najít metodologický přístup umožňující rychlou a nenáročnou produkci a testování těchto látek, aby bylo možné posoudit jejich potenciál pro uplatnění ve zdravotnictví, zemědělství či průmyslu. V praxi bylo potřeba vybrat několik zástupců s jednoduchou strukturou a robustní aktivitou pro další výzkum. Ačkoliv se tedy práce inspirovala studií italské výzkumné skupiny K. Pane (Pane et al., 2016), byla provedena řada úprav, která vedla k zjednodušení a urychlení postupů.

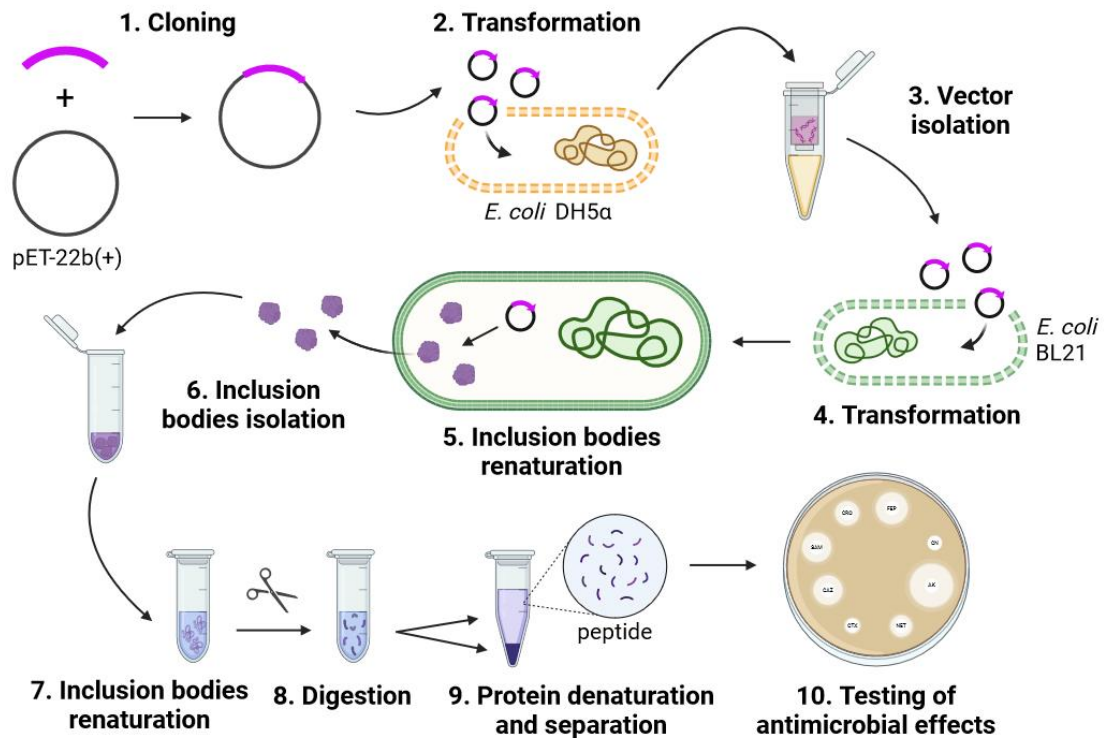
Prvním významněji odlišujícím se krokem od původní práce skupiny Dr. Pane byla izolace inkluzních tělísek (IBs), která byla inspirována přístupem v diplomové práci T. Staškové (Stašková, 2012). V průběhu čtených opakování se ovšem ukázalo, že některé kroky dále optimalizovat, a přitom zachovat kvalitu dostačující pro účely této práce. V referované italské publikaci je použito čištění fúzního proteinu pomocí afinitní chromatografie využívající histidinový hexapeptid. Na základě provedených pokusů bylo ovšem usouzeno, že zlepšení čistoty proteinů není tak velké, aby bylo zásadně přínosné. Tento krok byl tedy v námi použitém finálním procesu zcela vypuštěn.

