

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Syntéza a funkční *in vitro* screening antimikrobiálních peptidů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eva Trejtnarová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Konzultanti:	Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D. Ing. Sergej Karel, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 9. 6. 2020

Bc. Eva Trejtnarová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem pracovníkům ze společnosti Contipro, a.s., kteří mi poskytli potřebnou pomoc a přátelský přístup. Jmenovitě zvláště Mgr. Kristině Nešporové, Ph.D. a Ing. Sergejovi Karlovi, Ph.D., kterým děkuji za odborné vedení a rady při realizaci této práce.

Díky patří také vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za jeho čas a ochotu nabídnout pomocnou ruku při řešení dané problematiky.

Děkuji dále mé rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu během mého studia.

V poslední řadě děkuji také za všechny prostředky v rámci projektů IGA: IGA_PrF_2019_011 a IGA_PrF_2020_025.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eva Trejtnarová
Název práce	Syntéza a funkční <i>in vitro</i> screening antimikrobiálních peptidů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02
Vedoucí práce	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Konzultanti	Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D. Ing. Sergej Karel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	

Tato diplomová práce se zabývá syntézou a biologickou charakterizací peptidů s potenciálními antimikrobiálními vlastnostmi. V teoretické části jsou shrnuty základní vlastnosti antimikrobiálních peptidů, mechanismus jejich působení, funkce a zástupci. Dále je zde stručně popsáno získávání peptidů a zvláště pak metoda syntézy peptidů na pevné fázi. Experimentální část je zaměřena na přípravu látek, jejich charakterizaci dostupnými fyzikálně-chemickými metodami a biologickou analýzu. Při stanovení proteolytické stability bylo zjištěno, že peptidy obsahující v sekvenci D-aminokyseliny nejsou štěpeny enzymem trypsinem. Dále byla stanovena hodnota minimální inhibiční koncentrace peptidů pro bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Pro stanovení cytotoxicity vůči savčím buňkám byly využity myší dermální fibroblasty. U některých peptidů byly prokázány koncentrace, které působí toxicky vůči bakteriálním buňkám, ale jsou zároveň netoxické vůči savčím. Další charakterizací bylo definování hemolytické aktivity s využitím lidské krve a v poslední řadě byly vybrané peptidy také testovány pro svou anti-biofilmovou aktivitu. Získané výsledky napovídají tomu, že struktura a vlastnosti peptidů hrají významnou roli při definování jejich antimikrobiální aktivity a že mohou tyto látky působit jako významná alternativa v boji proti bakteriálním onemocněním.

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, syntéza, biofilm, cytotoxicita, minimální inhibiční koncentrace, rezistence
Počet stran	106
Počet příloh	21
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eva Trejtnarová
Title	Synthesis and functional <i>in vitro</i> screening of antimicrobial peptides
Type of thesis	Diploma
Department	Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02
Supervisor	doc. Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.
Consultants	Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D. Ing. Sergej Karel, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The main topic of this diploma thesis is synthesis and biological characterization of potentially antimicrobial peptides. In the theoretical part, main features of antimicrobial peptides (AMPs) are introduced including mechanism of action, function and specimen of AMPs. Furthermore, methods of AMPs extraction are described with a focus on solid-phase peptic synthesis. Within materials and methods, detailed protocols of peptide synthesis and their biological examination are provided. Examination of proteolytic stability of the synthesized peptides indicated, that peptides with a D-amino acids in their sequence are not susceptible to cleavage by trypsin. Moreover, minimum inhibitory concentration values against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria were determined. Subsequently, mouse dermal fibroblasts were used for mammalian cytotoxicity measurement. For certain concentrations, some peptides displayed both effective bacterial killing and no mammalian toxicity. Hemolytic activity was assayed by using human blood and additionally anti-biofilm activity assessment was conducted as well. Findings of this research suggest that structure and properties are crucial in determination of peptide antimicrobial effects and support the idea of potential use of peptides in bacterial infection treatment.

Keywords	Antimicrobial peptides, synthesis, biofilm, cytotoxicity, minimum inhibitory concentrations, resistance
Number of pages	106
Number of appendices	21
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Antibiotika a antimikrobiální rezistence	2
2.1.1	Alternativy k současným antibiotikům	3
2.2	Antimikrobiální peptidy	5
2.2.1	Struktura a vlastnosti	5
2.2.2	Mechanismus působení	7
2.2.3	Biologické funkce v organismu	9
2.2.4	Zdroje a zástupci antimikrobiálních peptidů	10
2.2.4.1	Antimikrobiální peptidy u prokaryot	11
2.2.4.2	Antimikrobiální peptidy u eukaryot	12
2.2.4.3	Syntetické antimikrobiální peptidy	16
2.3	Získání proteinů a syntéza peptidů	18
2.3.1	Princip syntézy peptidů na pevné fázi	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Materiály	23
3.1.1	Biologický buněčný materiál	23
3.1.2	Chemikálie, reagensie, složení roztoků	23
3.1.3	Přístroje	26
3.1.4	Programy a databáze	27
3.2	Metody chemické syntézy a analýzy	28
3.2.1	Syntéza peptidů na pevné fázi	28
3.2.2	Purifikace peptidů	32
3.2.3	Proteolytická stabilita	33
3.2.4	Stanovení optické otáčivosti	34
3.3	Metody biologické analýzy	35
3.3.1	Mikrodiluční test antimikrobiální aktivity	35
3.3.2	Stanovení cytotoxicity	36
3.3.3	Stanovení hemolytické aktivity	38
3.3.4	Stanovení anti-biofilmové aktivity	39
4	VÝSLEDKY	41
4.1	Syntéza a purifikace antimikrobiálních peptidů	41
4.2	Stanovení proteolytické stability	41
4.3	Vyhodnocení optické otáčivosti	45
4.4	Stanovení minimální inhibiční koncentrace	46
4.5	Stanovení cytotoxicity	53
4.6	Vyhodnocení hemolytické aktivity	56
4.7	Stanovení anti-biofilmové aktivity	57
5	DISKUZE	59
6	ZÁVĚR	66
7	LITERATURA	67
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77
9	PŘÍLOHY	79

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

1. Vypracování literární rešerše na téma metody syntézy peptidů, využití syntetických peptidů, antimikrobiální peptidy.

Experimentální část:

1. Syntéza vybraných peptidů manuálně metodou na pevné fázi, jejich purifikace a charakterizace dostupnými fyzikálně-chemickými metodami.
2. Testování antimikrobiální účinnosti vybraných peptidů syntetizovaných v předchozím kroku na gram-pozitivní/gram-negativní bakterie.
3. Testování cytotoxicity těchto peptidů na savčích buňkách (MTT, hemolýza).

1 ÚVOD

Jeden z největších problémů současné doby je rezistence bakterií k běžně užívaným antibiotikům (ATB). Léčba právě pomocí ATB je jedním z hlavních přístupů moderní medicíny, který se používá k boji proti infekčním patogenům. Stále častější selhávání ve vývoji nových léčiv a jejich nesprávné používání jsou predispoziční faktory spojené se vznikem rezistence, jež představuje vážnou hrozbu ohrožující zdraví lidí, zvířat a životního prostředí. Důvodem je vznik a šíření multi-rezistentních bakterií (multidrug-resistant, MDR) odolných vůči více používaným léčivům najednou (Davies a Davies, 2010). Původně účinné antimikrobiální látky (AML) přestávají fungovat, a tím se zvyšují nejenom náklady na léčbu infekcí, ale i riziko úmrtí pacientů. Řada důležitých organizací, jako jsou Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC), Společnost pro infekční nemoci Ameriky, Světové ekonomické fórum a Světová zdravotnická organizace (WHO), prohlásila rezistenci vůči antibiotikům za „globální problém veřejného zdraví“ (Michael *et al.*, 2014; Spellberg *et al.*, 2016). Příčinami celosvětové antimikrobiální rezistence (AMR) jsou přelidnění, zvýšená globální migrace, zvýšené používání těchto léčiv na klinikách a také v živočišné produkci, selekční tlak, špatná hygiena, šíření volně žijících živočichů či nesprávný systém likvidace odpadních vod (Marshall a Levy, 2011; Singer *et al.*, 2016).

Současně je třeba vyvinout komplexní úsilí, aby se minimalizovala narůstající rezistence. V mnoha zemích se vědci zabírají studiem metabolismu mikroorganismů, mechanismů rezistence a antimikrobiálních látek. Progresivní alternativní přístupy v návrhu a získávání účinných substancí (probiotika, protilátky, vakcíny nebo antimikrobiální peptidy) prokázaly slibné výsledky ve studiích, které naznačují roli těchto alternativ jako možných léčiv používaných při terapiích v budoucnosti (Aslam *et al.*, 2018).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Antibiotika a antimikrobiální rezistence

Antibiotika byla využívána dlouho před příchodem moderní medicíny. Účinky chlebu, na kterém narostly vláknité houby, jsou při léčbě ran a popálenin známy již od starověkého Egypta (Pećanac *et al.*, 2013). Významné objevy přicházely však až ke konci 19. a na začátku 20. století. Rok 1928 byl důležitým pro Alexandra Fleminga, který objevil, že substance z houby *Penicillium notatum* dokáže účinně inhibovat růst bakterie *Staphylococcus aureus* (Fleming, 1929). Molekula byla nazvána penicilin. Objev tohoto antibiotika a četné zprávy o produkci antimikrobiálních sloučenin pomocí mikroorganismů vedly Selmana Waksmana na konci 30. let 20. století k vytvoření systematické studie mikrobů jako producentů AML. Waksman definoval antibiotikum jako „sloučeninu vytvořenou mikroorganismem pro zničení jiných mikroorganismů“ a podílel se na identifikaci vláknitých Actinomycetales jako producentů AML (Waksman *et al.*, 2010). Waksmanova práce byla inspirací pro farmaceutický průmysl a díky tomu začal od 40. do 60. let 20. století tzv. „zlatý věk“ objevu antibiotik. Většina těchto ATB je stále v klinickém použití, ale jejich účinnost je narušena vzestupem AMR (Katz a Baltz, 2016).

ATB lze rozdělit do skupin na základě jejich mechanismu antimikrobiální aktivity. Hlavními mechanismy jejich účinku jsou: inhibice syntézy buněčné stěny, depolarizace buněčné membrány, inhibice syntézy proteinů, inhibice syntézy nukleových kyselin či inhibice některých metabolických drah bakterií (Reygaert, 2018).

Antimikrobiální rezistence je získaná odolnost patogenů vůči AML, k nimž byly dříve patogeny citlivé (Llor a Bjerrum, 2014). Bakterie mohou vykazovat rezistenci buď přirozenou (konstitutivně se vyskytující v daném bakteriálním druhu), nebo nově získanou díky horizontálnímu přenosu genů (Cox a Wright, 2013; Martinez, 2014). Mechanismy antimikrobiální rezistence se dělí do čtyř hlavních skupin: omezení doručení léčiva, jeho modifikace či inaktivace a aktivní eflux léčiva z buňky (Reygaert, 2018). Každý z těchto funkčních mechanismů má za následek, že antibiotikum není schopné správně působit a je proto neefektivní. Protože výzkum a vývoj nových ATB je v dnešní době v porovnání s minulými lety utlumen, hledají se nové přístupy a alternativy, které by mohly pomoci při řešení problému současné antimikrobiální rezistenční krize (Hutchings *et al.*, 2019).

2.1.1 Alternativy k současným antibiotikům

Ačkoliv v přírodních podmínkách už několik alternativ k antibiotikům existuje, je výzvou tyto možnosti realizovat také v klinickém použití. V současné době každoročně umírá na celém světě statisíce pacientů v souvislosti s nárůstem AMR a odhaduje se, že čísla budou v průběhu dalších let růst do miliónů (Ghosh *et al.*, 2019). Pokroky v biotechnologiích, genovém inženýrství a syntetické chemii poskytují nové možnosti hledání terapií, které mohou nahradit použití klasických známých ATB. Strategické přístupy obsahují: přirozeně se vyskytující látky, metody založené na biotechnologiích a v poslední řadě postupy pro synteticky získané sloučeniny (Ghosh *et al.*, 2019).

Jednou z přirozeně se v přírodě vyskytující alternativou je použití bakteriofágů. Tyto fágy byly použity k léčbě infikovaných hospodářských zvířat ještě předtím, než byla za tímto účelem použita konvenční antibiotika (Gravitz, 2012). Fágy se množí na úkor bakterií. Lytický cyklus bakteriofágů tak může být využit k vývoji jiného možného a zároveň selektivního přístupu k cílení patogenních bakterií (Kutter *et al.*, 2010; Abedon *et al.*, 2011).

Další možnou variantou je využití bakteriocinů. Některé bakterie produkují malé peptidy, které působí proti jiným bakteriím v populaci. Bakteriociny jsou často aktivní proti rezistentním patogenním bakteriím klinického významu (Cotter *et al.*, 2013).

Změnou střevní mikrobioty, která obsahuje u savců více než 1000 mikrobiálních druhů zahrnující bakterie a kvasinky, se dá také docílit léčby a prevence systémového šíření infekce. Bifidobakterie, laktobacily, streptokoky a nepatogenní kmeny *Escherichia coli*, *Bacteroides* sp., *Clostridiodes* sp., *Fusobacterium* sp. a *Veillonella* sp. jsou některé z dominantních bakteriálních rodů ve střevním traktu (Jia *et al.*, 2008). Tyto bakterie hrají klíčovou roli v energetickém metabolismu a imunitní funkci, a tím přispívají k lidskému zdraví. Proto jsou právě probiotika a prebiotika často uplatňována při léčbě různých gastrointestinálních infekcí (Isolauri, 2001).

Jako další možnost se jeví použití bakterií coby predátorů proti bakteriálním patogenům. Bakterie *Bdellovibrio* a této bakterii podobné organismy byly považovány za slibnou alternativu k antibiotikům. Jsou to δ -proteobakterie, které se množí pouze po vstupu do jiných gram-negativních bakteriálních buněk, jako jsou *E. coli*, *Salmonella*, *Legionella* či *Pseudomonas* (Kadouri *et al.*, 2013). Jsou schopny degradovat buňky kořisti skrze hostitelskou lýzi a to pomocí různých hydrolytických enzymů (Sockett a Lambert, 2004).

V boji proti invazi patogenů mohou být také použity protilátky – proteiny, které rozpoznávají specifické složky patogenu. V současné době jsou některé protilátky proti stafylokokům, *Pseudomonas aeruginosa* a také *Bacillus anthracis* ve stádiu klinického vývoje. Některé jsou již dokonce schváleny úřadem pro kontrolu potravin a léčiv FDA (Food and Drug Administration) (Bebbington a Yarranton, 2008; Saylor *et al.*, 2009).

Také s využitím biotechnologických strategií byly učiněny pokroky při získávání alternativ pro boj s bakteriálními infekcemi. V tomto směru se jedná o geneticky modifikované fágy, enzymatické lysiny (endolysiny, exolysiny a autolysiny) nebo systém CRISPR-Cas9 pro cílenou editaci genomu (Ghosh *et al.*, 2019).

Strategie založené na navržení a získání syntetických sloučenin vykazujících antimikrobiální aktivitu jsou další možnou alternativou k antibiotikům. Antiseptika a dezinfekční prostředky jsou široce používány v nemocnicích a dalších zdravotnických zařízeních. V těchto výrobcích se nachází celá řada aktivních chemických látek jako jsou alkoholy, fenoly, jod nebo chlor. Většina z těchto látek vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu, avšak o způsobu působení těchto látek bylo z počátku ve srovnání s antibiotiky známo jen málo (McDonnell a Russell, 1999).

V současné době je trendem navrhnout a synteticky napodobit antimikrobiální látky na bázi peptidů (Scorciapino a Rinaldi, 2012). Existují různé přístupy v navrhování syntetických analogů antimikrobiálních peptidů. Většina z těchto strategií se snaží překonat problémy s proteasovou labilitou, toxicitou a vysokými náklady na výrobu těchto látek (Ghosh a Haldar, 2015). Nejčastější syntetické strategie použité ke zvýšení proteasové stability se zaměřují na modifikace polypeptidového řetězce a udržení stabilního kationtového a amfifilního stavu molekuly. Začlenění hydrofobních a kationtových domén do struktury vede následně k získání antimikrobiálních polymerů (Xue *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Konai *et al.*, 2018). Tyto syntetické antimikrobiální látky přinesly již slibné výsledky, některé z nich jsou schopné působit i na bakterie rezistentní na komerční antibiotika (Uppu *et al.*, 2015; Uppu a Haldar, 2016; Uppu *et al.*, 2016; Konai *et al.*, 2018).

Pro boj s antimikrobiální rezistencí a na léčbu bakteriálních infekcí bylo již vyvinuto mnoho alternativ k běžným antibiotikům. Některé z přístupů pokročily, zatímco jiné jsou stále na laboratorní úrovni. Jednou velmi perspektivní strategií se zdá být právě použití ať už přirozených nebo syntetických peptidů vykazujících antimikrobiální vlastnosti.

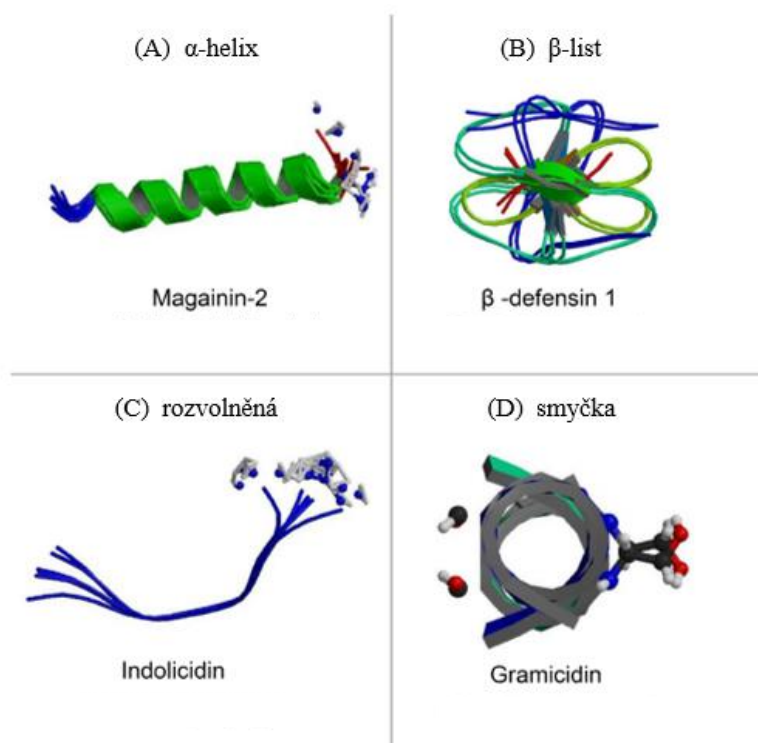
2.2 Antimikrobiální peptidy

Zvyšující se bakteriální rezistence na běžně používaná léčiva, zejména antibiotika, dala v posledních několika letech do popředí jiné alternativní látky jako slibné sloučeniny pro boj s bakteriálními infekcemi a kontaminacemi. **AntiMikrobiální Peptidy (AMP)** se jeví v této souvislosti jako perspektivní substance, které díky svým vlastnostem, struktuře, získávání, modifikacím a mechanismům účinku, mohou pomoci v řešení současné rezistenční krize (Zhu *et al.*, 2017). Už v roce 1922 Alexander Fleming identifikoval lysozym, první uváděný lidský antimikrobiální protein. Tento objev byl však zastíněn, když v roce 1928 Fleming objevil penicilin a ve 40. letech 20. století začal „zlatý věk“ antibiotik. Už v 60. letech však vzestup antimikrobiální rezistence a nefunkčnost antibiotik vzbudila zájem o AMP jako o hostitelské obranné molekuly (Zhang a Gallo, 2016). AMP jsou evolučně velmi konzervované a vyskytují se jak u prokaryot, tak eukaryot. Jedná se o peptidy, které mohou mít různou délku řetězce, od 5 až přes 100 aminokyselinových reziduí (Zhu *et al.*, 2017). Byly však identifikovány i antimikrobiální peptidy obsahující pouze 2 aminokyseliny (AK) (Ramesh *et al.*, 2016). AMP mají široké spektrum cílových organismů jako jsou gram-pozitivní (gram⁺) i gram-negativní (gram⁻) bakterie, houby, viry, paraziti či dokonce rakovinné buňky (Bahar a Ren, 2013). Velmi důležitou výhodou u AMP je jejich rychlý účinek. Některé AMP mohou usmrtit buňku během několika sekund i při nízké koncentraci po počátečním kontaktu s buněčnou membránou (Loeffler *et al.*, 2001).

2.2.1 Struktura a vlastnosti

AMP jsou produkovány mnoha živými organismy (mikroorganismy, živočichy a rostlinami) při napadení patogeny (Sayed a Jardine, 2015). I přes velkou rozmanitost má většina peptidů společné fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou založeny na jistých pravidlech. Přirozeně se vyskytující AMP mívají přibližnou délku 50 AK, zatímco syntetické peptidy jsou obvykle krátké a obsahují 5 – 6 aminokyselinových zbytků (Zhu *et al.*, 2017). Obecně většina z nich obvykle obsahuje kladně nabitě a hydrofobní skupiny kvůli přítomnosti specifických aminokyselinových zbytků. Naopak obsahují nízký podíl polárních a záporně nabitých AK (Hancock a Chapple, 1999). Celková hydrofobicita AMP definuje jejich lytické vlastnosti a schopnost penetrovat do buněk. Na základě složení bakteriální buněčné stěny, která je bohatá na záporně nabitě fosfolipidy, jsou tyto peptidy poté schopné rozlišit bakteriální buňky od savčích (Zaslouff, 2002).

Antimikrobiální peptidy mají amfipatickou povahu, která určuje jejich konformační flexibilitu. Většinu z dosud známých AMP lze charakterizovat jako jeden z následujících typů na základě jejich sekundárních struktur: α -helix, β -list, rozvolněná a smyčka (Waghu *et al.*, 2014). Příklady těchto struktur jsou znázorněny na Obr. 1. Mezi těmito typy je nejčastější α -helix a β -list (Sun *et al.*, 2014). Kromě vytváření jednotlivých strukturálních motivů existují také peptidy, jejichž struktura obsahuje jejich kombinaci. Smíšená struktura α -helix / β -listu je dalším důležitým strukturálním motivem některých AMP. Cysteinem stabilizované α/β -defensiny jsou AMP (od 34 do 54 aminokyselinových zbytků) bohaté na cystein. Obvykle se skládají z α -helixu a tří β -vláken stabilizovaných třemi nebo čtyřmi disulfidovými vazbami, a běžně se vyskytují u několika druhů organismů (Dias a Franco, 2015). U některých peptidů se jejich konformace mění v závislosti na prostředí, ve kterém se vyskytují. Magaininy a cecropiny jsou zástupci AMP nestrukturovaných ve vodném roztoku, které však během interakce s membránami vytvářejí amfipatické α -helikální struktury (Karal *et al.*, 2015; Juhaniwicz *et al.*, 2016). Indolicidiny vykazují ve vodných roztocích amfipatickou a globulární konformaci, zatímco v prostředí napodobujícím lipidovou dvojvrstvu své strukturální uspořádání také mění. Při této změně se poté inkorporují do membrány a tím ji narušují (Zhu *et al.*, 2017).



Obr. 1 Příklady typů struktur AMP (upraveno z Peters *et al.*, 2010). (A) α -helix, (B) β -list, (C) rozvolněná a (D) smyčka.

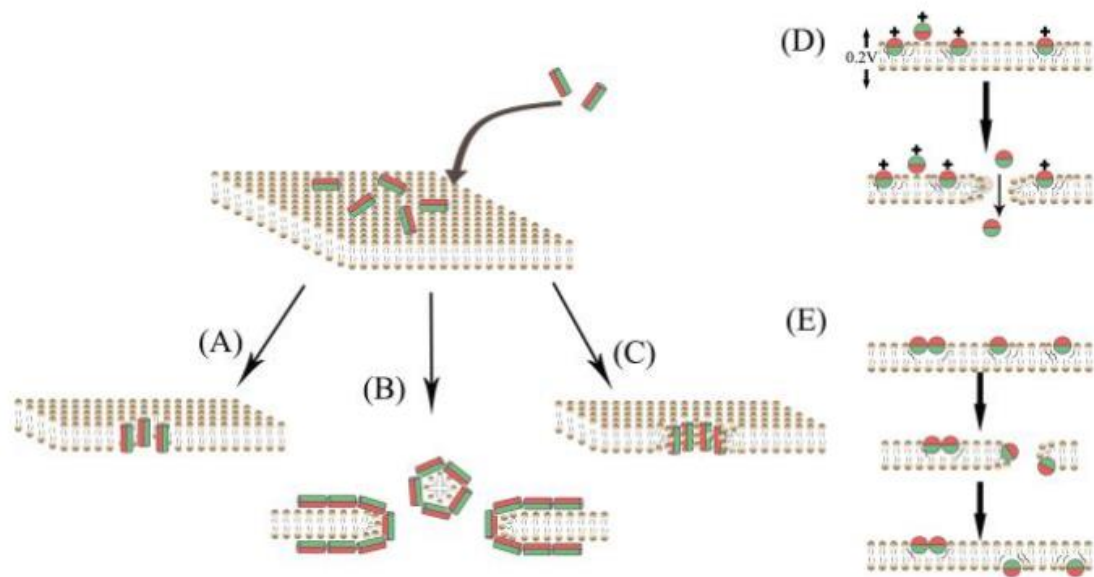
2.2.2 Mechanismus působení

Aktivita AMP je téměř univerzálně závislá na jejich interakci s bakteriální buněčnou membránou. AMP lze rozdělit na základě mechanismu působení do dvou skupin. Do první skupiny se zařazují peptidy, které způsobují permeabilizaci membrány s následným narušením celé buňky, přičemž dochází k vylití buněčného obsahu a smrti buňky. Druhá skupina zahrnuje peptidy, které nepůsobí primárně na membrány, ale ovlivňují intracelulární metabolické děje. Na základě narušení metabolických pochodů bakterií působí v konečném důsledku baktericidně (Toke, 2005; Yount a Yeaman, 2005). V obou případech umožňuje elektrostatická interakce se záporně nabitými skupinami lipopolysacharidů u gram⁻ bakterií nebo lipoteichoových kyselin u gram⁺ bakterií inkorporaci peptidu do vnitřních částí buněčné membrány. Tento proces je navíc podpořen hydrofobními interakcemi a změnou strukturálního motivu peptidu (Epanand a Vogel, 1999; Hancock a Chapple, 1999; Yeaman a Yount, 2003; Jenssen *et al.*, 2006).

Zhu *et al.* (2017) ve své publikaci prezentují modely mechanismu právě těchto AMP, které způsobují narušení membrány (Obr. 2). Model sudové skruže (barrel-stave model), je typický pro peptidy se strukturálním motivem α -helixu. Peptidy se orientují kolmo do lipidové dvojvrstvy a jednotlivé monomery následně společně vytváří svým tvarem imitaci sudu. Tímto způsobem vznikají kanály, které následně vedou k buněčné smrti (Thevissen *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010).

U kobercového modelu jsou AMP poutány paralelně prakticky na celém povrchu lipidové dvojvrstvy díky elektrostatickým interakcím. Někdy je tento model nazýván také detergentový, z důvodu podobného mechanismu působení jako mají právě detergenty. Membrána se v konečném důsledku působení AMP rozpadá a v ohybech dvojvrstvy se vytváří micely (Jean-Francois *et al.*, 2008).

Model toroidního póru je podobný modelu sudové skruže s rozdílem, že při tomto mechanismu peptidy zůstávají spojené se zápornými skupinami lipidů na membráně v celém procesu interakce peptidu. Tento model je charakterizován jako transmembránový svazek, který je složený z komponent peptidů a lipidů (Matsuzaki *et al.*, 1996; Guliani *et al.*, 2007). Při interakci s povrchem membrány dochází ke zakřivování fosfolipidové vrstvy směrem dovnitř membrány a dochází ke vzniku pórů. Do těchto pórů se inkorporují řetězce peptidů. Jejich tvorba se odvíjí od koncentrace



Obr. 2 Mechanismy působení AMP narušujících membránu (Zhu *et al.*, 2017). Na počátku je pro všechny modely společná asociace AMP s membránou. (A) model sudové skruže (barrel-stave model), (B) koberecový model (carpet model), (C) model toroidního póru (toroidal model), (D) molekulární elektroporační model (molecular electroporation model), (E) „sinking raft model“. Zelená barva představuje hydrofobní části, zatímco červená barva hydrofilní části AMP.

AMP. Se zvyšující se koncentrací peptidu dochází ke snížení stability vzniklých pórů v důsledku Coulombovských odpuzivých sil mezi pozitivně nabitými vedlejšími řetězci (Guliani *et al.*, 2007).

Podle dalšího modelu molekulární elektroporace se kationtové peptidy sdružují na povrchu bakteriální membrány a vytvářejí rozdíl elektrického potenciálu. Když tento rozdíl přesáhne definovanou hodnotu, předpokládá se, že jsou póry generovány právě pomocí elektroporace (Lee *et al.*, 2014; Dennison *et al.*, 2015).

Vazba amfipatických peptidů může na membráně způsobit hmotnostní nerovnováhu a následně i zvýšení jejího lokálního zakřivení. Podle „sinking raft“ modelu přispívají v této souvislosti AMP ke vzniku přechodných pórů, které zapříčiní, že peptidy tímto způsobem mohou „propadnout“ do nitra buňky (Pokorný a Almeida, 2005; Dennison *et al.*, 2015).

V dřívějších studiích AMP bylo narušení a permeabilizace bakteriální buněčné membrány považováno za primární mechanismus působení a určování aktivity AMP. Stále více novějších studií však naznačuje, že narušení membrány nemusí být jediným mechanismem antimikrobiální činnosti peptidů. AMP mohou inhibovat signální dráhy v buňce nebo jinak interagovat s dalšími intracelulárními cíli (Dennison *et al.*, 2015).

Je známo, že jedna třetina všech proteinů bakteriální buňky je spojena s membránou a že tyto proteiny mají mnoho funkcí, které jsou esenciální pro správný chod bakteriálních buněčných procesů. Mezi tyto procesy patří např. aktivní transport živin, respirace, generování ATP, tvorba protonového gradientu či mezibuněčná signalizace (Zhang a Rock, 2009). Funkce těchto proteinů může být narušena při působení AMP. Jejich rychlý účinek tedy nenastává pouze v důsledku narušení membrány, ale také z důvodu narušení funkce těchto proteinů. Významnými látkami jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou známé jako markery apoptických buněk (Madeo *et al.*, 2004). Studie zabývající se indukci intracelulárních signálních drah rozšířily počet AMP, které jsou ve spojení právě s těmito látkami. Účinek AMP je v tomto směru spojen s intracelulární produkcí ROS (Narasimhan *et al.*, 2001; Vriens *et al.*, 2016). Kromě již zmiňovaných procesů mohou antimikrobiální peptidy také: inhibovat syntézu DNA, blokovat syntézu RNA, inhibovat enzymy nezbytné pro výstavbu buněčné stěny, inhibovat funkce ribozomu a syntézu proteinů či cílit na mitochondrie a inhibovat procesy s nimi spojené (Peters *et al.*, 2010).

2.2.3 Biologické funkce v organismu

Organismy mají vrozenou obranyschopnost, pomocí které jsou schopny čelit patogenům a infekcím. Do mechanismů obranných reakcí patří i exprese a syntéza antimikrobiálních peptidů, které plní v organismu mnoho důležitých fyziologických funkcí (Xia *et al.*, 2018). Lidské AMP byly identifikovány v těle na místech, která jsou běžně vystavena mikrobům, je to např. povrch kůže, oči, gastrointestinální, respirační či urogenitální trakt (Zhang a Gallo, 2016). U lidí jsou tyto peptidy syntetizovány v široké škále buněk imunitního systému, včetně neutrofilů, NK a T buněk, stejně jako i v tkáních s výstelkou epiteliálních buněk. Exprese těchto látek může být konstitutivní (např. α - a β -defensiny v neutrofilech), indukovatelná (např. β -defensiny v buňkách epitelu) nebo kombinovaná (např. katelicidiny a β -defensiny v různých buňkách, včetně neutrofilů, makrofágů a buňkách epitelu) (Yang *et al.*, 2004). Exprese většiny β -defensinů je také indukována prozánětlivými stimuly zahrnující bakterie, působení LPS, IL-1 a TNF α (Diamond *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2003). Specifická místa a přísná regulace exprese AMP jsou klíčem k pochopení toho, jak fungují. To může vysvětlit, proč tyto peptidy jako evolučně konzervované produkty genomu zůstávají účinnými v boji proti bakteriálním infekcím, zatímco se klasická antibiotika rychle stávají neúčinnými v důsledku rozvoje bakteriální rezistence (Zhang a Gallo, 2016).

Některé peptidy vykazují přímou antibakteriální aktivitu. Lidské katelicidiny a defensiny mají schopnost usmrcovat *in vitro* celou řadu gram⁺ a gram⁻ bakterií (Garcia *et al.*, 2001a; Harder *et al.*, 2001; Zaiou *et al.*, 2003). Stejně jako u některých antibiotik je tato aktivita závislá na jejich dávce. Baktericidní účinek je obvykle pozorován už při mikromolárních koncentracích. Důkazy o jejich účinnosti pocházejí ze studií *in vivo* využívajících zvířecí modely (Huang *et al.*, 2002) a také ze studií využívajících transgenní nebo knock-out myši modely s defekty v produkci různých AMP (Moser *et al.*, 2002; Salzman *et al.*, 2003).

Kromě své antimikrobiální účinnosti mohou tyto peptidy svými imunomodulačními vlastnostmi přispívat k lepší obranyschopnosti hostitele. Takové peptidy, které jsou produkovány buňkami epitelu a imunitními cirkulujícími buňkami, patří mezi první imunitní efekторы, se kterými přichází patogenní mikroorganismy do kontaktu (Jenssen *et al.*, 2006). Lidský katelicidin LL-37 moduluje vrozenou imunitní odpověď působením jako chemoatraktant pro neutrofilů, monocytů a T-lymfocytů (Niyonsaba *et al.*, 2002a; Yang *et al.*, 2000). Lidské β -defensiny působí stejným mechanismem pro leukocyty (Garcia *et al.*, 2001b; Niyonsaba *et al.*, 2002b). β -defensiny také přitahují dendritické buňky, které mohou přímo zničit patogeny prostřednictvím fagocytózy (Liu, 2001). Tyto buňky se pak mohou dále produkováním cytokinů, chemokinů a jiných AMP podílet na imunitní odpovědi (Duits *et al.*, 2002). Katelicidiny, defensiny a chemokiny se tak spoluúčastní chemotaktické strategie a ovlivňují vrozenou imunitu a obranu vůči patogenům.

2.2.4 Zdroje a zástupci antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy jsou rozšířeny v přírodě napříč prokaryoty i eukaryoty (Liu *et al.*, 2007a; Peters *et al.*, 2010). Mikroorganismy produkují AMP především za účelem zneškodnění konkurentů v boji o živiny. U vyšších mnohobuněčných organismů jsou tyto peptidy považovány za součást obranného systému proti invazi a infekci mikrobiálních původců onemocnění. U živočichů se považují za první linii vrozené imunitní odpovědi mající účinek proti bakteriím, plísním nebo virům (Zasloff, 2002).

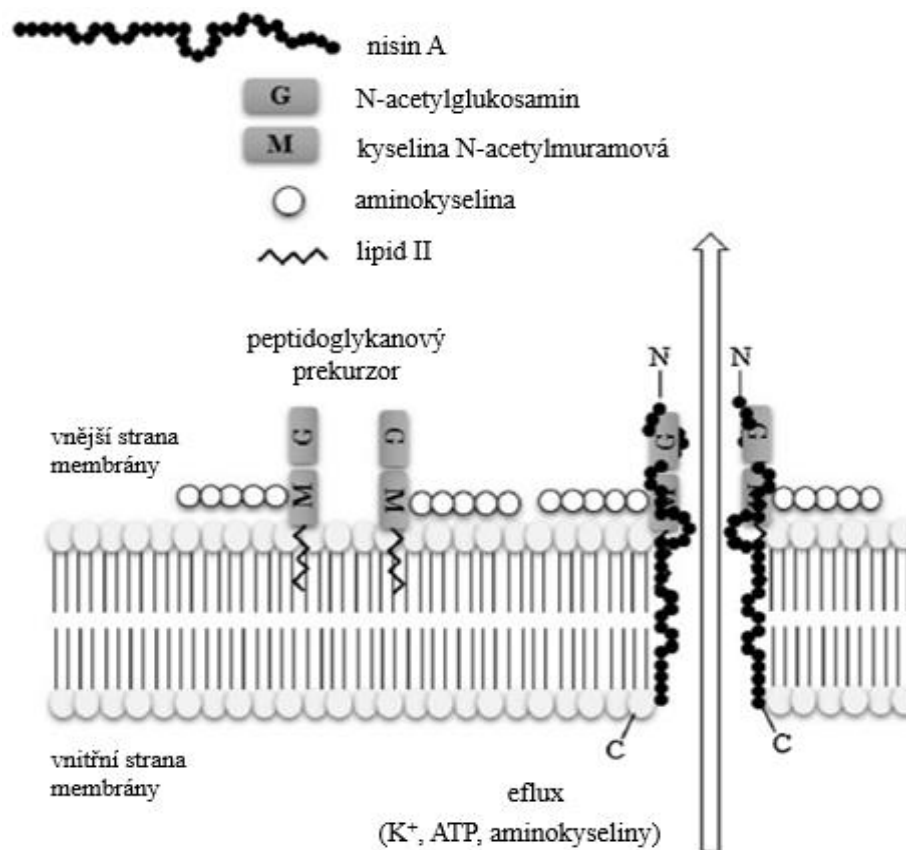
Vzhledem ke svým vlastnostem a potenciálnímu využití jsou AMP v posledních letech velmi cennými zdroji v boji proti patogenům. V rámci této skutečnosti je k dispozici mnoho databází právě pro vyhledávání, porovnávání a sdílení různých antimikrobiálních látek peptidového charakteru. Příkladem takové databáze je dbAMP (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/dbAMP/>, navštíveno 14. 2. 2020), která poskytuje přehled

doposud existujících sloučenin. V současné době se v této databázi nachází přes 12380 záznamů, z toho přes 4270 experimentálně ověřených a 8110 predikovaných (Jhong *et al.*, 2019). Tyto databáze nabízejí vhodné vyhledávací nástroje pro získání informací o struktuře, funkčních vlastnostech, zdrojovém organismu nebo hostitelském cíli. Zároveň pomáhají zjednodušit proces objevování a navrhování nových AMP s lepším terapeutickým indexem nebo antimikrobiální aktivitou (Jhong *et al.*, 2019).

Z biosyntetického hlediska lze rozdělit peptidy do dvou základních skupin podle toho, jak v organismu vznikají. Jsou buď geneticky kódované produkované pomocí ribozomů, anebo genem nekódované, kdy vznikají v buňkách složitými enzymovými reakcemi (Zhu *et al.*, 2017). Ne-ribozomální peptidy (NRP) jsou v buňkách syntetizovány multi-doménovými enzymy, které se nazývají ne-ribozomální peptidové syntetasy (NRPS), aniž by bylo zapotřebí ribozomů a mRNA (Evans *et al.*, 2011). Každý samostatný systém NRPS syntetizuje pouze jeden typ produktu, a to na principu zavádění jednotlivých volných AK do řetězce peptidu. Struktura ne-ribozomálně vytvořených sloučenin tak může obsahovat např. nepřirozené AK, cyklické kruhy nebo kovalentně navázané skupiny glykanů (Strieker *et al.*, 2010). Příkladem NRP jsou antibiotika (penicilin, vankomycin), cytotoxika (bleomycin) nebo imunosupresiva (cyklosporiny), která již našla uplatnění v medicíně (Hoffmeister a Keller, 2007).

