

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.



UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Michaela Helusová**

Mechanismus antibakteriálního účinku 4. generace lipofosfonoxinů

Mode of action of the 4<sup>th</sup> generation of antibacterial compounds  
lipophosphonoxins

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Gabriela Mikušová, Ph.D.

Praha, 2020



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 7.8.2020

Michaela Helusová

## **Poděkování**

Velmi bych chtěla poděkovat své paní školitelce RNDr. Gabriele Mikušové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, podporu, pomoc při pokusech i při psaní této práce a čas, který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat paní Lucii Jánkové za pomoc s přípravou materiálů a za vlídná slova povzbuzení.

Děkuji všem členům laboratoře Fyziologie bakterií Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovi za rady, ochotu, pomoc a za možnost učit se v přátelském prostředí, které celý kolektiv tvoří.

Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a pochopení.

## Abstrakt

Lipofosfonoxiny jsou malé syntetické antimikrobiální molekuly, jejichž zásahovým místem je cytoplazmatická membrána bakterií. Tato práce se zaměřuje na porovnání a podstatu rozdílu v aktivitě tří vybraných zástupců lipofosfonoxinů 4. generace, které se liší počtem uhlíků v jednotlivých modulech a také svou antibakteriální a hemolytickou aktivitou. Nejslibnějším kandidátem je látka 7072 vykazující dobrou antimikrobiální aktivitu a nízkou hemolytickou aktivitu. Dalšími testovanými lipofosfonoxiny jsou hemolytický 7070 a antibakteriálně slabě účinný 7107. V této práci je zkoumána jejich pórotvorná aktivita na modelových membránách i na živých buňkách *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Výsledky naznačují, že i malý rozdíl ve struktuře může mít zásadní vliv na aktivitu těchto molekul. Lipofosfonoxiny 7072 a 7070 vykazují stejnou aktivitu proti bakteriím, kdy jejich baktericidní účinek spočívá ve vytváření pórů v cytoplazmatické membráně. Bakterie účinkem lipofosfonoxinů rychle hynou následkem ztráty membránového potenciálu. Vysoká hemolytická aktivita látky 7070 pravděpodobně souvisí s její preferencí k nenabitým membránám. Podstata slabé antimikrobiální aktivity látky 7107 je dána tvorbou pouze malých pórů a také neschopností překonat a rozrušit vnější membránu.

Klíčová slova: antimikrobiální látky, lipofosfonoxiny, cytoplazmatická membrána, pórotvorná aktivita

## **Abstract**

Lipophosphonoxins are small synthetic antimicrobials targeting the cytoplasmic membrane of bacteria. This thesis focuses on comparison of three lipophosphonoxins which differ in the number of carbons in its modules and in antimicrobial and hemolytic activity. The most promising candidate compound is lipophosphonoxin 7072 showing good antimicrobial activity as well as low hemolytic activity. Other two tested lipophosphonoxins are 7070 displaying high hemolytic activity and weakly antibacterial lipophosphonoxin 7107. The pore-forming activity of lipophosphonoxins is investigated using model membranes as well as living bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results show that small difference in structure can fundamentally affect the activity of these molecules. Lipophosphonoxins 7072 and 7070 display equal antibacterial activity against tested bacteria by forming pores in the bacterial membrane. Bacteria rapidly die of loss of membrane potential caused by lipophosphonoxins. The high hemolytic activity of the compound 7070 is probably related with its preference for uncharged membranes. The weak antimicrobial activity of 7107 is caused by its capability to form only small pores and its incapability to overcome and disrupt the outer membrane.

Key words: antimicrobial agents, lipophosphonoxins, cytoplasmic membrane, pore-forming activity



## Obsah

|         |                                                                                         |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | Úvod.....                                                                               | 13 |
| 2       | Literární přehled .....                                                                 | 14 |
| 2.1     | Složení cytoplazmatické membrány bakterií.....                                          | 14 |
| 2.1.1   | Vliv fosfolipidového složení na vazbu antimikrobiálních látek .....                     | 15 |
| 2.1.2   | Membránové mikrodomény.....                                                             | 17 |
| 2.1.2.1 | Látky zabraňující správné funkci bakteriálních mikrodomén .....                         | 19 |
| 2.2     | Antimikrobiální látky působící v cytoplazmatické membráně .....                         | 20 |
| 2.2.1   | Membránově aktivní látky peptidické povahy.....                                         | 20 |
| 2.2.1.1 | Kationtové antimikrobiální peptidy.....                                                 | 20 |
| 2.2.1.2 | Peptidomimetika.....                                                                    | 25 |
| 2.2.2   | Membránově aktivní látky nepeptidické povahy .....                                      | 27 |
| 2.3     | Lipofosfonoxiny.....                                                                    | 31 |
| 2.3.1   | Vznik a vývoj LPPO .....                                                                | 32 |
| 2.3.1.1 | 1. generace LPPO .....                                                                  | 34 |
| 2.3.1.2 | 2. a 3. generace LPPO .....                                                             | 35 |
| 2.3.1.3 | 4. generace LPPO .....                                                                  | 36 |
| 2.3.2   | Mechanismus účinku LPPO .....                                                           | 37 |
| 2.3.3   | Účinek LPPO na eukaryotní buňky a celé organizmy .....                                  | 38 |
| 3       | Cíle.....                                                                               | 39 |
| 4       | Materiál a metody .....                                                                 | 40 |
| 4.1     | Použité bakteriální kmeny .....                                                         | 40 |
| 4.2     | Příprava kultivačních půd .....                                                         | 40 |
| 4.3     | Sterilizace.....                                                                        | 40 |
| 4.4     | Kultivace bakteriálních kultur .....                                                    | 41 |
| 4.5     | Vodivostní měření na planárních lipidických membránách .....                            | 41 |
| 4.6     | Sledování permeabilizace membrány živých buněk pomocí vstupu sondy propidium jodid..... | 43 |
| 4.7     | Sledování změny membránového potenciálu .....                                           | 44 |
| 4.8     | Sledování permeabilizace vnější membrány bakterie <i>E. coli</i> .....                  | 46 |
| 4.9     | Příprava lipozómů.....                                                                  | 47 |
| 4.10    | Stanovení koncentrace anorganického fosfátu .....                                       | 48 |
| 4.11    | Sledování úniku fluorescenční sondy z lipozómů .....                                    | 49 |
| 4.12    | Vliv LPPO na životaschopnost bakterií.....                                              | 50 |
| 5       | Výsledky .....                                                                          | 52 |