Další inovací bylo použití 40% kyseliny mravenčí na renaturaci proteinů ve formě IBs a její následné odpaření. Tento postup sice přináší riziko nechtěných formylací proteinů, ale při zohlednění poznatků ze studie Zhenga a Doucetteho je možné se tomuto jevu vyhnout a proces rozpouštění významně urychlit (Zheng & Doucette, 2016). Navazující bod termického štěpení v kyselém roztoku byl proveden dle dříve uvedené italské studie, avšak bez využití dusíkaté atmosféry. I přesto postup přinesl očekávané výsledky – AMPs se úspěšně štěpily ze svých nosných proteinů.

Poslední krok produkce AMPs, separace peptidů od proteinů zbývajících v roztoku po štěpení, byl taktéž upraven. Namísto 16h inkubace v  $\text{NH}_3$  při 28 °C a následné dialýzy byly vzorky neutralizovány  $\text{NH}_4\text{OH}$  a inkubovány po dobu 30 min za pokojové teploty. Precipitace zbytků nosného proteinu fungovala i s touto změnou, zkrátila dobu pro izolaci peptidů, přičemž stačilo supernatant získaný odstředěním odpařit za pokojové teploty.

V originální práci je úspěšnost štěpení fúzních proteinů a separace ověřována na 20% SDS-PAGE umožňující vizualizovat i přítomnost samotných peptidů. Zde se nám osvědčila SDS-PAGE s 10% tricínovým roztokem, která je vhodná pro rozlišování malých proteinů (do 100 kDa) (Schägger, 2006) a použita jako důkaz separace i pro nepřímý odhad kvantity peptidu na základě úbytku hmotnosti prověřovaných fúzních proteinů. Pro rozptýlení případných pochyb je možné analýzu doplnit kontrolou vzorků hmotnostní spektrometrií.

Testování antimikrobiálního působení peptidů se nejčastěji provádí v pufrch se slabými iontovými silami (například 1–5mM fosfátových pufrch), které jinak negativně ovlivňují aktivitu AMPs (Hof et al., 2001; Zasloff, 2002). Inkubované pufrы obsahující buňky a testované peptidy jsou nanášeny na kultivační misky, a poté se vyhodnocuje množství přeživších bakteriálních kolonií. Tato metoda byla aplikována i v referované studii týmu K. Pane (Pane et al., 2016). Další možností je testování s použitím přímo kultivačních médií, nebo diskové difúzní metody (Hof et al., 2001; Mercer et al., 2020), která byla zvolena v této práci. V daných podmínkách jsou peptidy vystaveny vyšší koncentraci solí, která obecně má nepříznivé účinky na jejich aktivitu (Park et al., 2004; Kandasamy & Larson, 2006), tudíž testováním projdou pouze robustnější AMPs, které tím pádem mají větší potenciál pro další aplikaci.



**Obr. 8:** Schéma metodického postupu (Created with Biorender.com).

Uvedené zjednodušující změny a úpravy v protokolech nabízí možnost přípravy a testování většího počtu kandidátních AMPs. Jak se ovšem ukázalo v případě Melitinu, který nebylo možné za podmínek popsaných v metodické části práce produkovat, tento přístup není zcela optimální pro všechny adepty. Na základě zkušeností získaných především přípravou Psacothasinu pak bylo přidáno další kritérium pro budoucí výběr AMPs z databázi, a to že kandidátní peptid nesmí ve své sekvenci obsahovat cysteiny. Jak bylo uvedeno již v úvodu práce, existují tendence ke vzniku intramolekulárních disulfidických můstků mezi cysteiny, které pak činí strukturu peptidu komplexnější (Hancock & Sahl, 2006), ale zároveň tak vzniká více prostoru pro chybné sbalení peptidů a následnou neaktivitu. Prioritní výběr peptidů bez cysteinů v sekvenci by tak eliminoval pravděpodobně zbytečnou investici do pro výrobu neperspektivních AMPs.