2.2.4.1 Antimikrobiální peptidy u prokaryot

U prokaryot jsou významnými zástupci AMP bakteriociny. Jedná se o ribozomální peptidy produkované mnoha bakteriemi (Anaya-López *et al.*, 2013; O'Connor *et al.*, 2020). Mají účinek proti jiným bakteriím patřícím ke stejnému nebo odlišnému rodu. Samotní producenti pak mají mechanismy, pomocí kterých jsou imunní vůči účinku produkovaných látek. Tyto peptidy se klasifikují podle toho, jestli jsou jejich producenty gram⁺ či gram⁻ bakterie (Bilková *et al.*, 2011). Mechanismus působení těchto látek spočívá v jejich interakci s buněčnou membránou a tvorbou pórů (Obr. 3). Kromě cílení na buněčnou membránu však mohou bakteriociny také inhibovat syntézu peptidoglykanu. Tímto způsobem působí např. nisin F, komerčně používaný bakteriocin (Cotter *et al.*, 2013). Další zástupci jsou příkladem ze skupiny kolicinů či mikrocinů v případě zdrojů gram⁻ bakterií či již zmiňované nisinu u gram⁺ bakterií (Karpinski a Szkaradkiewicz, 2013). Bakteriociny jsou v současné době využívány v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu jako ochranné složky před kontaminací (Dobson *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; O'Connor *et al.*, 2020).



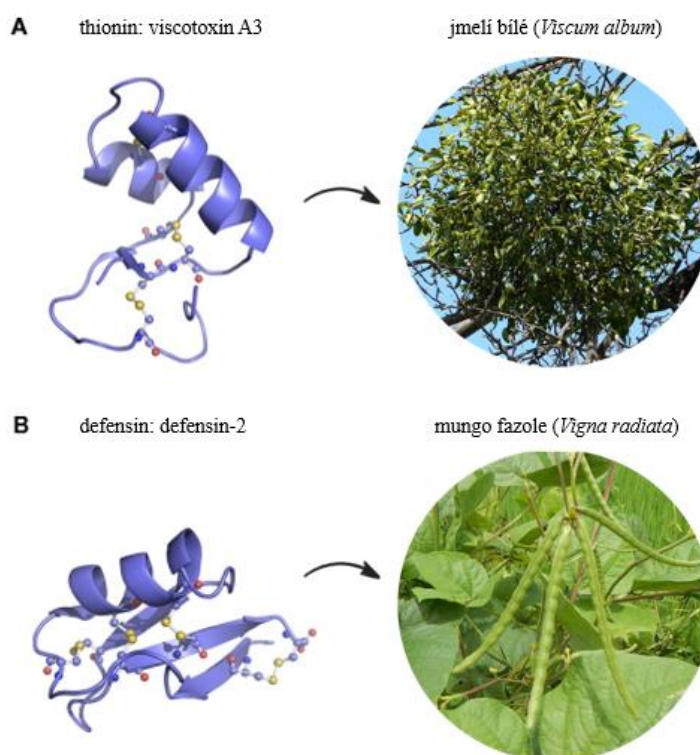
Obr. 3 Mechanismus působení nisinu A (upraveno z Kawada-Matsuo a Komatsuzawa, 2017). Bakteriocin tvoří komplexy s lipidem II a narušuje biosyntézu buněčné stěny. Je schopen vytvářet v buněčné membráně póry. Tento účinek vede k odtoku malých molekul z buňky a následně k buněčné smrti.

2.2.4.2 Antimikrobiální peptidy u eukaryot

Houby jsou dalšími organismy, u nichž byly objeveny antimikrobiální peptidy. Plektasin byl první peptid izolovaný z askomycety *Pseudoplectania nigrella* (Schneider *et al.*, 2010). Jedná se o defensin s délkou řetězce 40 AK, který je účinný proti *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium diphtheriae* či dokonce MRSA (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) (Mygind *et al.*, 2005). Copsin z *Coprinopsis cinerea* se 184 AK je účinný proti *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* nebo *Bacillus subtilis* (Essig *et al.*, 2014). Tyto dva AMP inhibují syntézu buněčné stěny díky interakci s bakteriálním membránovým prekurzorem lipidem II (Schneider *et al.*, 2010; Essig *et al.*, 2014). Mezi další studované AMP izolované z hub se řadí např. alamethicin z *Trichoderma viride* (Meyer a Reusser, 1967), který na rozdíl od předchozích dvou peptidů působí také proti dalším houbám nebo živočišným a hmyzím buňkám (Leitgeb *et al.*, 2007).

Také rostliny jsou bohaté na mnoho biologicky účinných látek, mezi které patří fytohormony, induktory obranných reakcí či peptidy. Rostlinné druhy musí čelit mnoha biotickým či abiotickým vlivům, a proto produkují mnoho antimikrobiálních a insekticidních látek, které inhibují vývoj různých patogenů. Mnoho AMP získaných z rostlin obsahuje velké množství cysteinu. Díky přítomnosti této AK se vytváří v molekulách disulfidické můstky, což zajišťuje vysokou stabilitu dané látky (Egorov a Odintsova, 2012). Mezi dvě hlavní skupiny rostlinných AMP patří defensiny a thioniny (Obr. 4).

Defensiny jsou kationtové peptidy s délkou řetězce v rozmezí 45 – 54 AK (Vriens *et al.*, 2014) patřící mezi nejvíce studované rostlinné antimikrobiální látky. Byly identifikovány v semenech, listech, květech i plodech. V genomu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno přes 300 typů sekvencí odpovídajících struktuře defensinů. Studie naznačují, že některé defensiny působí jako enzymové inhibitory např. α -amylas a proteas. Je tedy předpoklad, že se tyto peptidy podílejí na obranných odpovědích při napadení hmyzem (Egorov a Odintsova, 2012). Jiné defensiny vykazují



Obr. 4 Struktury rostlinných antimikrobiálních peptidů (upraveno z Silva *et al.*, 2011; obrázky: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Viscum_album_apple-tree_2009_G1.jpg; https://commons.wikimedia.org/wiki/File:09438jfFranza_Halls_Vigna_radiata_Plants_Science_Munoz_Ecijafvf_18.JPG, navštíveno 9. 3. 2020).

A – příklad thioninu: viscotoxin A3 z *Viscum album*, B – příklad defensinu: defensin-2 z *Vigna radiata*.

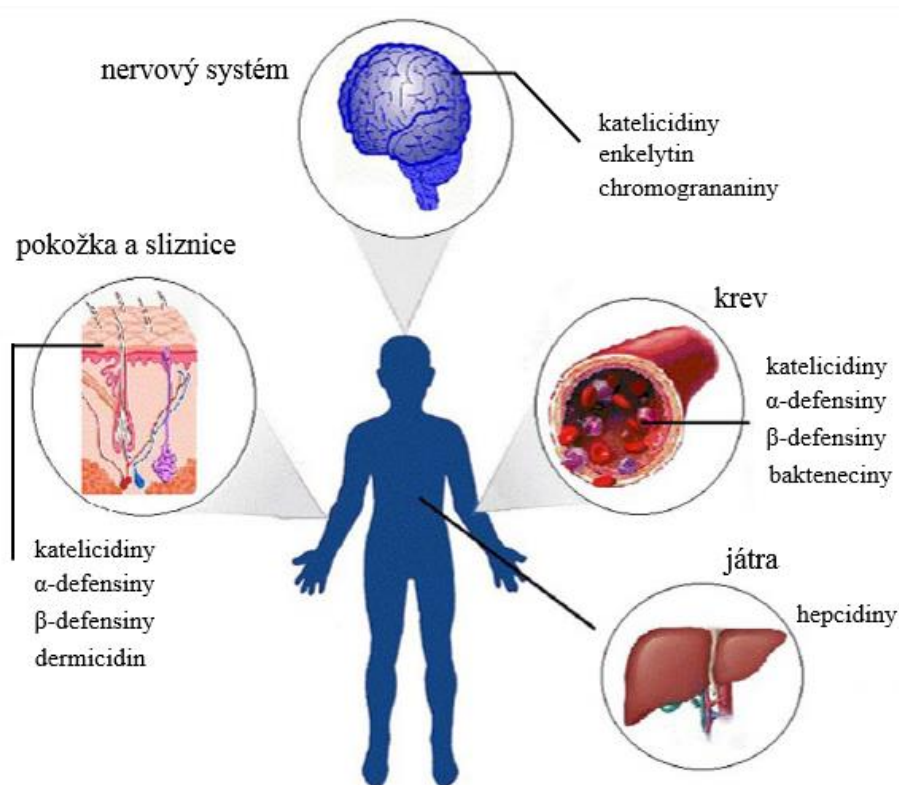
i baktericidní účinky. Jako příklad lze uvést Ct-AMP1 izolovaný z *Clitoria ternatea* mající účinek proti *B. subtilis*, TAD1 z pšenice působící na *P. cichorii* nebo Tk-AMPD1 z kukuřice inhibující růst bakterie *P. syringae* (Egorov a Odintsova, 2012).

Thioniny mají podobnou délku řetězce jako defensiny. Jsou bohaté na cysteinová rezidua a vyskytují se u jednoděložných i dvouděložných rostlin. Do této skupiny se řadí α/β -thioniny a γ -thioniny (Stec, 2006). U některých zástupců (př. α -1-purothionin) z těchto skupin studie prokázaly jejich toxicitu vůči savčím buňkám a patogenním bakteriím jako jsou *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum* či *Rhodococcus fascians* (López-Solanilla *et al.*, 2003; Nawrot *et al.*, 2014).

V živočišné říši patří mezi významné skupiny magaininy a cecropiny. Obojživelníci představují bohatý zdroj peptidů se širokým spektrem antimikrobiální aktivity. Produkují AMP, které jsou posléze ukládány v sekrečních granulích v dermální vrstvě jejich kůže. Uvolňují se při poškození kůže nebo v reakci na specifický chemický stimul (Rinaldi, 2002; Rollins-Smith *et al.*, 2005). Do současné doby bylo již popsáno několik stovek většinou kationtových α -helikálních peptidů odvozených z kožních sekretů různých druhů žab (Conlon *et al.*, 2007). První magaininy byly původně izolovány z kůže africké žáby *Xenopus laevis* (Karal *et al.*, 2015), kdežto cecropiny jsou třídou AMP původně izolovaných z hemolymfy hmyzu (Juhaniwicz *et al.*, 2016). Obě tyto skupiny vykazují silnou nespecifickou toxicitu vůči eukaryotním buňkám, což omezuje jejich praktické použití. Proto se studie zaměřují spíše na jejich strukturní aktivitu a modifikaci sekvencí s dvojnásobným cílem zlepšit antimikrobiální aktivitu a zároveň snížit toxicitu proti rostlinným nebo živočišným buňkám (Marcos a Manzanares, 2011).

U savců docházelo v průběhu evoluce k vývoji komplexního imunitního systému, který zahrnuje produkci antimikrobiálních sloučenin jako jsou anorganické látky (peroxid vodíku nebo oxid dusnatý), proteiny (lysozym či laktoferin) a AMP (Yang *et al.*, 2002). Mezi hlavní a nejvíce studované savčí antimikrobiální peptidy se řadí katelicidiny a defensiny. Schématická distribuce AML konkrétně u člověka je znázorněna na Obr. 5.

Katelicidiny (více než 30 členů) jsou malé, kationtové, amfipatické AMP vyskytující se včetně člověka také u řady savců jako jsou prasata, ovce, koně, skot, kozy nebo králíci. Mají široké spektrum působení proti plísním, virům i bakteriím (van Dijk *et al.*, 2011; Kościuczuk *et al.*, 2012). Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je LL-37 s délkou 37 AK, také známý jako hCAP-18, FALL-39 nebo CAMP, který je jediným katelicidinem nalezeným společně u lidí, opic, myší, potkanů a morčat (Dürr *et al.*, 2006;



Obr. 5 Distribuce antimikrobiálních látek popsanych v lidském těle (upraveno z Silva *et al.*, 2011). Peptidy se vyskytují hlavně na kůži, sliznicích, v krvi, nervovém systému a játrech.

Kościewicz *et al.*, 2012). LL-37 je účinný proti gram⁺ i gram⁻ bakteriím (Dürr *et al.*, 2006), konkrétně proti *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Turner *et al.*, 1998; De Smet a Contreras, 2005). Tento peptid je amfipatický s lineární neuspořádanou strukturou, pokud se nachází v roztoku. Při interakci s buněčnými membránami získává však α -helikální strukturu. Předpokládá se, že LL-37 vytváří póry na buněčné membráně nebo inhibuje syntézu buněčné stěny a tím usmrcuje bakteriální buňky (Duplantier a van Hoek, 2013). Tento katelicidin byl navržen jako léčivo při ošetřování infikovaných ran (Duplantier a van Hoek, 2013), a to především díky své schopnosti zabránit tvorbě bakteriálního biofilmu už při jeho mikromolární koncentraci (Overhage *et al.*, 2008). Mezi další katelicidiny patří například indolicidin (katelicidin-4), protegriny nebo baktenečiny (Ageitos *et al.*, 2017).

Defensiny jsou také součástí imunitního systému obratlovců, zvláště pak savců (Niyonsaba a Ogawa, 2005). Obsahují šest cysteinových reziduí a jsou rozděleny do 3 podskupin podle uspořádání jejich disulfidických můstků: α -defensiny, β -defensiny a θ -defensiny (Selsted a Ouellette 2005; Guilhelmelli *et al.*, 2013).

2.2.4.3 Syntetické antimikrobiální peptidy

Obecně se kationtové peptidy obtížně získávají rekombinantními technologiemi, protože jsou toxické pro buňky, které je syntetizují. Proto se mnoho AMP vyrábí chemickou syntézou. Některé z nich, jako jsou např. katelicidiny a defensiny, však mohou být exprimovány i v bakteriích (Li, 2011), a to jako součást fúzních proteinů, tandemových multimerů nebo prostřednictvím zabudování peptidu do inkluzních tělísek (Chang *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2007; Ruangsri *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). Chemická příprava peptidů však poskytuje výhody skrze modifikace, které mohou zahrnovat změny aminokyselinové sekvence a použití nepřirozených nebo D-aminokyselin (Wade *et al.*, 1990; Bahar a Ren, 2013).

Na konci osmdesátých a začátkem devadesátých let zveřejnili Boman a Merrifield průkopnické studie syntézy hybridů cecropinu A a melitinu A (Boman *et al.*, 1989; Wade *et al.*, 1990; Andreu *et al.*, 1992; Merrifield *et al.*, 1995). Od té doby jsou připravovány syntetické hybridní peptidy založené na přírodních AMP. Tyto kombinované sloučeniny vykazovaly mnohdy zvýšenou aktivitu, sníženou cytotoxicitu nebo působily na rozdílné molekulární cíle v hostitelské buňce (Andreu *et al.*, 1992). Dále bylo zjištěno, že analogy obsahující D-aminokyseliny byly mnohdy stabilnější než jejich protějšky obsahující L-aminokyseliny (Oh *et al.*, 2000). Příkladem CAMELO obsahující 15 AK je hybrid cecropinu A (1-7) a melitinu A (2-9), který představuje jeden z několika přírodních analogů syntetizovaných k cílení anaerobních bakterií (Oh *et al.*, 2000). BP100 s obsahem 11 AK je další syntetický hybrid cecropinu A a melitinu A, který byl vyprodukován kombinatorickou chemií (Badosa *et al.*, 2007). Tento AMP způsobuje propustnost buněčné membrány a zároveň vyvolává její depolarizaci (Alves *et al.*, 2010). Také dokáže usmrtit gram⁻ bakterie a vykazuje střední cytotoxicitu vůči savčím buňkám (Ferre *et al.*, 2009; Torcato *et al.*, 2013). Několik analogů BP100 bylo syntetizováno s cílem zvýšit aktivitu a spektrum účinku této sloučeniny; dva takové příklady jsou RBP100 a RW-BP100, kde byly lysiny nahrazeny argininy. Tato modifikace vedla k tomu, že analogy působily jak na gram⁻, tak i na gram⁺ bakterie (Torcato *et al.*, 2013).

Další možností je přímá syntéza analogů přirozených antimikrobiálních peptidů. Pexiganan (22 AK) je syntetický analog magaininu II se širokým spektrem účinku. Mechanismem jeho působení je tvorba toroidních pórů v bakteriálních membránách (Gottler a Ramamoorthy, 2009). Bylo zjištěno, že tento AMP byl aktivní u 3108 klinických bakteriálních izolátů (2692 aerobů a 416 anaerobů) s minimální

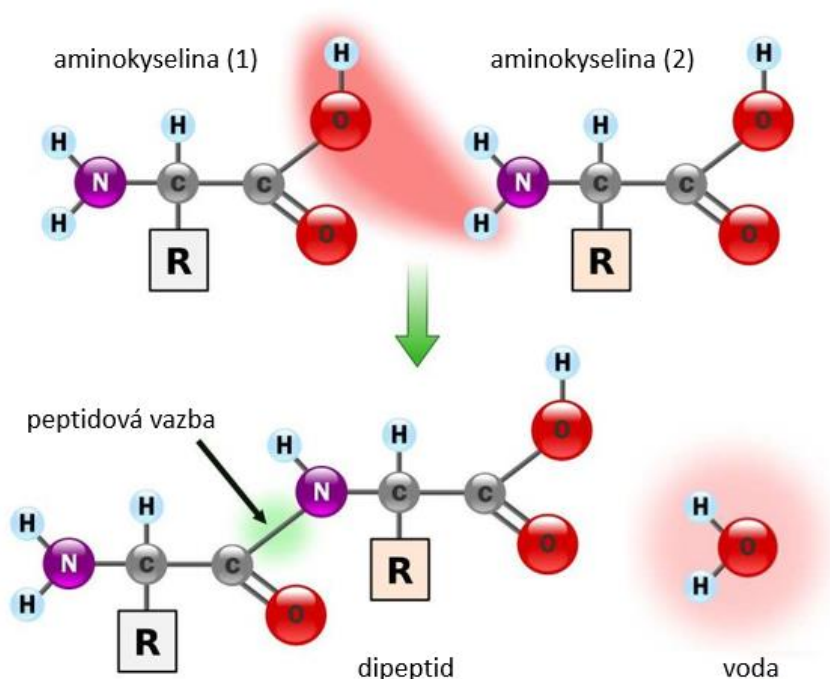
inhibiční koncentrací (MIC) v rozmezí od 0,8 do 6,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u 87 % testovaných vzorků. Tyto klinické testy zahrnovaly gram⁺ i gram⁻ bakterie rezistentní na řadu antibiotik jako jsou oxacilin, cefazolin, cefoxitin, imipenem, ofloxacin nebo gentamycin. Navíc se zdálo, že sensitivita vůči pexigananu je stejná pro všechny bakteriální kmeny, ať už byly na klasická antibiotika citlivé nebo rezistentní. V tomto případě nebyla detekována žádná rezistence na pexiganan. Klinický patogen *A. baumannii* je jednou z bakterií s nejvyšší citlivostí na tento AMP (s MIC v rozmezí 0,4 až 3,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zatímco *E. faecalis* a *S. sanguis* jsou vůči němu odolnější a vyžadují MIC nad 6,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ge *et al.*, 1999). Dalším příkladem je FL9, analog falaxinu (Nielsen *et al.*, 2007), který může působit také proti MRSA (Gottschalk *et al.*, 2015). Peptid se váže na DNA a indukuje SOS (z anglického „Save Our Souls“) odpovědi. Mechanismus účinku FL9 závisí na jeho koncentraci. Při koncentracích pod jeho MIC cílí hlavně na DNA, zatímco při vyšších koncentracích vytváří póry a narušuje buněčnou membránu, což vede k buněčné smrti (Gottschalk *et al.*, 2015). Cantisani *et al.* (2014) ve své studii analyzovali klíčové aminokyselinové složení v myximidinu, AMP izolovaného z ryb. Na základě analýz identifikovali a modifikovali kritické AK za účelem zisku nových peptidů se zvýšenou mikrobiální aktivitou. WMR-NH₂ (13 AK) je příklad analogu myximidinu, který v porovnání s původním peptidem vykazuje větší aktivitu proti různým mikroorganismům.

Jinou alternativou pro získání AMP je navržení a syntéza nových antimikrobiálních peptidů, u kterých se jejich sekvence AK neshoduje se žádnou získanou z přirozených zdrojů. Syntetické kationtové amfipatické AMP, jako jsou příkladem tzv. V-peptidy, byly navrženy pro tvorbu silnější vazby k lipopolysacharidu a lipidu A (složky přítomné v membránách u gram⁻ bakterií). Tyto látky mají silnou aktivitu právě proti gram⁻ bakteriím. V testech byly V-peptidy 208krát účinnější než polymyxin B, který byl použit jako kontrola (Freceer *et al.*, 2004). Deslouches *et al.* (2005) navrhli peptidy s motivem obsahujícím kombinaci argininu a valinu ve struktuře α -helixu a studovali vliv délky řetězce a aminokyselinových substitucí na aktivitu testovaných látek. Autoři zjistili, že při použití AMP s více než 24 AK zbytky se aktivita sloučenin nezvýšila, zatímco substituce tryptofanem způsobila, že sloučeniny byly méně citlivé na přítomnost vysoké koncentrace soli. Z testovaných peptidů měl příkladem WLBU2 (24 AK, 3 substituce tryptofanem) nižší MIC pro *P. aeruginosa* a *S. aureus*, nezávisle na koncentraci soli nebo analyzovaném bakteriálním kmenu (Deslouches *et al.*, 2005).

2.3 Získání proteinů a syntéza peptidů

Proteiny a peptidy hrají klíčovou roli v biologickém, lékařském a farmaceutickém výzkumu. Tyto sloučeniny jsou heteropolymery složené z aminokyselinových reziduí spojených prostřednictvím peptidových vazeb. Tato vazba vzniká obvykle mezi -NH_2 skupinou na α -uhlíku jedné AK a -COOH skupinou na α -uhlíku jiné AK za současného vyloučení vody (Obr. 6). Přesná definice je poněkud neurčitá, avšak pokud jde o délku řetězce, považujeme za peptidy struktury s délkou řetězce od dvou do několika desítek reziduí. Jako určující faktor bývá udávána molekulová hmotnost, přičemž k peptidům jsou zařazovány látky, které jsou menší než 6000 Da (Dalton). Pokud je molekula větší, už se řadí mezi proteiny (Guzmán *et al.*, 2007).

Pro produkci proteinů a peptidů jsou dnes k dispozici různé technologie: extrakce z přirozených zdrojů (Hipkiss a Brownson, 2000), výroba s využitím rekombinantní DNA technologie (Gill *et al.*, 1996), využití transgenních zvířat (Wright *et al.*, 1991) a rostlin (Cunningham a Porter, 1997), produkce chemickou syntézou (du Vigneaud *et al.*, 1953; Merrifield, 1963; Noya *et al.*, 2003) a enzymovou technologií s využitím proteolytických enzymů (Feliu *et al.*, 1995).



Obr. 6 Schéma vzniku peptidové vazby (upraveno z https://www.wikiwand.com/en/Peptide_bond; 13. 2. 2020). Vazba vzniká obvykle mezi -NH_2 skupinou na α -uhlíku jedné AK a -COOH skupinou na α -uhlíku jiné AK za současného vyloučení vody.

První úspěšná příprava peptidu v roztoku byla realizována již v roce 1903 německým chemikem Emilem Fischerem, který řízeně hydrolyzoval diketopiperazin glycinu za vzniku prvního dipeptidu Gly-Gly. V této době prozatím nebyla k dispozici žádná vhodná strategie pro ochranu postranních skupin pro syntézu delších peptidů (Fischer a Otto, 1903). Zavedením chránící skupiny v podobě benzyloxykarbonylu Bergmannem a Zervasem (Bergmann a Zervas, 1932) a s pomocí dalších inovací začaly moderní dějiny klasické syntézy peptidů. Jedním z prvních velkých úspěchů byla syntéza nonapeptidu oxytocinu (du Vigneaud *et al.*, 1954), za kterou dostal americký biochemik V. du Vigneaud v roce 1955 Nobelovu cenu. Vzhledem k tomu, že syntéza peptidů a jednotlivé kroky reakcí byly v té době prováděny v roztoku (kondenzace, štěpení chránících skupin, izolace a čištění meziproductů), jednalo se o velmi složitý a časově náročný proces.

Výrazné zjednodušení přineslo až představení syntézy peptidu na pevné fázi, které navrhl Bruce Merrifield (Merrifield, 1963). Za tuto metodologii mu byla v roce 1984 udělena Nobelova cena. Syntéza peptidu na pevné fázi (Solid-phase peptide synthesis, SPPS) přinášela důležité výhody oproti stávající syntéze v roztoku. SPPS měla již ze začátku větší výtěžnost a lepší rozpustnost meziproductů s narůstajícím peptidovým řetězcem. Využití ukotvení první AK k polymernímu nosiči také zjednodušilo proces celé syntézy a umožnilo rychlou a efektivní přípravu rozličných sekvencí, což vedlo k současnému rozvoji možnosti studia vlastností peptidů (Coin *et al.*, 2007). Když Merrifield představil metodu SPPS, vědecká komunita reagovala poněkud skepticky (Andersson *et al.*, 2000). Syntéza v roztoku byla v té době dobře zavedená, avšak byla limitována izolací a purifikací jednotlivých meziproductů po každém syntetickém kroku. Oproti tomu je SPPS sice časově perspektivnější, avšak analýzu lze většinou provádět až po ukončení celého syntetického cyklu, pokud není zvolen rozbor odebraného a odštěpeného fragmentu (Andersson *et al.*, 2000). S postupem času byla tato metoda natolik zdokonalena, že dnes téměř zcela nahradila syntézu peptidů v roztoku (Coin *et al.*, 2007). V současné době může být dále také modifikována na základě využití různých nosičů, reakčních činidel nebo strategií pro chránící skupiny (Amblard *et al.*, 2006) a zároveň umožňuje začlenění nepřírodných AK do struktury peptidu (Chan *et al.*, 2000), inkorporaci D-aminokyselin (Kent, 2009), či modifikaci bočních skupin aminokyselin v řetězci (Palomo, 2014).

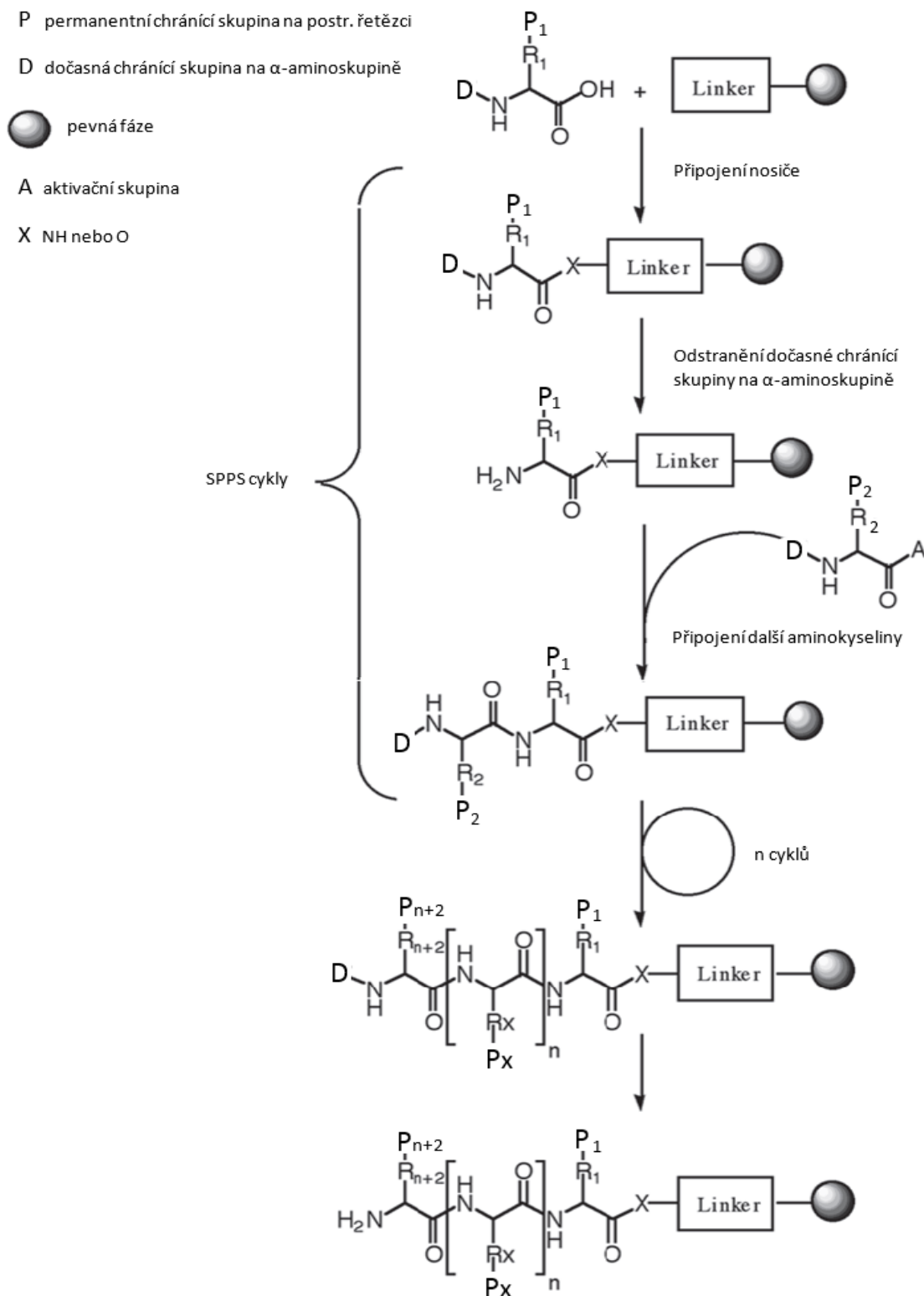
2.3.1 Princip syntézy peptidů na pevné fázi

Syntéza peptidu na pevné fázi spočívá v prodlužování peptidového řetězce ukotveného na nerozpustný polymerní nosič, a to postupným připojováním chráněných aminokyselin a jejich vazbou na poslední AK v narůstajícím řetězci až do dosažení požadované délky peptidu (Nilsson *et al.*, 2005). SPPS zahrnuje opakující se kroky, při kterých může být použito velkého objemu reagensů a činidel, které mohou být spolu s vedlejšími produkty odděleny od peptidu jednoduše promytím a filtrací. Tímto způsobem lze všechny kroky syntézy provádět v jedné nádobě bez přenosu materiálu. Obecné schéma SPPS je zobrazeno na Obr. 7.

Pevnou fázi (nosič, matrici) tvoří inertní pórovité polymerní částice s připojenými funkčními skupinami, tzv. linkerem. Nosič bývá nahrazován termínem „resin“ (Czarnik, 1998) či českým ekvivalentem „pryskyřice“. Jako vhodné pevné nerozpustné nosiče jsou při SPPS používány takové materiály, které dovolují přístup reagentů k připojenému narůstajícímu peptidu. Současně se nejvíce používají zesíťované polystyrenové matrice (PS), které vykazují vhodné vlastnosti a umožňují přístup rozpouštědel během jednotlivých kroků syntézy. Dále jsou využívány nosiče na bázi polyamidu (PA) či kombinace PS-polyethylenglykolu (PS-PEG), které jsou více hydrofilní a mohou být aplikovány při syntéze složitějších sekvencí či delších peptidů (Sherrington, 1998).

Nejpoužívanější matricí je v současné době resin typu Wang. Tento nosič má vhodné vlastnosti, má schopnost solvatace v řadě polárních rozpouštědel jako jsou *N,N*-dimethylformamid (DMF) či dichlormethan (DCM), a proto je právě často používán při SPPS (Santini *et al.*, 1998). Další používané resiny jsou např. modifikovaný Wang, 2-chlortrityl chlorid či RinkAmide (Amblard *et al.*, 2006).

Pro syntézu je možné využití třech strategií: připojení aminokyseliny za -COOH konec (nejčastější), připojení za -NH₂ konec nebo připojení pomocí vedlejšího řetězce (Cherkupally *et al.*, 2014). V případě strategie C→N (peptid se syntetizuje zprava doleva, sekvence je však psána a čtena zleva doprava) se po připojení první AK požadovaná peptidová sekvence sestavuje lineárně od C-konce k N-konci peptidu a to opakovanými cykly připojování chráněných AK, promytí, štěpení chránících skupin a opětovným promýváním (Amblard *et al.*, 2006).



Obr. 7 Schéma SPPS (upraveno z Amblard *et al.*, 2006). Během SPPS dochází nejprve k připojení první aminokyseliny na nosič přes amidovou či esterovou vazbu (X). Připojované aminokyseliny musí být v postranních řetězcích chráněné permanentní ochrannou skupinou (P) a zároveň dočasnou ochrannou skupinou (D). Po odstranění dočasné chránící skupiny dochází k vazbě další aminokyseliny, která nese aktivační skupinu (A). Následuje promytí a cykly se opakují (n-krát) až do dosažení požadované sekvence peptidu.

Při syntéze se používají AK s chránícími skupinami v postranních řetězcích. Z důvodu zamezení nežádoucích reakcí jsou používány jednak permanentní ochranné skupiny (P), které jsou navázány na skupiny vedlejších řetězců AK (-SH, -OH, -COOH, ...), a současně dočasná ochranná skupina (D), která chrání -NH₂ funkční skupinu na připojované AK. Dočasné skupiny jsou snadno odstraněny během kroku štěpení chránících skupin, kdežto permanentní skupiny jsou odstraněny na konci syntézy až při konečném odštěpení peptidu z nosiče (Amblard *et al.*, 2006).

V SPPS se používají dva způsoby ochrany α -NH₂ skupiny aminokyselin. Tato aminoskupina je buď chráněna Fmoc (9-fluorenylmethoxykarbonyl) skupinou nebo Boc (*t*-butyloxykarbonyl) skupinou. Rozdíly mezi těmito dvěma skupinami jsou např. v rozpustnosti AK či požadavcích na speciální vybavení při konečném odštěpení chránících skupin (Kates a Albericio, 2000). Pro ochranu postranních řetězců AK se obvykle používají permanentní chránící skupiny, které se snadno odštěpí po přidavku kyseliny trifluoroctové (TFA). Některé z nejčastěji používaných jsou př. Boc, *t*Bu (*t*-butyl), Trt (trityl), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl) nebo Pmc (3,4-dihydro-2,2,5,7,8-pentamethyl-2*H*-1-benzopyran-6-sulfonyl) (Amblard *et al.*, 2006).

Aby mohla vzniknout peptidová vazba mezi aminokyselinami, je nutné použít vhodná aktivační činidla. Nejčastěji se pro aktivaci karboxylové skupiny využívají karbodiimidy (př. *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC)) či uróniové deriváty (př. HBTU, TBTU). Dále to mohou být také organofosfátové reagenty, deriváty imidazolu, pyridinium a jiné (Han a Kim, 2004).

Po ukončení syntézy se řetězec peptidu odštěpuje z nosiče pomocí štěpného roztoku, jehož složení závisí na použitém resinu a AK. K tomuto účelu se používají různé koncentrované roztoky TFA. Při tomto finálním štěpení dochází k současnému odstranění chránících skupin z postranních řetězců. Do štěpného roztoku jsou proto přidávána aditiva (tzv. scavengery), která vychytávají uvolňované chránící skupiny, čímž je zamezeno jejich opětovnému (nevratnému) navázání na peptidový řetězec. Nejčastějšími scavengery jsou: anisol, fenol, triisopropylsilan, ethan-1,2-dithiol či 1,4-dithio-D-threitol (Bodanszky, 1984; Amblard *et al.*, 2006). Roztok obsahující připravený peptid je po štěpení izolován precipitací přidavkem etheru (Amblard *et al.*, 2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Biologický buněčný materiál

Pro měření byl v rámci mikrodiluční metody použit kmen *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) jako zástupce gram-pozitivních bakterií a kmen *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1961) jako zástupce gram-negativních bakterií. Při testování cytotoxicity na savčích buňkách byly použity buněčné linie myších 3T3 dermálních fibroblastů (ATCC). U stanovení hemolytické aktivity práce probíhala s plnou lidskou krví, která byla odebrána vyškoleným pracovníkem s informovaným souhlasem dárce těsně před samotnou analýzou.

3.1.2 Chemikálie, reagensie, složení roztoků

Syntéza peptidů na pevné fázi

- aminokyseliny - Iris Biotech, GL Biochem
 - Fmoc-6-Ahx-OH
 - Fmoc-D-Ala-OH
 - Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
 - Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH
 - Fmoc-L-Asp(*t*Bu)-OH
 - Fmoc-Gly-OH
 - Fmoc-L-His(Trt)-OH
 - Fmoc-L-Leu-OH
 - Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
 - Fmoc-D-Lys(Boc)-OH
 - Fmoc-L-Phe-OH
 - Fmoc-L-Trp(Boc)-OH
 - Fmoc-D-Trp(Boc)-OH
 - Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH
- anhydrid kyseliny octové - Lach-Ner
- činidla pro Kaiser test (Sigma-Aldrich, Iris Biotech, Lachema)
 - $0,04\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok fenolu v ethanolu
 - $0,3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok ninhydrinu v ethanolu

- $20\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok KCN v pyridinu
- diethylether (DEE) - Lach-Ner
- dichlormethan (DCM) - Lach-Ner
- *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC) - Iris Biotech
- *N,N*-dimethylaminopyridin (DMAP) - TCI
- *N,N*-dimethylformamid (DMF) - Lach-Ner
- *N,N*-dimethylformamid (peptide grade) (DMF) - Iris Biotech
- ethanol - Lach-Ner
- isopropylalkohol (IPA) - Contipro a.s.
- kyselina trifluoroctová (TFA) - Iris Biotech
- OxymaPure® (2-kyano-2-(hydroxyimino)acetát) - Iris Biotech
- piperidin - Iris Biotech
- pyridin - Lach-Ner
- resin typu Wang - Sun Resin
- scavengery
 - anisol - Merck
 - thioanisol - Merck
 - DODT - Sigma-Aldrich

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

- acetonitril (ACN) - VWR
- demiH₂O
- kyselina mravenčí - Lach-Ner
- methanol - VWR

Stanovení peptidové stability

- 35% kyselina chlorovodíková (HCl) (v/v) - Lach-Ner
- $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina octová v trypsin resuspendujícím pufru - Promega (USA)
- $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrogenuhličitan amonný (AmBic) - Sigma-Aldrich
- demiH₂O
- trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin) - Promega (USA)

Mikrodiluční test antimikrobiální aktivity AMP

- 0,02% kyselina octová (AcOH) (v/v) - Penta
- hovězí sérový albumin (BSA) - Sigma-Aldrich
- Mueller-Hintonův bujón (MHB) - Oxoid
- roztok rezazurinu (0,1 mg/ml; 0,4 mmol·l⁻¹)
 - fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline – PBS)
 - 0,2 g KCl - Lach-Ner
 - 0,2 g KH₂PO₄ - Lach-Ner
 - 1 L demiH₂O
 - 2,85 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O - Lach-Ner
 - 8,0 g NaCl - Fluka
 - resazurin - Sigma-Aldrich
- tryptický sójový agar (TSA) - Merck
- sterilní demiH₂O

Stanovení cytotoxicity AMP

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) roztok
 - 10 ml sterilního 1× PBS
 - 50 mg MTT - Abcam
- CASY ton roztok kat. č. 05651808001 - Roche
- kultivační médium pro myši 3T3 dermální fibroblasty
 - 435 ml základní médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM)
- Diagnostovum
 - 5 ml D-glukosa - Lach-Ner
 - 5 ml L-glutamin - Sigma
 - 5 ml penicilin/streptomycin - Diagnostovum
 - 50 ml hovězí fetální sérum (BOFES) - Diagnostovum
- solubilizační roztok
 - 100 g Triton X-100 - Acros
 - 450 ml dimethylsulfoxid (DMSO) - Sigma-Aldrich
 - 450 ml isopropylalkohol (IPA) - Penta s.r.o.
 - 8,2 ml 35% HCl (v/v) - Lach-Ner
- trypsin-EDTA 10× - Sigma

Stanovení hemolytické aktivity AMP

- 1% Triton X-100 (v/v) - Acros
- fosfátový pufr (PBS)
- fyziologický roztok
 - 2,25 g NaCl - Lach-Ner
 - 250 ml demiH₂O

Test anti-biofilmové aktivity AMP

- fosfátový pufr (PBS)
- fyziologický roztok
- Mueller-Hintonův bujón (MHB)
- prasečí plasma - jatka Letohrad
- sterilní demiH₂O
- tryptický sójový agar (TSA)

3.1.3 Přístroje

- Acquity ultra výkonná kapalinová chromatografie (UPLC) ve spojení se Synapt G2 Si qTOF (MS) - Waters (USA)
 - kolona ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm - Waters (USA)
- LC/MS – 2020 - SHIMADZU (Japonsko)
 - kolona X Bridge C18, 130 Å, 10 µm, 50 × 50 mm - Waters (USA)
- analytické váhy - KERN ALS 220 – 4N
- analytické váhy - Mettler Toledo
- CASY model TT - Roche
- centrifuga chlazená - Thermo Scientific IEC CL31R
- dávkovač kapalin opatřený filtrem 0,45 µm - Ceramus, Hirschmann-Laborgeräte
- elektromagnetické míchačka - IKA RCT basic
- Ensign™ Multimode Microplate Reader - PerkinElmer
- exsikátor 262 K - KAVALIERGLASS, a.s.
- inkubátor 37 °C, 7,5 % CO₂ - CO₂ incubator NB-203XL
- lyofilizátor ALPHA 2-4 LDplus - Christ
- pH metr pH 1100L - VWR pHenomenal

- polarimetr polAAr 3001 - Optical activity LTD
- spektrofotometr UV Line 9400 - SCHOTT
- světelný mikroskop - Nikon Eclipse Ts2
- třepačka - IKA KS 130 BASIC-sestava
- třepačka inkubovatelná - N-BIOTEK NB-205 Shaking Inkubator
- třepačka Thermomixer C - Eppendorf
- vakuová rotační odparka - Büchi Rotavapor® R-100
- vyhřívaný termoblok Thermo 120A - ÚOCHB AV ČR

Další pomůcky

- 96jamkové polystyrenové destičky - TPP®
- automatické pipety - Eppendorf
- fólie Nunc Sealing Tapes kat. č. 236707 - Thermo scientific
- laboratorní digestoř - MERCI M 1200
- lahve 200 ml - DURAN®
- laminární box - Holten Lamin Air
- skleněné reaktory o objemu 100 ml - Fortuna®
- sterilní mikrozkušavky 1,5 ml nebo 2 ml - Neptune, Schoeller Pharma.
- sterilní zkumavky 15 ml a 50 ml - BIOFIL, Schoeller Pharma
- zkumavky BD Vacutainer 4 ml Li-Hep na odběr krve - BD Vacutainer®

3.1.4 Programy a databáze

- dbAMP (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/dbAMP/>)
- GeneSnap
- Kaleido 2.0
- MassLynx V4.1
- Microsoft Excel
- Microsoft Powerpoint
- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2 Metody chemické syntézy a analýzy

3.2.1 Syntéza peptidů na pevné fázi

Sekvenční syntéza všech peptidů byla provedena na polystyrenovém nosiči typu Wang (loading $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$), kdy byly použity skleněné reaktory s kohoutem (Fortuna®) o objemu 100 ml, které byly vybaveny fritou o nejtěsnějším průměru reaktoru.