|       |                                                                                             |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1   | Sledování pórotvorného účinku LPPO na planární lipidické membráně.....                      | 52 |
| 5.1.1 | Koncentrační závislost pórotvorné aktivity LPPO 7072.....                                   | 52 |
| 5.1.2 | Vliv fosfolipidového složení membrány na aktivitu LPPO 7072 .....                           | 55 |
| 5.1.3 | Porovnání pórotvorné aktivity LPPO 7072, 7070 a 7107 .....                                  | 59 |
| 5.2   | Sledování permeabilizačního účinku LPPO na živých buňkách pomocí sondy propidium jodid..... | 62 |
| 5.3   | Vliv LPPO na membránový potenciál bakterií .....                                            | 66 |
| 5.4   | Schopnost LPPO rozrušovat vnější membránu <i>E. coli</i> .....                              | 68 |
| 5.5   | Vliv LPPO 7072 na životaschopnost bakterií .....                                            | 69 |
| 5.6   | Měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů po působení LPPO.....                           | 70 |
| 5.6.1 | Vliv fosfolipidového složení na permeabilizační účinek LPPO .....                           | 70 |
| 5.6.2 | Vliv přítomnosti LPS v lipozómech na aktivitu LPPO .....                                    | 73 |
| 6     | Diskuze.....                                                                                | 75 |
| 7     | Shrnutí .....                                                                               | 84 |
| 8     | Použitá literatura .....                                                                    | 85 |

## Seznam zkratek

|                      |                                                                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| AMP                  | Antimikrobiální peptid                                            |
| CF                   | Karboxyfluorescein (Carboxyfluorescein)                           |
| CFA                  | Schopnost tvořit kolonie (Colony forming ability)                 |
| CFU                  | Jednotky tvořící kolonie (Colony forming units)                   |
| CL                   | Kardiolipin (Cardiolipin)                                         |
| diNn                 | 3',6-dinonylneamin                                                |
| DiSC <sub>3(5)</sub> | 3,3' - dipropylthiadikarbocyanin jodid                            |
| DMSO                 | Dimetylsulfoxid                                                   |
| DOPC                 | Diolelylfosfatidyl cholin (Diolelylphosphatidylcholine)           |
| DOPE                 | Diolelylfosfatidyl etanolamin (Diolelylphosphatidylethanolamine)  |
| DOPG                 | Diolelylfosfatidyl glycerol (Diolelylphosphatidylglycerol)        |
| DPhPG                | Difytanoylfosfatidylglycerol (Diphytanoylphosphatidylglycerol)    |
| EDTA                 | Etylendiamintetraoctová kyselina                                  |
| FDA                  | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration) |
| FMM                  | Funkční membránové mikrodomény                                    |
| G <sup>-</sup>       | Gram-negativní                                                    |
| G <sup>+</sup>       | Gram-pozitivní                                                    |
| HC <sub>50</sub>     | Koncentrace látky, při které lyzuje 50 % červených krvinek        |
| HEPES                | 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetan sulfonová kyselina              |
| IF                   | Intenzita fluorescence                                            |
| LB                   | Luria-Bertani médium                                              |
| LPPO                 | Lipofosfonoxin                                                    |
| LPS                  | Lipopolysacharid                                                  |
| MIC                  | Minimální inhibiční koncentrace                                   |
| MRSA                 | Kmen <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k meticilinu        |
| NPN                  | N-fenyl-1-naftylamin                                              |
| OD                   | Optická denzita                                                   |
| PC                   | Fosfatidylcholin (Phosphatidylcholine)                            |
| PE                   | Fosfatidyletanolamin (Phosphatidylethanolamine)                   |
| PG                   | Fosfatidylglycerol (Phosphatidylglycerol)                         |
| PI                   | Propidium jodid (Propidium iodide)                                |
| PS                   | Fosfatidylserin (Phosphatidylserine)                              |
| UDP                  | Uridin difosfát (Uridine diphosphate)                             |



# 1 Úvod

V současné době se stále častěji setkáváme s bakteriemi rezistentními na používaná antibiotika. Jejich výskyt je umocňován nadměrným a nesprávným používáním těchto antibiotik v humánní i veterinární medicíně. Tento nárůst podnítl hledání nových účinných látek. Některé z těchto látek jsou izolovány z přírodních zdrojů, ale také se často objevují přístupy, kdy jsou již známé přírodní antimikrobiální látky modifikovány z důvodu zvýšení účinnosti a selektivity, anebo jsou účinné molekuly kompletně připraveny metodami chemické syntézy.

Výzkum se zaměřuje nejen na hledání nových antibiotik, ale také na nová nebo zatím nevyužitá zásahová místa. Mezi málo využívané zásahové místo by se dala zařadit cytoplazmatická membrána bakterií. Využití membrány jako místa zásahu antibiotika je velmi výhodné, jelikož k ní má účinná látka snadnější přístup než k intracelulárním cílům. Cytoplazmatická membrána je esenciální a velmi komplexní struktura buňky, ve které se odehrávají důležité životní procesy. Vytvoření rezistence proti membránově aktivní látce je pro bakterii složité, protože musí kompletně přestavit cytoplazmatickou membránu, což je pro ni nevýhodné a náročné. Membránově aktivní látky způsobují svým účinkem narušení membrány, kvůli kterému dochází k úniku iontů nebo i ztrátě důležitých molekul, případně mohou tyto látky způsobit kompletní dezintegraci membrány. Všechny tyto následky vedou k rychlé smrti buňky. Další výhodou použití těchto látek je i možnost selektivního účinku vůči bakteriím, a to díky odlišnostem ve fosfolipidovém složení membrán bakterií a eukaryotických organismů.

Mezi látky cílící na membránu patří i syntetické látky lipofosfonoxiny. Lipofosfonoxiny vykazují aktivitu proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a zároveň nejsou toxické proti eukaryotním buňkám. Velká výhoda lipofosfonoxinů spočívá v jejich modulovém složení, které umožňuje rozličné modifikace molekul, jednodušší sledování vlivu struktury látky na její aktivitu a také nenákladnou syntézu. Díky těmto vlastnostem by se daly považovat za jedny z potenciálních kandidátů na nová antibiotika.

Lipofosfonoxinů byly doposud vytvořeny celkem čtyři generace, které se mezi sebou odlišují chemickou strukturou molekuly, jež má vliv na jejich aktivitu. Předmětem této práce je charakterizace mechanismu účinku vybraných zástupců čtvrté generace lipofosfonoxinů.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Složení cytoplazmatické membrány bakterií

Biologické membrány tvoří bariéru mezi vnitřním prostředím buňky a vnějším prostředím. Tato bariéra zajišťuje chemický a elektrický gradient, který obstarává chod metabolismu buňky. Membrána je tvořena fosfolipidovou dvouvrstvou a proteiny. Největší část membránových fosfolipidů tvoří glycerofosfolipidy tvořené molekulou glycerolu, která má tři hydroxylové skupiny: na dvou hydroxylových skupinách jsou navázány mastné kyseliny tvořící hydrofobní část molekuly a na zbylé hydroxylové skupině je zbytek kyseliny fosforečné, který plní funkci polární hlavičky. Na tomto zbytku může být navázaný nějaký další substituent, například glycerol, etanolamin, serin atd.