Psacothasinu se týká i další hypotéza, a to že menší úspěšnost štěpení souvisí s jeho nestabilní vazbou. Proti Omigananu a Jelleinu-I měl jako jediný namísto Asp-Pro vazby variantu Asp-Cys, která sice má teoreticky vykazovat stejnou efektivitu štěpení fúzních proteinů jako prve uvedená (Pane et al., 2016), ale v případě Psacothasinu tomu mohlo být z dosud neobjasněných důvodů jinak. Bude ovšem potřeba provést více experimentů, aby mohlo být toto tvrzení dále podpořeno či vyvráceno.

Pokud by bylo uvažováno o zvýšení výtěžku produkce AMPs, za pozornost stojí otázka optimalizace uvolnění rekombinantních proteinů z formy IBs a následné renaturace před jejich štěpením. Pokud by se podařilo tento proces zefektivnit, bez přílišného vzrůstu ceny, samotné štěpení proteinů by bylo úspěšnější, a tím by se přímo zvýšil i konečný výtěžek. Další inovací, která by mohla stát za pokus, je návrh fúzního proteinu s konkatemerm ověřených malých peptidů, jako je například Jelleine-I. U takto malých peptidů bývá volena jako ekonomicky i prakticky nejvýhodnější cesta přípravy tzv. „solid-phase peptide synthesis“ (SPPS) (Goodwin et al., 2012; Gan et al., 2021). Zavedením produkce konkatemeru s využitím termolabilních vazeb pro snadné štěpení by se tento přístup mohl změnit.

Vzhledem k současným možnostem biologických metod představuje databáze antimikrobiálních peptidů velmi důležitý zdroj látek schopných v budoucnu do značné míry vyřešit problémy s antibiotiky. S dalším rozvojem poznatků na teoretické i praktické úrovni se pro AMPs rozšiřuje spektrum možných budoucích uplatnění. Nabízí se například sektor zemědělství, kde mohou sloužit k ochranně rostlin (Lee et al., 2018) v podobě bio agens (Zhang et al., 2023); nebo zdravotnictví, kde vedle mnohokrát zmiňovaného vývoje nových antimikrobiálních léčiv by mohly být AMPs využity ke sterilnímu ošetřování povrchů různých předmětů atd. Jak je zřejmé z této studie, lze očekávat, že v budoucnu význam AMPs značně vzroste.

## 6 Závěr

1. Bylo syntetizováno 5 rekombinantních genů kódujících antimikrobiální peptidy, které byly exprimovány v *E. coli*.
2. Byla zavedena jednoduchá metoda izolace fúzních proteinů, od kterých byly odštěpeny a poté separovány antimikrobiální peptidy.
3. Bylo zavedeno a provedeno testování antimikrobiálních účinků izolovaných peptidů.
4. Dva z testovaných peptidů vykazovaly evidentní antimikrobiální aktivitu.

## 7 Seznam použité literatury

- Aoki, W., & Ueda, M. (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. In *Pharmaceuticals* (Roč. 6, Číslo 8, s. 1055–1081). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph6081055>
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2009). Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *New England Journal of Medicine*, 360(5), 439–443. <https://doi.org/10.1056/NEJMp0804651>
- Arias, M., Piga, K. B., Hyndman, M. E., & Vogel, H. J. (2018). Improving the activity of trp-rich antimicrobial peptides by Arg/Lys substitutions and changing the length of cationic residues. *Biomolecules*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/biom8020019>
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. In *Journal of Antibiotics* (Roč. 65, Číslo 8, s. 385–395). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Bérdy, J. (2015). Microorganisms Producing Antibiotics. In Sánchez Sergio & Demain Arnold L. (Ed.), *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends* (s. 49–64). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781908230546.03>
- Brandenburg, K., Heinbockel, L., Correa, W., & Lohner, K. (2016). Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 Years of progress. In *Journal of Antibiotics* (Roč. 62, Číslo 1, s. 5–16). <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Der Torossian Torres, M., & De La Fuente-Nunez, C. (2019). Reprogramming biological peptides to combat infectious diseases. *Chemical Communications*, 55(100), 15020–15032. <https://doi.org/10.1039/c9cc07898c>
- Gaglione, R., Pane, K., Dell’Olmo, E., Cafaro, V., Pizzo, E., Olivieri, G., Notomista, E., & Arciello, A. (2019). Cost-effective production of recombinant peptides in