Do označeného reaktoru byl předložen nosič (3 g; 3,6 mmol). Do reaktoru byla k resinu přidána první aminokyselina (10,8 mmol), OxymaPure® (1,54 g; 10,8 mmol) a katalyzátor DMAP (135 mg, 1,1 mmol). Tato směs se nechala rozpustit v takovém množství bezvodého DMF (peptide grade), aby bylo dosaženo vhodné viskozity reakční směsi. K suspenzi bylo poté přidáno aktivační činidlo DIC (1,67 ml; 10,8 mmol), čímž došlo k aktivaci karboxylové skupiny připojované aminokyseliny a zahájení reakce. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc za neustálého míchání na třepačce a byla následně ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl poté promyt $3 \times 30 \text{ ml}$ DMF, $3 \times 30 \text{ ml}$ DCM a $3 \times 30 \text{ ml}$ DMF. Po ukotvení první aminokyseliny k nosiči byla takto připravená suspenze použita pro další kroky syntézy.

Pro zablokování nezreagovaných hydroxylových skupin na nosiči bylo přidáno 50 ml DMF a acetylační roztok – pyridin (580 μl ; 7,2 mmol) a acetanhydrid (680 μl ; 7,2 mmol). Reaktor byl ponechán 30 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl opět promyt kaskádou rozpouštědel $3 \times 30 \text{ ml}$ DMF, $3 \times 30 \text{ ml}$ DCM a $3 \times 30 \text{ ml}$ DMF.

Dalším krokem bylo odštěpení Fmoc-chránící skupiny, kdy byl do reaktoru přidán 20% (v/v) roztok piperidin/DMF. Reakce probíhala 5 min za laboratorní teploty a byla následně opakována s prodlouženou dobou štěpení 15 min. Štěpení bylo ukončeno odfiltrováním reakčního roztoku do graduované nádoby (250 ml) a peptidyl-resin byl opakovaně promýván DMF do dosažení požadovaného objemu vztaženého ke graduaci zvolené nádoby (250 ml). Zachycený roztok byl po 100násobném zředění spektrofotometricky analyzován při vlnové délce 300 nm, čímž byl stanoven uvolněný piperidin-dibenzofulvenový komplex vzniklý při odštěpení Fmoc-chránící skupiny. Z naměřené absorbance byla vypočtena substituce (S):

$$S = \frac{A \cdot V [\text{ml}]}{7800 \cdot m [\text{g}]} \cdot 100$$

S je ve vzorci stupeň substituce v mmol/g, **A** je absorbance stanovená proti standardu (DMF), **V** je celkový objem vzorku v ml a **m** je přesná vstupní hmotnost použitého nosiče v g.

Resin byl dále promyt 3×30 ml DCM a 3×30 ml DMF. Na promytý nosič byla předložena další aminokyselina (10,8 mmol) a činidlo OxymaPure® (1,54 g; 10,8 mmol). Navážky aminokyselin použitých při syntéze jednotlivých peptidů jsou shrnuty v Tab. 1. Ke směsi bylo opět přidáno co nejmenší množství bezvodého DMF, aby došlo k rozpuštění látek a aby byla dosažena požadovaná viskozita. Reakce byla zahájena přídatkem DIC (1,67 ml; 10,8 mmol). Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 – 24 h za intenzivního míchání na třepačce. Pro ověření průběhu reakce byl proveden Kaiser test (důkazová reakce primárních aminoskupin), kdy bylo odebráno malé množství nosiče, které bylo $3 \times$ promyto IPA. K nosiči bylo poté přidáno po 2 – 3 kapkách činidel: $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok fenolu v ethanolu, $0,3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok ninhydrinu v ethanolu a $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok KCN v pyridinu. Zkumavka se vzorkem byla umístěna do termobloku a inkubována při $100 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 min. Vizuálně byl následně vyhodnocen výsledek. V případě pozitivního testu (modré zbarvení resinu) byl proveden tzv. recoupling, kdy bylo ke směsi znovu přidáno stejné množství reagensů a kondenzační reakce dané aminokyseliny byla opakována. V případě negativního testu (nedošlo ke změně zbarvení resinu) byl nosič promyt 3×30 ml DMF, 3×30 ml DCM a 3×30 ml DMF a následovalo odštěpení Fmoc-chránící skupiny. Reakční cyklus se opakoval do doby, než byly navázány všechny aminokyseliny a byla dosažena požadovaná sekvence peptidu.

Tab. 1 Navážky chráněných aminokyselin použitých při syntéze AMP

Aminokyselina	Množství [g]
Fmoc-6-Ahx-OH	3,8
Fmoc-D-Ala	3,6
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	7,0
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	7,0
Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	4,4
Fmoc-Gly-OH	3,2
Fmoc-L-His(Trt)-OH	6,7
Fmoc-L-Leu-OH	3,8
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	5,1
Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	5,1
Fmoc-L-Phe-OH	4,2
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	5,7
Fmoc-D-Trp(Boc)-OH	5,7
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	5,0

Před závěrečným odštěpením peptidu z nosiče bylo provedeno koncové promytí 3×30 ml DMF, 3×30 ml DCM a 3×30 ml DEE. Nosič byl vysušen proudem vzduchu. Pro odštěpení byl použit vhodný štěpný roztok (zvoleno podle citace: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040654.pdf), který obsahoval roztok TFA v DCM s přidavkem aditiv – scavengerů (anisol, thioanisol a DODT). Štěpný roztok byl přidán k peptidyl-resinu a směs byla manuálně míchána každých 15 min. Štěpení probíhalo 2 h při laboratorní teplotě a poté byl roztok obsahující peptid vypuštěn do odpařovací baňky. Štěpící reakce byla $2 \times$ opakována s dobou štěpení 2 h a následně 1 h. Získaný roztok byl odpařen na vakuové rotační odparce do minimálního objemu. K destilačnímu zbytku byl přidán DEE a vyloučený peptid byl izolován filtrací pomocí frity (porozita S4). Zbytková rozpouštědla byla z produktu odstraněna v exsikátoru za sníženého tlaku. Purifikace peptidu a jeho čistota byly stanoveny pomocí HPLC/MS popsané v kapitole 3.2.2 na straně 32. Seznam připravených AMP a jejich charakterizace jsou v Tab. 2.

Tab. 2 Seznam a charakterizace připravených peptidů

Název peptidu	Sekvence*	Počet aminokyselin	Mol. hmotnost [Da]	pI**	Náboj
WK-12	H-KWWKWWKKWWKK-OH	12	1904,33	11,37	+6
WK-12D	H-kwwkwwkkwwkk-OH	12	1904,33	11,37	+6
WR-12	H-RWWRWRRWRR-OH	12	2072,42	12,85	+6
HD-12	H-RWWRHHDDWRR-OH	12	1892,08	11,63	+4
DAL	H-YaGFLR-OH	6	725,85	9,25	+1
DAL+WK-6	H-YaGFLR- ϵ Ahx - ϵ Ahx -KKWWKK-OH	14	1837,26	11,14	+5
DAL+WK-6D	H-YaGFLR- ϵ Ahx - ϵ Ahx -kkwwkk-OH	14	1837,26	11,14	+5
DAL+WR-6	H-YaGFLR- ϵ Ahx - ϵ Ahx -RRWRR-OH	14	1949,31	12,28	+5
DAL+WR-6D	H-YaGFLR- ϵ Ahx - ϵ Ahx -rrwrr-OH	14	1949,31	12,28	+5

*velká písmena označují L-aminokyseliny, malá písmena D-aminokyseliny (názvosloví UIPAC, <http://publications.iupac.org/pac/1984/pdf/5605x0595.pdf>)

YaGFLR je sekvence dalarginu (DAL), ϵ **Ahx**- ϵ **Ahx** je linker skládající se ze dvou 6-aminohexanových jednotek

**průměrné hodnoty pI získány z: <http://isoelectric.org/>

3.2.2 Purifikace peptidů

Surový peptid byl podle jeho výchozího množství rozpuštěn v daném rozpouštědle (Tab. 3) na požadovanou koncentraci (100 – 250 mg/ml). Pro odstranění větších nečistot byl peptid přefiltrován přes PVDF filtr (0,45 µm). Vzorek byl následně purifikován pomocí HPLC na koloně XBridge C18 (průtok mobilní fáze byl 30 ml/min) s detekcí na hmotnostním spektrometru (MS) (LC/MS – 2020 - SHIMADZU). Jako mobilní fáze byly použity 0,1% (v/v) kyselina mravenčí (mobilní fáze A) a 100% acetonitril (mobilní fáze B). U všech peptidů byla použita stejná kolona i mobilní fáze. V Tab. 3 jsou uvedena rozpouštědla a gradienty, které byly pro purifikaci použity. Po purifikaci byl vzorek zakonzentrován na odparce, zamražen a poté 2 dny lyofilizován (-82 – -79 °C; < 0,0010 mbar). Čistota vzorku byla ověřena při koncentraci vzorku 1 mg/ml.

Tab. 3 Charakteristika purifikačních metod

Peptid	Rozpouštědlo	Gradient	
		Čas [min]	Acetonitril [%]
WK-12 WK-12D	demiH ₂ O	5,0	5
		5,5	15
		19,5	30
		20,0	75
		24,0	75
		25,0	5
		28,0	
WR-12	ACN/demiH ₂ O (1:3)	2,0	23
		2,5	23
		13,0	35
		14,0	75
		19,0	75
		20,0	23
		22,0	3
23,0			
HD-12	50% ACN	3,0	5
		3,5	15
		9,5	17
		10,0	75
		14,0	75
		15,0	5
17,0			

Tab. 3 Charakteristika purifikačních metod (pokračování)

Peptid	Rozpouštědlo	Gradient	
		Čas [min]	Acetonitril [%]
DAL+WK-6	demiH ₂ O	3,0	5
DAL+WK-6D		3,5	15
		9,5	20
		10,0	75
		14,0	75
		15,0	5
		17,0	
DAL+WR-6	50% ACN	3,0	5
DAL+WR-6D		3,5	15
		9,5	20
		10,0	75
		14,0	75
		15,0	5
		17,0	
DAL	50% ACN	3,0	5
		3,5	20
		9,5	30
		10,0	75
		14,0	75
		15,0	5
		17,0	

3.2.3 Proteolytická stabilita

Pro stanovení proteolytické stability byly peptidy WK-12, WK-12D, DAL+WK-6 a DAL+WK-6D podrobeny enzymatické degradaci pomocí trypsinu. Nejprve byl připraven roztok enzymu o koncentraci 1 µg/µl přidáním 20 µl 50 mmol·l⁻¹ kyseliny octové do vialky s 20 µg lyofilizovaného trypsinu (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, USA). Roztok byl inkubován 30 min při 37 °C. Peptidy byly rozpouštěny v 50mmol·l⁻¹ hydrogenuhličitanu amonném (AmBic) na koncentraci 1 mg/ml. Do mikrozkušavek bylo od každého peptidu ze zásobního roztoku odebráno 150 µl (v triplicátu). Poté byly přidány 3 µl roztoku trypsinu (hmotnostní poměr trypsinu k AMP byl 1 : 50). Vzorky byly inkubovány na třepačce Thermomixer C (Eppendorf, Německo) při 37 °C a 1000 rpm. Bezprostředně po přidání trypsinu a v určených časech (0, 1, 2, 3, 6 a 24 h) bylo odebíráno 10 µl roztoku peptidu s trypsinem do mikrozkušavky s 1 µl 13,7mmol·l⁻¹ HCl pro ukončení reakce štěpení. Odebrané vzorky byly následně zamrazeny. Pro LC/MS analýzu a následnou relativní kvantifikaci byly všechny vzorky

naředěny na koncentraci přibližně 10 µg/ml (5 µl vzorku a 495 µl dH₂O s vnitřním standardem). Jako vnitřní standard (IS) byl použit peptid známé sekvence o koncentraci 1 µg/ml. Analýza byla provedena pomocí LC-MS systému Acquity UPLC - Synapt-G2 Si qTOF (Water, USA). Separace vzorků probíhala na koloně Acquity UPLC Peptide BEH C18, 130 Å, 17 µm, 2,1 × 100 mm (Waters, USA) při gradientu uvedeném v Tab. 4.

Tab. 4 Charakteristika použité metody při analýze trypsinového štěpení

Čas [min]	Průtok [ml/min]	Gradient	
		Kyselina mravenčí [%]	Acetonitril [%]
0,00	0,500	99,5	0,5
0,40	0,500	99,5	0,5
2,00	0,500	95,0	5,0
12,80	0,500	50,0	50,0
14,00	0,500	5,0	95,0
15,60	0,500	5,0	95,0
16,00	0,500	95,0	5,0
20,00	0,500	95,0	5,0

Jako mobilní fáze byly použity 0,1% (v/v) kyselina mravenčí v H₂O (mobilní fáze A) a 100% acetonitril (mobilní fáze B). Pro záznam hmotnostního spektra byla použita MS^e metoda standardně používaná v místní laboratoři při identifikaci peptidů. Na závěr byly výsledky analýzy (průměr triplikátů, směrodatné odchyly (SD)) zpracovány a vyjádřeny v grafech v čase jako hodnoty podílu plochy píku (a) a plochy píku vnitřního standardu (a(IS)).

3.2.4 Stanovení optické otáčivosti

Specifická optická otáčivost peptidů byla stanovena za využití polarimetrie. Peptidy WK-12, WK-12D, DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6 a DAL+WR-6D byly rozpuštěny v demiH₂O na koncentraci přibližně 0,7 g/dl. Do kyvety byl pro měření přidán 1 ml vzorku, délka kyvety činila 5 cm. Před každým měřením byl kyvetový prostor řádně vypláchnut demiH₂O a malým množstvím samotného vzorku. Teplota při měření dosahovala 20 °C. Specifická optická otáčivost $[\alpha]_D^{20}$ vztažená na koncentraci vzorku a délku kyvety byla bez přepočtu zaznamenána přímo z polarimetru.

3.3 Metody biologické analýzy

3.3.1 Mikrodiluční test antimikrobiální aktivity

Vzhledem k omezené rozpustnosti peptidů v médiích bohatých na proteiny bylo pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) jako primární rozpouštědlo zvoleno 0,4% BSA (w/v) v 0,02% (v/v) kyselině octové (<http://cmdr.ubc.ca/bobh/method/modified-mic-method-for-cationic-antimicrobial-peptides/>). Roztok BSA v kyselině octové byl připraven vždy čerstvý. Peptidy byly v tomto roztoku rozpuštěny na výchozí koncentraci 5 mg/ml. Jednotlivé koncentrace AMP byly následně připraveny dvojkovým ředěním v mikrozkušných s použitím 0,2% (w/v) BSA v 0,01% (v/v) kyselině octové. Připravené koncentrace peptidů vždy představovaly 10tinásobnou hodnotu konečné reálné koncentrace na panelu z důvodu ředění peptidů po přidavku bakteriální suspenze. Vzorky byly pipetovány v dubletu na 96jamkové panely v objemu 10 μ l peptidu na jamku. Následným přidavkem 90 μ l bakteriální suspenze byly peptidy zředěny na požadovanou ovlivňovací koncentraci.

Dále bylo připraveno bakteriální inokulum. Ze zásobních alikvotů bakterií byla bakterie potřena Petriho miska s TS agarem. Kmen se nechal růst 24 h při 37 °C. Po nárůstu bakterií se misky přemístily a uchovávaly v lednici max. 7 dní při 4 °C. Pro přípravu MHB média bylo rozpuštěno 4,2 g MH bujónu v 200 ml demiH₂O. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,3 \pm 0,1 při 25 °C a médium bylo vysterilizováno v autoklávu. Médium bylo uchováváno při pokojové teplotě max. 3 měsíce. Samotná příprava bakteriálního inokula pro mikrodiluční metodu zahrnovala přeočkování bakterie z agarové plotny pomocí inokulační kličky do 5 ml MHB média v 15 ml sterilních zkumavkách. Na tento objem média byla očkována 1 inokulační klička. Bakterie byly suspendovány v médiu do doby, kdy nebyly patrné žádné shluky. Zkumavka s bakteriemi byla inkubována na třepačce při 37 °C a 150 rpm 2 – 3 h. Bakteriální suspenze byla změřena na spektrofotometru při 600 nm. Pro další kroky bylo nutné suspenzi naředit přibližně na OD₆₀₀ = 0,1; tedy na hodnotu 0,5 McFarland (1 – 2 \times 10⁸ CFU/ml pro většinu bakterií). Po naředění MHB médiem a dosažení požadované hodnoty OD byly bakterie dále 2 \times ředěny a to prvně v poměru 1 : 150 a podruhé v poměru 1 : 2. Po každém ředění byla zkumavka se suspenzí řádně promíchána. Takto naředěné bakterie byly připraveny pro použití na 96jamkovém panelu k testování s již připravenými koncentracemi AMP. Bakterie se nanášely nejlépe do 15 minut od ředění. Jako kontrola sterility bylo použito čisté MHB médium, jako kontrola růstu bakterií bylo použito inokulum bez přítomnosti

AMP. Dále jako kontrola bylo s bakteriální suspenzí také použito samotné rozpouštědlo BSA v kyselině octové.

Panely byly přikryty víky, přeneseny do plastového sáčku s navlhčenou papírovou utěrkou (z důvodu zamezení odparu) a ponechány při 37 °C na 24 h ve vyhřívané třepačce při 150 rpm. Při analýze kinetiky růstu bakterií byl panel zalepen fólií pro zamezení odparu a destička byla přes noc měřena pomocí spektrofotometru (PerkinElmer) až do druhého dne (celkem 24 měření, 0 – 23 h). V tomto případě se měřila každou hodinu kontinuálně změna zákalu v čase.

Po 24 hodinách byly panely vyfoceny a vyhodnoceny. Nejnižší koncentrace AMP bez zákalu v jamkách byla stanovena jako hodnota MIC. Pomocí spektrofotometru byla dále změřena absorbance při 620 nm. Na závěr byla také stanovena viabilita bakterií pomocí 0,4 mmol·l⁻¹ roztoku resazurinu (ředění se vzorky 1 : 6,25; inkubace 20 – 90 min při pokojové teplotě při 120 rpm; detekce fluorescence s excitační vlnovou délkou 560 nm a emisní vlnovou délkou 600 nm).

3.3.2 Stanovení cytotoxicity

Myší 3T3 dermální fibroblasty byly kultivovány podle standardizovaného laboratorního protokolu. V první řadě bylo připraveno kultivační médium (složení uvedeno v kapitole 3.1.2 na straně 25). Buňky byly kultivovány v termostatu za standardních podmínek (5% CO₂, 37 °C, vysoká humidita).

Pasážování buněk proběhlo následujícím způsobem. Veškerá práce probíhala za sterilních podmínek. Kultivační nádoby (obsah 75 cm²) s buňkami byly přesunuty z inkubátoru do laminárního boxu. Každá lahev odpovídala jedné šarži buněk (celkem 3 šarže). Obsah z nádob byl odstraněn a dno nádob (s přilnutými buňkami) bylo opláchnuto 5 ml 1× PBS. Obsah byl opět odstraněn. K buňkám bylo přidáno 500 µl roztoku trypsinu (trypsin-EDTA 10×). Lahve s trypsinem se nechaly inkubovat 5 min při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci bylo z boku do lahví poklepáno, aby došlo k uvolnění buněk ode dna. Uvolnění buněk bylo ověřeno pozorováním na světelném mikroskopu. Pokud nedošlo k uvolnění buněk, nechaly se lahve ještě krátce inkubovat. K buňkám bylo následně přidáno 4,5 ml kultivačního média. Pomocí 10ml pipety bylo médium odsáváno a následně vypouštěno pro smytí buněk ze stěn nádoby. Dále byl všechn obsah přepipetován do sterilních 15 ml zkumavek. Ze zkumavek bylo odebráno 100 µl buněk do 100 ml CASY Ton roztoku a na přístroji CASY model TT bylo změřeno množství

buněk v každé šarži. Mezitím byly zkumavky centrifugovány 5 min při 1200 rpm při pokojové teplotě. Supernatant byl poté odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml + 4 ml kultivačního média. Podle výsledku měření byl vypočten objem roztoku buněk, který se následně pipetoval na 96jamkový panel při obsahu 3000 buněk/jamka. Dále byl vypočten objem kultivačního média, který se přidal k buňkám pro dosažení objemu 200 μ l/jamka. Do jamek bylo přidáno kultivační médium a poté byly nasazeny buňky pro dosažení požadovaného objemu. Panely byly inkubovány do druhého dne v inkubátoru (5% CO₂, 37 °C, vysoká humidita).

Během následujícího dne byly připraveny AMP na ovlivnění buněk. Peptidy byly rozpuštěny v 0,4% BSA (w/v) v 0,02% (v/v) kyselině octové na koncentraci 5 mg/ml. Takto připravené peptidy byly naředěny 10 \times sterilním kultivačním médiem na požadovanou nejvyšší koncentraci 500 μ g/ml. Připravené roztoky byly přefiltrovány přes 0,22 μ m filtr. Ze zásobního roztoku od každého peptidu byly připraveny další testovací koncentrace: 100 μ g/ml, 50 μ g/ml a 10 μ g/ml. Po přípravě koncentrací byly panely s buňkami vyjmuty z inkubátoru a kultivační médium bylo odsáto. K buňkám zachyceným na dně jamek bylo přidáno 200 μ l/jamka v tripletu od každé ovlivňovací koncentrace. Po napipetování všech destiček byly panely opět uschovány v inkubátoru při stejných podmínkách na 24 h, 48 h a 72 h.

Následující 3 dny byla stanovována viabilita buněk pomocí přídatku MTT. MTT test je využíván jako kolorimetrická metoda pro hodnocení metabolické aktivity buněk. Princip testu spočívá v redukci žlutého roztoku tetrazoliové soli MTT na nerozpustný fialově zbarvený formazan, který je ve formě krystalků. V metabolicky aktivních buňkách redukci zprostředkovávají mitochondriální dehydrogenasy. Formazan je následně rozpuštěn pomocí silného detergentu a stupeň zbarvení roztoku se poté hodnotí spektrofotometricky. Míra absorbance je přímo úměrná počtu metabolicky aktivních buněk (Mahto *et al.*, 2010; Stockert *et al.*, 2012).

Dopředu byl připraven roztok MTT a solubilizační roztok (složení roztoků je uvedeno v kapitole 3.1.2 na straně 25). V časech 24 h, 48 h a 72 h po ovlivnění bylo přidáno 20 μ l/jamka roztoku MTT. Destičky byly zabaleny do alobalu a uschovány v inkubátoru při 37° C na 2,5 h. Po ukončení inkubace byl obsah z destiček odstraněn, přičemž buňky zůstali přilnuty ke dnu jamek. Dále byl přidán solubilizační roztok o objemu 220 μ l. Panely byly opět zabaleny do alobalu a ponechány min. 1 h na stolní třepačce, aby došlo k uvolnění buněk a rozpuštění vzniklého formazanu. Po vytvoření homogenního barevného roztoku v jamkách byla změřena absorbance při 570 nm a 690 nm. Výsledná

absorbance se na závěr vypočetla jako rozdíl $A(570) - A(690)$. Ze získaných hodnot byly vypočteny průměry z paralelních vzorků a střední chyba průměru. Vliv testovaných AMP na viabilitu 3T3 buněk byl vyjádřen jako relativní viabilita k hodnotě neovlivněných kontrolních buněk změřených v čase T0 a relativní změna viability (A/I) ovlivněných buněk vzhledem k neovlivněné kontrole v daném čase. Pro výpočet byl použit následující vzorec. Na závěr byla data vynesena do grafů.

$$A/I = (A_{vzorek}/A_{CTRL} - 1) \times 100$$

3.3.3 Stanovení hemolytické aktivity

Pro analýzu hemolytické aktivity AMP byly peptidy rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a následně byly připraveny jednotlivé koncentrace těchto peptidů dalším ředěním za použití fyziologického roztoku do jamek v dubletu na 96jamkovém panelu. Připravené koncentrace činily dvojnásobné hodnoty z důvodu ředění peptidů po přidavku roztoku krevních buněk. Jako pozitivní kontrola byl použit 1% (v/v) Triton X-100, jako negativní kontrola bylo použito roztoku $1 \times$ PBS.

Krev byla odebrána od dárců do zkumavky BD Vacutainer 4 ml. Zkumavka byla několikrát jemně převrácena o 180° a zpět. Krev byla dále přenesena do 15ml zkumavky a $3 \times$ promyta přidavkem stejného objemu roztoku $1 \times$ PBS. Po každém promytí následovala centrifugace 10 min při 4000 rpm a odstranění supernatantu. Krevní buňky byly resuspendovány na 4% (v/v) roztok v PBS (př. 800 μ l buněk a 19,2 ml PBS). Takto připravené buňky byly pipetovány na 96jamkový panel k jednotlivým koncentracím AMP (100 μ l buněk a 100 μ l peptidu). Destička byla inkubována 1 h při 37°C . Po inkubaci byla destička centrifugována 20 min při 4100 rpm. Supernatant (100 μ l) byl odebrán do nového panelu. Na závěr byla změřena absorbance při 450 nm a z výsledků byla stanovena procentuální hemolýza podle vzorce:

$$\text{hemolýza (\%)} = \frac{A_{vzorek} - A_{blank}}{A_{triton} - A_{blank}} \times 100$$

3.3.4 Stanovení anti-biofilmové aktivity

Pro tvorbu biofilmu a stanovení anti-biofilmové aktivity AMP byla využita metoda kultivace bakterií na hrotech vycházející z technologie „Calgary Biofilm Device” (Ceri *et al.*, 1999). Reakční nádoba je zde složena ze dvou částí. Horní část tvoří víko s 96 hroty, kdežto spodní část tvoří mikrotitrační destička obsahující 96 jamek. Po přiložení víka jsou hroty umístěny v jamkách. K nárůstu biofilmu dochází na hrotech. Ovlivnění biofilmu je následně uskutečněno pomocí roztoků testovaných antimikrobiálních látek (Ceri *et al.*, 1999).

V rámci tohoto testování byl vytvořen 4denní protokol, který zahrnoval přípravu bakteriální suspenze, nasazení bakterií a nárůst biofilmu, ovlivnění biofilmu, kultivaci, následnou detekci a vyhodnocení.

Během prvního dne bylo připraveno bakteriální inokulum. Postup přípravy kmenu a bakteriálního inokula byl shodný s přípravou u mikrodilučního testu antimikrobiální aktivity. Připravená bakteriální suspenze byla změřena na spektrofotometru při 600 nm. Pokud byla naměřená hodnota vyšší než požadovaná hodnota, bylo nutné suspenzi naředit na $OD_{600} = 0,08 - 0,13$; tedy na hodnotu 0,5 McFarland ($1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml pro většinu bakterií). Následně bylo k 1 ml buněk přidáno 14 ml MHB média a 100 μ l čerstvě rozmražené prasečí plasmy, která byla sterilizovaná přes 0,22 μ m filtr. Po promíchání bylo na panel pomocí pipety přidáno 125 μ l tohoto roztoku na jamku. Několik jamek obsahovalo pouze kultivační médium jako kontrolu sterility. Destička byla následně překryta víkem s hroty a ponechána inkubovat za podmínek 110 rpm při 37 °C po dobu 24 h ve vlhké komůrce. Za tímto účelem byl využit pootevřený sáček obsahující navlhčenou papírovou utěrku.

Na druhý den byl připraven nový panel s koncentrační řadou AMP. Peptidy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku na výchozí koncentraci 5 mg/ml. Poté byl připraven zásobní roztok o nejvyšší koncentraci, která byla zároveň 2 \times vyšší než finální ovlivňovací koncentrace. Pomocí dvojkového ředění ve fyziologickém roztoku byly připraveny koncentrační řady. Vzorky byly připraveny v triplikátech a každá jamka obsahovala 100 μ l peptidu. Hodnota MIC získaná z mikrodilučního testu byla použita jako nejnižší koncentrace. Dále bylo pomocí multikanálové pipety k peptidu přidáno 100 μ l MHB média, takže finální objem každé jamky činil 200 μ l. Po inkubaci destičky s bakteriemi byly hroty porostlé biofilmem 2 \times promyty v PBS (200 μ l na jamku) po dobu 1 min. Víko bylo následně přeneseno do připravené ovlivňovací destičky. Panel byl kultivován bez třepání při 37 °C po dobu 24 h opět ve vlhké komůrce. Pro kontrolu nárůstu biofilmu

byla změřena spodní destička, ve které byly bakterie kultivovány pro nárůst biofilmu při OD_{600} pro určení zákalu.

Třetí den byly hroty $2\times$ promyty v PBS po dobu 1 min. Víko bylo přeneseno na destičku obsahující pouze čisté MHB médium. Panel byl ponechán při 110 rpm při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h ve vlhké komůrce. Spodní ovlivňovací destička s různými koncentracemi AMP byla pro kontrolu růstu planktonních bakterií změřena.

Čtvrtý den byl v jamkách měřen zákal při OD_{600} . Pokud bylo MHB médium čisté (a nedošlo v jamkách k zákalu z důvodu přítomnosti bakterií), byla odpovídající nejnižší koncentrace AMP z ovlivňovacího panelu vyhodnocena jako hodnota MBEC (minimum biofilm eradication concentration).

4 VÝSLEDKY

4.1 Syntéza a purifikace antimikrobiálních peptidů

Peptidy byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. (strana 28). Purifikace proběhla pomocí systému HPLC/MS. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. 5, HPLC čistota peptidu je zde vyjádřena jako % ploch píku. Výsledné chromatogramy získané při analytickém ověření čistoty jsou zobrazeny v příloze 1 – 4. Čistota AMP byla ověřena na stejném systému jako proběhla samotná purifikace. Protože byly nasyntetizované peptidy připraveny v požadované kvalitě a kvantitě, byly použity pro následné testování.

Tab. 5 Výsledky HPLC/MS analýzy při purifikaci peptidů

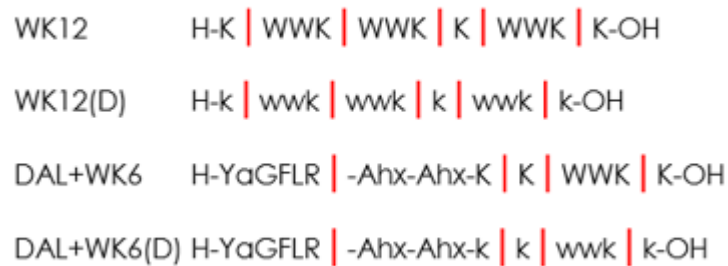
Peptid	Čas frakcí [min]	Molekulová hmotnost (M_w)		Čistota [% ploch]
		Vypočteno	Nalezeno*	
WK-12	9,62-12,25	1904,31	381,80 (M+5H) ⁵⁺	> 99%
WK-12D	9,79-13,15	1904,31	381,80 (M+5H) ⁵⁺	> 99%
WR-12	7,50-12,00	2072,39	519,05 (M+4H) ⁴⁺	> 99%
HD-12	6,13-6,79	1892,05	379,25 (M+5H) ⁵⁺	> 99%
DAL	6,30-6,89	725,83	363,85 (M+2H) ²⁺	> 99%
DAL+WK-6	6,90-9,73	1837,26	460,20 (M+4H) ⁴⁺	> 99%
DAL+WK-6D	6,90-9,73	1837,26	460,20 (M+4H) ⁴⁺	> 99%
DAL+WR-6	6,99-8,98	1949,31	488,35 (M+4H) ⁴⁺	> 99%
DAL+WR-6D	7,13-8,54	1949,31	488,35 (M+4H) ⁴⁺	> 99%

*Nalezené hodnoty M_w odpovídají n-násobně nabitým fragmentům ($n = 2, 4$ nebo 5).

4.2 Stanovení proteolytické stability

Proteolytická stabilita byla stanovena za účelem porovnání odolnosti optických izomerů jednotlivých peptidů vůči specifické protease trypsinu. Soubor odebraných vzorků – triplikátů byl analyzován pomocí systému LC/MS. Jednotlivé fragmenty peptidů byly identifikovány na základě fragmentačních spekter. Výsledné chromatogramy získané při analýze jsou k dispozici v příloze 5 a 6.

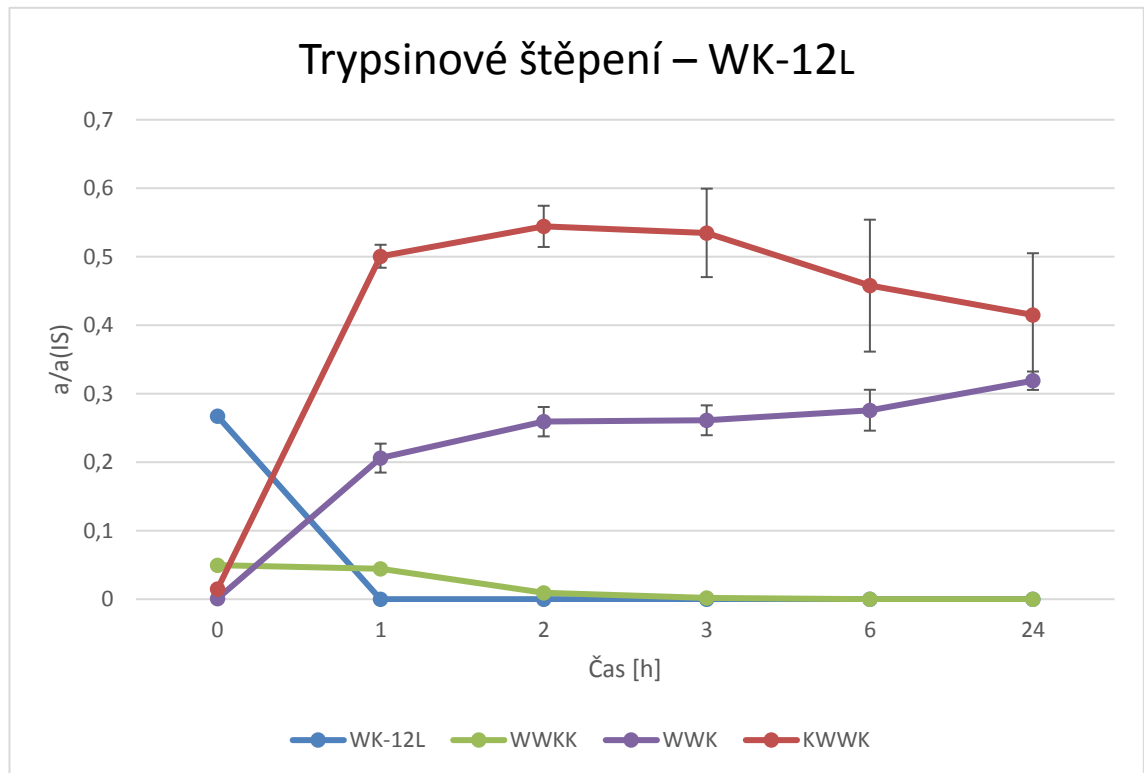
Trypsin jako obecně nejvíce používaná proteasa štěpí na karboxylové terminální straně lysin (Lys; K) a arginin (Arg; R), pokud nenásleduje prolin (Pro; P) (Olsen *et al.*, 2004). Podle teorie by WK-12 a WK-12D měly obsahovat 5 štěpných míst (Obr. 8) a poskytovat



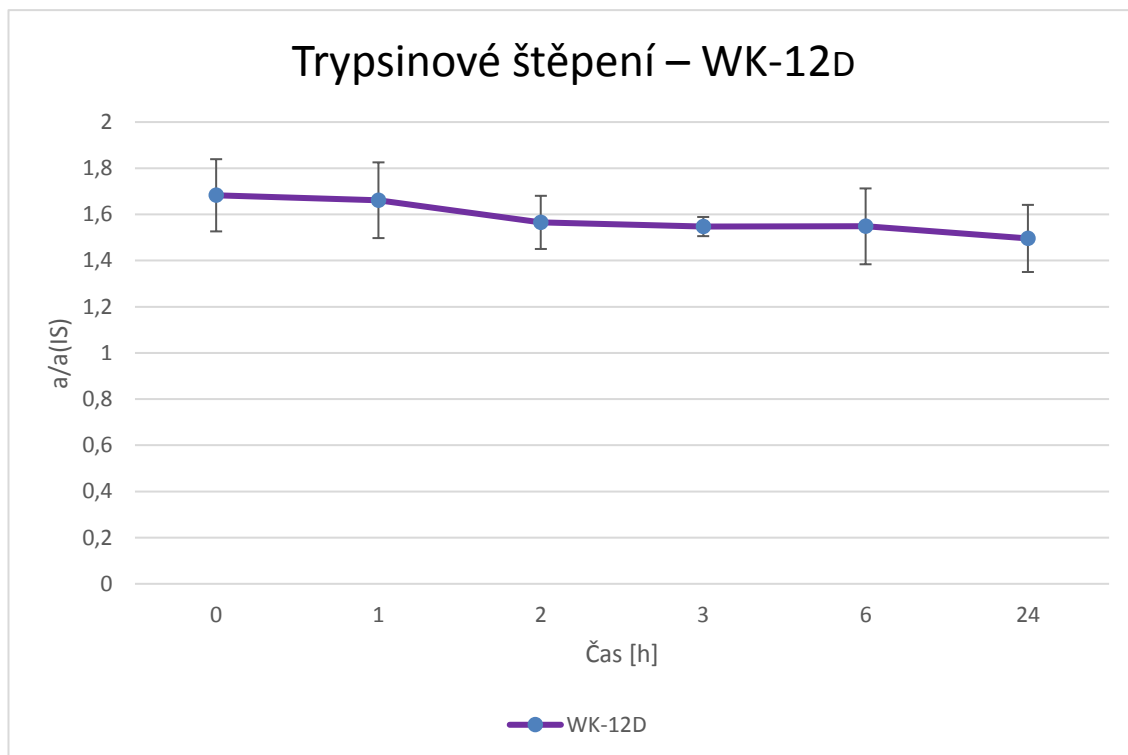
Obr. 8 Teoretická místa štěpení trypsinem. Enzym štěpí za lysinem a argininem. Červené značky znázorňují místo štěpení peptidové vazby.

tedy při kompletním štěpení 6 fragmentů. DAL+WK-6 a DAL+WK-6D by měly mít 4 štěpná místa, díky kterým vznikne 5 fragmentů (Obr. 8).