Fosfolipidy získávají díky zbytku kyseliny fosforečné záporný náboj. Tento náboj ale může být neutralizován substituentem navázaným na této kyselině. Například fosfatidyletanolamin (PE, phosphatidylethanolamine) má na zbytku kyseliny fosforečné navázaný etanolamin, který nese kladný náboj na aminové skupině. Stejně to je u fosfatidylcholinu (PC, phosphatidylcholine) obsahujícího substituent cholin, kde je kladný náboj na dusíku. Polární část fosfatidylserinu (PS, phosphatidylserine) je tvořena aminokyselinou serinem, který nese jak kladný, tak záporný náboj, čímž je molekula elektroneutrální a ve spojení se záporným nábojem na zbytku kyseliny fosforečné je výsledný fosfolipid záporně nabitý. Záporně nabitý je i například fosfatidylglycerol (PG, phosphatidylglycerol) jehož substituent glycerol je elektroneutrální. Zvláštním fosfolipidem je kardiolipin (CL, cardiolipin) tvořený dvěma molekulami kyseliny fosfatidové, které jsou spojené glycerolem. Tento fosfolipid tudíž obsahuje dva zbytky kyseliny fosforečné, a proto nese dva záporné náboje. Některé fosfolipidy mají na sobě navázanou kladně nabitou aminokyselinu, která ovlivňuje náboj celé molekuly. Příkladem je lysyl-PG, který nese díky kladně nabitému lysinu kladný náboj.

Membrány bakterií se svým složením liší oproti eukaryotním buňkám. U eukaryot se nejčastěji vyskytuje PC, PE, sfingomyelin, PS a fosfatidylinositol. Negativně nabité fosfolipidy se vyskytují hlavně ve vnitřním listu membrány. Ve vnějším listu se majoritně vyskytuje PC, díky kterému je membrána eukaryot elektroneutrální.

U gram-negativních ( $G^-$ ) bakterií je majoritním fosfolipidem PE. U *Escherichia coli* tvoří 80 % všech membránových fosfolipidů, u *Klebsiella pneumoniae* 82 %, u

u *Pseudomonas aeruginosa* je to méně – 60 %. Dále jejich membrány obsahují hlavně PG a CL (Epanand & Epanand, 2011).

Membrány gram-pozitivních ( $G^+$ ) bakterií jsou více variabilní v podílu různých fosfolipidů. U většiny  $G^+$  bakterií tvoří velký podíl fosfolipidů PG. U *Bacillus subtilis* představuje PG 70 % polárních lipidů (Clejan *et al.*, 1986), u *Staphylococcus aureus* 57 % a u *Staphylococcus epidermidis* dokonce 90 % (Epanand *et al.*, 2010). Dále se v membránách  $G^+$  bakterií hojně vyskytuje PE nebo CL. V membránách některých  $G^+$  bakterií PE nenajdeme vůbec, například u *S. aureus* nebo u *Streptococcus pneumoniae* (Epanand *et al.*, 2007; Epanand & Epanand, 2011). Naopak u *Bacillus polymyxa* je PE majoritním fosfolipidem (Epanand *et al.*, 2010).

Hlavním rozdílem mezi stavbou  $G^-$  a  $G^+$  bakterií je přítomnost vnější membrány u  $G^-$  bakterií. Ta tvoří další bariéru mezi bakterií a látkami přicházejícími z vnějšího prostředí. Díky vnější membráně jsou obecně  $G^-$  bakterie odolnější vůči účinku antibiotik v porovnání s  $G^+$  bakteriemi, protože molekuly antibiotika musejí překonat další překážku. Vnější membrána má asymetrické složení. Vnitřní list vnější membrány je tvořen fosfolipidy stejně jako vnitřní membrána. Vnější list obsahuje navíc lipopolysacharid (LPS, lipopolysaccharide), díky kterému je vnější membrána omezeně prostupná pro hydrofobní látky.

### 2.1.1 Vliv fosfolipidového složení na vazbu antimikrobiálních látek

Fosfolipidové složení membrány má vliv na vazbu a funkci antimikrobiálních látek, jejichž zásahovým místem je cytoplazmatická membrána bakterií. Například lipopeptidové antibiotikum daptomycin vyžaduje přítomnost PG pro vazbu a tvorbu oligomerů v membráně (Muraih *et al.*, 2012). Kmeny *B. subtilis*, které byly defektní v syntéze PG, byly k daptomycinu méně citlivé, tzn. že minimální inhibiční koncentrace (MIC, minimal inhibitory concentration) daptomycinu byla proti těmto kmenům větší (MIC 8  $\mu\text{g/ml}$ ) než proti laboratornímu kmenu 168 (MIC 1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Hachmann *et al.*, 2009). Mutace v syntéze PG byly objeveny i v klinických izolátech *S. aureus* u pacientů, u kterých léčba daptomycinem selhala (Peleg *et al.*, 2012).

Látky duramycin a cinnamycin jsou dalším příkladem antibiotik vyžadující přítomnost určitého fosfolipidu v cílové membráně, a to PE (Navarro *et al.*, 1985; Märki *et al.*, 1991). Duramycin je produkován bakterií *Streptoverticillium hachijoense* a cinnamycin produkuje *Streptomyces longisporoflavus* (Fredenhagen *et al.*, 1990).

Duramycin u citlivých buněk způsobuje poškození jejich povrchových struktur, změnu morfologie buněk (Dunkley Jr. *et al.*, 1988; Hasim *et al.*, 2018) a také zabraňuje translokaci proteinů v membráně (Chen & Tai, 1987). Účinek duramycinu je bakteriostatický. Bakterie rodu *Bacillus* jsou schopny si vytvořit rezistenci proti duramycinu snížením obsahu PE ve svých membránách. U bakterií inkubovaných přes noc v médiu s 1  $\mu$ M duramycinem byl pozorován znatelný rozdíl ve fosfolipidovém složení jejich membrány oproti citlivé první generaci. Tyto bakterie postrádaly PE a při inokulaci do čerstvého média s vyšším obsahem duramycinu byly k této látce necitlivé (Navarro *et al.*, 1985; Hasim *et al.*, 2018).

Dalším příkladem jsou rostlinné cirkulární proteiny cyklotidy, které jsou schopny se vázat do membrány, narušovat ji a tvořit v ní póry (Svangård *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Vyskytují se v čeledích rostlin mořenovité a violkovité (Craik *et al.*, 1999), kde pravděpodobně slouží jako insekticid (Jennings *et al.*, 2001; Barbeta *et al.*, 2008). Stejně jako výše zmíněná antibiotika duramycin a cinnamycin preferují cyklotidy membrány obsahující PE. Vazba cyklotidů na membrány bez PE byla slabá a také byly tyto membrány velmi málo permeabilizovány. Z několika testovaných cyklotidů pouze zástupce označovaný jako cyO2 vykazoval antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* (Henriques *et al.*, 2012). CyO2 byl aktivní i proti dalším  $G^-$  bakteriím (*S. enterica*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*), ale  $G^+$  bakterie jako *S. aureus* nebo *S. epidermidis* byly k této látce necitlivé, protože ve svých membránách PE neobsahují (Epanand *et al.*, 2010; Pránting *et al.*, 2010).