- Escherichia coli. *New Biotechnology*, 51, 39–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.004>
- Gan, B. H., Gaynord, J., Rowe, S. M., Deingruber, T., & Spring, D. R. (2021). The multifaceted nature of antimicrobial peptides: Current synthetic chemistry approaches and future directions. In *Chemical Society Reviews* (Roč. 50, Číslo 13, s. 7820–7880). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00729c>
- Gesell, J., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an  $\alpha$   $\alpha$ -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. In *Journal of Biomolecular NMR* (Roč. 9).
- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). (2022). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022*. <https://www.who.int/publications/book-orders>.
- Goodwin, D., Simerska, P., & Toth, I. (2012). Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(26), 4451–4461.  
<https://doi.org/10.2174/092986712803251548>
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli. *Protein Journal*, 32(6), 419–425.  
<https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>
- Hancock, R. E. W. (1997). Peptide antibiotics. *The Lancet*, 349(9049), 418–422.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7)
- Hancock, R. E. W. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 156–164.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00092-5)
- Hancock, R. E. W., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, 8(9), 402–410.  
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0)
- Hancock, R. E. W., & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82–88. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01156-6)
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. In *Nature Biotechnology* (Roč. 24, Číslo 12, s. 1551–1557). <https://doi.org/10.1038/nbt1267>

- Hof, W. van t, Veerman, E. C. I., Helmerhorst, E. J., & Amerongen, A. V. N. (2001). Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Biological Chemistry*, 382(4). <https://doi.org/10.1515/BC.2001.072>
- Hoover, D. M., Chertov, O., & Lubkowski, J. (2001). The structure of human  $\beta$ -defensin-1. New insights into structural properties of  $\beta$ -defensins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39021–39026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103830200>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. In *Current Opinion in Microbiology* (Roč. 51, s. 72–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Choffnes, E. R., Relman, D. A., Mack, A., Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, Institute of Medicine (US) Board on Global Health, & National Academies Press (US). (2010). *Antibiotic resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12925>
- Kandasamy, S. K., & Larson, R. G. (2006). Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.030>
- Koczulla, A. R., & Bals, R. (2003). Antimicrobial Peptides. *Drugs*, 63(4), 389–406. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363040-00005>
- Lee, H. H., Kim, J. S., Hoang, Q. T. N., Kim, J. Il, & Kim, Y. S. (2018). Root-specific expression of defensin in transgenic tobacco results in enhanced resistance against *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3), 811–823. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1419-6>
- Li, Y. (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 54(1), 1–9. <https://doi.org/10.1042/ba20090087>
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antimicrobial therapy: principles of use. In *Medicine (United Kingdom)* (Roč. 45, Číslo 10, s. 614–621). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2017.07.007>