Analýza WK-12 ukázala, že tento peptid poskytuje po digesci trypsinem fragmenty, které odpovídají teoretickému štěpení. WK-12 je v čase štěpen na kratší fragmenty, které jsou následně činností enzymu také dále štěpeny (Obr. 9). U WK-12D ke štěpení nedochází (Obr. 10). U tohoto AMP byly následně odebrány také vzorky v čase po 48, 72 a 96 h. Identifikován byl však pouze opět celý peptid. V těchto časech však již může



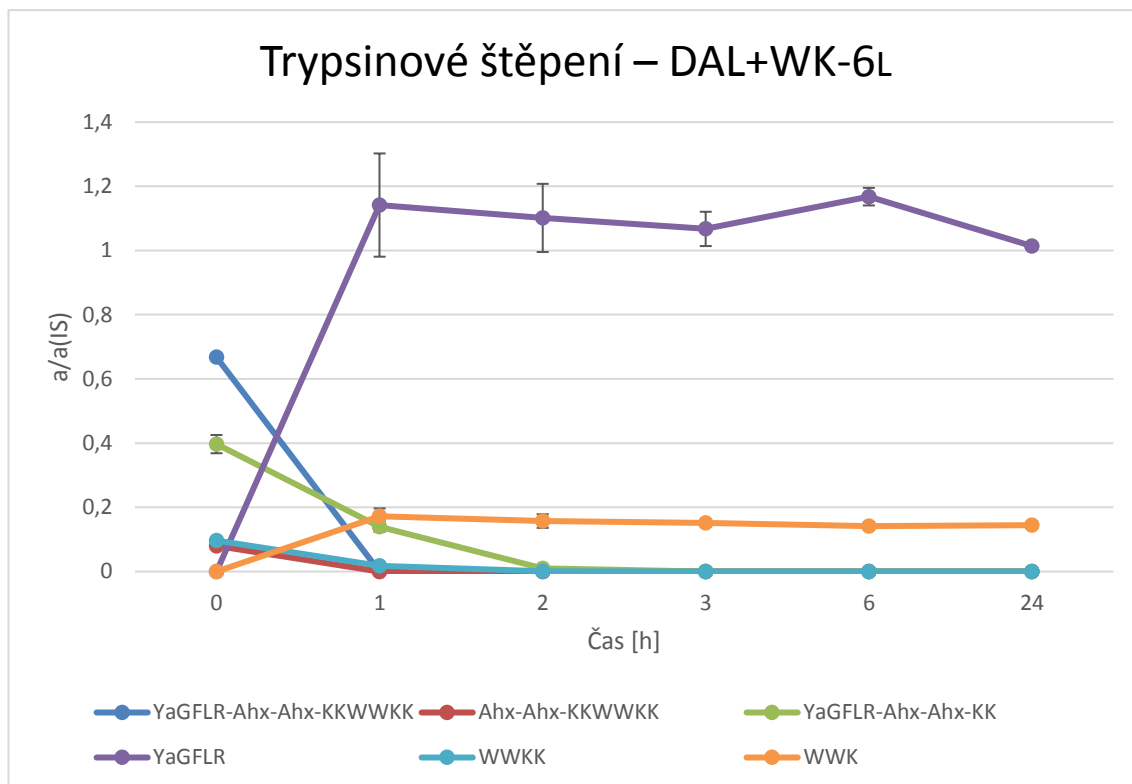
Obr. 9 Výsledky trypsinového štěpení WK-12L. U tohoto antimikrobiálního peptidu dochází v čase ke štěpení původního peptidu na kratší fragmenty (WWKK, WWK, KWWK). Hodnoty vyjádřeny jako podíl plochy píku (a) a plochy píku vnitřního standardu (a(IS)). Body označují průměrnou hodnotu \pm SD tří měření.



Obr. 10 Výsledky trypsinového štěpení WK-12D. U tohoto antimikrobiálního peptidu nedochází v čase ke štěpení původního peptidu, žádné fragmenty nevznikají. Hodnoty vyjádřeny jako podíl plochy píku (a) a plochy píku vnitřního standardu (a(IS)). Body označují průměrnou hodnotu \pm SD tří měření.

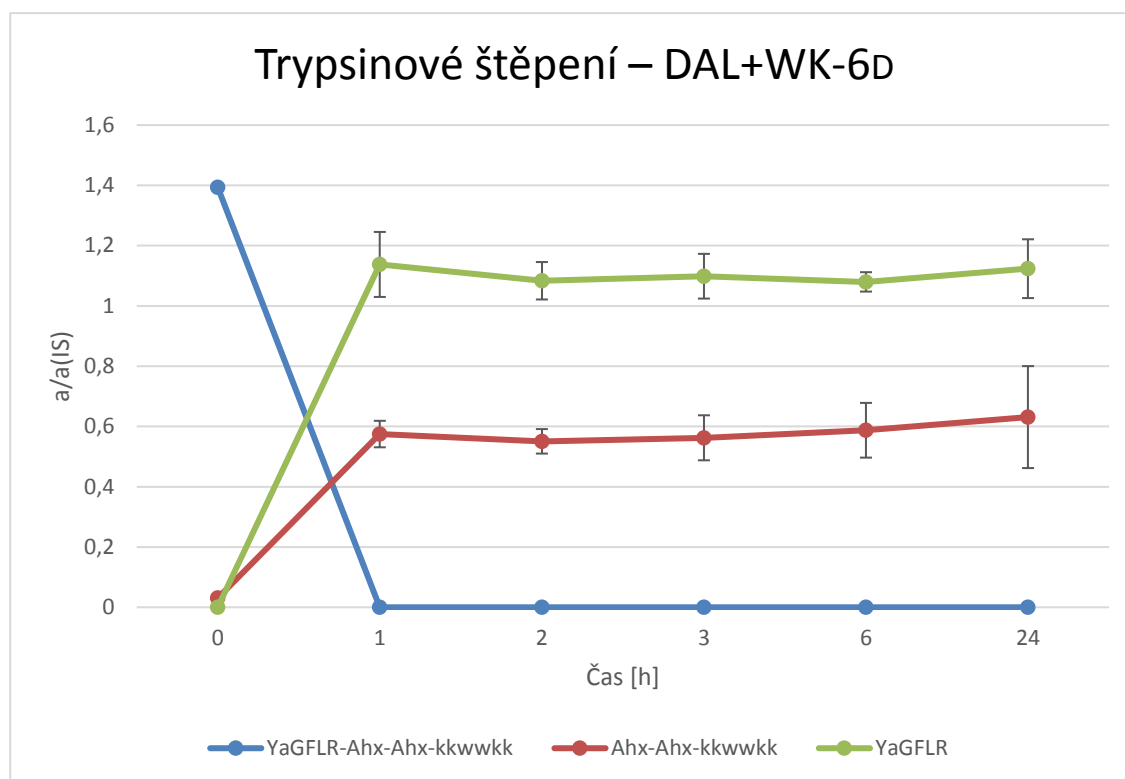
mít vliv na výsledky snižující se aktivita trypsinu a dále vznik nespecifických produktů štěpení možnou chymotrypsinovou aktivitou enzymu.

U analýzy peptidů DAL+WK-6 a DAL+WK-6D byly zaznamenány podobné výsledky. DAL+WK-6 poskytoval fragmenty štěpení, které odpovídaly specifické aktivitě enzymu. Na Obr. 11 lze vidět, že v čase docházelo k nárůstu obsahu kratších fragmentů a zároveň k úbytku fragmentů delších. Oproti tomu byl DAL+WK-6D štěpen pouze na dva fragmenty: Ahx-Ahx-kkwwkk a YaGFLR (peptid dalargin), který naznačuje štěpné místo za argininem (Obr. 12). U DAL+WK-6D byly také odebrány vzorky po 2, 3 a 4 dnech. Výsledek byl stejný jako v případě WK-12D, ani zde nebyly identifikovány žádné kratší fragmenty.



Obr. 11 Výsledky trypsinového štěpení DAL+WK-6L. Tento peptid se v čase štěpí, z původního peptidu (YaGFLR-Ahx-Ahx-KKWWKK) vznikají kratší fragmenty (Ahx-Ahx-KKWWKK, YaGFLR-Ahx-Ahx-KK, YaGFLR, WWKK a WWK). Hodnoty vyjádřeny jako podíl plochy píku (a) a plochy píku vnitřního standardu (a(IS)). Body označují průměrnou hodnotu \pm SD tří měření.

Z výsledků je patrné, že ke štěpení peptidů dochází pouze v případě, kdy peptidová sekvence obsahuje výhradně L-aminokyseliny (Obr. 9, 11 a 12). V obou případech sekvencí složených pouze z D-aminokyselin ke štěpení nedocházelo ani po delším časovém úseku (Obr. 10). Na základě těchto výsledků lze říct, že peptidy složené z D-aminokyselin jsou odolnější vůči tryptickému štěpení, což by mohlo být významným přínosem právě při použití AMP *in vivo*. Z těchto získaných dat však nelze obecně tvrdit, že tyto peptidy složené z D-aminokyselin jsou celkově proteolyticky odolnější. Tato hypotéza by musela být ověřena dalšími experimenty s využitím jiných typů proteolytických enzymů (např. proteasami produkovanými bakteriemi) či jejich směsí.



Obr. 12 Výsledky trypsinového štěpení DAL+WK-6D. Tento peptid se v čase štěpí pouze v místě, kde jsou v sekvenci obsaženy L-aminokyseliny. Z původního peptidu (YaGFLR-Ahx-Ahx-kkwwkk) vznikají 2 kratší fragmenty (Ahx-Ahx-kkwwkk a YaGFLR). Hodnoty vyjádřeny jako podíl plochy píku (a) a plochy píku vnitřního standardu (a(IS)). Body označují průměrnou hodnotu \pm SD tří měření.

4.3 Vyhodnocení optické otáčivosti

Optická otáčivost AMP rozpuštěných v demiH₂O byla analyzována na polarimetru polAAR 3001 (Optical activity LTD). Výsledky specifické optické otáčivosti $[\alpha]_D^{20}$ jsou uvedeny v Tab. 6. Z naměřených hodnot vyplývá, že peptidy lišící se pouze obsahem L- a D-aminokyselin nejsou zrcadlovými obrazy.

Tab. 6 Výsledky hodnot specifické optické otáčivosti

Peptid	Hodnota $[\alpha]_D^{20}$
WK-12	-5,8
WK-12D	+26,4
DAL+WK-6	-9
DAL+WK-6D	+27,4
DAL+WR-6	-1,8
DAL+WR-6D	+31,3

4.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byl v této práci použit mikrodiluční test antimikrobiální aktivity. Byly využity dva bakteriální kmeny: *Staphylococcus aureus* (CCM 4223) jako zástupce gram-pozitivních bakterií a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1961) jako zástupce gram-negativních bakterií.

Účinek peptidů byl definován na základě 3 stanovení. Po inkubaci (24 h) byl panel vyfocen a vizuálně vyhodnocen (příklady fotografií destiček jsou k dispozici v příloze P7 a P8). Hodnoty turbidimetrie byly stanoveny pomocí spektrofotometru. Data byla zpracována a vynesena do grafů (příloha P9 a P10). Při každém měření byly panely dále hodnoceny pomocí barviva resazurinu, které se díky metabolickým procesům v živých buňkách mění na fluorescenční resorufin (příklady fotografií destiček po barvení jsou uvedeny v příloze P11). Pro ověření viability bakteriálních buněk byla na spektrofotometru změřena fluorescence a naměřené hodnoty byly také následně vyneseny do grafů (příloha P12 a P13). Výsledky těchto 3 různých stanovení (z fotografie, z měření absorbance, z měření fluorescence) korelovaly. Pomocí resazurinu se potvrdilo, že vzniklý zákal netvoří odumřelé buňky či vysrážený peptid.

Závěrečné hodnoty MIC jsou uvedeny v Tab. 7. Tyto hodnoty byly získány z 5 opakování, kdy při každém testu byly vzorky analyzovány v dubletu.

Tab. 7 Stanovení hodnot MIC u syntetických antimikrobiálních peptidů

	MIC [$\mu\text{g/ml}$]*	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
WK-12	6,3	6,3
WK-12D	6,3	6,3
WR-12	25	12,5
HD-12	> 50	> 50
DAL	> 500	> 500
DAL+WK-6	> 500	> 500
DAL+WK-6D	> 500	> 500
DAL+WR-6	500	125
DAL+WR-6D	500	125

* MIC vyjadřuje takovou koncentraci antimikrobiálního peptidu, která ve všech opakováních experimentu zcela inhibovala růst bakterií.

Většina AMP (kromě WR-12, DAL+WR-6 a DAL+WR-6D) vykazovala stejnou hodnotu MIC u obou testovaných bakteriálních kmenů. Pro peptidy lišící se obsahem L- a D-aminokyselin, konkrétně u WK-12 a WK-12D, byla stanovena hodnota MIC 6,3 µg/ml. U DAL+WK-6 a DAL+WK-6D docházelo však shodně u všech testovaných koncentrací k viditelnému bakteriálnímu růstu (P8 a P10). Tyto L- a D-AMP se po digesci trypsinem lišily v získaných výsledcích (Obr. 9 – 12), avšak při tomto testování nikoliv.

Antimikrobiální aktivita WR-12, DAL+WR-6 a DAL+WR-6D byla rozdílná při testování na gram⁺ a gram⁻ bakterie (Tab. 7). Účinku peptidů více odolávaly gram⁻ bakterie. V tomto případě zřejmě může souviset aminokyselinové složení peptidu (přítomnost argininu) se stavbou buněčné stěny bakterií, tedy odlišností gram⁺ od gram⁻ bakterií.

U peptidů HD-12 a DAL nebyla konkrétní hodnota MIC stanovena. Při všech opakování u všech testovaných koncentrací docházelo vždy k bakteriálnímu růstu.

Testováno bylo také samotné rozpouštědlo BSA v kyselině octové. Z výsledků vyplývá, že při testovací koncentraci toto rozpouštědlo neovlivňovalo růst bakteriálních buněk a nevykazovalo žádné antimikrobiální vlastnosti (příloha P7 – P10).

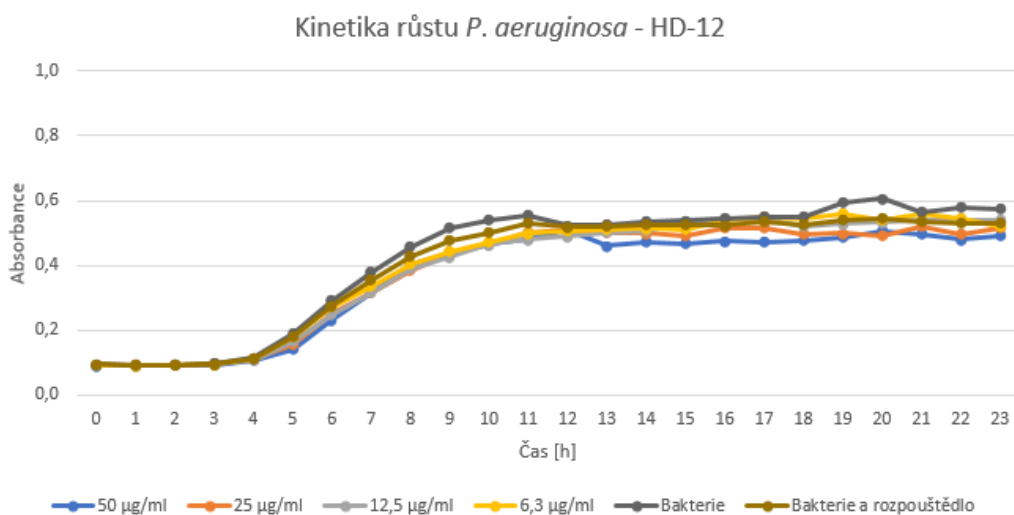
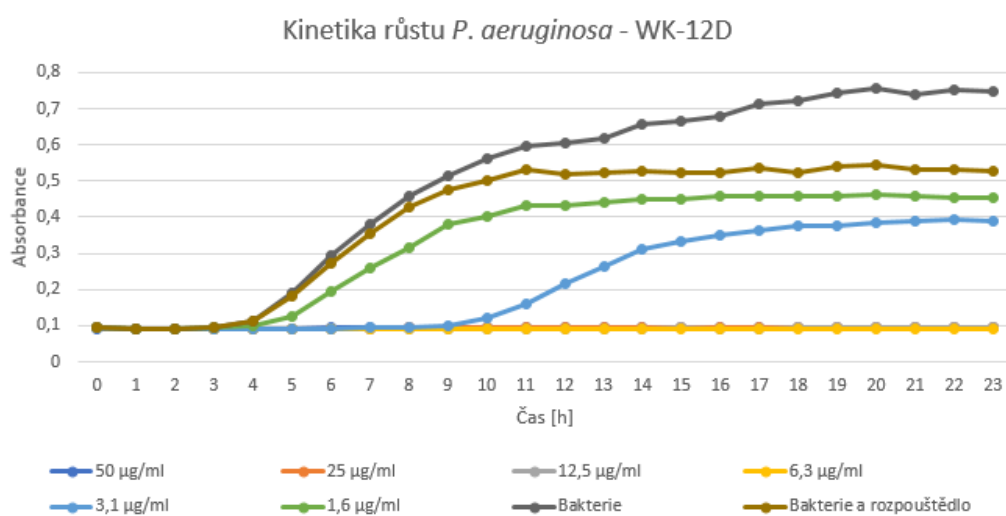
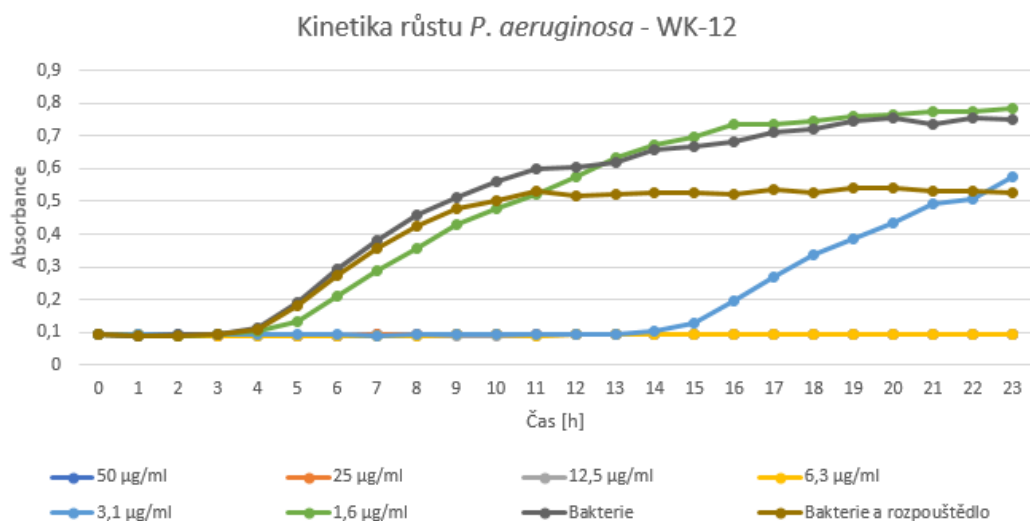
Další výsledky byly získány při měření kinetiky růstu bakterií. Reprezentativní grafy byly získány pouze z jednoho opakování (vzorky na jedné destičce v dubletu).

U obou bakteriálních kmenů byl mezi L- a D-AMP (3 ze 4) zaznamenán posun růstové křivky u koncentrace, jejíž hodnota byla polovinou MIC (Tab. 7); byla to tedy nejvyšší koncentrace, při které už docházelo k bakteriálnímu růstu a zákalu. U WK-12 v případě *P. aeruginosa* došlo k růstu křivky v čase mezi 14 a 15 h, kdežto u WK-12D byl nárůst zaznamenán už mezi 9 a 10 h (Obr. 13). U *S. aureus* byl naopak u WK-12 zaznamenán růst křivky v čase mezi 4 a 5 h, kdežto u WK-12D až mezi 5 a 6 h (Obr. 14). V porovnání s HD-12 nebyl u obou bakteriálních kmenů v čase u tohoto peptidu zaznamenán žádný vliv na růst bakterií (Obr. 13 a 14).

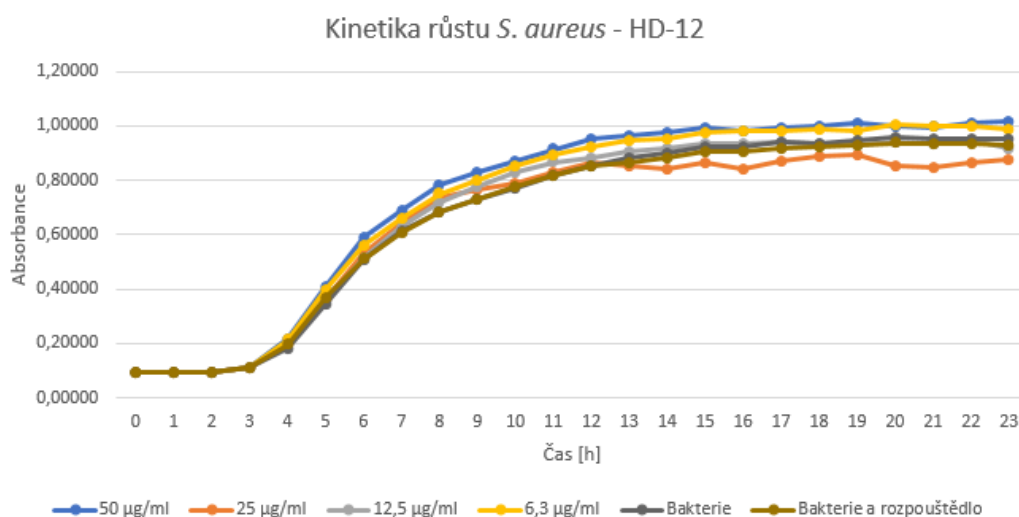
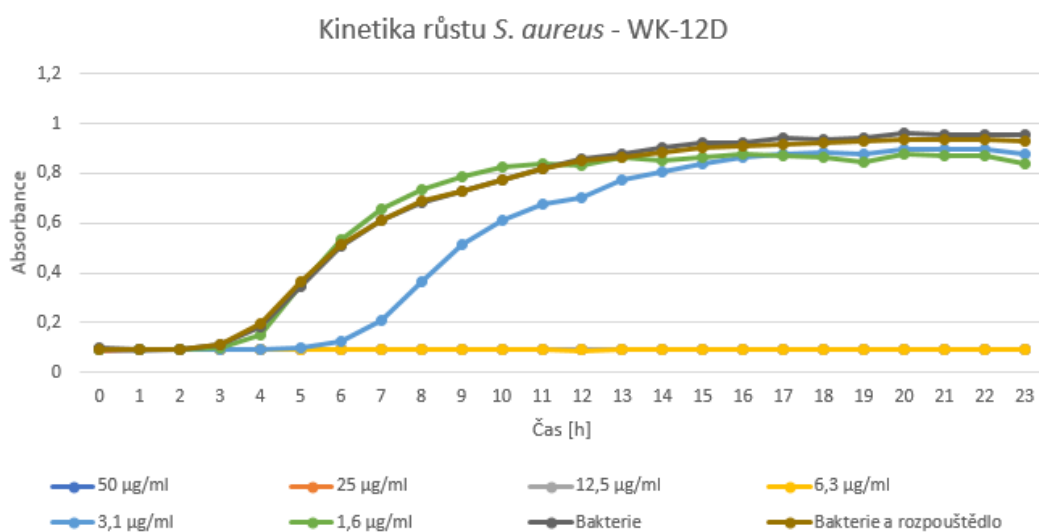
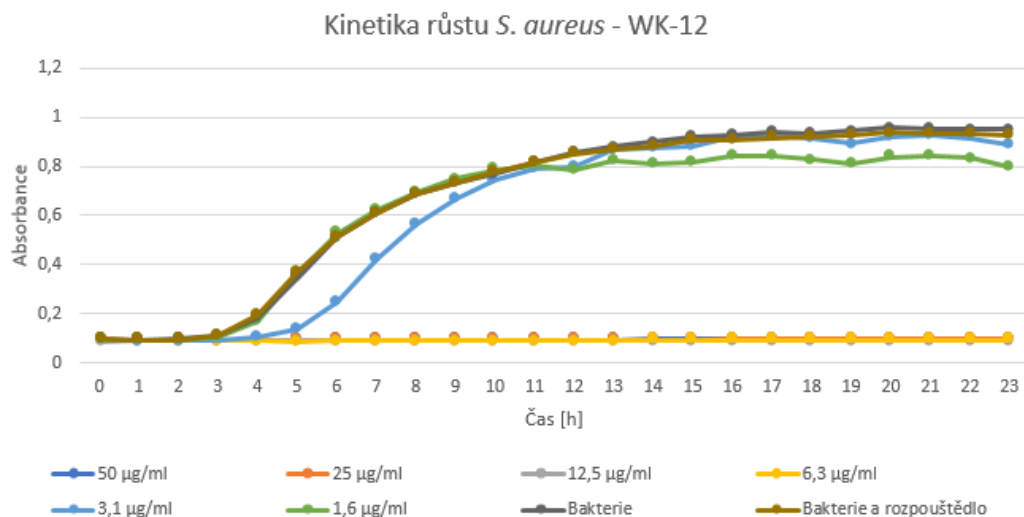
U konjugátů DAL došlo k podobné situaci. Při testování *P. aeruginosa* byl u DAL+WR-6 a DAL+WR-6D nárůst u D-AMP v tomto případě zaznamenán až po 4 h (Obr. 15). Během analýzy *S. aureus* byl zaznamenán růst křivky u D-AMP až v čase mezi 10 a 11 h, tedy o 4 h později než u L-AMP (Obr. 16). V rámci testování je ve výsledcích u DAL+WR-6 (Obr. 16) zaznamenán nárůst bakterií i při koncentraci 125 µg/ml, jejíž hodnota byla stanovena jako MIC. V tomto případě zřejmě mohlo dojít k chybě

v pipetování (kontaminaci) a zisku chybného výsledku. DAL byl při těchto měřeních porovnáván s konjugáty. U konjugátů DAL+WK-6 a DAL+WK-6D docházelo k podobnému trendu bakteriálního růstu jako v případě DAL. U těchto peptidů nebyl při použitých koncentracích zaznamenán žádný vliv na růst bakterií.

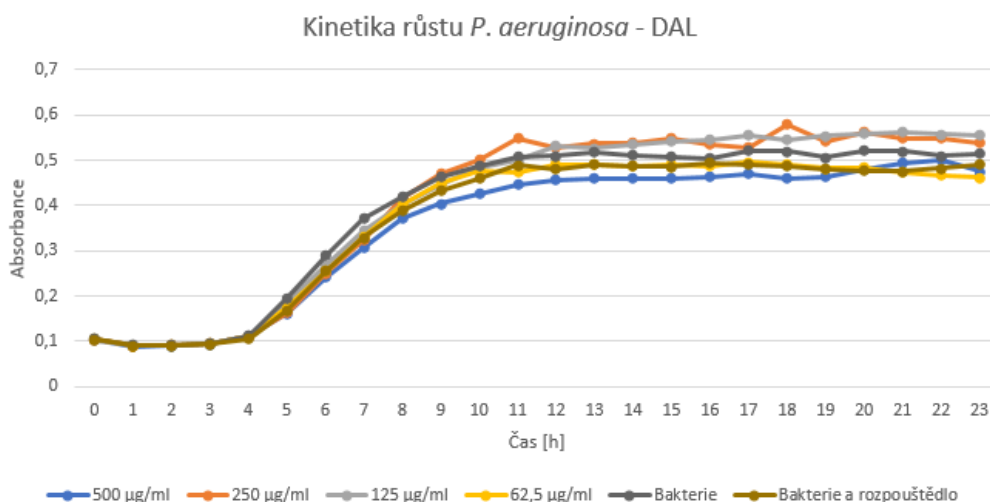
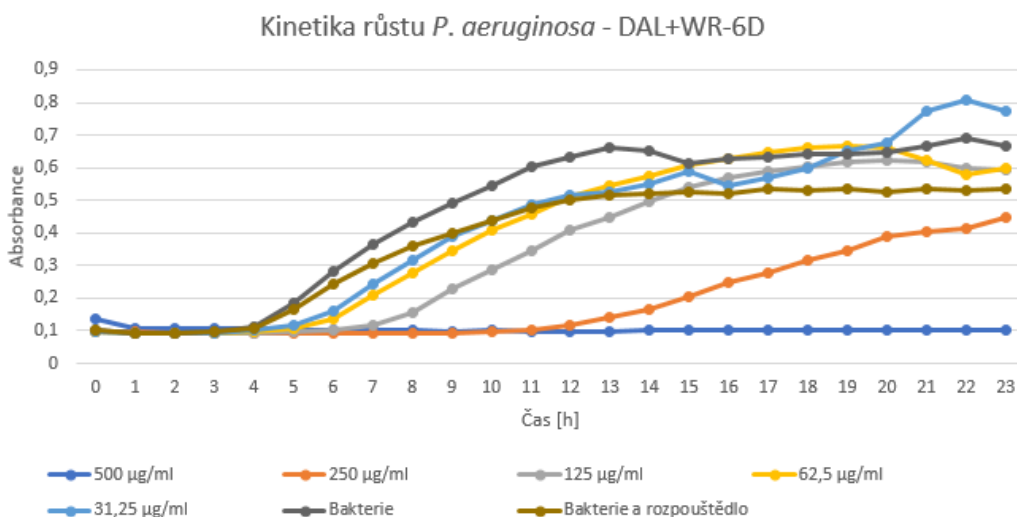
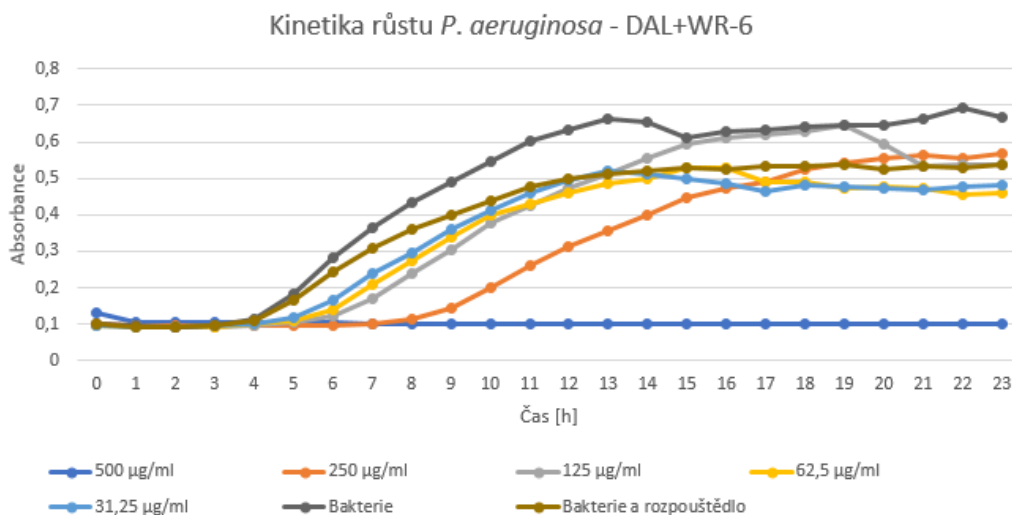
Tyto získané výsledky naznačují, že by D-AMP mohly být při některých koncentracích mírně účinnější, avšak pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba pro vyhodnocení dalších testů a opakování.



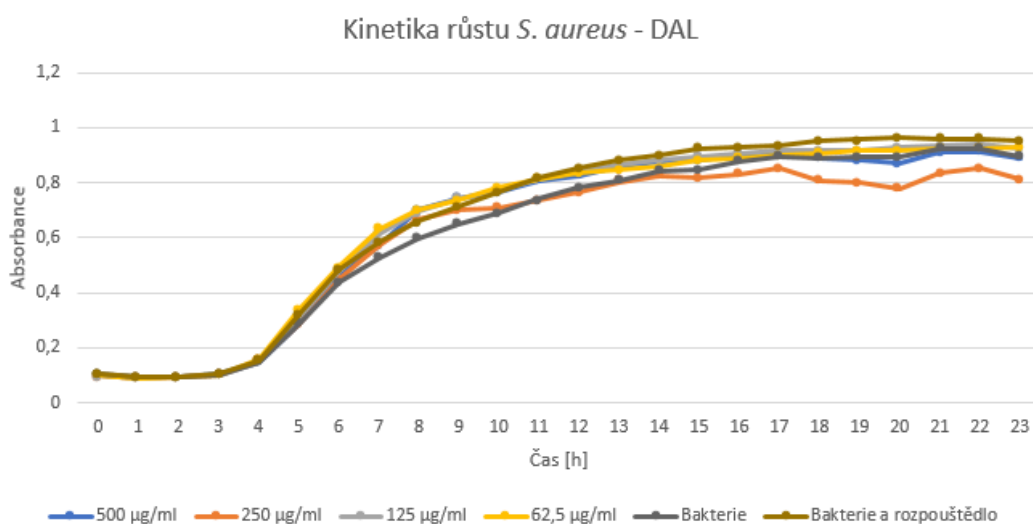
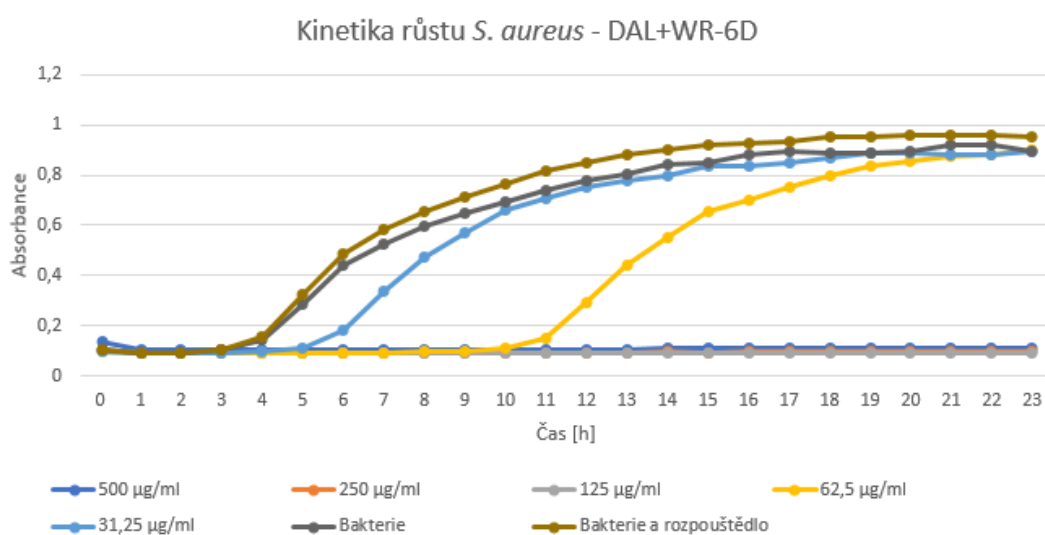
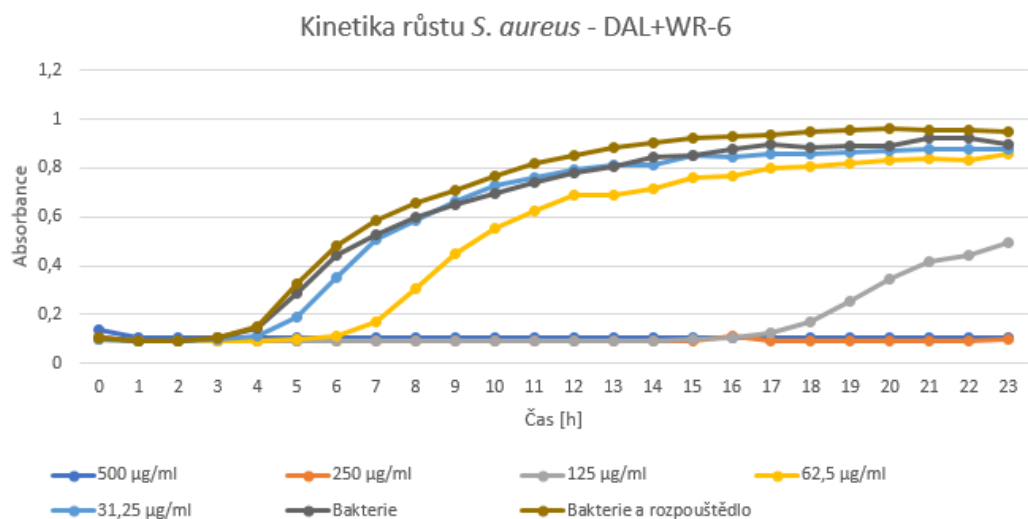
Obr. 13 Porovnání křivek růstu *P. aeruginosa* u WK-12, WK-12D a HD-12 při různých koncentracích peptidů. U WK-12 a WK-12D byla hodnota MIC stanovena jako 6,3 µg/ml. Při koncentraci 3,1 µg/ml již dochází k růstu bakterií, v případě WK-12D je jako u jediného peptidu křivka posunuta směrem doleva (9 h). HD-12 nemá vliv na bakteriální růst.



Obr. 14 Porovnání křivek růstu *S. aureus* u WK-12, WK-12D a HD-12 při různých koncentracích peptidů. U WK-12 a WK-12D byla hodnota minimální inhibiční koncentrace stanovena jako 6,3 µg/ml. Při koncentraci 3,1 µg/ml již dochází k růstu bakterií, avšak u WK-12D je křivka posunuta směrem doprava (5 h). HD-12 nemá vliv na bakteriální růst.



Obr. 15 Porovnání křivek růstu *P. aeruginosa* u DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL při různých koncentracích peptidů. U obou konjugátů byla hodnota minimální inhibiční koncentrace stanovena jako 500 µg/ml. Při koncentraci 250 µg/ml již dochází k bakteriálnímu růstu, avšak u DAL+WR-6D dochází k nárůstu bakterií v čase později (12 h). DAL nemá vliv na bakteriální růst.



Obr. 16 Porovnání křivek růstu *S. aureus* u DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL při různých koncentracích peptidů. U obou konjugátů byla hodnota minimální inhibiční koncentrace stanovena jako 125 µg/ml. Při koncentraci 62,5 µg/ml dochází u obou peptidů k bakteriálnímu růstu, avšak u DAL+WR-6D dochází k nárůstu bakterií v čase později (10 h). DAL nemá vliv na bakteriální růst.

4.5 Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxicity peptidů a vyhodnocení viability buněk byly použity buněčné linie myších 3T3 dermálních fibroblastů. Pomocí barviva MTT byla stanovena životaschopnost kontrolních buněk v čase T0 a dále buněk ovlivněných roztoky AMP po 24, 48 a 72 h inkubaci. Při každém měření byly pomocí mikroskopu pozorovány kontrolní buňky a tímto způsobem byla vizuálně hodnocena jejich viabilita a vývoj (příloha P14). Data srovnání životaschopnosti buněk (T0) s jednotlivými koncentracemi látek ve stanovených časech jsou k dispozici v grafech v příloze P15 a P16. Výsledné závěry stanovení jsou pro jednotlivé testované koncentrace peptidů uvedeny v Tab. 8 (grafické vyhodnocení výsledků aktivace/inhibice růstu 3T3 buněk po ošetření AMP včetně směrodatných odchylek (SD) je uvedeno v příloze P17 a P18).

Tab. 8 Výsledky stanovení cytotoxicity u syntetických antimikrobiálních peptidů. Cytotoxicita je uvedena jako změna viability buněk vůči neovlivněné kontrole (%) \pm SD.