Některé membránově aktivní látky nevyžadují přímo přítomnost určitého fosfolipidu. Rozhodující pro jejich vazbu a aktivitu je však celkový náboj membrány, který na fosfolipidovém složení závisí. Příkladem těchto látek jsou cerageniny. Míra depolarizace bakteriální membrány způsobená cerageniny závisí na převažujících neutrálních fosfolipidech. Gram-pozitivní bakterie jako je například *S. aureus* nebo *S. epidermidis* ve svých membránách neobsahují žádný elektroneutrální PE, ale více jak polovinu všech jejich membránových fosfolipidů tvoří záporně nabitý PG. Míra depolarizace membrány u těchto bakterií způsobená cerageniny dosahovala dva- až čtyřikrát nižších hodnot než u bakterií *Bacillus cereus* a *Bacillus polymyxa*, u kterých je neutrální PE majoritním fosfolipidem v membráně. Stejně tak je k cerageninům citlivá bakterie *E. faecalis* i přes to, že ve své membráně neobsahuje PE. V membráně této

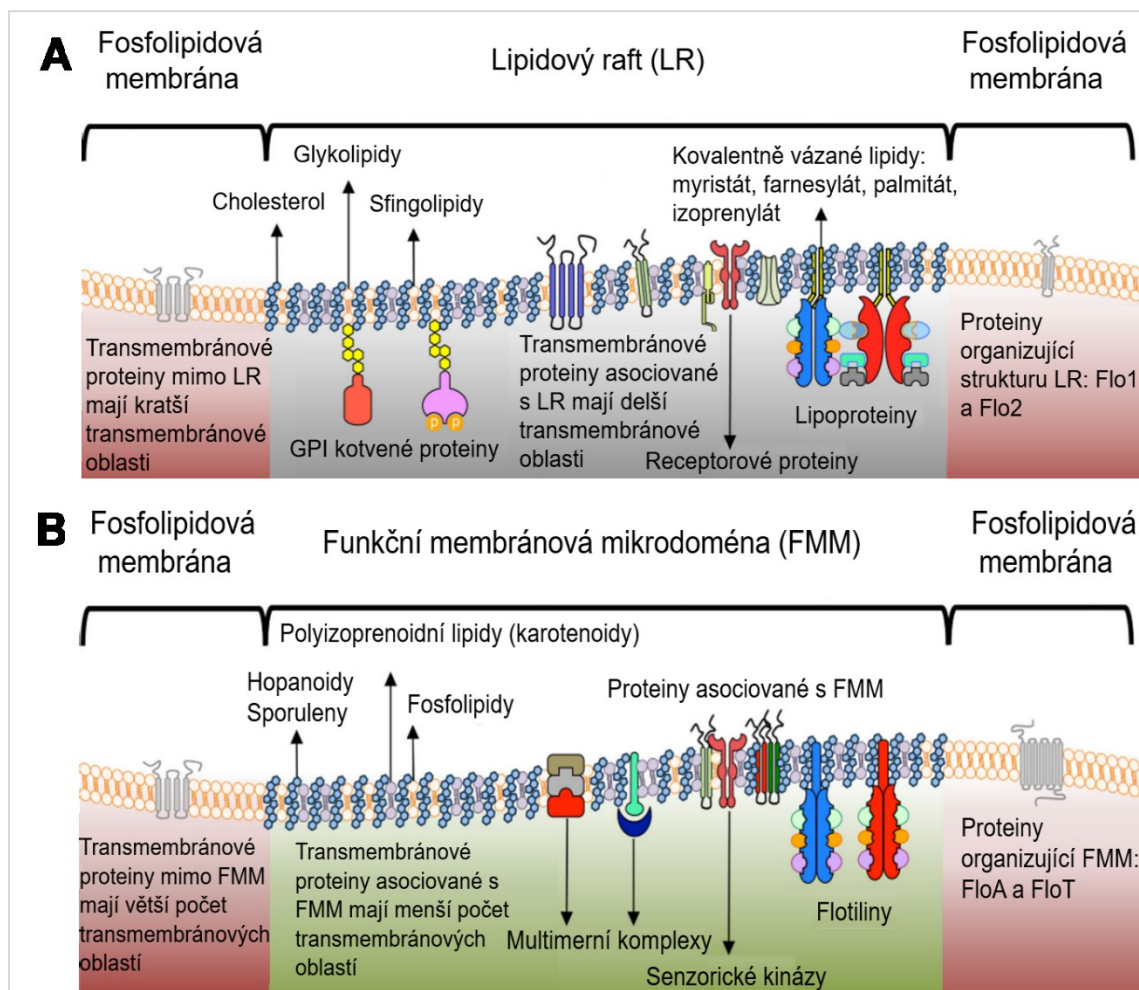


bakterie se vyskytují kladně nabitý lysyl-PG, který „maskuje“ negativní náboj PG, a také elektroneutrální glykolipid fosfatidylkojibiosyl diglycerol (Epanand *et al.*, 2010).

### 2.1.2 Membránové mikrodomény

Pohled na strukturu a uspořádání buněčné membrány se postupně od sedmdesátých let dvacátého století vyvíjel. Obecně přijímaným návrhem popisujícím strukturu membrány byl model tekuté mozaiky. Ten říká, že fosfolipidy a transmembránové proteiny jsou v membráně pravidelně rozmístěny, jsou na sobě nezávislé a interagují spolu jen slabě (Singer & Nicolson, 1972). Od tohoto modelu se během osmdesátých let začalo upouštět, protože bylo zjištěno, že fosfolipidy nejsou v membráně rozmístěny homogenně, ale vytvářejí jakési domény (Karnovsky *et al.*, 1982). Ke konci tisíciletí byly u eukaryotních buněk objeveny membránové mikrodomény (Simons & Ikonen, 1997), které vrhají na strukturu membrány nový pohled.

Membránové mikrodomény (rafty) eukaryot jsou strukturně funkční oblasti membrány, které jsou tvořeny molekulami sfingomyelinu, cholesterolu a také proteiny (Obrázek 2.1A). Proteiny jsou v raftech kotveny transmembránovou doménou, glykosylfosfatidylinositolovou kotvou anebo acylovým řetězcem. Vnější list raftu je tvořen už zmíněným sfingomyelinem a dalšími glykosfingolipidy, vnitřní list membrány raftu je tvořen glycerolipidy, jako jsou například PS nebo PE (Simons & Ikonen, 1997). Prostory mezi molekulami fosfolipidů v obou listech vyplňuje cholesterol, který způsobuje ztlustění membrány a zvyšuje její rigiditu. Typickými proteiny v membránových raftech jsou flotiliny. Flotiliny se účastní několika buněčných procesů jako je endocytóza, fagocytóza, signalizace nebo buněčná adheze (Banning *et al.*, 2011). Flotiliny také rekrutují další proteiny do membránových mikrodomén a usnadňují jim vazbu mezi sebou (Browman *et al.*, 2007; Lopez & Koch, 2017).