- Mataraci, E., & Dosler, S. (2012). In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(12), 6366–6371. <https://doi.org/10.1128/AAC.01180-12>
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1462*(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- Mercer, D. K., Torres, M. D. T., Duay, S. S., Lovie, E., Simpson, L., von Köckritz-Blickwede, M., de la Fuente-Nunez, C., O’Neil, D. A., & Angeles-Boza, A. M. (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Roč. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>
- Mor, A. (2000). Peptide-Based Antibiotics: A Potential Answer to Raging Antimicrobial Resistance. *Drug Development and Biotechnology in Israel*, *50*(3–4), 440–447.
- Munk, J. K., Ritz, C., Fliedner, F. P., Frimodt-Moller, N., & Hansen, P. R. (2014). Novel method to identify the optimal antimicrobial peptide in a combination matrix, using anoplins as an example. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(2), 1063–1070. <https://doi.org/10.1128/AAC.02369-13>
- Naghmouchi, K., Le Lay, C., Baah, J., & Drider, D. (2012). Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: Synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in Microbiology*, *163*(2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.11.002>
- Nuding, S., Frasnich, T., Schaller, M., Stange, E. F., & Zabel, L. T. (2014). Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides and Antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(10), 5719–5725. <https://doi.org/10.1128/AAC.02542-14>
- Pane, K., Durante, L., Pizzo, E., Varcamonti, M., Zanfardino, A., Sgambati, V., Di Maro, A., Carpentieri, A., Izzo, V., Di Donato, A., Cafaro, V., & Notomista, E. (2016). Rational design of a carrier protein for the production of recombinant toxic peptides in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146552>
- Park, I. Y., Cho, J. H., Kim, K. S., Kim, Y. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2004). Helix Stability Confers Salt Resistance upon Helical Antimicrobial Peptides. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 279(14), 13896–13901.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M311418200>
- Piers, K. L., Brown, M. H., & Hancock, R. E. W. (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria (Defensin; cecropin; inclusion bodies; fusion protein; expression). In *Gene* (Roč. 134).
- Projan, S. J. (2003). Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 427–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.08.003>
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, 2013.  
<https://doi.org/10.1155/2013/675391>
- Roca-Pinilla, R., López-Cano, A., Saubi, C., Garcia-Fruitós, E., & Arís, A. (2020). A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity. *Microbial Cell Factories*, 19(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01380-7>
- Rozek, A., Powers, J. P. S., Friedrich, C. L., & Hancock, R. E. W. (2003). Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease Stability. *Biochemistry*, 42(48), 14130–14138. <https://doi.org/10.1021/bi035643g>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Spížek, J., Sigler, K., Řezanka, T., & Demain, A. (2016). Biogenesis of antibiotics—viewing its history and glimpses of the future. In *Folia Microbiologica* (Roč. 61, Číslo 4, s. 347–358). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0462-y>
- Stašková, T. (2012). *Studium rekombinantních proteinů Sericinu-2 bource morušového (Bombyx mori)* [Diplomová práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.
- Vidovic, V., Prongidi-Fix, L., Bechinger, B., & Werten, S. (2009). Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification. *Journal of Peptide Science*, 15(4), 278–284. <https://doi.org/10.1002/psc.1112>

- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.009>
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity. In *Nature Reviews Microbiology* (Roč. 5, Číslo 3, s. 175–186). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- Yang, Y., Sanchez, J. F., Strub, M. P., Brutscher, B., & Aumelas, A. (2003). NMR structure of the cathelin-like domain of the protegrin-3 precursor. *Biochemistry*, 42(16), 4669–4680. <https://doi.org/10.1021/bi027133c>
- Yim, G., Huimi Wang, H., & Davies, J. (2006). The truth about antibiotics. In *International Journal of Medical Microbiology* (Roč. 296, Číslo 2–3, s. 163–170). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.039>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang, Y. M., Ye, D. X., Liu, Y., Zhang, X. Y., Zhou, Y. L., Zhang, L., & Yang, X. L. (2023). Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. In *Advanced Agrochem* (Roč. 2, Číslo 1, s. 58–78). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>
- Zheng, S., & Doucette, A. A. (2016). Preventing N- and O-formylation of proteins when incubated in concentrated formic acid. *Proteomics*, 16(7), 1059–1068. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500366>

## 8 Přílohy

### 8.1 Média

Všechna média byla sterilizována nebo připravována sterilním postupem.