Peptid	Koncentrace [μ g/ml]	Čas [h]*		
		24	48	72
WK-12	500	70 \pm 4	79 \pm 5	91 \pm 2
	100	73 \pm 3	82 \pm 5	92 \pm 2
	50	50 \pm 12	55 \pm 6	61 \pm 7
	10	-10 \pm 9	-13 \pm 23	2 \pm 17
WK-12D	500	63 \pm 4	69 \pm 9	86 \pm 3
	100	75 \pm 4	82 \pm 5	92 \pm 2
	50	71 \pm 4	81 \pm 4	92 \pm 2
	10	-12 \pm 8	-21 \pm 15	-15 \pm 23
WR-12	500	74 \pm 4	83 \pm 4	92 \pm 1
	100	23 \pm 6	21 \pm 15	25 \pm 11
	50	-1 \pm 7	-1 \pm 13	7 \pm 15
	10	3 \pm 12	0 \pm 10	14 \pm 15
HD-12	500	0 \pm 2	9 \pm 8	10 \pm 20
	100	0 \pm 6	9 \pm 9	11 \pm 16
	50	1 \pm 13	2 \pm 7	15 \pm 11
	10	14 \pm 7	16 \pm 13	23 \pm 10

*Význam: inhibice < 20 % - **ne**cytotoxický; inhibice 20 – 40 % - **slabě** cytotoxický; inhibice 40 – 60 % - **středně** cytotoxický a inhibice > 60 % - **silně** cytotoxický.

Tab. 8 Výsledky stanovení cytotoxicity u syntetických antimikrobiálních peptidů. Cytotoxicita je uvedena jako změna viability buněk vůči neovlivněné kontrole (%) ± SD (pokračování).

Peptid	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Čas [h]*		
		24	48	72
DAL+WK-6	500	5 ± 11	8 ± 8	20 ± 19
	100	2 ± 12	0 ± 8	11 ± 22
	50	0 ± 13	-6 ± 7	4 ± 13
	10	2 ± 10	-3 ± 10	10 ± 11
DAL+WK-6D	500	15 ± 11	10 ± 8	15 ± 19
	100	2 ± 12	-1 ± 8	11 ± 17
	50	-4 ± 13	-8 ± 10	5 ± 11
	10	-6 ± 14	-8 ± 14	7 ± 14
DAL+WR-6	500	10 ± 12	19 ± 15	28 ± 14
	100	0 ± 11	-7 ± 12	7 ± 11
	50	2 ± 13	-5 ± 6	7 ± 10
	10	2 ± 11	-3 ± 7	9 ± 12
DAL+WR-6D	500	58 ± 9	75 ± 2	84 ± 6
	100	16 ± 10	19 ± 13	23 ± 26
	50	10 ± 8	14 ± 9	17 ± 16
	10	-2 ± 13	1 ± 12	11 ± 9
DAL	500	1 ± 6	1 ± 10	11 ± 14
	100	0 ± 5	6 ± 11	6 ± 11
	50	6 ± 7	5 ± 11	10 ± 7
	10	14 ± 7	15 ± 6	22 ± 12

*Význam: inhibice < 20 % - **necytotoxický**; inhibice 20 – 40 % - **slabě cytotoxický**; inhibice 40 – 60 % - **středně cytotoxický** a inhibice > 60 % - **silně cytotoxický**.

Jako jediný AMP, který působí necytotoxicky ve všech čtyřech koncentracích, se prokázal DAL+WK-6D. U peptidů HD-12 a DAL došlo k překročení inhibiční hranice 20 % v čase 72 h po ovlivnění nejnižší koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$. K dosažení obdobného výsledku došlo také u DAL+WK-6 a DAL+WR-6 avšak naopak při nejvyšší koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 8).

U WK-12 (L- i D-forma) bylo z výsledků získaných z hmotnostní spektrometrie zjištěno, že u tohoto peptidu dochází k formylaci lysinu (příloha P3 a P5). K tomuto jevu zřejmě v čase dochází při nedokonalém uskladnění látky kvůli přítomnosti vlhkosti ve vzduchu. Během testování byly k dispozici dva L-peptidy, a to WK-12 syntetizovaný

se zbytkem testovaných peptidů a WK-12*, který byl připraven o několik měsíců dříve. V rámci stanovení cytotoxicity byly oba tyto peptidy testovány a hodnoceny. Výsledky porovnání jsou k dispozici v příloze P19. Ze získaných dat lze soudit, že přítomnost formylu nemá vliv na výsledný účinek peptidu, oba vykazovaly téměř stejné výsledky. Dále bylo zjištěno, že u jediného WK-12D při nejvyšší koncentraci 500 µg/ml (v porovnání s WK-12 a ostatními AMP) dochází během kultivace buněk k zakalení média. Tento efekt byl pozorován při všech opakováních ve všech jamkách (příloha P20). Vzhledem ke zvolené metodě měření by však zákal neměl v tomto případě ovlivnit získané výsledky.

Podle aminokyselinového složení působí WK-12 více toxicky v porovnání s WR-12 (Tab. 8). Během přípravy a ředění AMP (viz. postup v kapitole 3.3.2 na straně 37) došlo u WR-12 po přidavku kultivačního média k zakalení roztoku. Tímto způsobem mohla být koncentrace v ovlivňovacím roztoku po filtraci snížena díky zachycení peptidu na filtru. Avšak v souvislosti se získanými výsledky WR-12 stále vykazuje koncentrační závislost, takže není pravděpodobné, že došlo ke ztrátě většiny peptidu.

U konjugátů DAL zase naopak evidentně hraje roli přítomnost argininu především u D-formy DAL+WR-6D, kdy tento peptid působí při koncentraci 500 µg/ml silně toxicky na 3T3 buňky, kdežto u DAL+WK-6 a DAL+WK-6D silná cytotoxicita zaznamenána nebyla (Tab. 8).

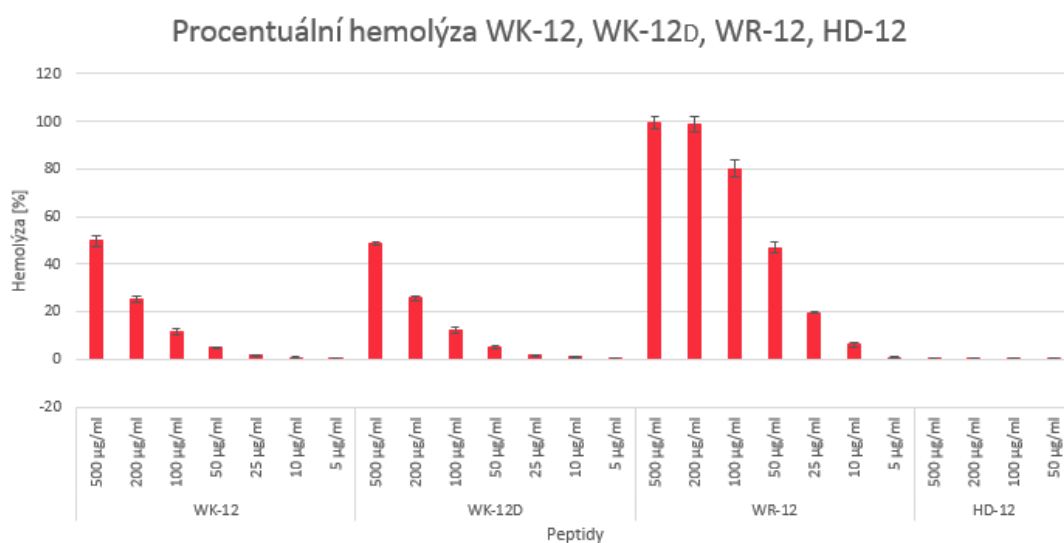
Důležitým hodnocením je dále porovnání hodnot MIC získaných z mikrodilučního testu s výsledky z cytotoxicity. U WK-12 a WK-12D je hodnota MIC stanovena pod 10 µg/ml, je to tedy koncentrace účinná proti oběma testovaným bakteriálním kmenům a zároveň necytotoxická vůči myším fibroblastům. Podobně u WR-12 byla MIC definována jako 25 µg/ml (či 12,5 µg/ml), přičemž současně je z výsledků patrné, že koncentrace 50 µg/ml u tohoto AMP stále na 3T3 buňky toxicky nepůsobí. V případě DAL+WR-6 a DAL+WR-6D se MIC u testovaných bakteriálních kmenů lišila (500 µg/ml pro *P. aeruginosa* a 125 µg/ml pro *S. aureus*). L-AMP vykazuje při testu cytotoxicity slabou toxicitu a to až po 72 h od aplikace. Oproti tomu byl však u D-AMP pozorován při dávce 500 µg/ml vůči myším buňkám dokonce silně toxický efekt.

4.6 Vyhodnocení hemolytické aktivity

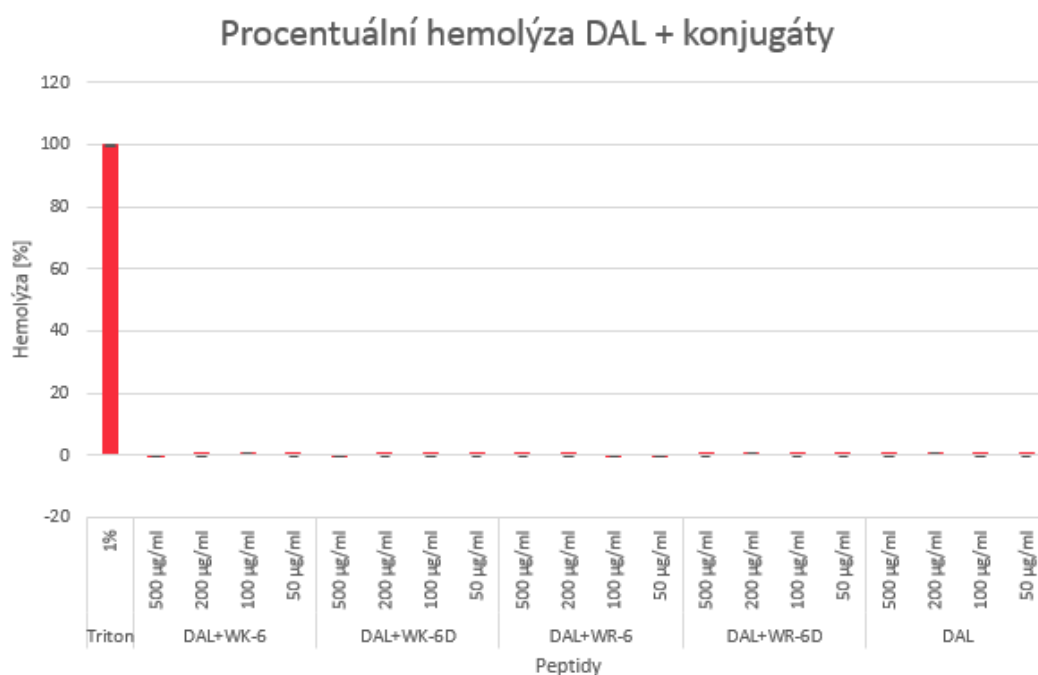
Aby mohl být AMP považován za terapeutickou alternativu, musí mít nejen silné antibakteriální vlastnosti, ale také nízkou cytotoxickou a zároveň hemolytickou aktivitu. Při hemolytických testech jsou posuzovány účinky různých koncentrací testovaných látek vůči krevním buňkám. Výsledky z těchto testů poté poskytují informace o tom, jaké ředění látek způsobí určitý stupeň hemolýzy erytrocytů (Zhang *et al.*, 2016).

Již po inkubaci roztoků AMP spolu s krevními buňkami (viz. postup v kapitole 3.3.3 na straně 38) byly vizuálně rozeznatelné rozdíly v odlišných koncentracích látek (příloha P21).

Hemolytická aktivita byla vyjádřena minimální hemolytickou koncentrací (MHC), která odpovídá koncentraci AMP způsobující 10% hemolýzu lidských červených krvinek (Zhang *et al.*, 2016). Pro tři peptidy byla odvozena MHC: WK-12 100 $\mu\text{g/ml}$, WK-12D 100 $\mu\text{g/ml}$, WR-12 10 – 25 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 17). Peptidy WK-12 a WK-12D vykazovaly shodný účinek při všech koncentracích, přičemž nejvyšší testovací (500 $\mu\text{g/ml}$) způsobila 50% lýzi krevních buněk. Oproti těmto AMP způsoboval WR-12 při dvou nejvyšších koncentracích (500 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$) 100% hemolýzu. Lze uvést, že pro všechny peptidy je koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ nepoškozující a efekt v tomto případě vůči červeným krvinkám téměř nulový. Dále byly testovány také všechny konjugáty včetně samotného DAL (Obr. 18). U těchto peptidů při všech koncentracích (od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 500 $\mu\text{g/ml}$) nedocházelo k žádné lýzi buněk.



Obr. 17 Výsledky měření hemolytické aktivity různých koncentrací peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12. Porovnání hodnot je uskutečněno proti 1% (v/v) tritonu-X (100% hemolýza). Sloupce označují průměr \pm SD tří nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.



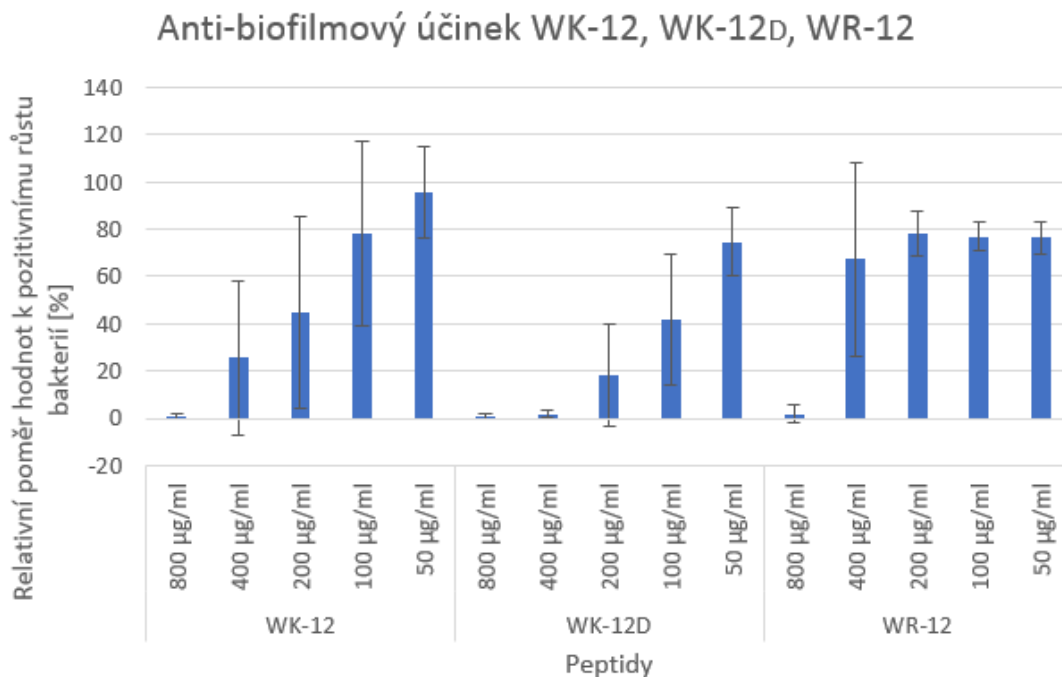
Obr. 18 Výsledky měření hemolytické aktivity různých koncentrací peptidu DAL a jeho konjugátů. Porovnání hodnot je uskutečněno proti 1% (v/v) tritonu-X (100% hemolýza). Sloupce označují průměr \pm SD tří nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.

4.7 Stanovení anti-biofilmové aktivity

V rámci stanovení antimikrobiální aktivity mohou být testované látky také hodnoceny pro jejich anti-biofilmovou aktivitu. Bakterie schopné vytvořit biofilm vykazují větší odolnost. Biofilm bakterie chrání před imunitním systémem hostitele a působením léčiv. Bakteriální citlivost na AMP je v případě vytvořeného biofilmu ve srovnání s planktonickým stavem nižší (Folkesson *et al.*, 2008). Anti-biofilmová aktivita je tedy stanovována za účelem získání informací o koncentraci AMP, která poskytuje účinek na zralý biofilm.

Pro vyhodnocení anti-biofilmové aktivity AMP byly na základě dat získaných ze stanovení MIC vybrány tři peptidy: WK-12, WK-12D a WR-12, které byly v tomto případě (oproti mikrodilučnímu testu antimikrobiální aktivity) rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Při prvotních testech byl fyziologický roztok vyhodnocen jako nejlepší rozpouštědlo pro dosažení optimálních výsledků z důvodu tvorby zákalu při aplikaci MHB média. Pro tento test (3 opakování) byl použit kmen *S. aureus*.

U všech peptidů je možné stanovit MBEC jako 800 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 19). Z grafu je patrné, že WK-12 a WK-12D vykazují mírně lepší výsledky ve srovnání s WR-12. Dále byl zaznamenán také mírný rozdíl v účinku mezi různými koncentracemi D-AMP a L-AMP.



Obr. 19 Výsledky stanovení anti-biofilmové aktivity při použití různých koncentrací antimikrobiálních peptidů (AMP) WK-12, WK-12D a WR-12. Nejvyšší koncentrace 800 µg/ml se ukázala jako účinná u všech tří peptidů. U WK-12D byl zaznamenán účinek také u druhé nejvyšší koncentrace 400 µg/ml. V tomto případě poskytuje D-AMP mírně lepší účinek ve srovnání s L-AMP. Sloupce označují průměr ± SD tří nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v tripletu.

Pro získání biofilmu je velmi důležité zachovat správné podmínky kultivace bakterií. Při opakování došlo ve dvou případech ze tří k tomu, že narostl menší biofilm. V tomto případě je možné, že takový biofilm může být více citlivý na ovlivnění.

Dále je ve výsledcích u L- a D-AMP vidět určitý trend. V nejlepším případě by měla být znatelná ostrá hranice mezi nárůstem bakterií a jejich absencí. Koncentrační závislost může signalizovat přítomnost peptidů na hrotech i po jejich promytí, což pak může ovlivnit růst planktonních buněk a v závěru celkový výsledek testu. Případně dalším vysvětlením může být, že testované látky mají na bakterie bakteriostatický efekt a růst bakterií může být ve výsledku zpomalen. Pro přesnější potvrzení účinnosti všech forem peptidů by tedy musely proběhnout další testy a analýzy.

5 DISKUZE

Šíření multi-rezistentních bakterií a vznik celosvětové antimikrobiální rezistence vedly v posledních letech k intenzivnímu hledání nových sloučenin se zlepšenou antimikrobiální kapacitou (Park *et al.*, 2011; Tillotson a Theriault, 2013). Antimikrobiální peptidy upoutaly velkou pozornost jako potenciální alternativa díky svým vlastnostem: mají široké spektrum aktivity, různé mechanismy účinku, nízký potenciál pro rozvoj rezistence, jsou schopné neutralizovat virulentní faktory uvolňované patogeny a modulovat imunitní odpověď hostitele (van 't Hof *et al.*, 2001; Marr *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2012). Existuje však několik omezení pro použití přirozeně se vyskytujících AMP, která zahrnují cytotoxicitu vůči eukaryotickým buňkám, degradaci proteasami, ztrátu antimikrobiální aktivity v přítomnosti fyziologické koncentrace solí a vysoké náklady na výrobu v důsledku jejich složitého designu (Mohammad *et al.*, 2015). Tyto nevýhody značně omezují použití těchto látek ve farmaceutickém průmyslu. Během posledních let však bylo vyvinuto značné úsilí pro zlepšení účinnosti AMP proti bakteriím a zároveň snížení jejich cytotoxicity, aby bylo možné uvažovat o jejich budoucím klinickém použití (McPhee *et al.*, 2005; Matsuzaki, 2009).

Cílem této diplomové práce byla příprava a identifikace AMP, které působí antimikrobiálně a zároveň nejsou toxické vůči savčím buňkám. Biologické testy pro stanovení antimikrobiální aktivity probíhaly s využitím bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, které se nejvíce vyskytují v kožních ranách. Pokud by se identifikoval peptid vykazující toxicitu vůči těmto bakteriím a zároveň by nebyl cytotoxický vůči savčím buňkám, mohlo by se uvažovat o jeho využití při léčbě ran. Součástí hypotézy bylo využití konjugátu, u kterého by byla kombinovaná antimikrobiální vlastnost s efektem hojení. V tomto ohledu by se jednalo o potenciální látku s duálním efektem vhodnou pro aplikaci při léčebných postupech.

Pro tuto práci byly syntetické peptidy připraveny s využitím syntézy peptidu na pevné fázi (SPPS), která představuje časově perspektivní jednoduchou metodu, jež je pro získání AMP k jejich následnému biologickému testování hojně využívána (Alvarez-Bravo *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2014; Bacalum *et al.*, 2017).

Sekvence testovaných peptidů obsahovaly různý podíl aminokyselin lysinu (Lys; K), argininu (Arg; R), tryptofanu (Trp; W) a histidinu (His; H), nebo se přímo jednalo o peptid dalargin (syntetický analog Leu-enkefalinu) či jeho konjugáty. Všechny tyto peptidy

měly pozitivní náboj, který je obecně u AMP způsoben vysokým obsahem pozitivně nabitých AK, mezi které patří právě lysin, arginin a histidin. Tento aminokyselinový obsah napomáhá navázání molekul peptidu na (obvykle) negativně nabitý povrch bakteriálních membrán (Takahashi *et al.*, 2010). Další důležitou vlastností AMP je jejich amfipatická povaha. Obsah hydrofobních AK může v některých případech dosáhnout až 50 %. Z aminokyselin, které propůjčují AMP jejich hydrofobní charakter, je nejdůležitější tryptofan (také obsažen v testovaných peptidech), který jako aromatická AK vykazuje silnou preferenci k lipidovým membránám (Killian *et al.*, 1996; Schibli *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008).

U některých peptidů (WK-12 a WR-12) je již z dřívějších studií známo, že poskytují antimikrobiální aktivitu (Deslouches *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2016). Krátký peptid dalargin je naopak díky svým vlastnostem (chrání buňky a přispívá k jejich proliferaci) spojený u savčích buněk s podporou hojení ran (Shekhter *et al.*, 1988; Legeza *et al.*, 1995). V této práci byl tento peptid pro posouzení jeho aktivity testován samostatně a zároveň také jako konjugát s peptidy obsahujícími buď motiv KW nebo motiv RW (předpokládá se tedy jeho dvojitý efekt a po spojení s motivy se očekávala zároveň jeho antimikrobiální aktivita).

Je dobře známo, že AMP obsahující ve své struktuře právě RW motiv (např. indolicidin či hovězí laktofericin) mají jednu z nejvyšších antimikrobiálních aktivit, nezávisle na jejich sekundární struktuře (Staubitz *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007b). Kromě toho je navrhování a syntéza zvláště krátkých AMP (2 až 12 AK) dalším vhodným řešením pro snížení nákladů na výrobu těchto sloučenin (Ramesh *et al.*, 2016).

Jedním z omezení u kationtových AMP v různých terapeutických kontextech je jejich citlivost vůči proteolytické degradaci. Mnoho bakterií si v průběhu evoluce v obraně vyvinulo různé proteasy (např. elastasa u *P. aeruginosa*, aureolysin a V8 u *S. aureus*), které dokážou peptid rychle degradovat. Gastrointestinální trávicí enzymy, jako je pepsin a trypsin, a proteasy v séru navíc přispívají k nízké stabilitě většiny AMP (Ebbensgaard *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu byla i v této diplomové práci sledována stabilita testovaných peptidů v přítomnosti enzymu trypsinu.

Ebbensgaard *et al.* (2015) ve své studii testovaly přirozené a syntetické AMP vůči působení trypsinu a proteinasy K. Souhrnně jejich zjištění potvrzují, že zejména antimikrobiální peptidy, které mají kationtový charakter, vykazují rychlou degradaci. Nedávné výzkumy se zvláště zaměřují na nalezení způsobů, jak zlepšit proteolytickou

stabilitu kationtových AMP. Bylo prokázáno, že inkorporace nepřírodných AK, jako jsou D-aminokyseliny nebo deriváty argininu, modifikace terminálních oblastí včetně acetylace, amidace a použití nepeptidových částí inkorporovaných do řetězců páteře (peptidomimetika) zlepšuje proteasovou stabilitu (Strömstedt *et al.*, 2009; Knappe *et al.*, 2010; Giuliani a Rinaldi, 2011; Malmsten *et al.*, 2011). Na základě těchto prokázání byly v rámci této práce testovány také peptidy, které obsahovaly jak L- tak i D-aminokyseliny.

Ong *et al.* (2014) ve své studii vyhodnocovali proteolytickou stabilitu peptidů vytvářejících β -list, kdy pro stanovení připravily jak L-, tak D-formy AMP. Z výsledků vyplývá, že po ošetření proteasami došlo u L-formy k úplné ztrátě bakteriálních inhibičních aktivit, což naznačuje jejich degradaci přítomnými enzymy. Všechny D-AMP si naopak zachovaly antibakteriální účinky proti 3 různým testovaným mikroorganismům. V další studii Vishnepolsky *et al.* (2019) k posouzení rezistence peptidů vůči proteasám vystavily testované peptidy proteinase K a α -chymotrypsinu. Ze získaných výsledků bylo patrné, že všechny testované L-peptidy byly proteasami částečně nebo zcela štěpeny. Oproti tomu peptidy obsahující D-aminokyseliny vykazovaly vůči štěpicím enzymům rezistenci.

V této diplomové práci byly dosaženy obdobné výsledky. U připravených peptidů bylo pro stanovení proteolytické stability uskutečněno porovnání odolnosti optických izomerů jednotlivých peptidů vůči působení trypsinu. Sekvence peptidů obsahující D-AK nebyly štěpeny ani po dlouhém časovém úseku (několik dní). Na základě těchto skutečností lze tvrdit, že se o těchto peptidech může uvažovat jako o potenciálních kandidátech pro vývoj nových antimikrobiálních léčiv.

Důležitým rysem AMP je rychlé usmrcení jejich mikrobiálních cílů. Pro charakterizaci vlivu látek na gram⁻ a gram⁺ bakterie byly vybráni zástupci *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Tyto bakterie jsou běžnými patogeny, které způsobují chronické infekce. Zároveň jsou cílem studií díky vzniku jejich rezistence na aplikovaná léčiva (Martinez, 2014).

Peptidy mohou být při kultivaci s bakteriemi degradovány bakteriálními proteasami a jejich koncentrace se v roztoku může snížit. Během praktického testu to znamená, že testovaná koncentrace nemusí být ve výsledku reálná, ale může být díky štěpení peptidu snížena. V tomto případě je možné, že určité procento populace bakterií přežije a po jejich namnožení dojde po určitém čase opět ke zvýšení zákalu. Teoreticky by tedy L- a D-peptidy měly poskytovat rozdílné výsledky, které by odpovídaly degradaci (L-) případně stabilitě (D-) peptidu. Takové výsledky zaznamenali například ve své studii

Alvarez-Bravo *et al.* (1994), kdy D-enantiomer vykazoval poloviční hodnotu MIC ve srovnání s L-enantiomerem.

Výsledky L- a D-AMP byly v této práci při stanovení MIC shodné, ovšem není možné určit, jestli se stabilita těchto peptidů při tomto testu *in vitro* liší či nikoliv. Z výsledků získaných při stanovení specifické optické otáčivosti (Tab. 6 na straně 45) bylo zjištěno, že tyto peptidy nejsou enantiomery a jejich hodnoty se liší (při použití demiH₂O jako rozpouštědla). To naznačuje, že AMP s rozdílným L- a D-aminokyselinovým složením mohou teoreticky vytvářet odlišné sekundární struktury, a tím mohou být přístupné nebo naopak nepřístupné pro různé proteasy v odlišných prostředích. Pro stanovení $[\alpha]_D^{20}$ v dalších rozpouštědlech však nebylo v této práci uskutečněno více testů.

Další možností pro posouzení sekundární struktury a stanovení vztahu mezi délkou a helicitou AMP je porovnat jejich CD spektra získaná při rozpuštění látek a měření v rozdílných rozpouštědlech. Deslouches *et al.* (2013) použili jednak vodný roztok a dále dodecylsulfát sodný (SDS) či 2,2,2-trifluorethanol (TFE) pro napodobení prostředí vyskytujícího se kolem bakteriálních membrán. Naměřená data poukazovala na náhodné spirály nebo neuspořádané konformace ve vodném rozpouštědle, kdežto v přítomnosti SDS nebo TFE vytvářely peptidy silné a uspořádané helikální konformace (v této studii byl přímo testován také WR-12). Pro vyhodnocení tvorby sekundárních struktur však nebyly peptidy v této diplomové práci takovým testům podrobeny.

V publikaci zveřejněné o tři roky později Deslouches *et al.* (2016) uvádějí rozdíly mezi peptidy WK-12 a WR-12. Výsledky ukazují, že se navzdory velmi podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem lysinu a argininu jejich podíl na funkčních vlastnostech antimikrobiálních peptidů může lišit. I přes podobnou aktivitu WK-12 a WR-12, která byla původně pozorována při testech s bakteriemi a určování minimální baktericidní koncentrace (MBC), fyziologicky relevantní změny v testovacích podmínkách (v přítomnosti Ca²⁺ a Mg²⁺) odhalily významné rozdíly v aktivitě mezi těmito dvěma AMP. Tyto rozdíly ukázaly, že aktivita argininu byla ve srovnání s lysinem zvýšena. Při testech povrchové plasmonové rezonance (SPR) se dále WR-12 vázal k membráně *P. aeruginosa* v daleko větší míře, než WK-12. Zajímavou otázkou tedy bylo, proč tyto dva AMP vykazovaly podobné MBC, ale za stejných podmínek měly odlišné vazebné a membránové permeabilizační vlastnosti. Věrohodným vysvětlením může být, že peptid bohatý na lysin může usmrcovat bakterie také odlišným sekundárním mechanismem, jak je ukázáno u jiných antimikrobiálních peptidů (Hale a Hancock, 2007).

Při testování peptidu dalarginu nebyla u této látky antimikrobiální aktivita potvrzena. U připravených konjugátů bylo teoreticky předpokládáno, že část peptidu obsahující sekvenci dalarginu bude sloužit pro proces hojení, kdežto hydrofobní část obsahující motiv KW nebo RW bude vykazovat antimikrobiální aktivitu. Získané hodnoty MIC (pouze u DAL+WR-6 a DAL+WR-6D) byly u konjugátů mnohonásobně vyšší ve srovnání s peptidy WK-12 a WR-12. V porovnání se samotným DAL byla tedy antimikrobiální aktivita pozorována, byl zaznamenán částečný efekt, který může být způsoben přítomností RW motivu. Kosikowska *et al.* (2015) ve své studii při testech u konjugátu DAL-PEG-DK5 potvrdili jeho antimikrobiální aktivitu proti gram⁻ a gram⁺ bakteriálním patogenům. Tento konjugát obsahoval dalargin připojený skrze krátký neimunogenní linker (PEG) k antimikrobiálnímu peptidu bohatému na lysin (DK5). I v rámci této práce by bylo vhodné pro definitivní závěry a objasnění mechanismu působení tyto látky testovat na modelu *in vivo* pro stanovení komplexních efektů a antimikrobiálního působení. Tyto testy (nejdříve standardně provedené *in vitro*) by současně mohly zahrnovat také změny v délce sekvence (prodloužení hydrofobní části obsahující motiv KW nebo RW) pro definování antimikrobiální aktivity konjugátů s různou délkou řetězce.

Jedním z dalších biologických testů bylo stanovení cytotoxicity. Nízká toxicita peptidů proti savčím buňkám vůči jejich antimikrobiální aktivitě naznačuje jejich selektivní působení proti negativně nabitým bakteriálním membránám ve srovnání se zwitterionovými savčími membránami. Získané výsledky tedy naznačují, že WK-12, WK-12D a WK-12 mohou mít (při nejnižších testovacích koncentracích) příznivý profil bezpečnosti léčiv.

Deslouches *et al.* (2016) ve své publikaci prezentují data získaná ze stanovení potenciálního cytotoxického vlivu peptidů vůči makrofágům odvozených z primárních lidských monocytů. WK-12 a WR-12 neprokázaly žádnou detekovatelnou cytotoxicitu při koncentracích podobných odpovídajícím hodnotám MBC nebo MIC. Při maximální koncentraci peptidu $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (přibližně 10krát MIC a 20krát MBC) vykazoval WR-12 průměrnou toxicitu pro makrofágy 16 %, kdežto WK-12 13 %. V porovnání s touto publikací však WK-12 vykazoval při měření a stanovení cytotoxicity v této diplomové práci větší toxicitu a inhibici růstu myších 3T3 dermálních fibroblastů oproti peptidu WR-12.

Dále byl při stanovení cytotoxicity u dvou konjugátů DAL+WR-6 a DAL+WR-6D zaznamenán významný rozdíl v jejich působení při nejvyšší testované koncentraci (500 µg/ml). Z literárních zdrojů (Ong *et al.*, 2014; Vishnepolsky *et al.*, 2019) a naměřených dat bylo potvrzeno, že peptidy lišící se L- a D-aminokyselinovým obsahem dosahují rozdílných výsledků ve své proteolytické stabilitě. V tomto případě je možné brát v úvahu štěpící enzymy, které degradují L-formu peptidu, zatímco D-forma zůstává intaktní. Je pravděpodobné, že při testech vlivem přítomnosti enzymů produkovaných buňkami dochází u DAL+WR-6D ke štěpení na dva kratší fragmenty jako tomu je v případě DAL+WK-6D, a právě za těchto podmínek může působit hydrofobní část řetězce při této koncentraci silně toxicky (oproti DAL+WR-6, který může být štěpen na více fragmentů a úplně degradován). Tato hypotéza by však musela být ověřena případnými testy.

Další biologické testování bylo uskutečněno s lidskou krví, kdy byla stanovena hemolytická aktivita testovaných AMP vůči krevním buňkám. V předchozí zmiňované publikaci autoři kromě stanovení cytotoxického vlivu peptidů vůči buňkám imunitního systému také určovali hemolytickou aktivitu WK-12 a WR-12. Data naznačovala, že oba tyto peptidy vykazovaly méně než 10% hemolytickou aktivitu při koncentracích peptidu do 20 µmol·l⁻¹ a souhrnně nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl mezi těmito AMP v jejich aktivitě při každé koncentraci peptidu (Deslouches *et al.*, 2016). V této diplomové práci byly u každého peptidu analyzovány koncentrace od 5 do 500 µg/ml. Už při koncentraci 25 µg/ml vykazoval WR-12 dvojnásobnou hemolytickou aktivitu v porovnání s WK-12. Tyto výsledky (shodné ve třech opakováních) byly tedy v kontrastu se získanými daty ze stanovení cytotoxicity, kdy jak WK-12, tak jeho D-forma WK-12D působily vůči savcím buňkám naopak více toxicky.

Vysvětlením, proč je tedy WR-12 méně cytotoxický a více hemolytický, by mohla být rozdílná náchylnost buněčných membrán fibroblastů a erytrocytů nebo použití rozdílného rozpouštědla u obou stanovení (BSA v kyselině octové v případě stanovení cytotoxicity a fyziologický roztok u hemolýzy). Tato pozorování naznačují, že je nezbytné sledovat selektivitu (u cytotoxicity a hemolytické aktivity) ve vhodném fyziologicky relevantním prostředí a vyžadují tudíž další studium.

Posledním biologickým vyhodnocením bylo stanovení anti-biofilmové aktivity peptidů. Tvorba biofilmu je jedním z hlavních virulentních faktorů gram⁺ bakterie *S. aureus* (Archer *et al.*, 2011). Polysacharidová matrice biofilmu chrání bakterie

před imunitní obranou hostitele a brání antibiotikům v cílení na hluboce usazené bakterie, které se nacházejí uvnitř biofilmu (Mah a O'Toole, 2001). Biofilmy navíc působí jako infekční struktury s kontinuálním uvolňováním bakterií do těla hostitele, což vede následně k chronickým infekcím, život ohrožujícím infekcím krevního řečiště a ve výsledku k neschopnosti působení účinných látek a selhání léčby (Archer *et al.*, 2011).

Mohamed *et al.* (2016) testovali účinek WR-12 a jeho schopnost narušit zralý biofilm (vytvořený po 24 a 48 h) právě u bakterie *S. aureus*. Peptid (při 4× MIC) významně narušil 24hodinový zralý biofilm, přičemž se snížila hmotnost biofilmu o 50 %. Zralý 48hodinový biofilm byl rezistentní na antibiotika bez pozorovaného významného snížení hmoty biofilmu, a to i při působení velmi vysokých koncentrací (64× MIC). Naopak při ošetření s WR-12 (4× MIC) došlo v tomto čase ke snížení hmotnosti biofilmu o více než 50 %.

Data získaná v této diplomové práci však ukázala, že hodnota MBEC je mnohonásobně vyšší oproti hodnotě MIC definované při mikrodilučním testu, a to konkrétně 64× MIC u WR-12 a 128× MIC u WK-12 a WK-12D. Rozdíly v hodnotách MBEC mohou být částečně způsobené v tomto směru metodou měření. Získané výsledky jsou však podobné chování klasických antimikrobiálních látek (ATB či antiseptik), které také vykazují mnohem vyšší MBEC ve srovnání s MIC u planktonních bakterií (Mah a O'Toole, 2001).

6 ZÁVĚR

Tato práce byla nejdříve zaměřena na teoretickou část, kde byly charakterizovány antimikrobiální peptidy, jakožto perspektivní látky účinné v boji proti bakteriálním infekcím. Dále zde bylo také popsáno využití syntetických peptidů a metody syntézy peptidů, zvláště SPPS.

Cílem experimentální části práce poté byla vlastní syntéza a biologická charakterizace připravených antimikrobiálních peptidů. Celkem bylo s využitím metody SPPS připraveno 9 různých látek, kdy se některé odlišovaly v páru na základě inkorporace D-aminokyselin. Peptidy byly podle standardního postupu před testováním purifikovány a uchovány za vhodných podmínek skladování.

Z dosažených výsledků vyplývá, že přítomnost D-aminokyselin v řetězci má zásadní vliv na stabilitu peptidu při působení štěpících enzymů, konkrétně proteasy trypsinu. Oproti této skutečnosti však nebyly zaznamenány mezi L- a D-AMP rozdíly při stanovení minimální inhibiční koncentrace. Na polarimetru byla poté stanovena specifická optická otáčivost, jejíž hodnoty napovídaly tomu, že tyto látky nejsou zrcadlovými obrazy. Další analýzy tvorby sekundárních struktur ovšem nebyly uskutečněny. Stanovení cytotoxicity odhalilo drobné rozdíly v toxicitě mezi L- a D-peptidy. S ohledem na stanovení hodnot MIC je možné u 6 ze 7 AMP (kromě DAL+WR-6D) definovat koncentrace, které nepůsobí toxicky vůči testovaným savčím buňkám, ale vykazují toxický efekt u dvou bakteriálních kmenů použitých v této práci. Hemolytická aktivita se u DAL a jeho konjugátů nepotvrdila. Zbylé peptidy vykazovaly zanedbatelnou procentuální hemolýzu, pokud se jednalo o koncentraci blízké MIC. Dva peptidy (HD-12 a DAL) nevykazovaly žádný účinek ani vliv na všechny testované buňky. V poslední řadě byl analyzován také anti-biofilmový účinek 3 AMP na narostlý biofilm bakterie *S. aureus*. Koncentrace inhibující zralý biofilm byla několikanásobně vyšší než byla hodnota MIC. V tomto směru vzhledem k omezenému počtu testování na modelu biofilmu je však nutné získané údaje brát jako preliminární a pro definitivní stanovení MBEC měření opakovat.

Závěrem některé peptidy analyzované v této práci vykazovaly antimikrobiální aktivitu, která by mohla posloužit společně s daty získanými ze stanovení proteolytické stability jako předmět dalšího zkoumání a dát základ pro možné budoucí uplatnění těchto látek.