Obrázek 2.1 Srovnání lipidového raftu s funkční membránovou mikrodoménou; A) Lipidový raft u eukaryot, B) Funkční membránová mikrodoména u bakterií; FMM = funkční membránová mikrodoména, GPI = glykosylfosfatidylinositol, LR = lipidový raft. Upraveno podle Lopez & Koch, 2017.

Předpokládalo se, že membránové rafty jsou výsadou pouze eukaryot. V roce 2010 byla ale tato domněnka vyvrácena. Membránové mikrodomény byly objeveny i u bakterií, konkrétně u *B. subtilis* (López & Kolter, 2010), a jsou také označovány jako funkční membránové mikrodomény (FMM, functional membrane microdomains) (Obrázek 2.1B). Tak jako se v eukaryotních raftech vyskytuje cholesterol, ve FMM se vyskytují hopanoidy a karotenoidy (Bramkamp & Lopez, 2015). Společným prekurzorem syntézy hopanoidů a cholesterolu je skvalen. Hopanoid diplopterol v bakteriální membráně stejně jako cholesterol u eukaryot uspořádává mastné kyseliny fosfolipidů, čímž zvyšuje rigiditu membrány (Sáenz *et al.*, 2012, 2015). Karotenoidy mají na membránu stejný efekt (Rottem & Markowitz, 1979). Fosfolipid CL tvoří shluky na pólech buňky a v místě tvorby septa (Mileykovskaya & Dowhan, 2009) a tím přispívá k organizaci membrány bakterií a spoluvytváření mikrodomén (Bramkamp &

Lopez, 2015). FMM obsahují také proteiny sekvenčně podobné eukaryotickým flotilinům: FloT a FloA (původně označované jako YuaG a YqfA) (Zhang *et al.*, 2005; Donovan & Bramkamp, 2009). Tyto proteiny kolokalizují v mikrodoménách spolu s dalšími proteiny, jejichž správná funkce je poutána na vazbu v membránové mikrodoméně. Mezi tyto proteiny patří například proteiny metabolismu buněčné stěny, jako jsou např. TagU a GtaB, které se účastní syntézy kyseliny teichoové (Kawai *et al.*, 2011). Dále sem spadají proteiny energetického metabolismu (AcsA, ResC), proteiny účastníci se signalizace (McpABC), proteiny angažované v chemotaxi anebo proteiny podílející se na transportu (FhuD, MntA) a sekreci (SecY, SppA) (Bach & Bramkamp, 2013). Jedním z takových proteinů, jehož funkce je vázaná na přítomnost ve FMM, je i např. kináza KinC, která ovlivňuje tvorbu biofilmu. Přítomnost proteinů podobných flotilinu je klíčová pro funkci této kinázy. Mutantní kmen s poruchou syntézy FloT i FloA nebyl schopný tvořit biofilm (López & Kolter, 2010; Bramkamp & Lopez, 2015).

### **2.1.2.1 Látky zabraňující správné funkci bakteriálních mikrodomén**

#### *Kyselina zaragozová*

Kyselina zaragozová zabraňuje syntéze skvalenu inhibicí enzymu skvalensyntázy (Bergstrom *et al.*, 1993). Ze skvalenu jsou syntetizovány hopanoidy i karotenoidy, které jsou součástí bakteriálních mikrodomén (Bramkamp & Lopez, 2015). Kmen *B. subtilis* rostoucí v přítomnosti kyseliny zaragozové nebyl schopný tvořit biofilm, jehož tvorba je řízena kinázou KinC. Jelikož nebyl v buňce vlivem účinku kyseliny zaragozové přítomný skvalen, nemohly být tvořeny karotenoidy a hopanoidy tvořící membránové mikrodomény. Kvůli jejich absenci nebyly v membráně přítomny ani FloT a FloA proteiny, které jsou důležité pro správnou funkci kinázy KinC. Stejný fenotyp vykazoval i mutantní kmen s poruchou skvalensyntázy. Kolonie *S. aureus* po ošetření kyselinou zaragozovou navíc ztratily své typické zabarvení, které jim dává karotenoid stafyloxantin (López & Kolter, 2010).

#### *3',6-dinonylneamin*

Neamin je aminoglykosidové antibiotikum, které se váže do 16S podjednotky ribozomu a inhibuje syntézu proteinů (Kotra & Mobashery, 2005). Jeho derivát 3',6-dinonylneamin (diNn) (Baussanne *et al.*, 2010) se váže do oblastí bohatých na CL, které jsou na pólech buňky, snižuje fluiditu membrány a zvyšuje její permeabilitu. Buňky *P. aeruginosa* vystavené účinku diNn se asymetricky dělily (Swain *et al.*, 2018) a měly narušenou morfologii. Působením diNn totiž dochází k rozpadu CL mikrodomén, ve

kterých je kotven MreB protein (El Khoury *et al.*, 2017) odpovídající za tyčinkovitý tvar buněk (Wachi *et al.*, 1987). Když jsou tyto mikrodomény narušeny, MreB nefunguje správně, čímž dochází k neobvyklé morfologii buněk. Poškození mikrodomén má vliv i na další děje v buňce. Již v sublimitní koncentraci diNn ( $0,75 \times \text{MIC}$ ) došlo u *P. aeruginosa* k inhibici dýchacího řetězce, ke snížení rychlosti růstu a ke snížení životaschopnosti buněk (El Khoury *et al.*, 2017).

## 2.2 Antimikrobiální látky působící v cytoplazmatické membráně

Cytoplazmatická membrána je výhodným zásahovým místem pro antibiotika díky své přístupnosti. Zároveň je pro bakterii obtížnější si proti antibiotikům s tímto mechanismem účinku vytvořit rezistenci pomocí změny zásahového místa, jelikož jako obranu musí kompletně přestavit celou membránu. Tato modifikace membrány je pro bakterie velmi komplikovaná a nevýhodná, protože se v membráně odehrávají životně důležité děje, které mohou být touto přestavbou ovlivněny. Další výhodou představuje odlišné složení bakteriální a eukaryotické membrány, kdy jiné složení fosfolipidů a náboj membrány mohou zajišťovat selektivitu látek cílících na membránu.