#### **LB médium**

Trypton	10 g
Kvasniční autolyzát	5 g
NaCl	10 g
Doplnit dH <sub>2</sub> O	do 1 litru
pH 7,0	

#### **LB médium – selekční**

Trypton	10 g
Kvasniční autolyzát	5 g
NaCl	10 g
Ampicilin	c = 100 µg/ml
Doplnit dH <sub>2</sub> O	do 1 litru
pH 7,0	

#### **LB agar**

Trypton	10 g
Kvasniční autolyzát	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Doplnit dH <sub>2</sub> O	do 1 litru
pH 7,0	

#### **LB agar – selekční**

Trypton	10 g
Kvasniční autolyzát	5 g
NaCl	10 g
Ampicilin	c = 100 µg/ml
Agar	15 g
Doplnit dH <sub>2</sub> O	do 1 litru
pH 7,0	

#### **TB médium – selekční**

Trypton	20 g
Kvasniční autolyzát	24 g
Glycerol	4 ml
dH <sub>2</sub> O	do 900 ml
Ampicilin	c = 100 µg/ml
Fosfátový pufr	100 ml

## 8.2 Enzymy a reagensie

**Tab. XIII:** Enzymy, reagensie, antibiotika.

Název	Použití	Zdroj / Kat. č.
KpnI	Restrikce	Thermo Scientific / ER0521
BamHI	Restrikce	Thermo Scientific / ER0051
SacI	Restrikce	Thermo Scientific / ER1135
T4 Polynucleotide Kinase	Fosforylace	Thermo Scientific / EK0031
T4 DNA Ligase (5 U/μL)	Ligace	New England Biolabs / M0202S
FastDigest Buffer (10×)	Všestranné	Thermo Scientific / B64
DreamTaq PCR MasterMix (2×)	PCR	Thermo Scientific / K1071
DreamTaq Green PCR MasterMix (2×)	PCR	Thermo Scientific / K1081
Pierce™ Prestained Protein MW Marker	SDS-PAGE	Thermo Scientific / 26612
Ampicillin sodium	Antibiotikum	Duchefa Biochemie / A0104

## 8.3 Pufrý a chemikálie

**Tab. XIV:** Složení pufrů a chemikálie

Název	Složení
B1	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH7)
B2	60 mM EDTA, 2 % Triton X-100 (v/v), 1,5 M NaCl (pH 7)
B3	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 7)
B4	B3 bez EDTA
„DNase“ pufr (25 ml)	250 μl MgCl <sub>2</sub> , 125 μl CaCl <sub>2</sub> , 250 μl DNáza, dolít B4
MgCl <sub>2</sub>	1 M zásobní roztok
CaCl <sub>2</sub>	1 M zásobní roztok
Fosfátový pufr	0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Lysozym (100× zásobní roztok)	finální c = 1 mg/ml, Tris/NaCl pufr

Název	Složení
Tris/NaCl pufr	50 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7)
Složení PAA gelu (15 ml)	2,85 ml H <sub>2</sub> O; 8,4 ml pufr; 3,75 ml akrylamid; 12 µl Temed, 112 µl APS
Akrylamid	40% akrylamid : bisakrylamid (29:1)
Pufr do PAA gelu	2,5M Tris-HCl pufr (pH 8,8)
10× „Running“ pufr (1 l)	30,3 g Tris; 45 g tricín; 5 g SDS; dolít dH <sub>2</sub> O
Coomassie roztok	0,1 % Coomassie, 7,5 % AA; 5 % methanol; 87,4 % dH <sub>2</sub> O
Odbarvovací roztok	7,5 % AA; 5 % methanol; 87,5 % dH <sub>2</sub> O