7 LITERATURA

- Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G., Kutter E. M. (2011): Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1**, 66-85.
- Ageitos J.M., Sánchez-Pérez A., Calo-Mata P., Villa T.G. (2017): Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology* **133**, 117-138.
- Alvarez-Bravo J., Kurata S., Natori S. (1994): Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* **302**, 535-538.
- Alves C.S., Melo M.N., Franquelim H.G., Ferre R., Planas M., Feliu L., Bardají E., Kowalczyk W., Andreu D., Santos N.C., Fernandes M.X., Castanho M.A. (2010): *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 27536-27544.
- Amblard M., Fehrentz J.A., Martinez J., Subra G. (2006): Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Molecular Biotechnology* **33**, 239-254.
- Anaya-López J.L., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A. (2013): Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology* **39**, 180-195.
- Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Nilsson B., Verlander M. (2000): Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section* **55**, 227-250.
- Andreu D., Ubach J., Boman A., Wåhlin B., Wade D., Merrifield R.B., Boman H.G. (1992): Shortened cecropin A-melittin hybrids significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Letters* **296**, 190-194.
- Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirliff M.E. (2011): *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* **2**, 445-459.
- Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch Z. (2018): Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* **11**, 1645-1658.
- Bacalum M., Janosi L., Zorila F., Tepes A.M., Ionescu C., Bogdan E., Hadade N., Craciun L., Grosu I., Turcu I., Radu M. (2017): Modulating short tryptophan- and arginine-rich peptides activity by substitution with histidine. *Biochimica et Biophysica Acta* **7**, 1844-1854.
- Bahar A.A. a Ren D. (2013): Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543-1575.
- Bebbington C. a Yarranton G. (2008): Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 613-619.
- Bergmann M. a Zervas L. (1932): A general procedure of the peptide synthesis. *Ber. Deutsch. Chem* **65**, 1192-1201.
- Bilková A., Kiňová Sepová H., Bilka F., Balážová A. (2011): Bakteriocíny produkované baktériami mliečného kvasenia. *Česká a slovenská farmacie* **60**, 65-72.
- Bodanszky M. (1984): *Principles of Peptide Synthesis*. 1st ed., Heidelberg: Springer, Berlin, Německo, 308 stran.
- Boman H.G., Wade D., Boman I.A., Wåhlin B., Merrifield R.B. (1989): Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Letters* **259**, 103-106.
- Cantisani M., Finamore E., Mignogna E., Falanga A., Nicoletti G.F., Pedone C., Morelli G., Leone M., Galdiero M., Galdiero S. (2014): Structural insights into and activity analysis of the antimicrobial peptide myxinidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 5280-5290.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. (1999): The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1771-1776.
- Coin I., Beyermann M., Bienert M. (2007): Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols* **2**, 3247-3256.
- Conlon J.M., Al-Ghaferi N., Abraham B., Leprince J. (2007): Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods* **42**, 349-357.

- Cotter P.D., Ross R. P., Hill C. (2013): Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* **11**, 95-105.
- Cox G. a Wright G.D. (2013): Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology* **303**, 287-292.
- Cunningham C. a Porter, A.J. (1997): *Methods in Biotechnology, Vol.3: Recombinant proteins from plants - production and isolation of clinically useful compounds*. Totowa, N.J; Humana Press, ISBN: 0-89-603390-2.
- Czarnik A. W. (1998): Solid-phase synthesis supports are like solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **61**, 77-79.
- Davies J. a Davies D. (2010): Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**(3), 417-433.
- De Smet K. a Contreras R. (2005): Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* **27**, 1337-1347.
- Dennison S.R., Mura M., Harris F., Morton L.H., Zvelindovsky A., Phoenix D.A. (2015): The role of C-terminal amidation in the membrane interactions of the anionic antimicrobial peptide, maximin H5. *Biochimica et Biophysica Acta* **1848**, 1111-1118.
- Deslouches B., Hasek M.L., Craigo J.K., Steckbeck J.D., Montelaro R.C. (2016): Comparative functional properties of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of tryptophan and either lysine or arginine. *Journal of Medical Microbiology* **65**, 554-565.
- Deslouches B., Phadke S.M., Lazarevic V., Cascio M., Islam K., Montelaro R.C., Mietzner T.A. (2005): De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 316-322.
- Deslouches B., Steckbeck J.D., Craigo J.K., Doi Y., Mietzner T.A., Montelaro R.C. (2013): Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 2511-2521.
- Diamond G., Russell J.P., Bevins C.L. (1996): Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5156-5160.
- Dias R.D.O. a Franco O.L. (2015): Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to antibacterial activity, *Peptides* **72**, 64-72.
- Dobson A., Cotter D. P., Ross P. R., Hill C. (2012): Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 1-6.
- Du Vigneaud V., Ressler C., Swan C.J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G., Gordon S. (1953): The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **75**, 4879-4880.
- Du Vigneaud V., Ressler C., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G. (1954): The synthesis of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **76**, 3115-3121.
- Duits L.A., Ravensbergen B., Rademaker M., Hiemstra P.S., Nibbering P.H. (2002): Expression of β -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**, 517-525.
- Duplantier A.J. a van Hoek M.L. (2013): The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in Immunology* **4**, 1-14.
- Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. (2019): Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* **53**, 371-382.
- Dürr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A. (2006): LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, 1408-1425.
- Ebbensgaard A., Mordhorst H., Overgaard M.T., Nielsen C.G., Aarestrup F.M., Hansen E.B. (2015): Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PLoS One* **11**; 10:e0144611.
- Egorov T.A. a Odintsova T.I. (2012): Defense peptides of plant immune system. *Bioorganicheskaja khimiia* **38**, 7-17.
- Epand R.M. a Vogel H.J. (1999): Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* **15**, 11-28.

- Essig A., Hofmann D., Münch D., Gayathri S., Künzler M., Kallio P.T., Sahl H.G., Wider G., Schneider T., Aebi M. (2014): Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 34953-34964.
- Evans B.S., Chen Y., Metcalf W.W., Zhao H., Kelleher N.L. (2011): Directed Evolution of the Nonribosomal Peptide Synthetase AdmK Generates New Andrimid Derivatives in vivo. *Chemistry & Biology* **18**, 601-607.
- Fang X.M., Shu Q., Chen Q.X., Book M., Sahl H.G., Hoefl A., Stuber F. (2003): Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood. *European Journal of Clinical Investigation* **33**, 82-87.
- Feliu J.A., De Mas C. López-Santín J. (1995): Studies on papain action in the synthesis of Gly-Phe in two-liquid-phase media. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 882-887.
- Ferre R., Melo M.N., Correia A.D., Feliu L., Bardají E., Planas M., Castanho M. (2009): Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. *Biophysical Journal* **96**, 1815-1827.
- Fischer E. a Otto E. (1903): Synthesis of the derivatives of some dipeptides. *Ber. Deutsch. Chem.* **36**, 2106-2116.
- Fleming A. (1929): On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology* **10**, 226-236.
- Folkesson A., Haagenen J.A.J., Zampaloni C., Sternberg C., Molin S. (2008): Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *PLoS One* **3**,(4):e1891.
- Freder V., Ho B., Ding J. (2004): De novo design of potent antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3349-3357.
- Garcia J.R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodríguez-Jiménez J., Forssmann U., Adermann K., Klüver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W.G., Bals R. (2001b): Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and Tissue Research* **306**, 257-264.
- Garcia J.R., Krause A., Schulz S., Rodríguez-Jiménez F.J., Klüver E., Adermann K., Forssmann U., Frimpong-Boateng A., Bals R., Forssmann W.G. (2001a): Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB Journal* **15**, 1819-1821.
- Ge Y., MacDonald D.L., Holroyd K.J., Thornsberry C., Wexler H., Zasloff M. (1999): In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 782-788.
- Ghosh C. a Haldar J. (2015): Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. *ChemMedChem* **10**, 1606-1624.
- Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. (2019): Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology* **27**, 323-338.
- Gill I., López-Fandiño R., Jorba X., Vulfson E.N. (1996): Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology* **18**, 162-183.
- Giuliani A. a Rinaldi A.C. (2011): Beyond natural antimicrobial peptides: Multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 2255-2266.
- Gottler L.M. a Ramamoorthy A. (2009): Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan – a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1680-1686.
- Gottschalk S., Gottlieb C.T., Vestergaard M., Hansen P.R., Gram L., Ingmer H., Thomsen L.E. (2015): Amphibian antimicrobial peptide fallaxin analogue FL9 affects virulence gene expression and DNA replication in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* **9**, 2052-2058.
- Gravitz L. (2012): Turning a new page. *Nature Medicine* **18**, 1318-1320.
- Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski Lda S., Silva-Pereira I., Kyaw C.M. (2013): Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology* **4**, 353.

- Guliani A., Pirri G., Nicoletto F (2007): Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* **2**, 1-33.
- Guzmán F., Barberis S., Illanes A. (2007): Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology* **10**, 279-314.
- Hale J. D. a Hancock R. E. (2007): Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **5**, 951-959.
- Han S.Y. a Kim Y.A. (2004): Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **60**, 2447-2467.
- Hancock R.E. a Chapple D.S. (1999): Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M. (2001): Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5707-5713.
- Hipkiss A.R. a Brownson C. (2000): A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 747-753.
- Hoffmeister D. a Keller N.P. (2007): Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports* **24**, 393-416.
- Huang G.T., Zhang H.B., Kim D., Liu L., Ganz T. (2002): A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Human Gene Therapy* **13**, 2017-2025.
- Huang K.S., Yang C.H., Huang S.L., Chen C.Y., Lu Y.Y., Lin Y.S. (2016): Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1578.
- Hutchings M.I., Truman A.W., Wilkinson B. (2019): Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* **51**, 72-80.
- Chan W.C. a White P.D. (2000): *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*. 1st ed., Oxford University Press, New York, USA, 376 stran.
- Chang C., Zhang Y., Zou J., Nie P., Secombes C.J. (2006): Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Society* **50**, 185-195.
- Cherkupally P., Acosta G.A., Ramesh S., De la Torre B.G., Govender T., Kruger H.G., Albericio F. (2014): Solid-phase peptide synthesis (SPPS), C-terminal vs. side-chain anchoring: a reality or a myth. *Amino Acids* **46**, 1827-1838.
- Isolauri E. (2001): Probiotics in human disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 1142S-1146S.
- Jean-Francois F., Elezgaray J., Berson P., Vacher P., Dufourc E. J., (2008): Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophysical Journal* **95**, 5748-5756.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. (2006): Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 491-511.
- Jhong J.H., Chi Y.H., Li W.C., Lin T.H., Huang K.Y., Lee T.Y. (2019): dbAMP: an integrated resource for exploring antimicrobial peptides with functional activities and physicochemical properties on transcriptome and proteome data. *Nucleic Acids Research* **8**, D285-D297.
- Jia W., Li H., Zhao L., Nicholson J.K. (2008): Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 123-129.
- Juhaniewicz J., Szyk-Warszyńska L., Warszyński P., Sęk S. (2016): Interaction of cecropin B with zwitterionic and negatively charged lipid bilayers immobilized at gold electrode surface. *Electrochimica Acta* **204**, 206-217.
- Kadouri D.E., To K., Shanks R.M., Doi Y. (2013): Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLoS One* **8**, e63397. doi: 10.1371/journal.pone.0063397.
- Karal M.A., Alam J.M., Takahashi T., Levadny V., Yamazaki M. (2015): Stretch-activated pore of the antimicrobial peptide, magainin 2. *Langmuir* **31**, 3391-3401.
- Karpiński T.M. a Szkaradkiewicz A.K. (2013): Characteric of bacteriocines and their applications. *Polish journal of microbiology* **62**, 223-235.

- Kates S.A., Albericio F. (2000): *Solid-phase synthesis: a practical guide*. 1st ed., CRC Press, New York, USA, 848 stran.
- Katz L. a Baltz R.H. (2016): Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **43**, 155-176.
- Kawada-Matsuo M. a Komatsuzawa H. (2017): Role of *Streptococcus mutans* two-component systems in antimicrobial peptide resistance in the oral cavity. *Japanese Dental Science Review* **53**, 86-94.
- Kent S. B. H. (2009): Total chemical synthesis of proteins. *Chemical Society Reviews* **38**, 338-351.
- Killian J.A., Salemink I., de Planque M.R., Lindblom G., Koeppe R.E., Greathouse D.V. (1996): Induction of nonbilayer structures in diacylphosphatidylcholine model membranes by transmembrane alpha-helical peptides: importance of hydrophobic mismatch and proposed role of tryptophans. *Biochemistry* **35**, 1037-1045.
- Knappe D., Henklein P., Hoffmann R., Hilpert K. (2010): Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 4003-4005.
- Konai M.M., Bhattacharjee B., Ghosh S., Haldar J. (2018): Recent Progress in Polymer Research to Tackle Infections and Antimicrobial Resistance. *Biomacromolecules* **19**, 1888-1917.
- Kościuczuk E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E. (2012): Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular Biology Reports* **39**, 10957-10970.
- Kosikowska P., Pikula M., Langa P., Trzonkowski P., Obuchowski M., Lesner A. (2015): Synthesis and Evaluation of Biological Activity of Antimicrobial-Pro-Proliferative Peptide Conjugates. *PLoS One* **10**, e0140377.
- Kutter E., De Vos D., Gvasalia G., Alavidze Z., Gogokhia L., Kuhl S., Abedon S. T. (2010): Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **11**, 69-86.
- Lee M.O., Jang H.J., Han J.Y., Womack J.E. (2014): Chicken NK-lysin is an alpha-helical cationic peptide that exerts its antibacterial activity through damage of bacterial cell membranes. *Poultry Science* **93**, 864-870.
- Legeza V. P., Koshcheev A. G., Konovalova L. N. (1995): Effect of dalargin on healing of a bullet wound of the soft tissues in rabbits. *Patologicheskaja Fiziologija i Eksperimental'naja Terapija* **4**, 45-48.
- Leitgeb B., Szekeres A., Manczinger L., Vágvölgyi C., Kredics L. (2007): The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. *Chemistry & Biodiversity* **4**, 1027-1051.
- Li Y. (2011): Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expression and Purification* **80**, 260-267.
- Liu S.L., Du X.B., Kong J.L., Jiang H. (2007a): A novel plant defensin from Chinese mistletoe, *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai. *Chinese Chemical Letters* **18**, 55-58.
- Liu Y.J. (2001): Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
- Liu Z., Brady A., Young A., Rasimick B., Chen K., Zhou C., Kallenbach N.R. (2007b): Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 597-603.
- Llor C. a Bjerrum L. (2014): Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety* **5**, 229-241.
- Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. (2001): Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**, 2170-2172.
- López-Solanilla E., González-Zorn B., Novella S., Vázquez-Boland J.A., Rodríguez-Palenzuela P. (2003): Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides, *FEMS Microbiology Letters* **226**, 101-105.
- Madeo F., Herker E., Wissing S., Jungwirth H., Eisenberg T., Fröhlich K.U. (2004): Apoptosis in yeast. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 655-660.

- Mah T. F. a O'Toole G. A. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* **9**, 34-39.
- Mahto S.K., Chandra P., Rhee S.W. (2010): In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences* **2**, 87-93.
- Malmsten M., Kasetty G., Pasupuleti M., Alenfall J., Schmidtchen A. (2011): Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP. *PLoS One* **27**, 1:e16400
- Marcos J.F. a Manzanares P. (2011): Antimicrobial peptides. In: *Antimicrobial Biopolymers*. 1st ed., (Lagarón J.M., Ocio M.J., López-Rubio A.), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, strana 195-225.
- Marr A.K., Gooderham W.J., Hancock R.E. (2006): Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology* **6**, 468-472.
- Marshall B.M. a Levy S.B. (2011): Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* **24**(4), 718-733.
- Martinez J.L. (2014): General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies* **11**, 33-39.
- Matsuzaki K. (2009): Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1687-1692.
- Matsuzaki K., Murase O., Fujiii N., Miyajima K. (1996): An antimicrobial peptide, magainin II, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**, 11361-11368.
- McDonnell G. a Russell A.D. (1999): Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 147-179.
- McPhee J.B., Scott M.G., Hancock R.E. (2005): Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**, 257-272.
- Merrifield B. (1963): Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154.
- Merrifield R.B., Juvvadi P., Andreu D., Ubach J., Boman A., Boman H.G. (1995): Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **92**, 3449-3453.
- Meyer C.E. a Reusser F. (1967): A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* **23**, 85-86.
- Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M. (2014): The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health* **2**, 145.
- Mohamed M.F., Abdelkhalek A., Seleem M.N. (2016): Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* **11**, 6:29707.
- Mohammad H., Thangamani S., Seleem M. N. (2015): Antimicrobial peptides and peptidomimetics - potent therapeutic allies for staphylococcal infections. *Current pharmaceutical design* **21**, 2073-2088.
- Moser C., Weiner D.J., Lysenko E., Bals R., Weiser J.N., Wilson J.M. (2002): beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infection and Immunity* **70**, 3068-3072.
- Mygind P.H., Fischer R.L., Schnorr K.M., Hansen M.T., Sönksen C.P., Ludvigsen S., Raventós D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., Taboureau O., Yaver D., Elvig-Jørgensen S.G., Sørensen M.V., Christensen B.E., Kjaerulff S., Frimodt-Møller N., Lehrer R.I., Zasloff M., Kristensen H.H. (2005): Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* **437**, 975-980.
- Nair D.G., Fry B.G., Alewood P., Kumar P.P., Kini R.M. (2007): Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprins family of snake venom proteins. *Biochemical Journal* **402**, 93-104.
- Narasimhan M.L., Damsz B., Coca M.A., Ibeas J.I., Yun D.J., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (2001): A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Molecular Cell* **8**, 921-930.
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Gozdzicka-Józefiak A. (2014): Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* **59**, 181-196.

- Nielsen S.L., Frimodt-Møller N., Kragelund B.B., Hansen P.R. (2007): Structure-activity study of the antibacterial peptide fallaxin. *Protein Science* **16**, 1969-1976.
- Nilsson B.L., Soellner M.B., Raines R.T. (2005): Chemical synthesis of proteins. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* **34**, 91-118.
- Niyonsaba F. a Ogawa H. (2005): Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents b-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *Journal of Dermatological Science* **40**, 157-168.
- Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. (2002b): Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International Immunology* **14**, 421-426.
- Niyonsaba F., Iwabuchi K., Someya A., Hirata M., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. (2002a): A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* **106**, 20-26.
- Noya O., Patarroyo M.E., Guzmán F., Alarcón de Noya B. (2003): Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current Protein & Peptide Science* **4**, 299-308.
- O'Connor P.M., Kuniyoshi T.M., Oliveira R.P.S., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. (2020): Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **61**, 160-167.
- Olsen J.V., Ong S.E., Mann M. (2004): Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 608-614.
- Ong Z.Y., Cheng J., Huang Y., Xu K., Ji Z., Fan W., Yang Y.Y. (2014): Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic β -sheet forming peptide amphiphiles. *Biomaterials* **35**, 1315-1325.
- Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C., Rehm B.H., Hancock R.E. (2008): Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and Immunity* **76**, 4176-4182.
- Palomo J.M. (2014): Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances* **4**, 32658-32672.
- Park S.C., Park Y., Hahn K.S. (2011): The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 5971-5992.
- Pećanac M., Janjić Z., Komarcević A., Pajić M., Dobanovacki D., Misković S.S. (2013): Burns treatment in ancient times. *Medicinski pregled* **66**, 263-267.
- Peters B. M., Shirliff M.E., Jabra-Rizk M.A. (2010): Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLOS Pathogens* **6**, e1001067.
- Pokorny A., Almeida P.F. (2005): Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysin: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides. *Biochemistry* **44**, 9538-9544.
- Ramesh S., Govender T., Kruger H.G., de la Torre B.G., Albericio F. (2016): Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science* **22**, 438-451.
- Rinaldi A.C. (2002): Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 799-804.
- Rollins-Smith L.A., Reinert L.K., O'Leary C.J., Houston L.E., Woodhams D.C. (2005): Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and Comparative Biology* **45**, 137-142.
- Ruangsi J., Kitani Y., Kiron V., Lokesh J., Brinchmann M.F., Karlsen B.O., Fernandes JM. (2013): A novel beta-defensin antimicrobial peptide in atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity. *PLoS One* **8**, e62302.
- Salzman N.H., Ghosh D., Huttner K.M., Paterson Y., Bevins C.L. (2003): Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422**, 522-526.
- Santini R., Griffith M.C., Qi M. (1998): A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Letters* **39**, 8951-8954.

- Sayed S. a Jardine M.A. (2015): Antimicrobial Biopolymers. In: *Advanced Functional Materials*. 1st ed., (Ashutosh Tiwari, Lokman Uzun), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, strana 493-533.
- Saylor C., Dadachova E., Casadevall A. (2009): Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine* **27**, G38–G46.
- Scorciapino M.A. a Rinaldi A.C. (2012): Antimicrobial peptidomimetics: reinterpreting nature to deliver innovative therapeutics. *Frontiers in Immunology* **3**, 171.
- Selsted M.E. a Ouellette A.J. (2005): Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* **6**, 551-557.
- Seo M.D., Won H.S., Kim J.H., Mishig-Ochir T., Lee B.J. (2012): Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules* **17**, 12276-12286.
- Shekhter A. B., Solov'eva A. I., Spevak S. E., Titov M. I. (1988): Effects of opioid peptide dalargin on reparative processes in wound healing. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **106**, 487-490.
- Sherrington D. C. (1998): Preparation, structure and morphology of polymer supports. *Chemical Communications* **21**, 2275-2286.
- Schibli D.J., Epand R.F., Vogel H.J., Epand R.M. (2002): Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochemistry and Cell Biology* **80**, 667-677.
- Schneider T., Kruse T., Wimmer R., Wiedemann I., Sass V., Pag U., Jansen A., Nielsen A.K., Mygind P.H., Raventós D.S., Neve S., Ravn B., Bonvin A.M., De Maria L., Andersen A.S., Gammelgaard L.K., Sahl H.G., Kristensen H.H. (2010): Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science* **328**, 1168-1172.
- Silva O.N., Mulder K.C., Barbosa A.E., Otero-Gonzalez A.J., Lopez-Abarrategui C., Rezende T.M., Dias S.C., Franco O.L. (2011): Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology* **2**:232, 1-14.
- Singer A.C., Shaw H., Rhodes V., Hart A. (2016): Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1728.
- Singh P.K., Jia H.P., Wiles K., Hesselberth J., Liu L., Conway B.A., Greenberg E.P., Valore E.V., Welsh M. (1998): Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14961-14966.
- Sockett R.E. a Lambert C. (2004): Bdellovibrio as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology* **2**, 669-675.
- Spellberg B., Srinivasan A., Chambers H.F. (2016): New societal approaches to empowering antibiotic stewardship. *The Journal of the American Medical Association* **315**(12), 1229-1230.
- Staubitz P., Peschel A., Nieuwenhuizen W.F., Otto M., Götz F., Jung G., Jack R.W. (2001): Structure-function relationships in the tryptophan-rich, antimicrobial peptide indolicidin. *Journal of Peptide Science* **7**, 552-564.
- Stec B. (2006): Plant thionins-the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1370-1385.
- Stockert J.C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R.W., Villanueva A. (2012): MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets. *Acta histochemica* **114**, 785-796.
- Strieker M., Tanović A., Marahiel M.A. (2010): Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 234-240.
- Strömstedt A.A., Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. (2009): Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 593-602.
- Sun H., Greathouse D.V., Andersen O.S., Koeppe R.E. (2008): The preference of tryptophan for membrane interfaces: insights from N-methylation of tryptophans in gramicidin channels, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22233-22243.
- Sun J., Xia Y.Q., Li D., Du Q., Liang D. (2014): Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1838**, 2985-2993.

- Takahashi D., Shukla S.K., Prakash O., Zhang G. (2010): Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* **92**, 1236-1241.
- Thevissen K., Kristensen H. H., Thomma B. P., Cammue B. P., Francois I. E. (2007): Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug discovery today* **12**, 966-971.
- Tillotson G.S. a Theriault N. (2013): New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. *F1000Prime Reports* **5**, 51.
- Toke O. (2005): Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* **80**, 717-735.
- Torcato I.M., Huang Y.H., Franquelim H.G., Gaspar D., Craik D.J., Castanho M.A., Troeira Henriques S. (2013): Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**, 944-955.
- Turner J., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I. (1998): Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2206-2214.
- Uppu D.S. a Haldar J. (2016): Lipopolysaccharide neutralization by cationic-amphiphilic polymers through pseudoaggregate formation. *Biomacromolecules* **17**, 862-873.
- Uppu D.S., Manjunath G.B., Yarlagadda V., Kaviyil J.E., Ravikumar R., Paramanandham K., Shome B.R., Haldar J. (2015): Membrane-active macromolecules resensitize NDM-1 gram-negative clinical isolates to tetracycline antibiotics. *PLoS One* **10**, e0119422. doi: 10.1371/journal.pone.0119422.
- Uppu D.S., Samaddar S., Ghosh C., Paramanandham K., Shome B.R., Haldar J. (2016): Amide side chain amphiphilic polymers disrupt surface established bacterial bio-films and protect mice from chronic *Acinetobacter baumannii* infection. *Biomaterials* **74**, 131-143.
- van Dijk A., Molhoek E.M., Bikker F.J., Yu P.L., Veldhuizen E.J., Haagsman H.P. (2011): Avian cathelicidins: paradigms for the development of anti-infectives. *Veterinary Microbiology* **153**, 27-36.
- van 't Hof W., Veerman E.C., Helmerhorst E.J., Amerongen A.V. (2001): Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biological Chemistry* **382**, 597-619.
- Vishnepolsky B., Zaalishvili G., Karapetian M., Nasrashvili T., Kuljanishvili N., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D.E., Tartakovsky M., Grigolava M., Pirtskhalava M. (2019): De Novo Design and In Vitro Testing of Antimicrobial Peptides against Gram-Negative Bacteria. *Pharmaceuticals* **12**, 82.
- Vogel H.J., Schibli D.J., Jing W., Lohmeier-Vogel E.M., Epanand R.F., Epanand R.M. (2002): Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology* **80**, 49-63.
- Vriens K., Cammue B., Thevissen K., (2014): Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules* **19**, 12280-12303.
- Vriens K., Cools T.L., Harvey P.J., Craik D.J., Braem A., Vleugels J., De Coninck B., Cammue B.P., Thevissen K. (2016): The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Peptides* **75**, 71-79.
- Wade D., Boman A., Wählén B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G., Merrifield R.B. (1990): All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* **87**, 4761-4765.
- Waghu F.H., Gopi L., Barai R.S., Ramteke P., Nizami B., Idicula T.S. (2014): CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research* **42**, D1154-D1158.
- Waksman S.A., Schatz A., Reynolds D.M. (2010): Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Antimicrobial Therapeutics Reviews* **1213**, 112-124.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. (1991): High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* **9**, 830-834.
- Wu G., Wu H., Li L., Fan X., Ding J., Li X., Xi T., Shen Z. (2010): Membrane aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **395**, 31-35.

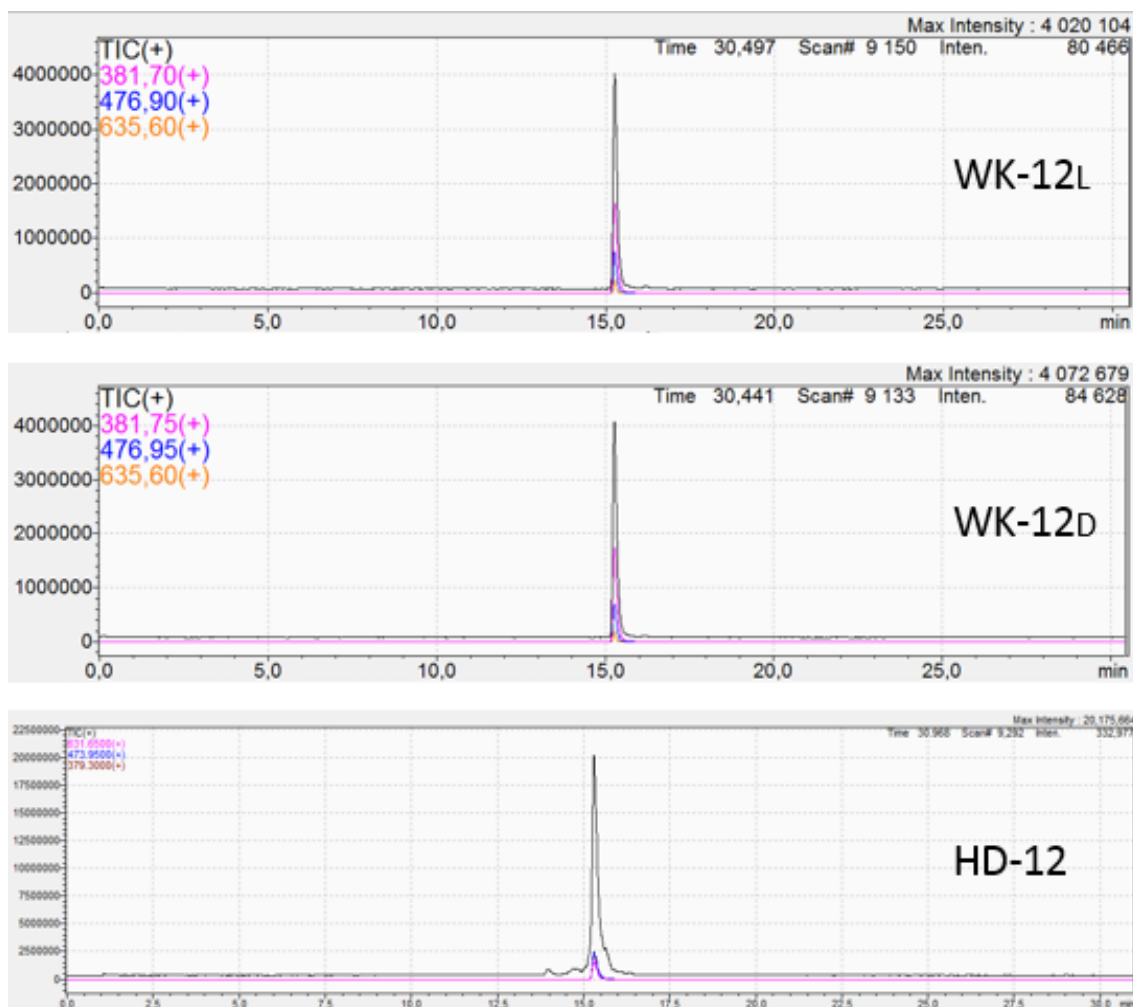
- Wu Xiaozhe, Zhenling Wang, Xiaolu Li, Yingzi Fan, Gu He, Yang Wan, Chaoheng Yu, Jianying Tang, Meng Li, Xian Zhang, Hailong Zhang, Rong Xiang, Ying Pan, Yan Liu, Lian Lu, Li Yan (2014): In Vitro and In Vivo Activities of Antimicrobial Peptides Developed Using an Amino Acid-Based Activity Prediction Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 5342-5349.
- Xia X., Cheng L., Zhang S., Wang L., Hu J. (2018): The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. *Antonie van Leeuwenhoek* **111**, 5-26.
- Xue Y., Xiao H., Zhang Y. (2015): Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 3626-3655.
- Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J. (2004): Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology* **22**, 181-215.
- Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J. (2002): Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends in Immunology* **23**, 291-296.
- Yang D., Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J., Chertov O. (2000): LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1069-1074.
- Yang S.CH., Lin CH.H., Sung T. C., Fang J.-Y. (2014): Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* **5**, 1-8.
- Yeaman M.R. a Yount N.Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55.
- Yount N.Y. a Yeaman M.R. (2005): Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein & Peptide Letters* **12**, 49-67.
- Yu H., Cai S., Gao J., Zhang S., Lu Y., Qiao X., Yang H., Wang Y. (2013): Identification and polymorphism discovery of the cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (*Limnonectes fragilis*). *FEBS journal* **280**, 6022-6032.
- Zaiou M., Nizet V., Gallo R.L. (2003): Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *Journal of Investigative Dermatology* **120**, 810-816.
- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **24**, 389-395.
- Zhang L.J. a Gallo R.L. (2016): Antimicrobial peptides. *Current Biology* **26**, R14-R19.
- Zhang S.K., Song J.W., Gong F., Li S.B., Chang H.Y., Xie H.M., Gao H.W., Tan Y.X., Ji S.P. (2016): Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific reports* **8**; 6:27394.
- Zhang Y.M. a Rock C.O. (2009): Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *The Journal of Lipid Research* **50**, S115-S119.
- Zhu M., Liu P., Niu Z.W. (2017): A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chemical Letters* **28**, 703-708.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

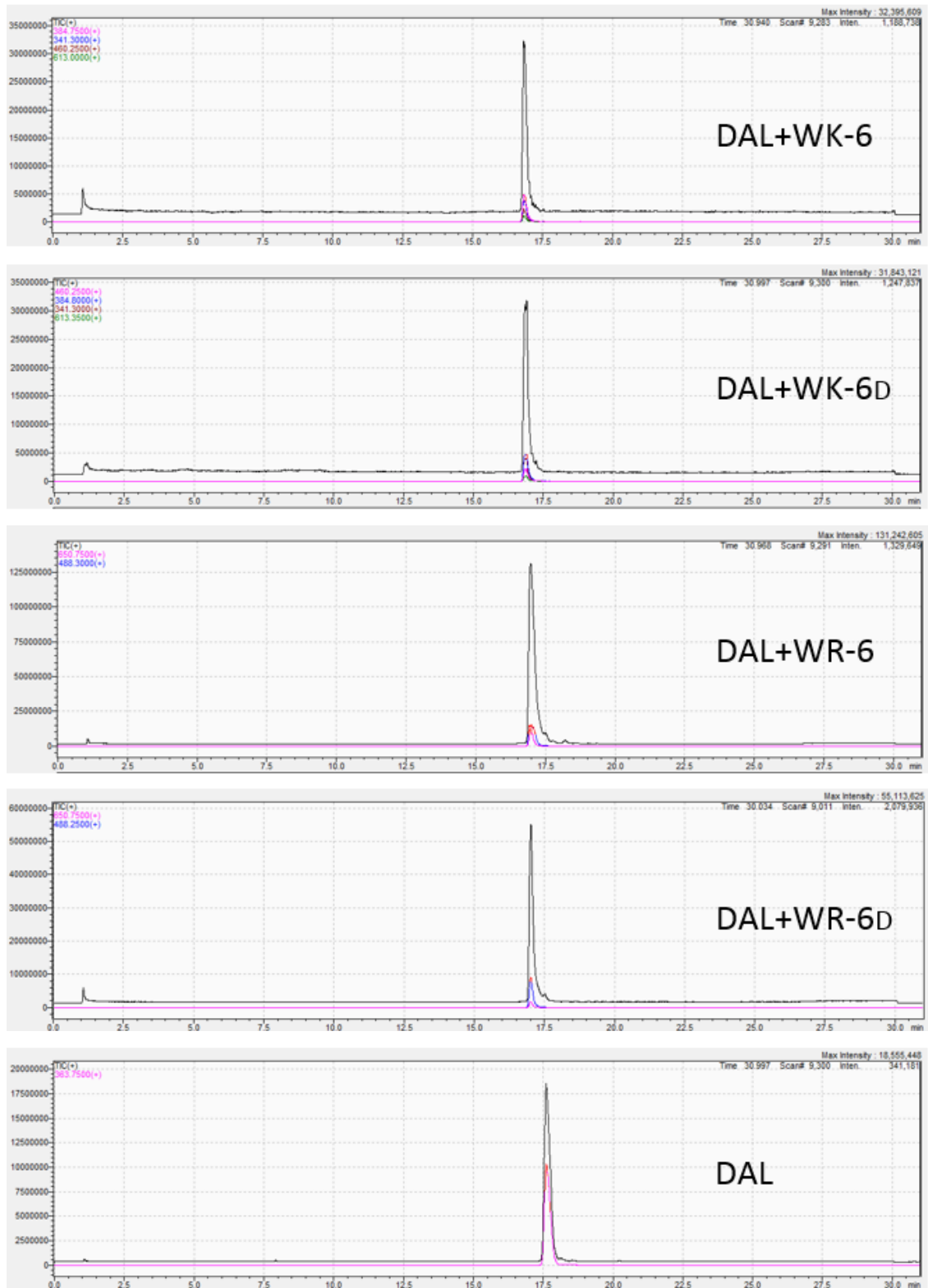
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
AK	aminokyselina
AmBic	hydrogenuhlčitan amonný
AML	antimikrobiální látky
AMP	antimikrobiální peptid(y)
AMR	antimikrobiální rezistence
ATB	antibiotika
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
BSA	hovězí sérový albumin
CD	cirkulární dichroismus
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-(dimethyl)aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Fmoc	9-fluorenylmethyloxykarbonyl
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium-hexafluorofosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL-1	interleukin 1
IPA	isopropylalkohol
IS	vnitřní standard
KCN	kyanid draselný
LC	kapalinová chromatografie
LPS	lipopolysacharidy
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MBEC	minimum biofilm eradication concentrations
MHC	minimální hemolytická koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace

MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	methyl-thiazol tetrazolium
NRP	ne-ribozomální peptidy
NRPS	ne-ribozomální peptidové syntetasy
OxymaPure®	ethyl-(hydroxyimino)kyanoacetát
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	fosfátový pufr
Pmc	3,4-dihydro-2,2,5,7,8-pentamethyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-6-sulfonyl
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SOS	„Save Our Souls“
SPPS	syntéza peptidu na pevné fázi (solid phase peptide synthesis)
SPR	povrchová plasmonová rezonance (surface plasmon resonance)
subsp.	subspecies
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TFA	kyselina trifluoroctová
TFE	2,2,2-trifluorethanol
TNF α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)
Trt	trityl
TSA	tryptický sójový agar (tryptic soy agar)
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
ϵ Ahx	kyselina 6-aminohexanová

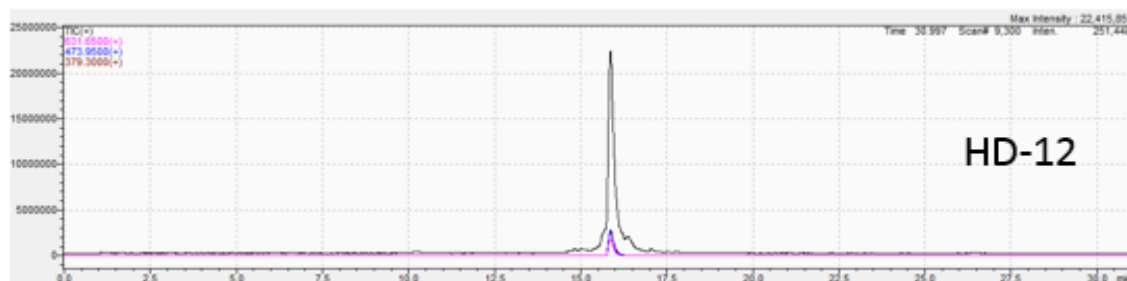
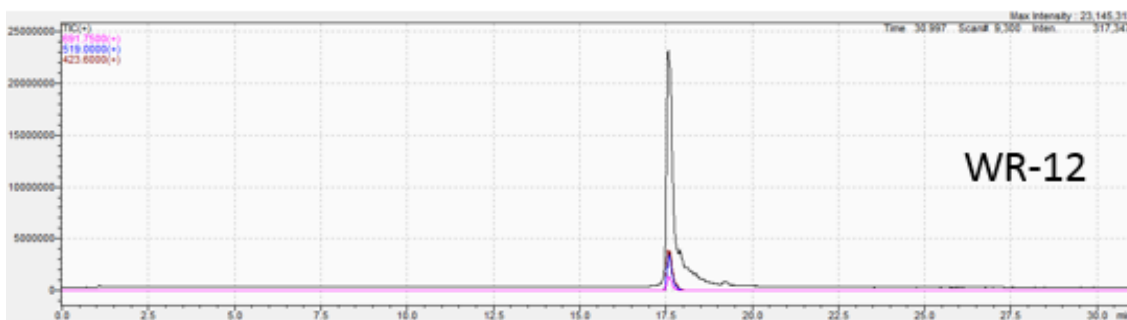
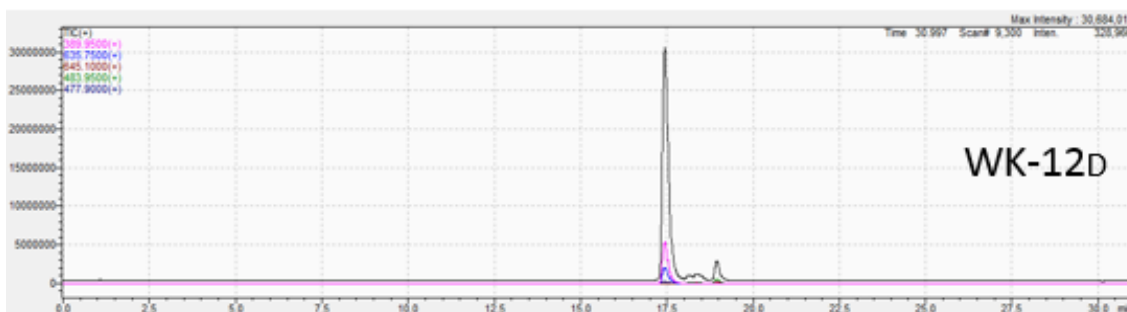
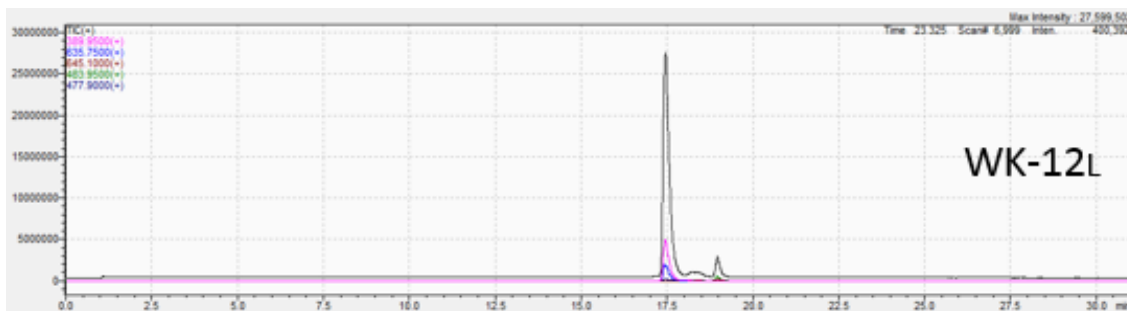
9 PŘÍLOHY



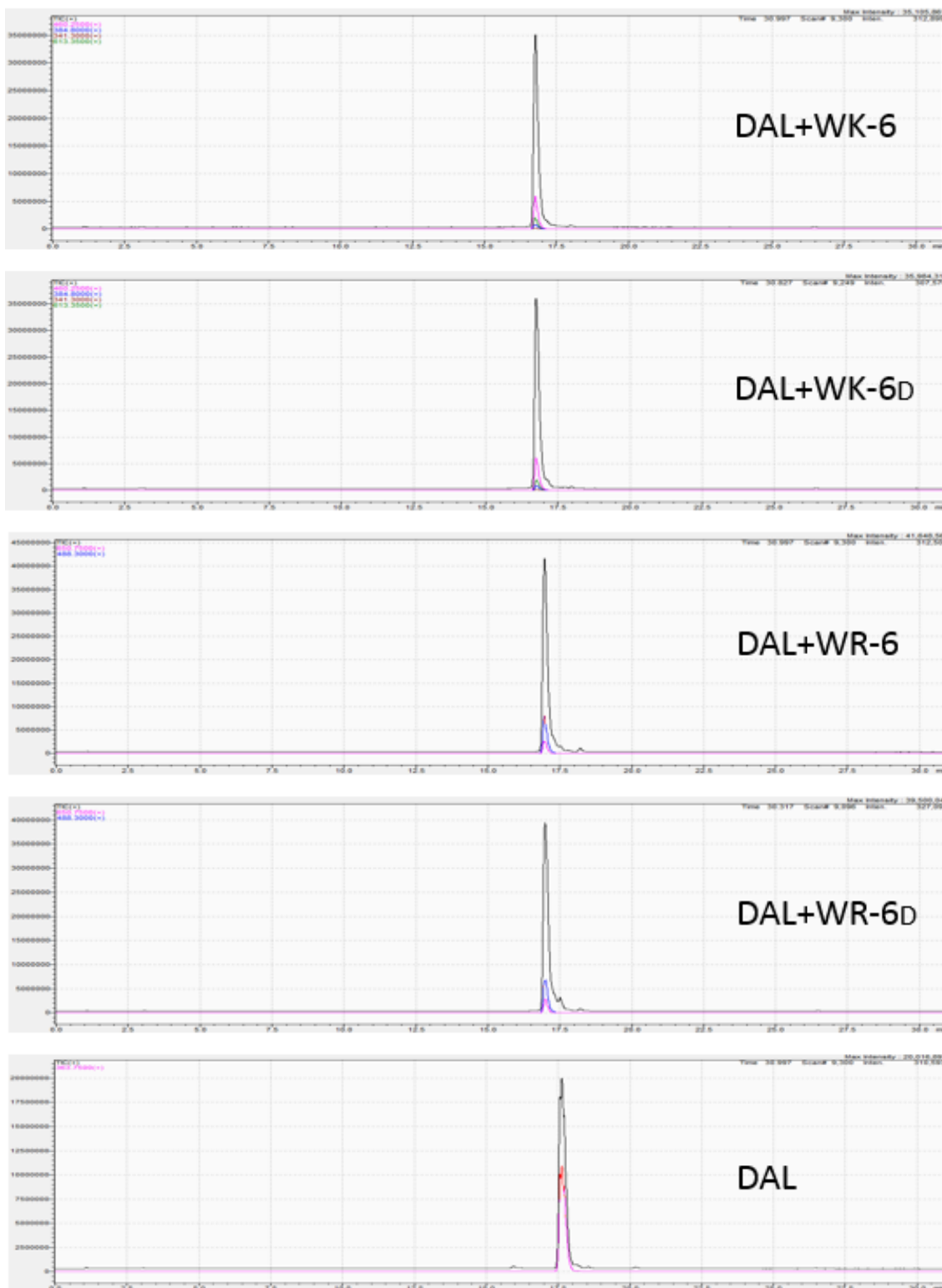
Obr. P1 Chromatogramy peptidů WK-12L, WK-12D a HD-12 získané při purifikaci na systému HPLC/MS. Nalezené hodnoty M_w (vznačeny barevně) odpovídají n-násobně nabitým fragmentům.