### 2.2.1 Membránově aktivní látky peptidické povahy

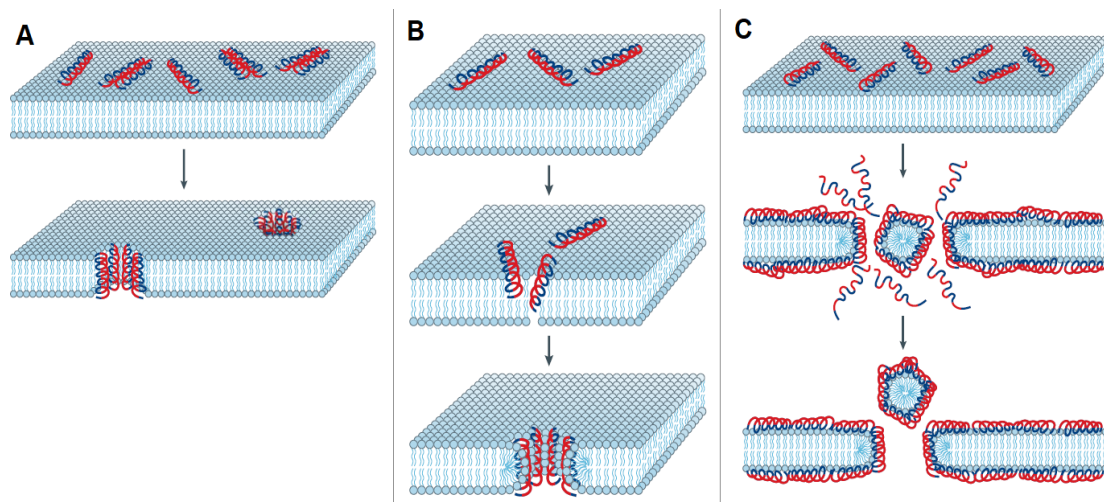
#### 2.2.1.1 Kationtové antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP, antimicrobial peptides) jsou peptidy hrající důležitou roli v obraně proti bakteriím, houbám a virům. Jsou součástí imunitního systému a vyskytují se ve všech doménách organismů (Zasloff, 2002). Rostliny nebo bezobratlí nemají adaptivní imunitu jako obratlovci, proto mají AMP v jejich imunitním systému významnou roli. Tyto peptidy produkují i bakterie, aby zneškodnily jiné bakterie v boji o niku (Kumar *et al.*, 2018). AMP jsou většinou tvořeny 12 až 50 aminokyselinami, z nichž polovinu tvoří hydrofobní aminokyseliny, a nejméně dvě aminokyseliny nesou kladný náboj (Hancock & Scott, 2000). Důležitá je amfipaticita molekuly, kdy hydrofilní část interaguje s fosfolipidovými hlavičkami a hydrofobní zase s mastnými kyselinami fosfolipidu (Oh *et al.*, 2014). AMP mohou být děleny podle struktury, sekvence nebo mechanismu účinku (Kumar *et al.*, 2018).

AMP cílící na bakterie je rozpoznávají díky jejich membráně, jež se liší od mnohobuněčných organismů svým složením, které ovlivňuje její náboj (Zasloff, 2002). AMP působící na membránu v ní mohou tvořit póry o struktuře barelu (tzv.

barrel stave pore) (Qian *et al.*, 2008) nebo toroidní póry (Brogden, 2005). Dále mohou membránu narušovat např. pomocí tzv. kobercového modelu (Oren & Shai, 1998). Detailněji budou tyto mechanismy popsány v následujících odstavcích. Ne vždy jde ale o tvorbu pórů. AMP také mohou způsobovat ztenčení membrány nebo agregaci fosfolipidů. Při ztenčení membrány dochází k inserci peptidu pouze do jednoho listu membrány. V tomto místě vložení je vytvořen prostor, který se snaží vyplnit mastné kyseliny fosfolipidů. Tím ale dojde k ohybu těchto řetězců, což vede ke ztenčení membrány (Ludtke *et al.*, 1995). Některé AMP mají i další mechanismy účinku, jako je například inhibice syntézy makromolekul (Park *et al.*, 1998; Patrzykat *et al.*, 2002), inhibice funkce některých enzymů (Otvos *et al.*, 2000) nebo inhibice tvorby buněčné stěny (Torrent *et al.*, 2008).

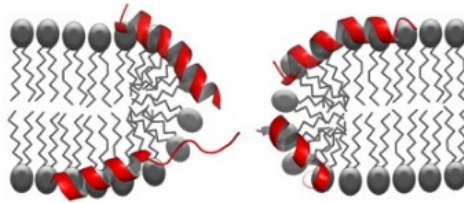
Nyní detailněji k pórotvorným AMP, mezi něž patří např. alamethicin. Jedná se o antimikrobiální peptid tvořený 20 aminokyselinami (Pandey *et al.*, 1977). Byl izolován z houby *Trichoderma viride* (Meyer & Reusser, 1967; Wimley, 2010) jako směs tří alamethicinů, které se liší v aminokyselinách na sedmé a devatenácté pozici. Z těchto dvaceti aminokyselin je 17 hydrofobních. Téměř polovinu všech aminokyselin tvoří neobvyklá alfa-aminoisomáselná kyselina. Na N-konci mají tyto tři zástupci acyl a na C-konci mají fenylalaninol (Miura, 2020). Alamethicin je zástupce AMP, který tvoří pór o struktuře barelu (Qian *et al.*, 2008). Při tvorbě tohoto typu póru nejdříve dojde k navázání monomerů peptidu na membránu (Obrázek 2.2A). Během vazby dochází ke konformační změně peptidu, která způsobí rozestoupení polárních hlaviček fosfolipidů vedoucí ke ztenčení membrány v místě interakce. Dále se hydrofobní část peptidu zanoří do membrány. Při dosažení prahové hodnoty koncentrace navázaných peptidů na membráně dojde k seskupení monomerů a k inserci hlouběji do membrány. Jak se přidávají další monomery, vytvořený pór se zvětšuje (Yeaman & Yount, 2003).



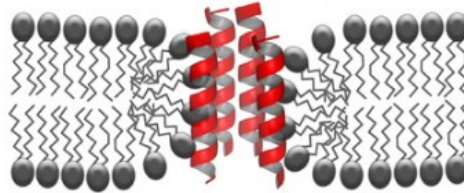
Obrázek 2.2 Modely mechanismu účinku AMP na membránu; A) Model póru ve formě barelu, B) Model toroidního póru, C) Kobercový mechanismus účinku; upraveno z Brogden, 2005.