## 8.4 Pracovní vybavení

**Tab. XV:** Přístrojové vybavení.

Název	Zdroj / Kat. č.
NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers	Thermo Scientific / ND2000CLAPTOP
Vortex Mixer	Labnet / S0200-230V-EU
Centifuge 5415 R	Eppendorf
BioPhotometer Model #6131	Eppendorf
211DS Digital Shaking Incubator	Labnet / I-5211-DS-220V
TC-E-48D Gene Pro Thermal Cycler	Hangzhou Bioer Technology
Sonopuls UW 2070	Bandelin
Concentrator 5301	Eppendorf
2540MLV Autoclave-steam sterilizer	Tuttnauer
Refrigerated shaking incubator	Gallenkamp / IOC400.XX2.C
FOB3/TS Benchtop Lab Sterilizer	Fedegari Group
Test-tube-rotator 34528	Snijders Scientific
EL-02 CUBE Dry Bath	Cleaver Scientific
Mini Gal systém B1 - Owl	Biotech
PowerPac™ Basis Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Magnetic stirrer	Boeco
MSH-300 Magnetic Stirrer	Biosan
pH-Electrode SenTix® 21	WTW
Orbital shaker OS 2 basic	IKA®
Biological Thermostat BT 120	LP
GS-800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad Laboratories

**Tab. XVI:** Pracovní kity.

Název	Použití	Zdroj / Kat. č.	Země původu
Hybrid-Q™ Plasmid Rapidprep	Práce s plazmidy	GeneAll / 100-102	Korea
Expin™ Combo GP	Extrakce z gelu	GeneAll / 112-102	Korea

## 8.5 Sekvence

**Tab. XVII:** Primery a oligonukleotidy.

Označení	Sekvence
PSAC Forward	<u>CGGGGATTGCATTGCGAAAGGCAACGGCTGCC</u> <u>AGCCGAGCGGCGTGCAGGGCAACTGCTGCAG</u> <u>CGGCCATTGCCATAAAGAACCGGGCTGGGTGG</u> <u>CGGGCTATTGCAAATAAGAGCT</u>
PSAC Reverse	<u>CTTATTTGCAATAGCCCGCCACCCAGCCCGGTT</u> <u>CTTTATGGCAATGGCCGCTGCAGCAGTTGCCCT</u> <u>GCACGCCGCTCGGCTGGCAGCCGTTGCCTTTC</u> <u>GCAATGCAATCCCCGGTAC</u>
MG Forward	<u>CGGGGATGGCATTGGCGCGGTGCTGAAAGTGC</u> <u>TGACCACCGGCCTGCCGGCGCTGATTAGCTGG</u> <u>ATTAAACGCAAACGCCAGCAGTAAGAGCT</u>
MG Reverse	<u>CTTACTGCTGGCGTTTTCGTTTAAATCCAGCTAA</u> <u>TCAGCGCCGGCAGGCCGGTGGTCAGCACTTTC</u> <u>AGCACCGCGCCAATGCCATCCCCGGTAC</u>
M Forward	<u>GATCCGGGCATTGGCGCGGTGCTGAAAGTGC</u> <u>GACCACCGGCCTGCCGGCGCTGATTAGCTGGA</u> <u>TTAAACGCAAACGCCAGCAGTAAGAGCT</u>
M Reverse	<u>CTTACTGCTGGCGTTTTCGTTTAAATCCAGCTAA</u> <u>TCAGCGCCGGCAGGCCGGTGGTCAGCACTTT</u> <u>CAGCACCGCGCCAATGCCCG</u>
J Forward	<u>CGGGGATCCGTTTAAACTGAGCCTGCATCTGT</u> <u>AAGAGCT</u>
J Reverse	<u>CTTACAGATGCAGGCTCAGTTTAAACGGATCC</u> <u>CCGGTAC</u>
O Forward	<u>GATCCGATTCTGCGCTGGCCGTGGTGGCCGT</u> <u>GGCGCCGCAAATAAGAGCT</u>
O Reverse	<u>CTTATTTGCGGCGCCACGGCCACCACGGCCA</u> <u>GCGCAGAATCG</u>
T7 (Forward)	TAATACGACTCACTATAGGG

Označení	Sekvence
Reverzní testovací primer	GCTTGTCGACGGAGCTCTTA

Podtržením jsou vyznačeny oblasti vzájemného nasedání.