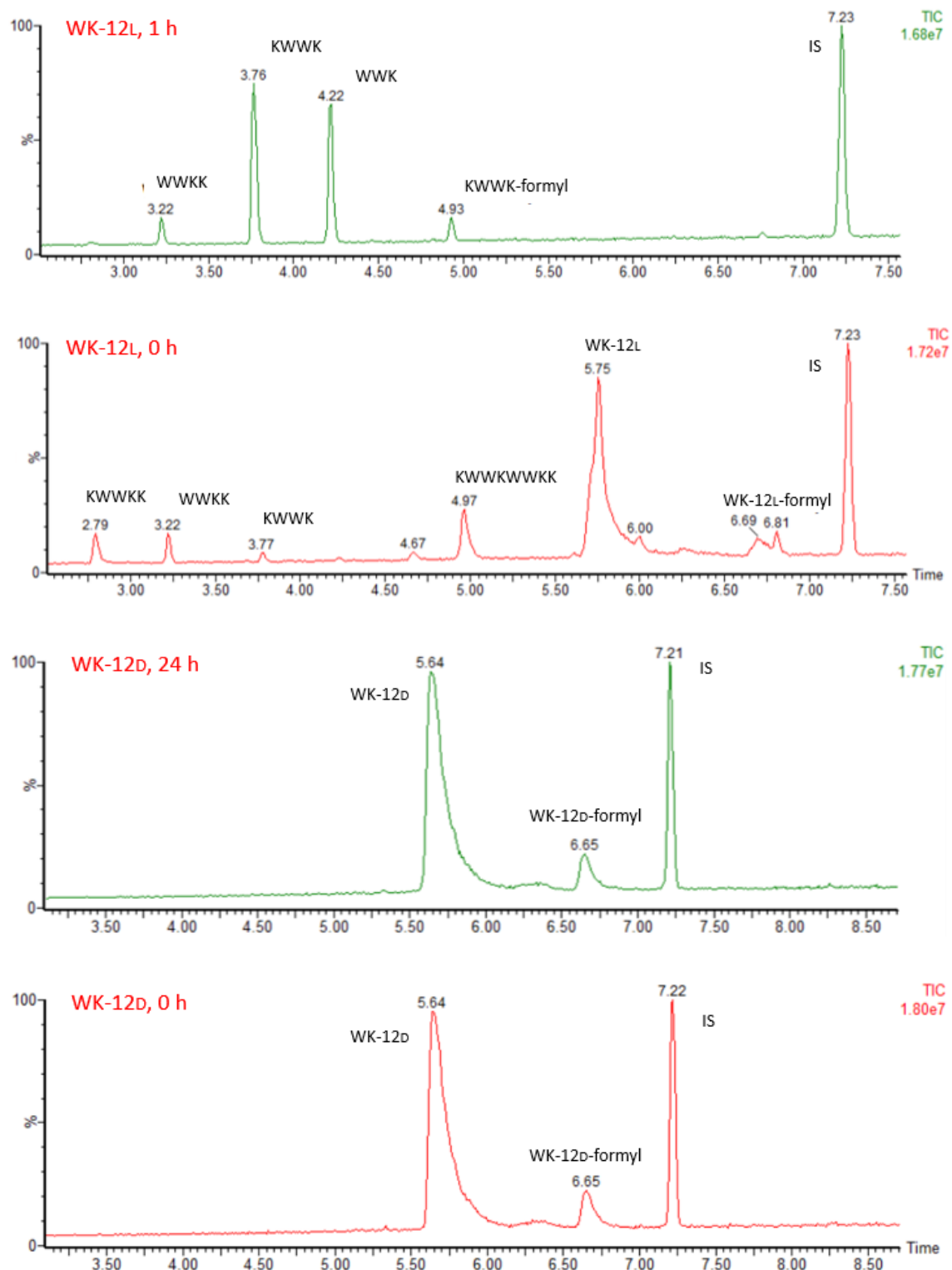
Obr. P2 Chromatogramy peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL získané při purifikaci na systému HPLC/MS. Nalezené hodnoty M_w (vyznačeny barevně) odpovídají n- násobně nabitým fragmentům.



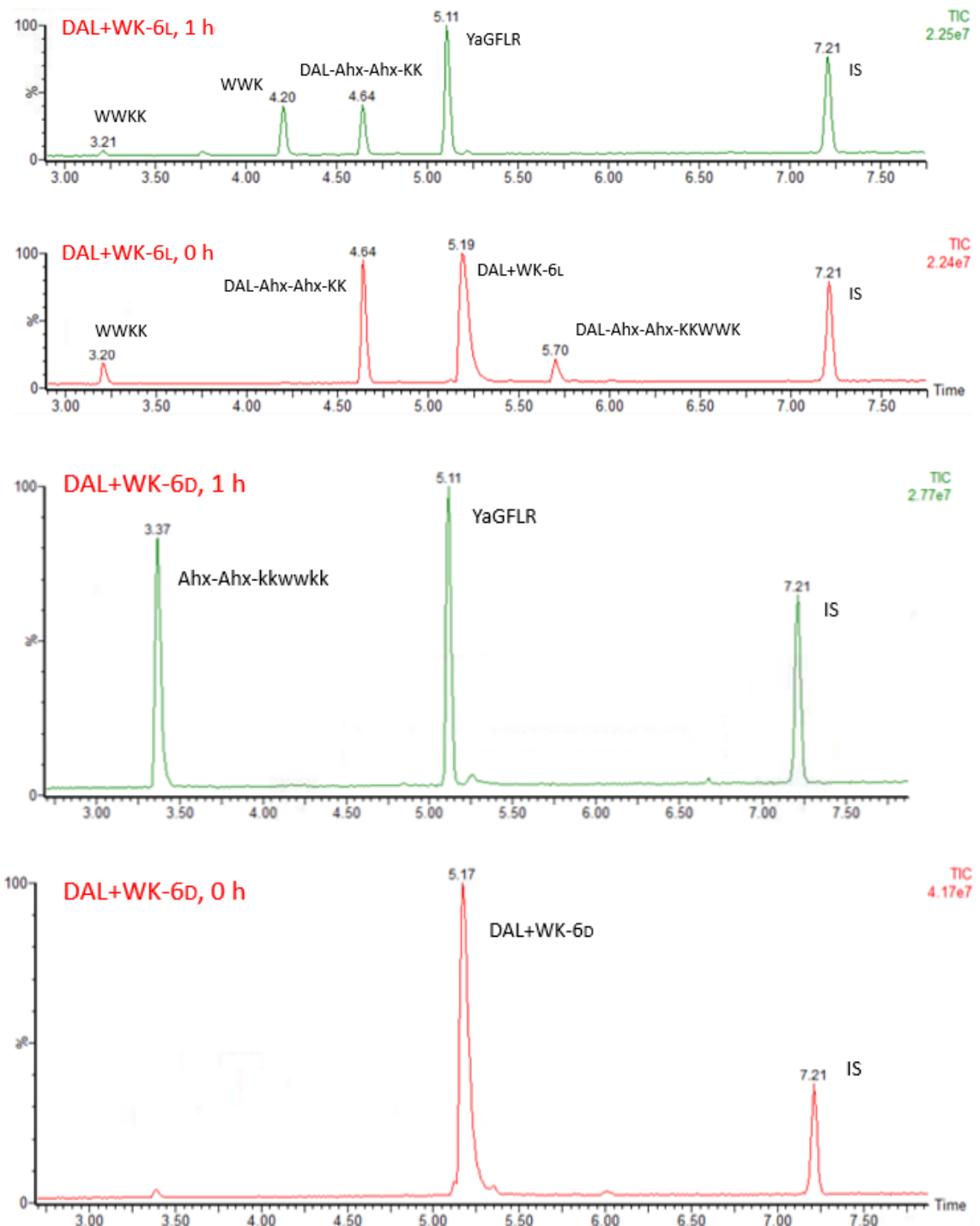
Obr. P3 Chromatogramy WK-12L, WK-12D, WR-12 a HD-12 získané při ověřování čistoty antimikrobiálních peptidů na systému HPLC/MS. Nalezené hodnoty M_w (vyznačeny barevně) odpovídají n-násobně nabitým fragmentům.



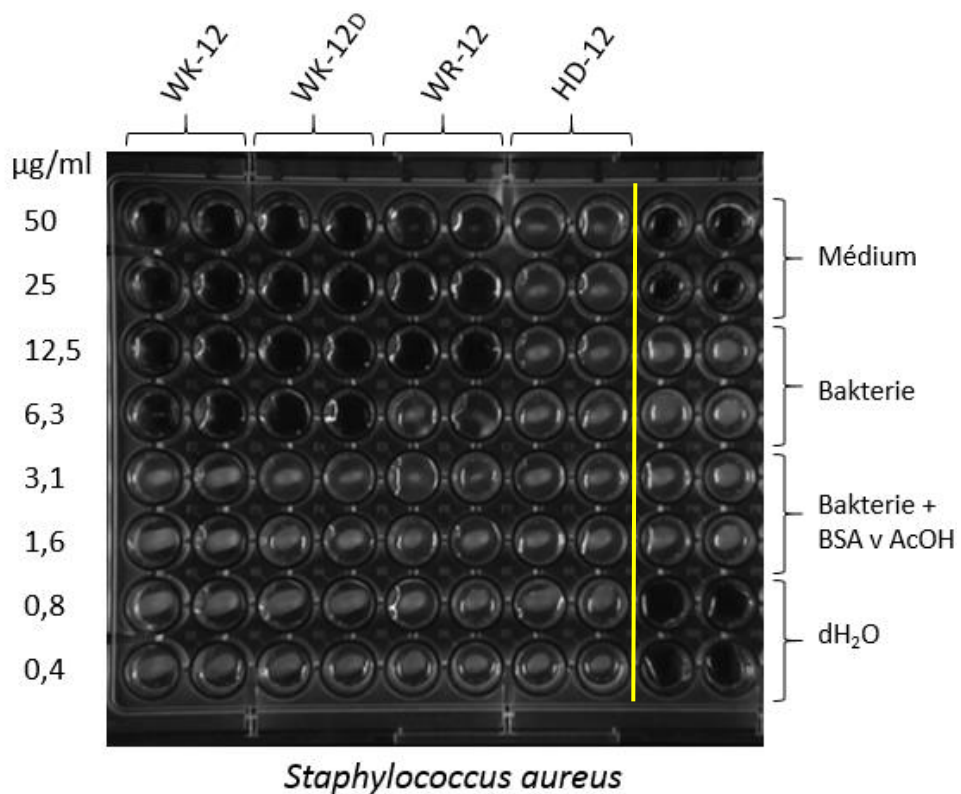
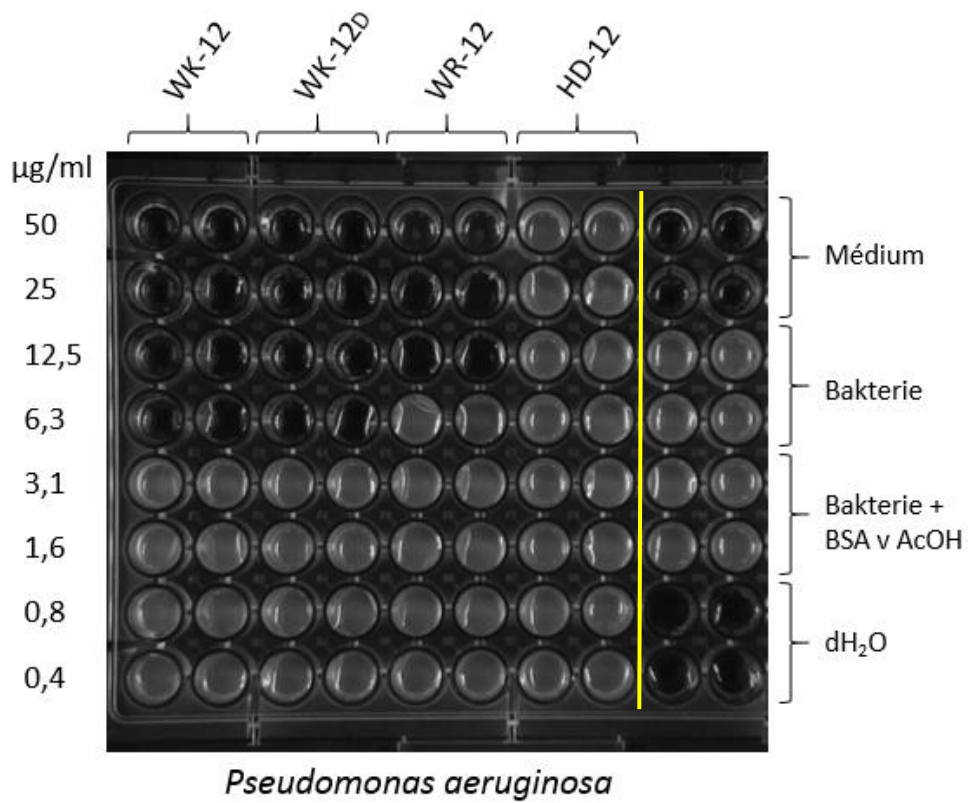
Obr. P4 Chromatogramy DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL získané při ověřování čistoty antimikrobiálních peptidů na systému HPLC/MS. Nalezené hodnoty M_w (vyznačeny barevně) odpovídají n-násobně nabitým fragmentům.



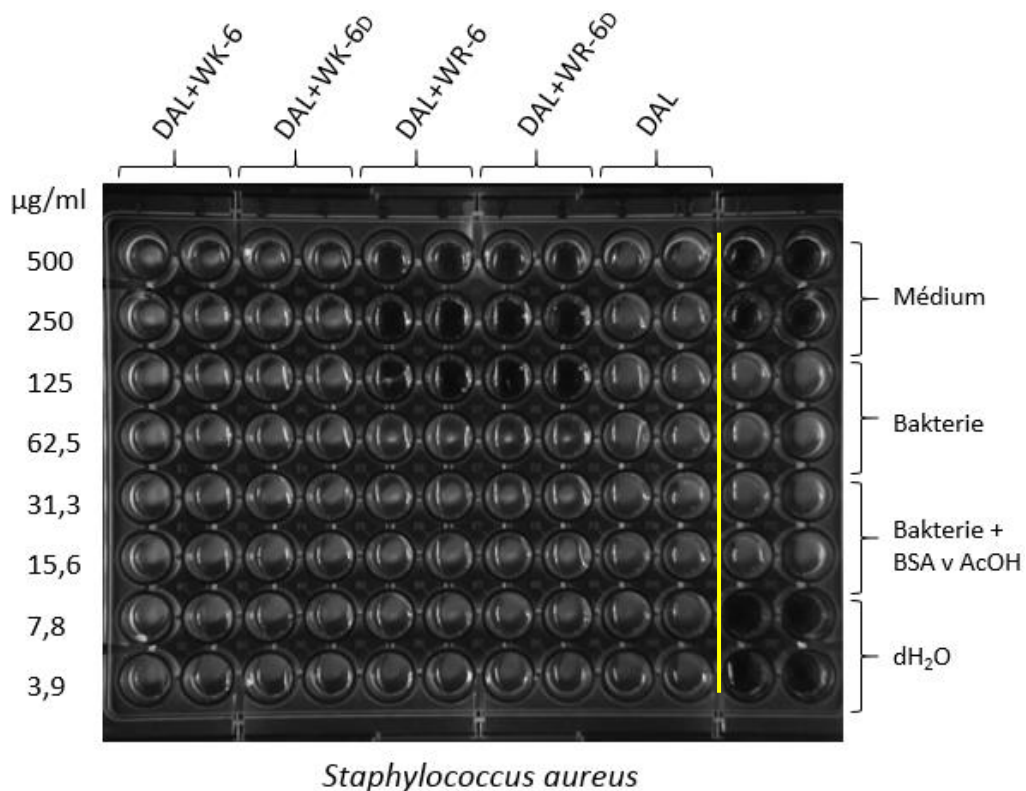
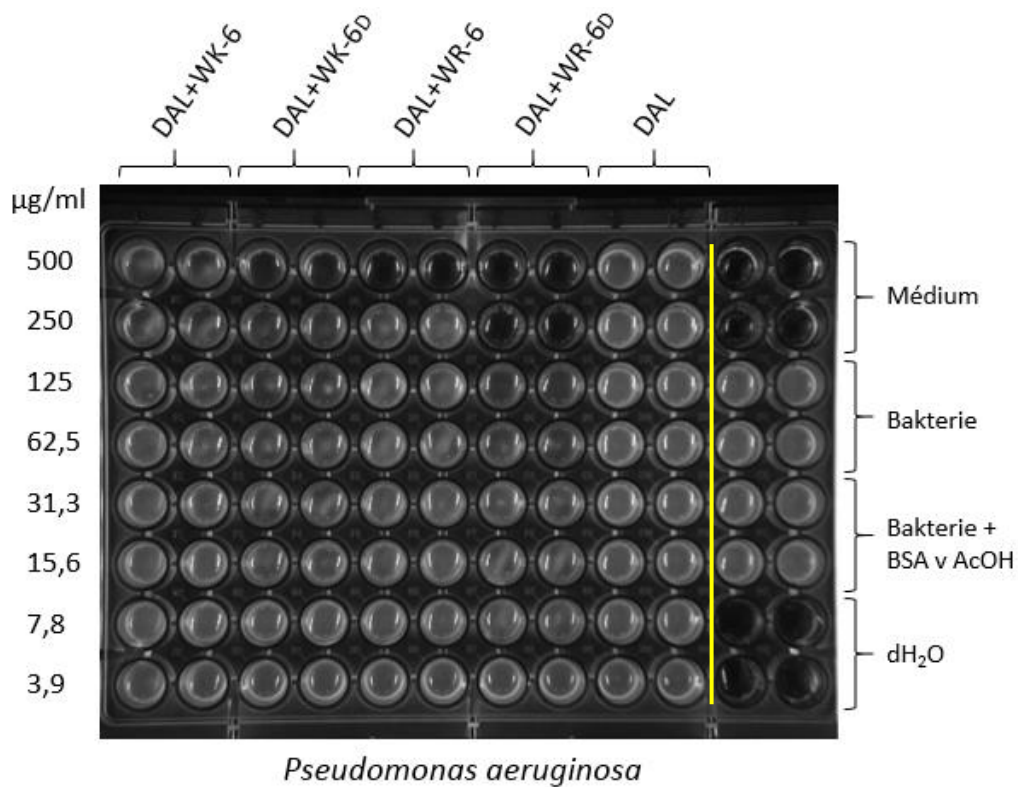
Obr. P5 Příklady chromatogramů peptidů WK-12 a WK-12D ze stanovení proteolytické stability. Červeně jsou označeny peptidy a čas odběru vzorku. IS – vnitřní standard. Každý fragment byl identifikován na základě fragmentačního spektra.



Obr. P6 Příklady chromatogramů peptidů DAL+WK-6 a DAL+WK-6D ze stanovení proteolytické stability. Červeně jsou označeny peptidy a čas odběru vzorku. IS – vnitřní standard. Každý fragment byl identifikován na základě fragmentačního spektra.

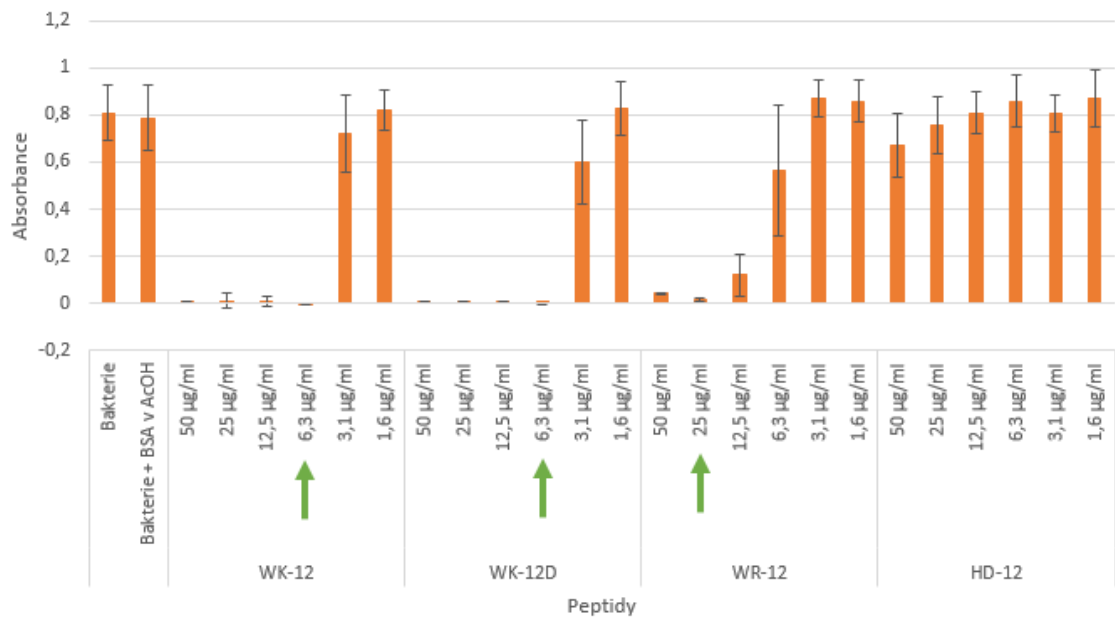


Obr. P7 Příklady fotografií destiček s různými koncentracemi ($\mu\text{g/ml}$) peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12 při mikrodilučním testu antimikrobiální aktivity. Horní panel obsahuje jako bakteriální suspenzi bakterii *P. aeruginosa* a spodní panel *S. aureus*.

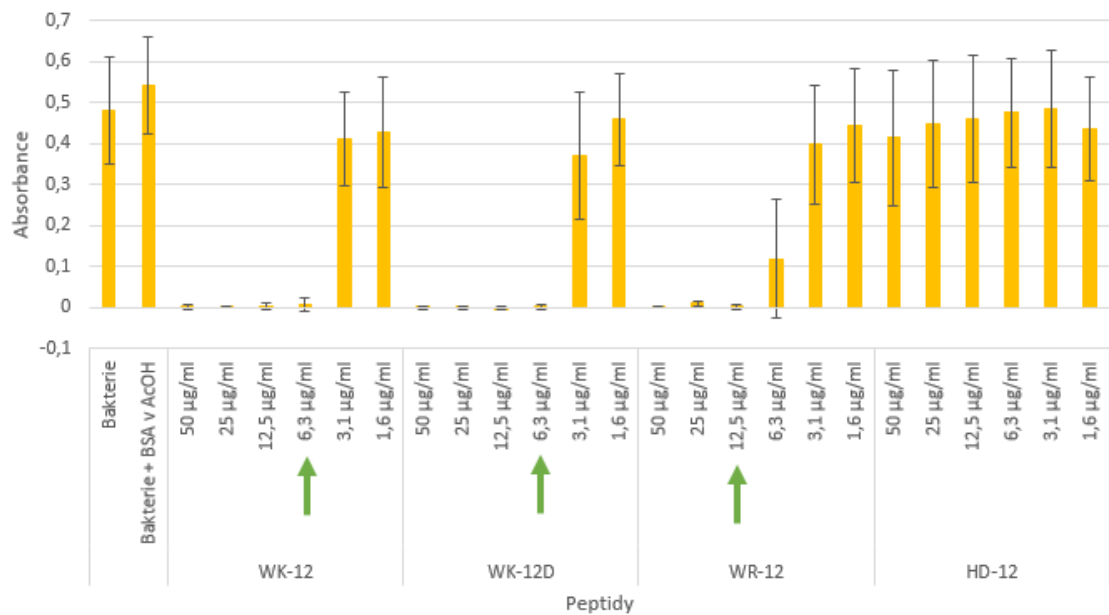


Obr. P8 Příklady fotografií destiček s různými koncentracemi ($\mu\text{g/ml}$) peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL při mikrodilučním testu antimikrobiální aktivity. Horní panel obsahuje jako bakteriální suspenzi bakterii *P. aeruginosa* a spodní panel *S. aureus*.

MIC *P.a.* WK-12, WK-12D, WR-12, HD-12

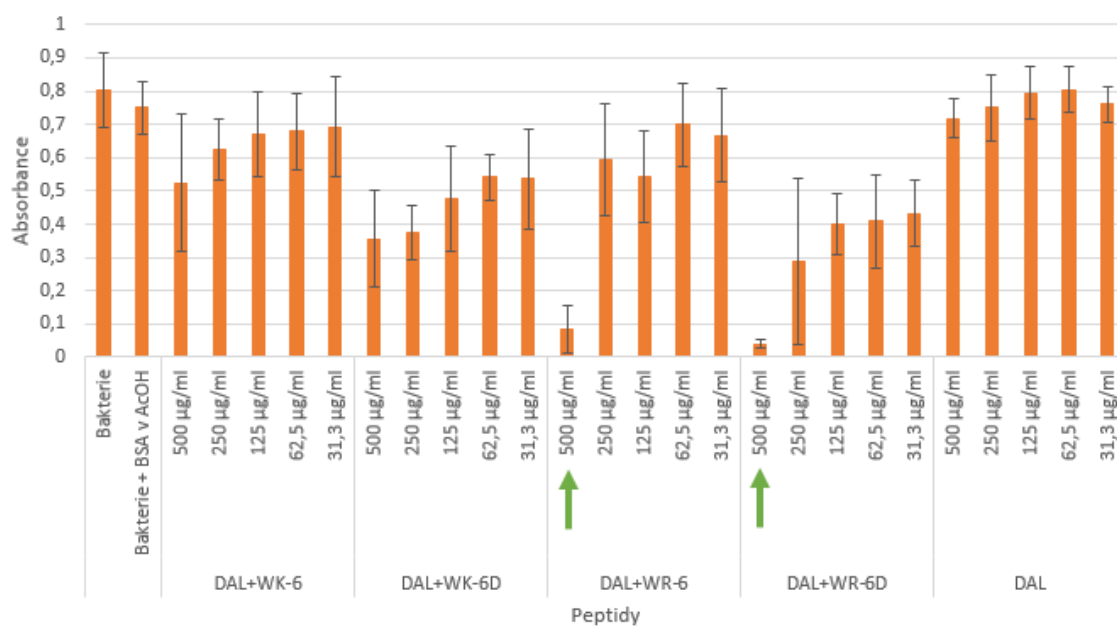


MIC *S.a.* WK-12, WK-12D, WR-12, HD-12

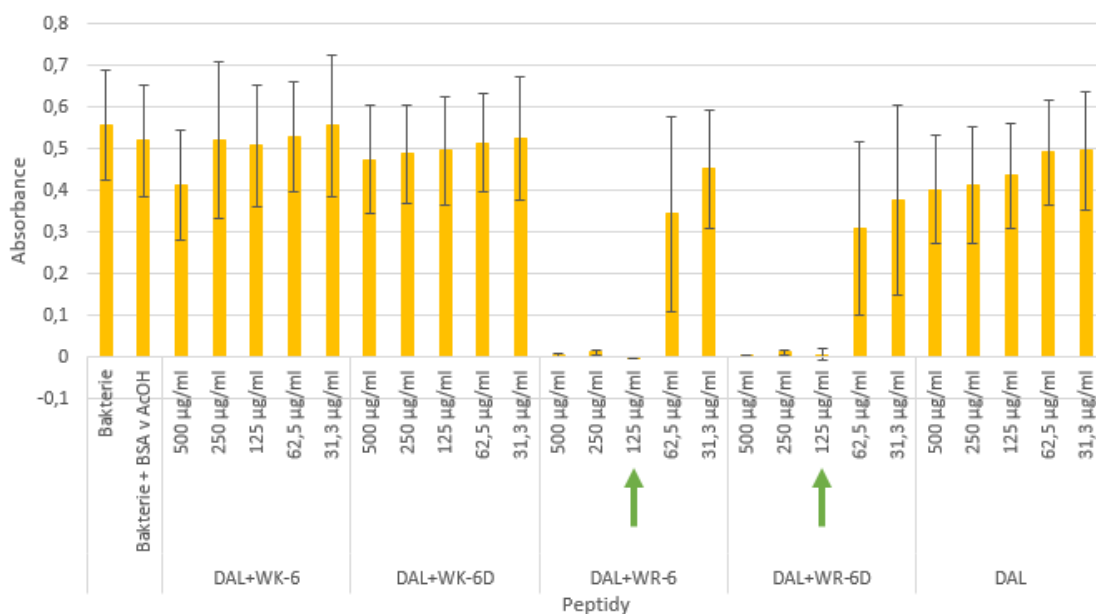


Obr. P9 Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) s různými koncentracemi (µg/ml) peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12. MIC je označena zelenou šipkou. Horní graf odpovídá výsledkům naměřeným s *P. aeruginosa* a spodní graf výsledkům získaným se *S. aureus*. Sloupce označují průměr ± SD pěti nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.

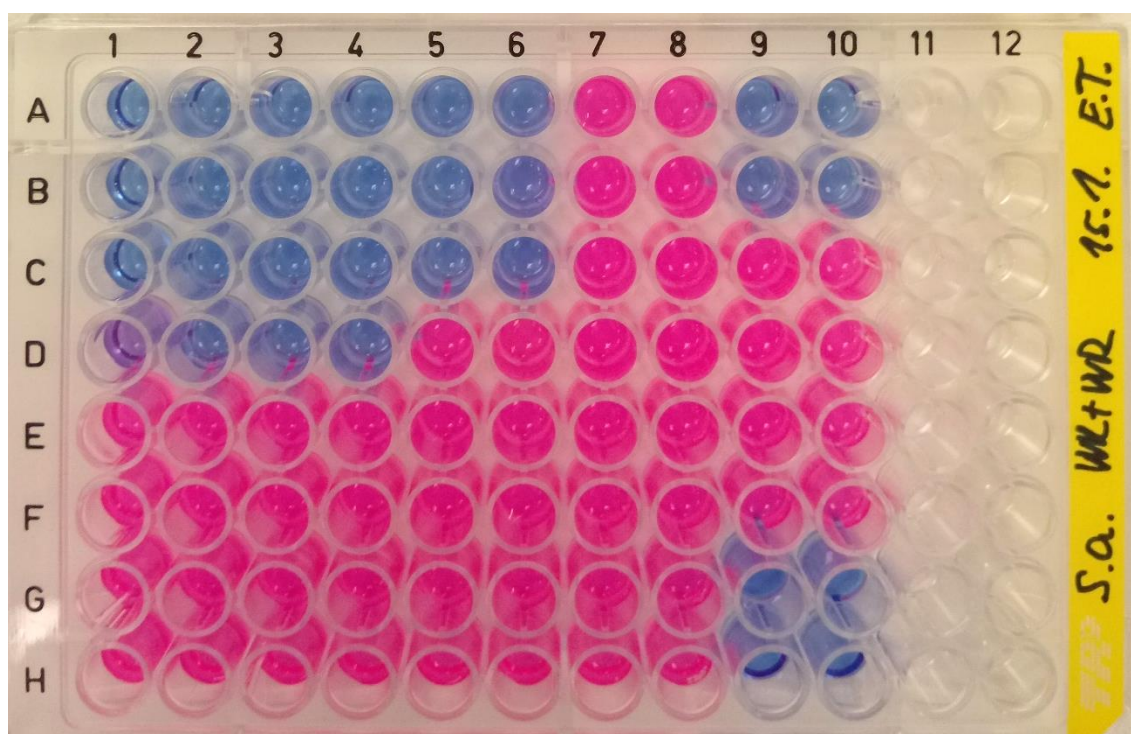
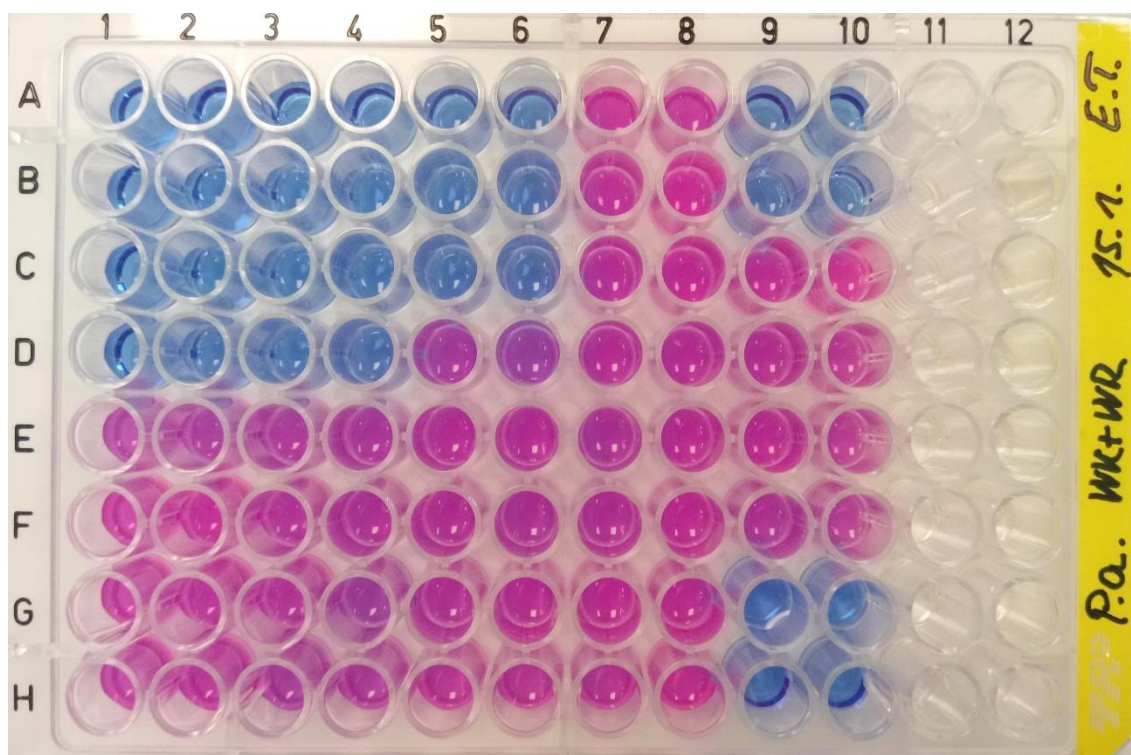
MIC *P.a.* DAL + konjugáty



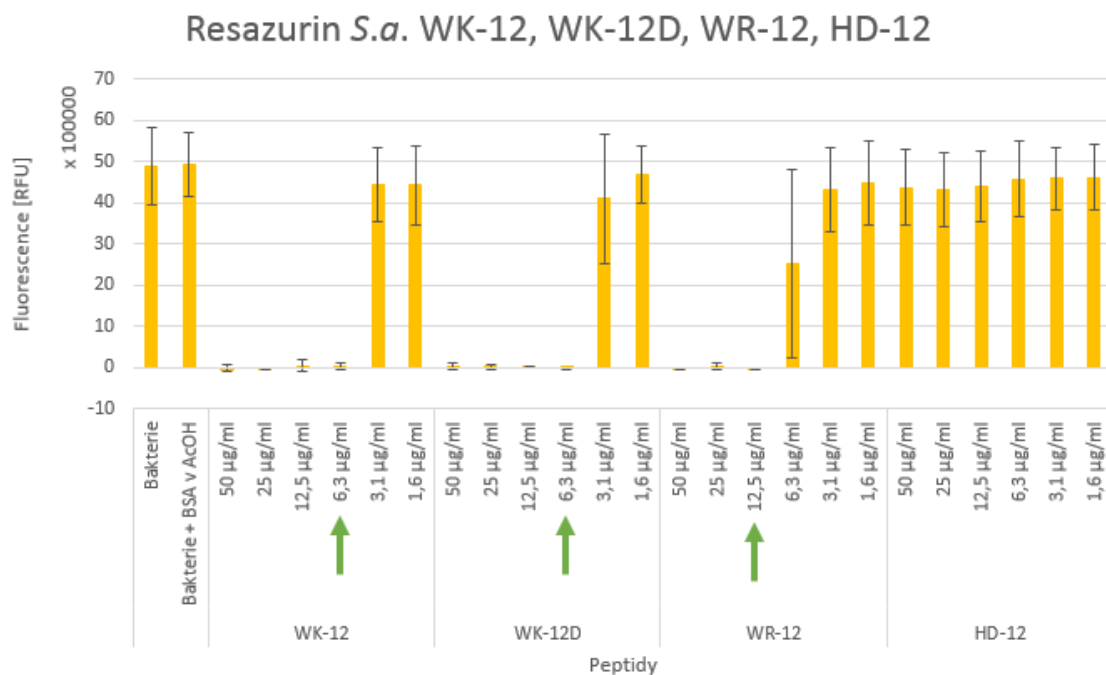
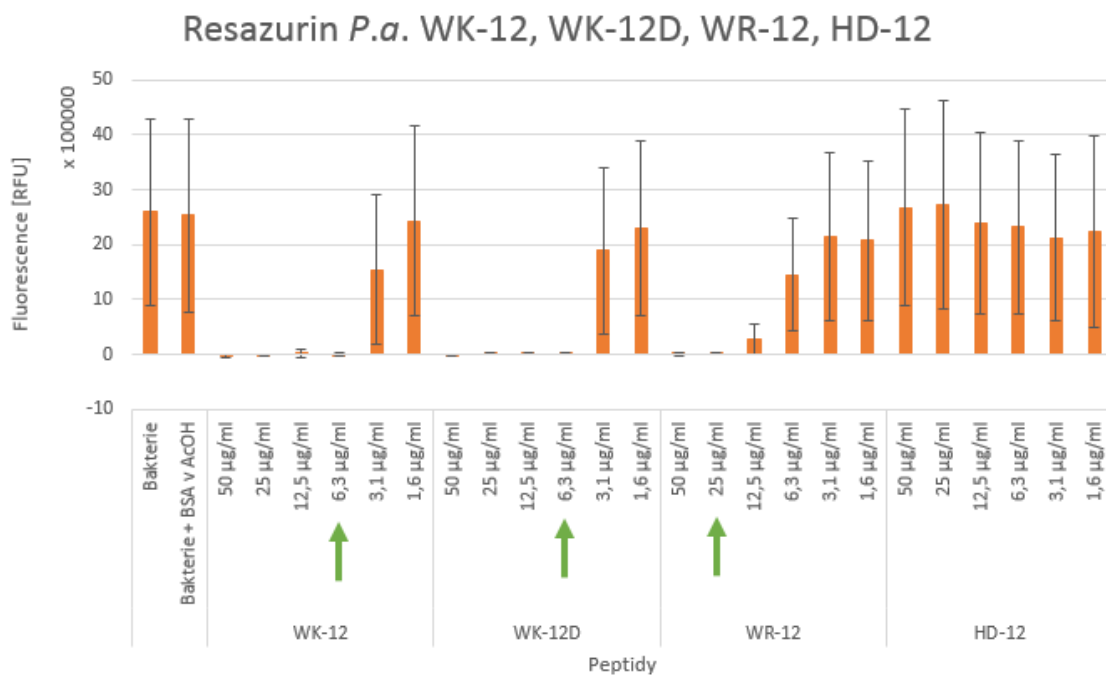
MIC *S.a.* DAL + konjugáty



Obr. P10 Stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) s různými koncentracemi (µg/ml) peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL. MIC je označena zelenou šipkou. Horní graf odpovídá výsledkům naměřeným s *P. aeruginosa* a spodní graf výsledkům získaným se *S. aureus*. Sloupce označují průměr ± SD pěti nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.