Dalším příkladem pórotvorných AMP jsou magaininy izolované z kůže žáby *Xenopus laevis*. Jedná se o skupinu AMP, které jsou tvořeny 23 aminokyselinami (Zasloff, 1987). Nejvíce studovanými zástupci jsou magainin 1 a magainin 2. Tyto dvě molekuly se liší jen málo. Magainin 2 má na desáté pozici aminokyselinu lyzin, kdežto u magaininu 1 se na tomto místě vyskytuje glycin. Druhou odlišností je přítomnost lyzinu na 22. pozici u magaininu 1 a asparaginu u magaininu 2 (Matsuzaki, 1998). Dále se tyto dvě molekuly liší typem póru, který v cílové membráně vytvářejí. Magainin 2 tvoří toroidní pór (Obrázek 2.2B) (Ludtke *et al.*, 1996; Brogden, 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016). Alfa-helixy magaininu 2 obsadí povrch membrány, tím dochází ke ztenčování (Ludtke *et al.*, 1995) a k pozitivnímu zakřivení membrány (Matsuzaki *et al.*, 1998). Při dosažení kritické koncentrace peptidů dochází na takto destabilizované membráně k tvorbě toroidního póru, který vzniká ohybem a spojením vnitřního a vnějšího listu membrány (Hara *et al.*, 2001). Na toroidním póru se tedy podílí jak peptidy, tak i fosfolipidy membrány. Naopak magainin 1 tvoří, stejně jako např. toxin ze včelího jedu melitin, neuspořádaný toroidní pór (Sengupta *et al.*, 2008). Ten se od výše zmíněného klasického toroidního póru odlišuje v tom, že peptidy netvoří uvnitř póru strukturu podobnou cylindru (Obrázek 2.3). Tyto peptidy jsou paralelně rozmístěny na membráně, ale jejich konce jsou zahnuté směrem do membrány, kde tvoří ústí póru, které je mnohem širší než jeho střed. Vnitřní prostor póru tvoří hlavně fosfolipidy a ve většině případů jeden až dva peptidy (Leontiadou *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2008).

### Neuspořádaný toroidní pór



### Klasický toroidní pór



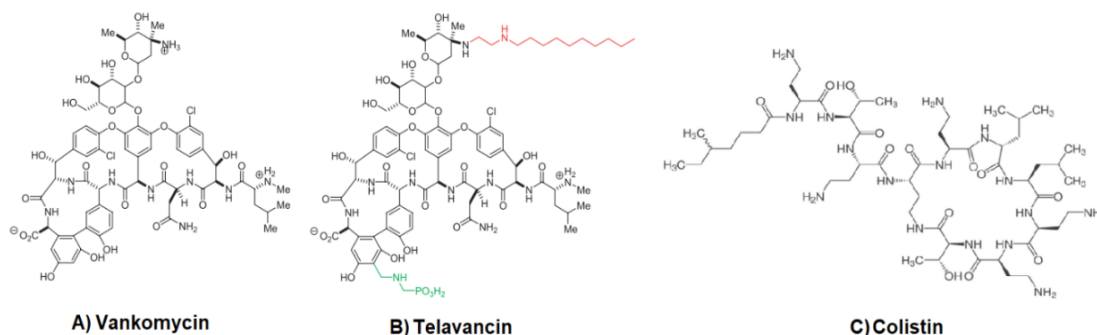
Obrázek 2.3 Schéma porovnávající neuspořádaný toroidní pór a klasický toroidní pór. Šedé kuličky představují fosfolipidové hlavičky, klikaté čáry znázorňují mastné kyseliny fosfolipidů. Červenými helixy jsou znázorněny proteiny. Upraveno ze Sengupta *et al.*, 2008.

Dalším známým zástupcem patřícím mezi kationtové AMP jsou cecropiny, jež dostaly název podle larvy *Hyalophora cecropia*, ze které byly poprvé izolovány (Hultmark *et al.*, 1980; Steiner *et al.*, 1981). Jedná se o antimikrobiální peptidy dlouhé 31–39 aminokyselin (Boman, 1991). Cecropiny byly nalezeny i u dalších zástupců hmyzu například u *Drosophila melanogaster* (Kylsten *et al.*, 1990) a *Sarcophaga peregrina* (Kanai & Natori, 1989) nebo u hlístice *Ascaris suum* (Lee *et al.*, 1989; Pillai *et al.*, 2005). Cecropiny netvoří póry, ale permeabilizují membránu pomocí tzv. detergentního neboli koberecového modelu (Obrázek 2.2C). Peptidy nejdříve jako koberec pokryjí membránu díky elektrostatické interakci mezi negativně nabitými hlavičkami fosfolipidů a pozitivně nabitými aminokyselinami peptidu. Po vazbě na membránu se peptidy uspořádají tak, aby jejich hydrofilní aminokyseliny interagovaly s polárními hlavičkami fosfolipidů nebo s molekulami vody. Následně dojde k reorientaci hydrofobních zbytků do hydrofobního středu membrány, což vede k permeabilizaci membrány. Při vyšší koncentraci peptidu dochází dokonce ke kompletní dezintegraci membrány jako při účinku detergentů a k tvorbě směsných micel peptidů s fosfolipidy. Na rozdíl od modelu póru o struktuře barelu jsou v tomto modelu aminokyseliny během celého procesu v kontaktu s fosfolipidovými hlavičkami (Oren & Shai, 1998).

## Příklady AMP používaných v praxi

Kvůli stále častěji se objevujícím kmenům bakterií rezistentních na stávající antibiotika se hledají možné alternativy – např. látky s jiným mechanismem účinku, jako jsou AMP cílicí na membránu. Některé z nich, např. daptomycin, colistin, oritavancin a deriváty vankomycinu dalbavancin a telavancin, byly schváleny americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) a zavedeny do klinické praxe (Chen & Lu, 2020). Většinou se používají až jako antibiotika poslední volby na léčbu infekcí způsobených multirezistentními kmeny bakterií.

Mezi AMP schválenými pro léčbu v roce 2014 patří telavancin, který je semisyntetickým derivátem vankomycinu (Obrázek 2.4.A,B), a patří tedy mezi lipoglykopeptidy. Jedná se o amfipatickou molekulu, jejíž hydrofobní část tvoří decylaminoethyl a hydrofilní (fosfometyl)aminometylová skupina (Leadbetter *et al.*, 2004). Telavancin má dva mechanismy účinku. Tak jako vankomycin inhibuje syntézu peptidoglykanu vazbou na jeho D-Ala, D-Ala konec. Jeho druhý účinek na bakteriální buňku spočívá v narušení membrány. Způsobuje zvýšenou permeabilitu membrány, únik intracelulárního draslíku a ATP a ztrátu membránového potenciálu (Higgins *et al.*, 2005). Používá se na léčbu kožních infekcí (Plotkin *et al.*, 2011).



Obrázek 2.4 Molekuly AMP používané v klinické praxi; A) Vankomycin, B) Telavancin (barevně jsou označeny řetězce lišící se od vankomycinu), C) Colistin. Upraveno podle Dunbar *et al.*, 2008 a Gurjar *et al.*, 2015.