### ONC-DCless-H6- (P) GKY20

#### NdeI

**CATATG**CAA**GAA**TGGCTGACTTTCCAGAAAAACATATCACTAACACTCGT**GAA**GTT**GAA**  
M Q **E** W L T F Q K K H I T N T R **E** V **E**

**TATGAA**AACATCCTGTCTACTAACCTGTTCCAT**TAT**AAA**GAA**AAAAACACTTTCATCTAC  
**Y** **E** N I L S T N L F H **Y** K **E** K N T F I Y

TCTCGTCCGGAACCGGTTAAAGCTATC**CTG**AAAGGTATCATCGCTTCTAAAAACGTTCTG  
S R P E P V K A I **L** K G I I A S K N V L

#### EcoRI

ACTACTTCT**GAATTC**TACCTGTCT**GAATAT**AACGTTACTTCTCGTCCG**TAT**AAATACAAA  
T T S E F Y L S **E** **Y** N V T S R P **Y** K Y K

CTGAAAAAATCTACTAACAAATTC**ATT**GTTACT**ATT**GAAAACCAGGCTCCGGTTCATTTTC  
L K K S T N K F **I** V T **I** E N Q A P V H F

#### KpnI

#### BamHI

#### (P) GKY20

GTTGGTGTGGTTCT**CATCATCATCATCATCAT****GGTACC**GG**GGATCC**Gggcaaatatggc  
V G V G S **H H H H H H** **G T G D P** G K Y G

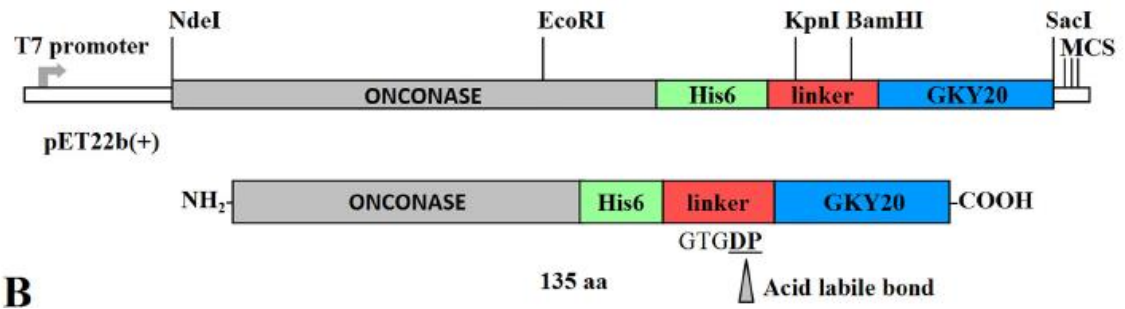
#### (P) GKY20

#### SacI

ttctacacccatgtgttccgcctgaaaaaatggattcagaaagtcattTAA**GAGCTC**  
F Y T H V F R L K K W I Q K V I -

**Obr. 9:** Sekvence rekombinantního proteinu s nosným proteinem Onkonázou a vloženým peptidem GKY20 (Pane et al., 2016).





**Obr. 10:** Schéma konstruktů fúzního proteinu (Pane et al., 2016). **Onconase** – nosný protein, **His6** – histidinový hexapeptid (His-Tag), **linker** – spojující sekvence s nestabilní vazbou Asp-Pro, **GKY20** – oblast insertovaného peptidu.

## 8.6 Seznam zkratek

AA	kyselina octová ledová
AC	aktivní koncentrace
AMP/AMPs	antimikrobiální peptid/y
APS	peroxodisíran amonný
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
ddH <sub>2</sub> O	ultra-destilovaná voda
FA	kyselina mravenčí
His-Tag	histidinový hexapeptid
IBs	inkluzní tělíska
IPTG	izopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
MW	molekulová hmotnost
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězcová reakce
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	vertikální elektroforéza na PAA gelu
TB	Terrific Broth