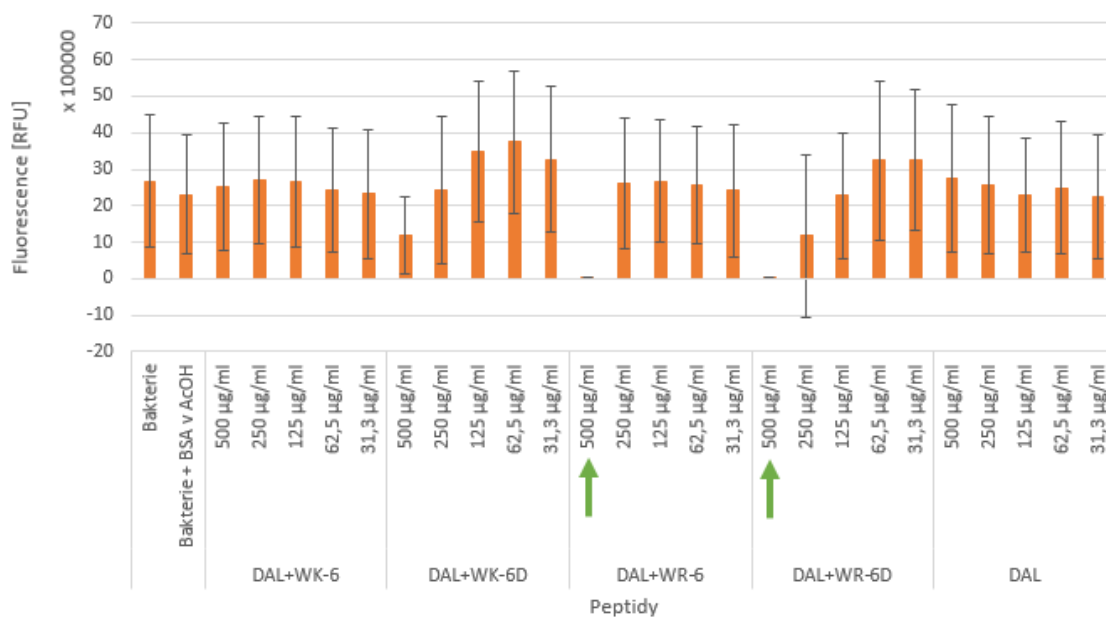


Obr. P11 Barvení pomocí resazurinu pro stanovení viability buněk při mikrodilučním testu antimikrobiální aktivity. Fialové či růžové zbarvení signalizuje přítomnost živých buněk. Horní panel obsahuje *P. aeruginosa* a spodní panel *S. aureus*.

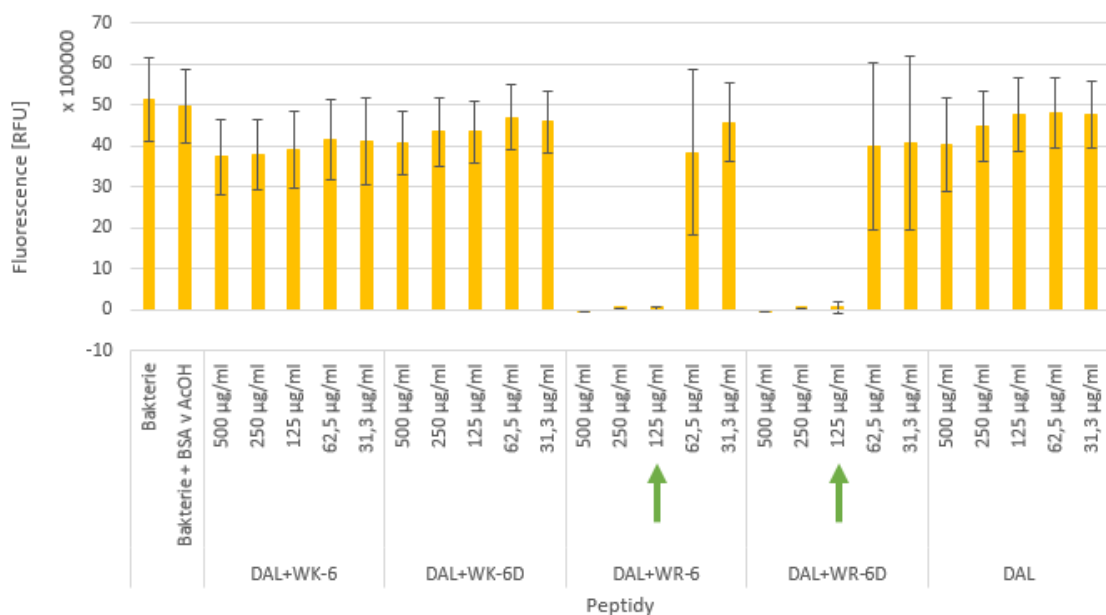


Obr. P12 Výsledky měření po barvení resazurinem u peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je označena zelenou šipkou. Horní graf odpovídá výsledkům naměřeným s *P. aeruginosa* a spodní graf výsledkům získaným se *S. aureus*. Sloupce označují průměr ± SD pěti nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.

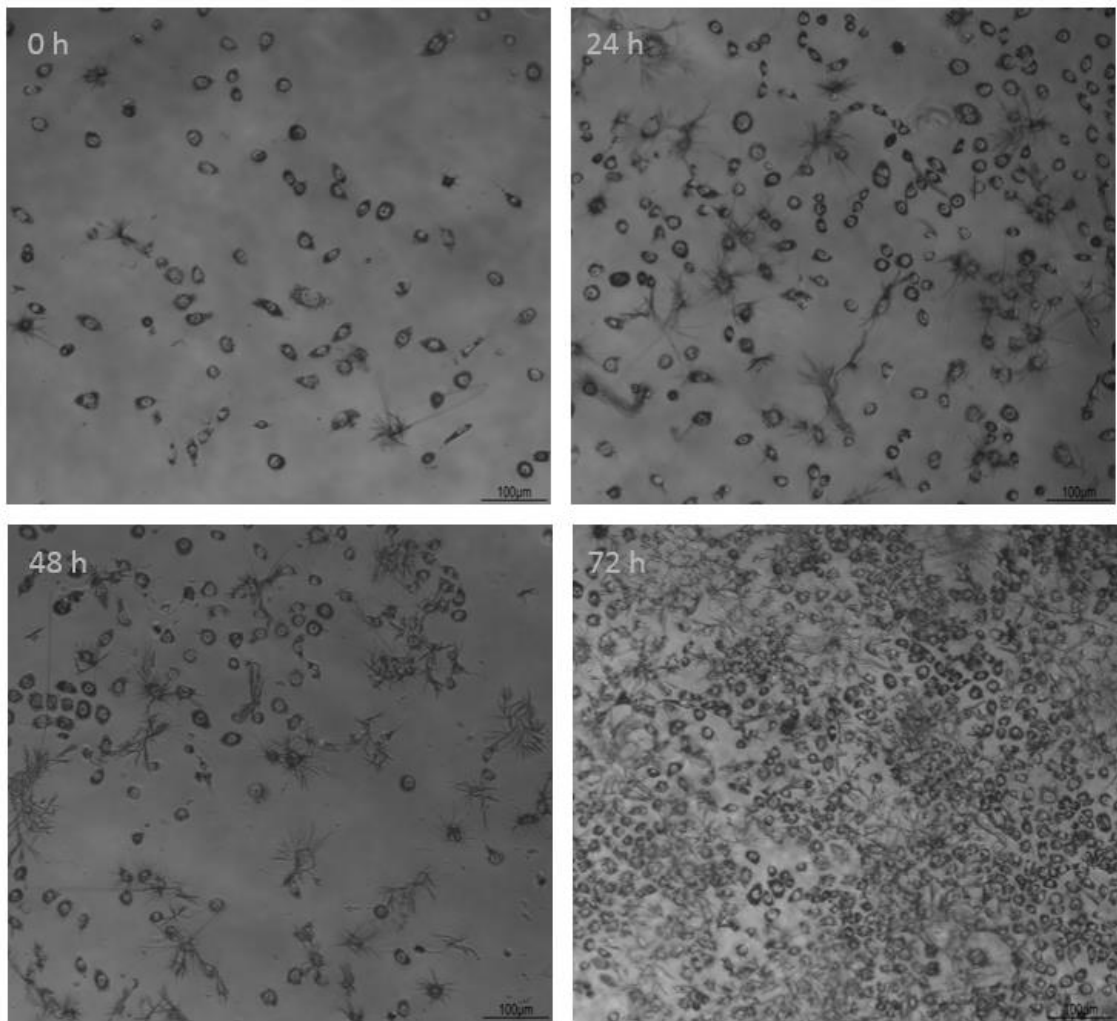
Resazurin *P.a.* DAL + konjugáty



Resazurin *S.a.* DAL + konjugáty

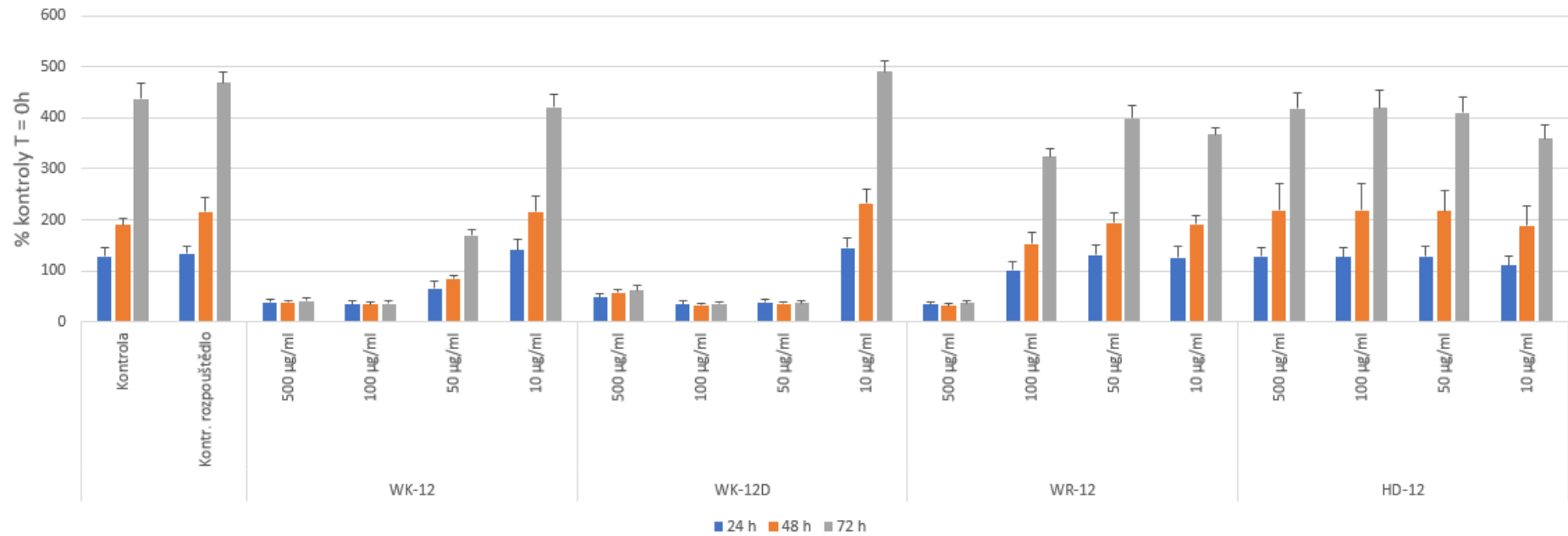


Obr. P13 Výsledky měření po barvení resazurinem u peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je označena zelenou šipkou. Horní graf odpovídá výsledkům naměřeným s *P. aeruginosa* a spodní graf výsledkům získaným se *S. aureus*. Sloupce označují průměr ± SD pěti nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány v dubletu.

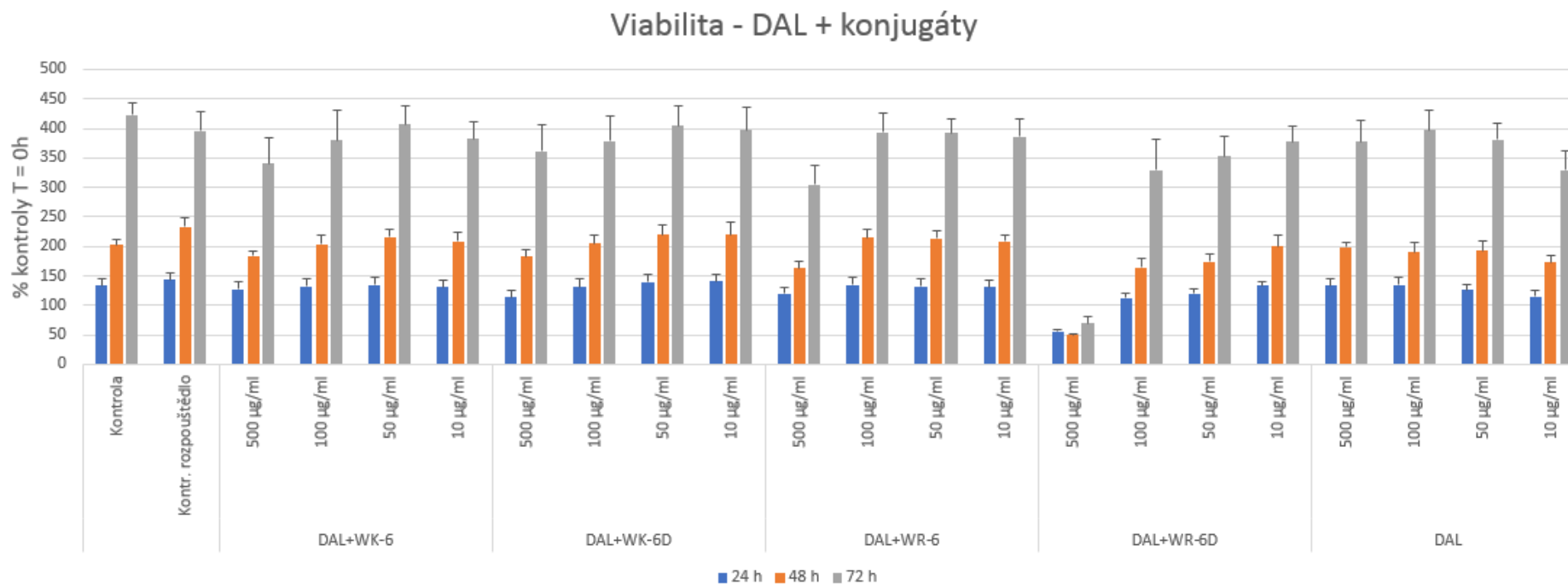


Obr. P14 Kontrolní buňky 3T3 myších dermálních fibroblastů po 2,5 h inkubaci s MTT v různých časech po pasážování a nasazení buněk při testech cytotoxicity. Tmavě zbarvený je nerozpustný formazan tvořící se v buňkách. Všechny snímky jsou pořízeny při stejném zvětšení, měřítko 100 µm.

Viabilita - WK-12, WK-12D, WR-12, HD-12

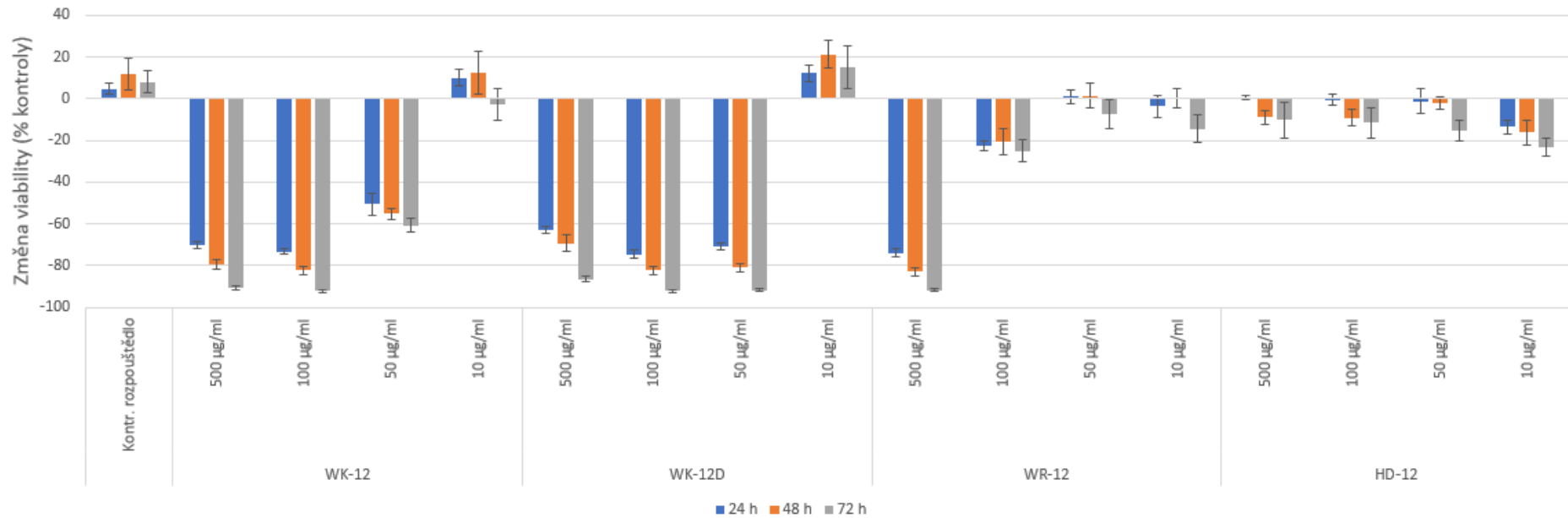


Obr. P15 Výsledky stanovení viability buněk po ošetření různými koncentracemi peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12 vztažené ke kontrole odebrané v čase T0. Sloupce označují průměr ± SD dvou nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány při každém měření u 3 šarží buněk v tripletu.



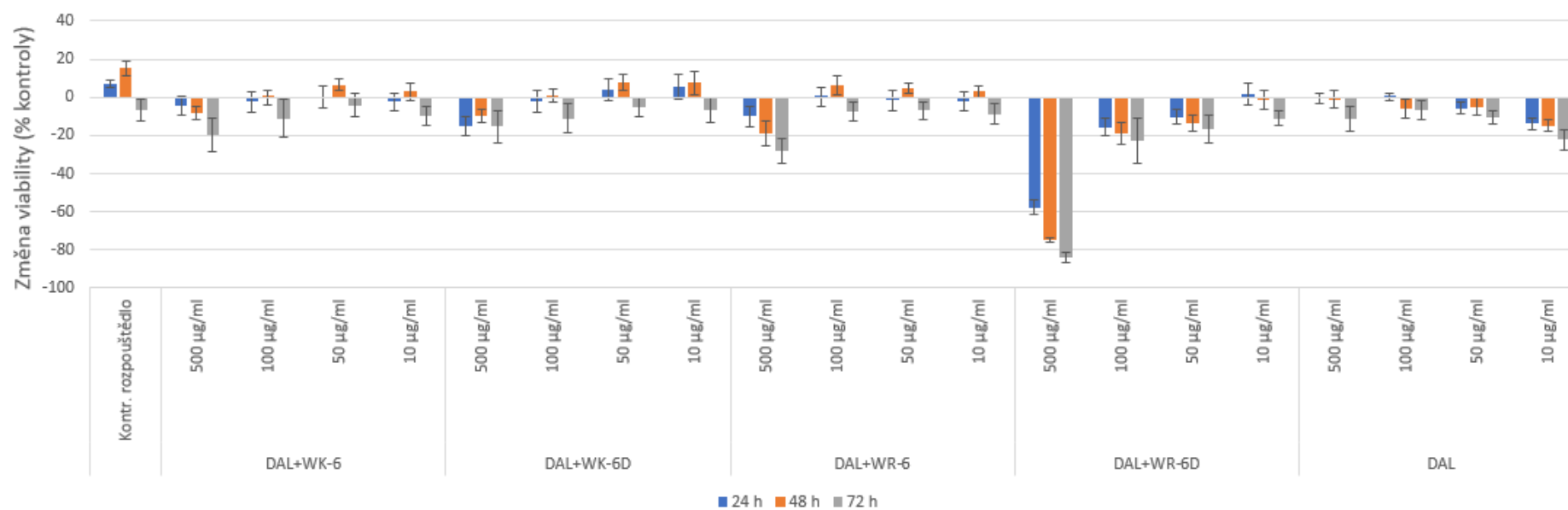
Obr. P16 Výsledky stanovení viability buněk po ošetření různými koncentracemi peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL vztažené ke kontrole odebrané v čase T0. Sloupce označují průměr ± SD dvou nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány při každém měření u 3 šarží buněk v tripletu.

Aktivace / inhibice 3T3 - WK-12, WK-12D, WR-12, HD-12

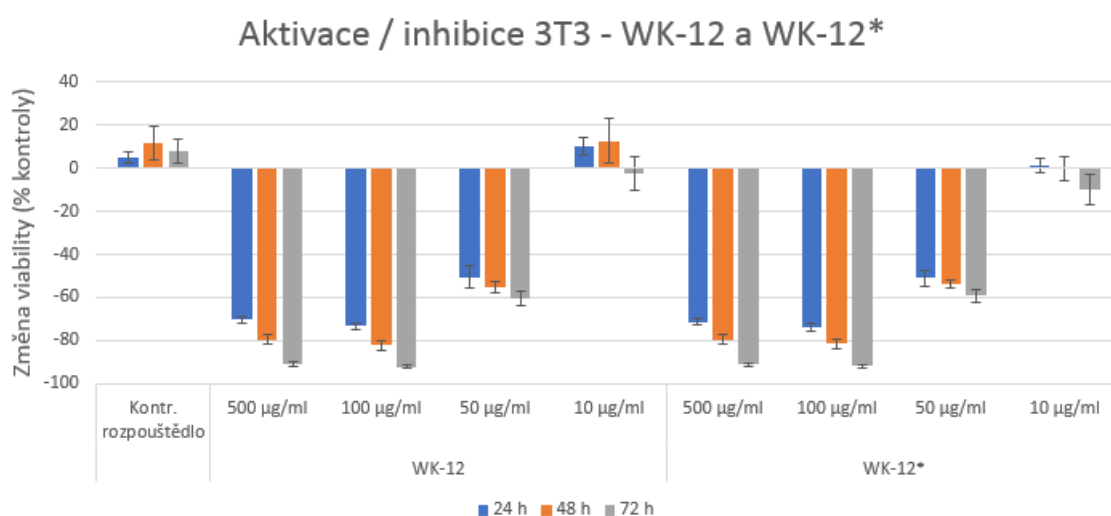
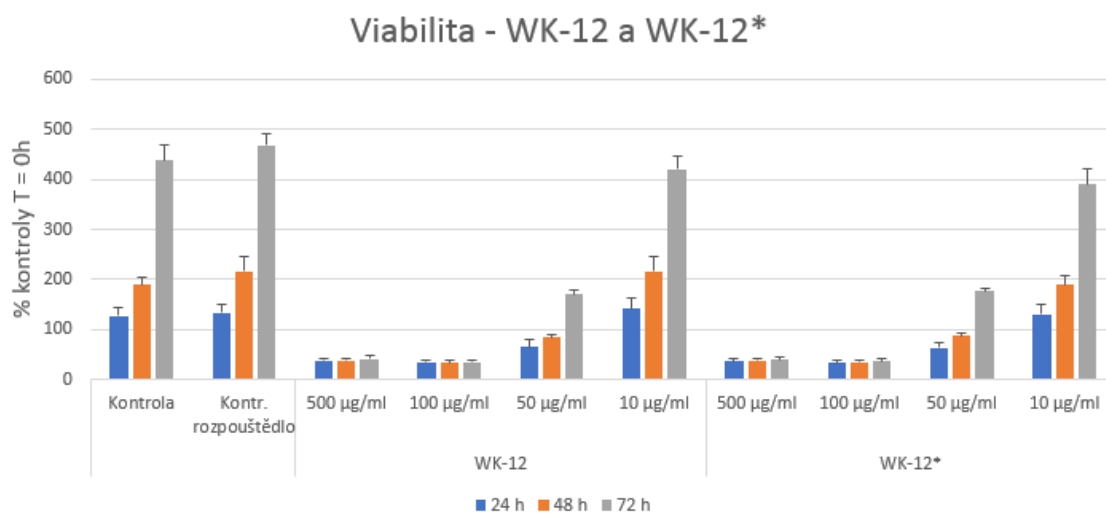


Obr. P17 Výsledky stanovení aktivace/inhibice buněk po ošetření různými koncentracemi peptidů WK-12, WK-12D, WR-12 a HD-12 vztažené k růstu kontrolních buněk. Sloupce označují průměr ± SD dvou nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány při každém měření u 3 šarží buněk v tripletu.

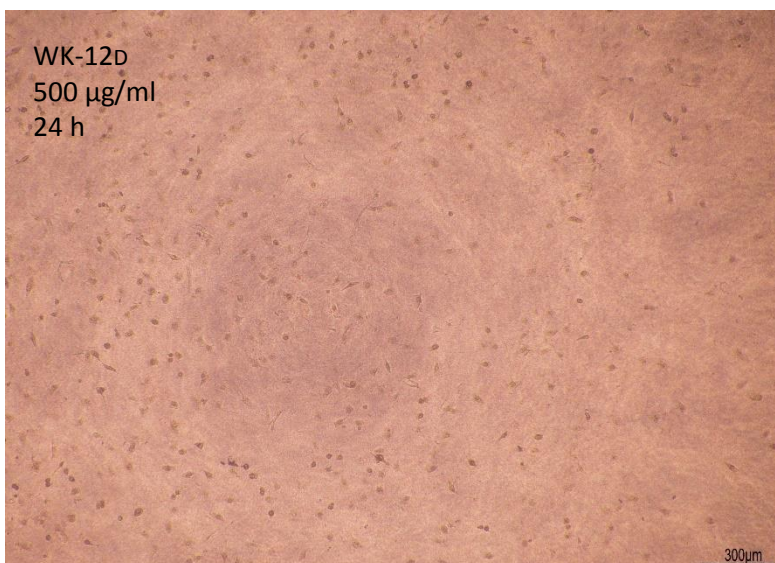
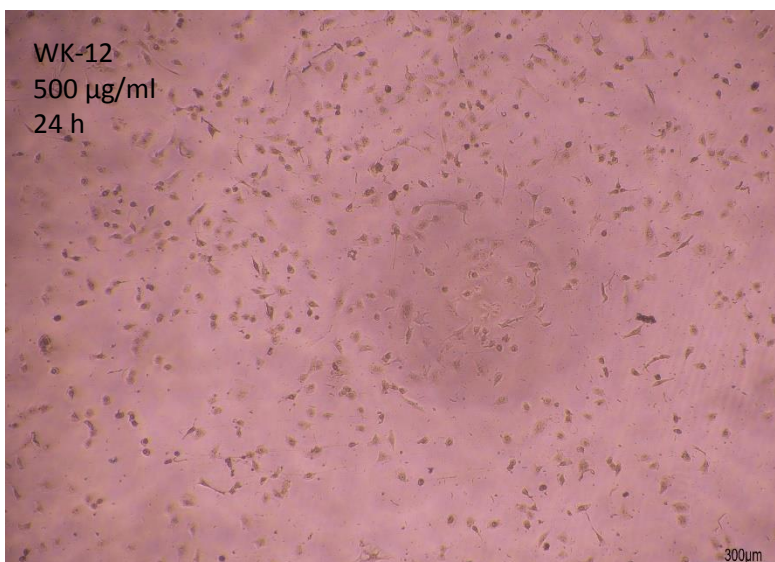
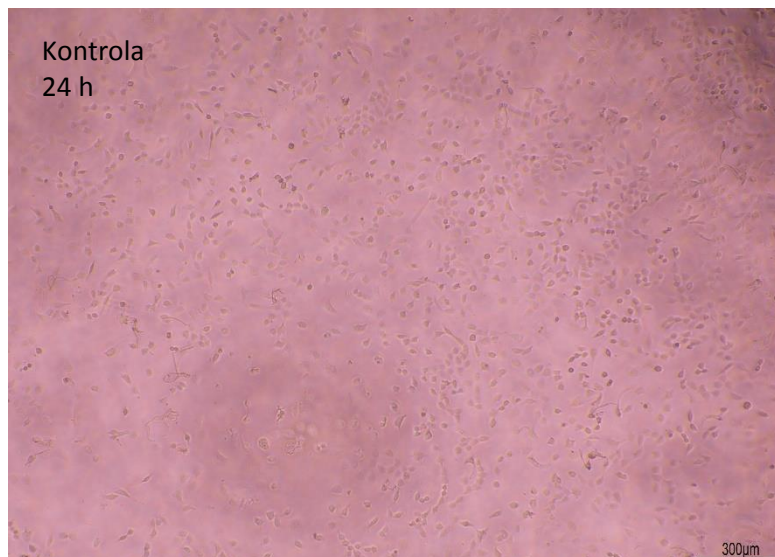
Aktivace / inhibice 3T3 - DAL + konjugáty



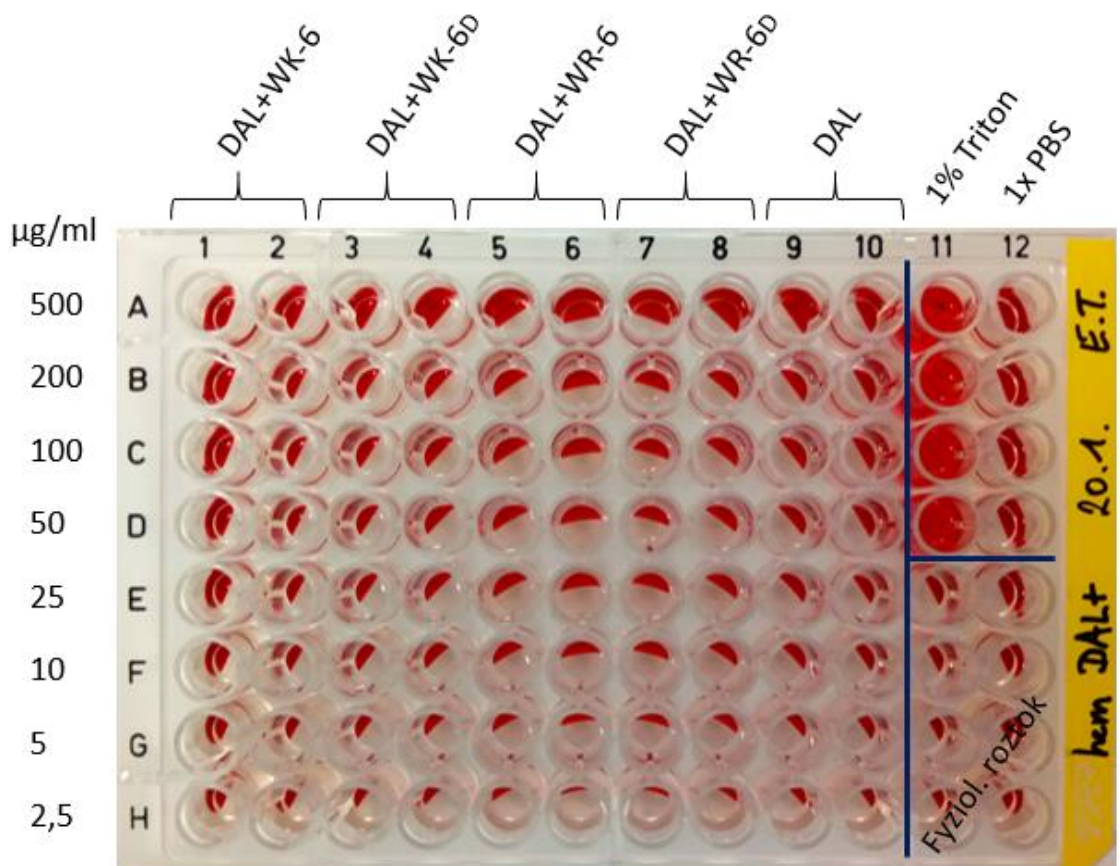
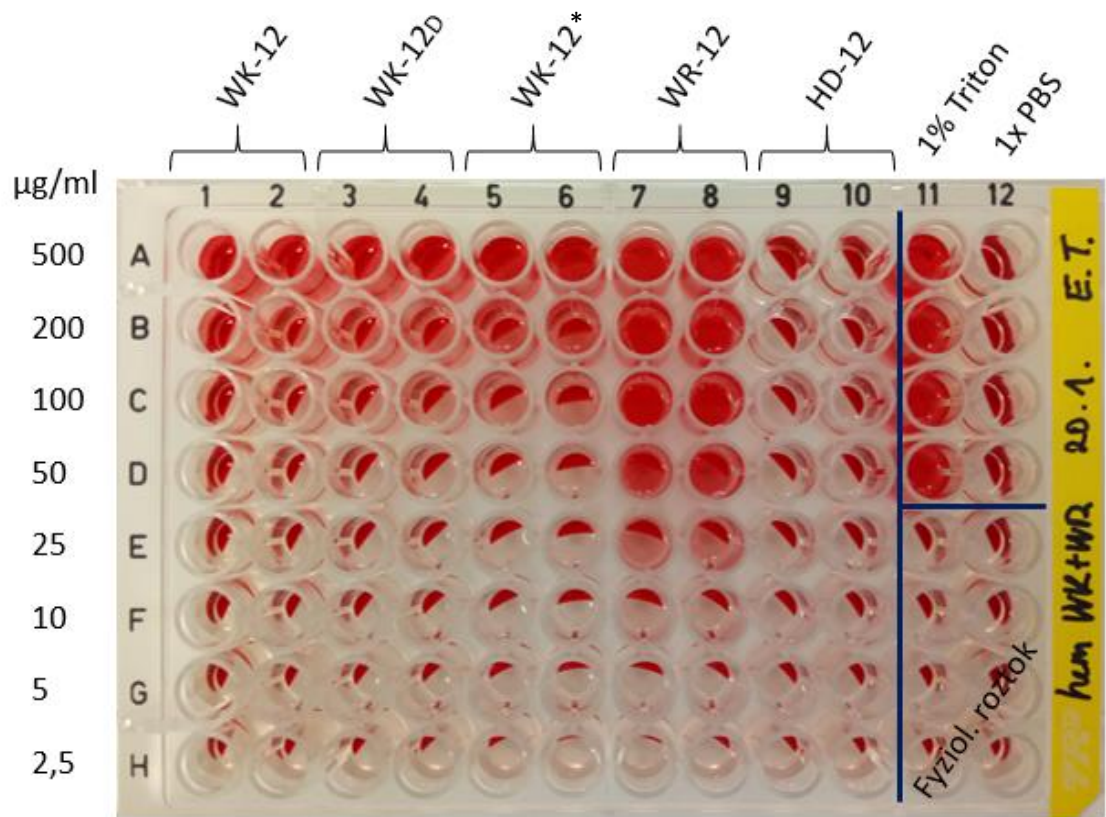
Obr. P18 Výsledky stanovení aktivace/inhibice buněk po ošetření různými koncentracemi peptidů DAL+WK-6, DAL+WK-6D, DAL+WR-6, DAL+WR-6D a DAL vztážené k růstu kontrolních buněk. Sloupce označují průměr ± SD dvou nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány při každém měření u 3 šarží buněk v tripletu.



Obr. P19 Porovnání výsledků různých koncentrací peptidů WK-12 a WK-12* při stanovení cytotoxicity. WK-12* je peptid, který byl nasyntetizován a uskladněn pro použití při biologických testech několik měsíců před syntézou nového WK-12. Stáří peptidu nemá vliv na účinek látky. Oba antimikrobiální peptidy poskytují téměř shodné výsledky. Sloupce označují průměr \pm SD dvou nezávislých měření, kdy byly vzorky analyzovány při každém měření u 3 šarží buněk v tripletu.



Obr. P20 Snímky kontrolních buněk a buněk ovlivněných peptidy WK-12 a WK-12D po 24 hodinách od ošetření při testování cytotoxicity. Kontrola vykazuje normální růst a vývoj. U WK-12D dochází v porovnání s WK-12 k tvorbě zákalu (odlišné zbarvení pozadí). Zákal se vytvořil při všech opakováních. Všechny snímky jsou pořízeny při stejném zvětšení.



Obr. P21 Příklady fotografií destiček se všemi testovanými antimikrobiálními peptidy při stanovení hemolytické aktivity po ošetření různými koncentracemi (µg/ml) peptidů.