Dalším používaným AMP je colistin (Obrázek 2.4C). Je to cyklický lipopeptid patřící mezi polymyxiny. Zvyšuje permeabilitu vnější membrány a únik vnitrobuněčného obsahu (Mohamed *et al.*, 2014). Polymyxiny interagují s LPS, se kterým tvoří klastry. Diskontinuita mezi klastrem a ostatními fosfolipidy způsobuje rozrušení membrány (Khadka *et al.*, 2018). Je tvořen deseti aminokyselinami, šest



z nich jsou lyziny, a 6-metyl oktanovou mastnou kyselinou (Chen & Lu, 2020). Používá se jako antibiotikum poslední volby k léčbě infekcí způsobených rezistentními G<sup>-</sup> bakteriemi (Mohamed *et al.*, 2014).

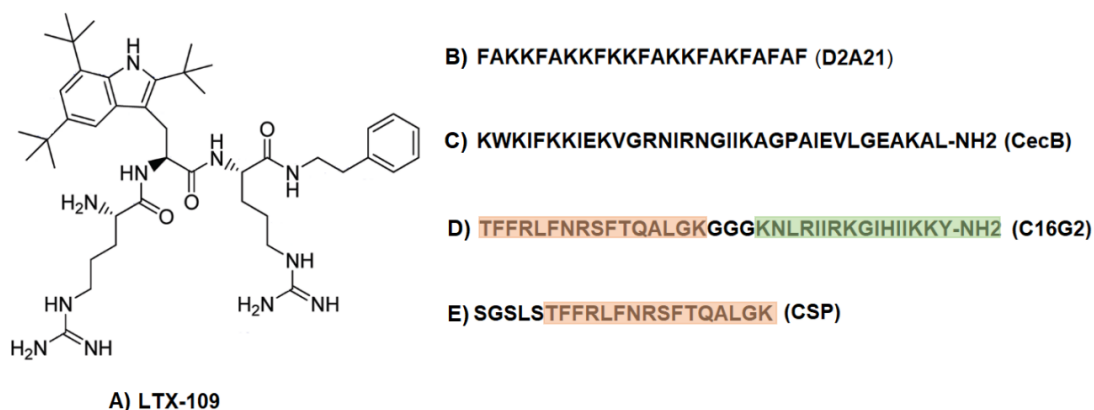
### 2.2.1.2 Peptidomimetika

Ačkoliv se AMP zdají jako slibný přírodní zdroj pro nová antibiotika, mají také svá omezení. Jelikož je membrána jejich místem zásahu, jsou často toxické i pro eukaryotní buňky, tím pádem nevhodné pro humánní nebo veterinární medicínu. Další jejich nevýhodou je, že některé podléhají účinku proteáz. Izolace AMP z přírodních zdrojů má také často nízké výtěžky a jejich produkce je pomalá a nákladná (Dias & Rauter, 2019). Tyto důvody vzbudily zájem o přípravu syntetických AMP, které jsou někdy nazývány jako peptidomimetika. Jak už název napovídá, tyto látky napodobují přírodní AMP. Nesou ale strukturální modifikace, které zlepšují jejich vlastnosti, jako je např. zvýšená stabilita *in vivo*, odolnost vůči proteázám, snížená toxicita, antibakteriální aktivita proti širšímu spektru bakterií nebo jednoduchá syntéza (O'Connell *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017).

Peptidomimetik je nepřehledné množství. V následujících odstavcích představím jako příklad tři vybrané látky, které jsou již ve druhé nebo třetí fázi klinických testů. První z těchto látek je syntetická molekula označená LTX-109, která je tvořena tryptofanovým jádrem substituovaným terc-butylovými zbytky, dále obsahuje dva argininy a jeden fenethyl (Obrázek 2.5A). Díky svému amfipatickému charakteru se dobře zabudovává do membrány, kterou narušuje (Flemming *et al.*, 2009; Isaksson *et al.*, 2011). Vykazuje dobrý antimikrobiální účinek vůči G<sup>+</sup> bakteriím (MIC *S. aureus* 2 µg/ml), proti G<sup>-</sup> bakteriím (MIC *P. aeruginosa* 8 µg/ml) i proti kmenům *S. aureus* rezistentním k vankomycinu nebo meticilinu (u obou MIC 2-4 µg/ml). Zároveň vykazuje nízkou hemolytickou aktivitu HC<sub>50</sub> (koncentrace, při které lyzuje 50 % červených krvinek) 175 µg/ml (Isaksson *et al.*, 2011; Saravolatz *et al.*, 2012). Tato látka prošla již druhou fází klinických studií. Byla testována její bezpečnost, snášenlivost, biologická dostupnost a účinnost proti perzistentním kmenům *S. aureus* v nosní dutině. Také byla ověřována závislost účinku na koncentraci. Látka byla aplikována na sliznici nosu v koncentraci 2 % a 5 % v podobě gelu po tři dny. Během této doby došlo k významné redukci jednotek tvořících kolonii (CFU, colony forming unit), ale docházelo častěji k vedlejším účinkům jako je zarudnutí, svědění nebo pálení (Nilsson *et al.*, 2015).

Druhou popisovanou látkou je D2A21, který je derivátem cecropinu (Obrázek 2.5C) (Ballweber *et al.*, 2002). Tvoří jej pouze tři druhy aminokyselin: lysin, alanin a fenylalanin, kterých je v molekule celkem 23 (Obrázek 2.5B) (Schwab *et al.*, 1999). Způsobuje narušení integrity membrány a výtok obsahu cytoplazmy (Ballweber *et al.*, 2002). Je účinný proti *S. aureus* (MIC 2 µg/ml) a *P. aeruginosa* (MIC 2 µg/ml), také proti kmenu *S. aureus* rezistentnímu k meticilinu (MRSA, methicilin-resistant *S. aureus*) (MIC 1 µg/ml) a také proti multirezistentním kmenům *P. aeruginosa* (MIC 1 µg/ml) (Schwab *et al.*, 1999). Byl použit na léčbu kožní infekce u myši způsobené *P. aeruginosa*, kdy u všech testovaných jedinců došlo k vyléčení infekce (Chalekson *et al.*, 2003). Díky těmto výsledkům byl tento derivát kandidátem pro klinické testování. D2A21 je nyní ve třetí fázi klinických testů proti infekcím popálenin při topickém podání (Koo & Seo, 2019).

O něco větším peptidem, než byl předchozí zástupce, je peptid s označením C16G2, který je tvořen celkem 35 aminokyselinami (Obrázek 2.5D). Jeho mechanismus účinku spočívá v poškození membrány, které vede ke ztrátě membránového potenciálu a k výtoku malých molekul jako je ATP (Kaplan *et al.*, 2011). C16G2 patří mezi tzv. specificky cílené antimikrobiální peptidy, protože ve své struktuře obsahuje sekvenci osmi aminokyselin (C16 oblast), která je stejná jako u peptidu CSP (Obrázek 2.5E) stimulujícího kompetenci u *Streptococcus mutans*. Díky této sekvenci dané peptidomimetikum cílí přímo na *S. mutans*, ale ne na ostatní streptokoky osidlující ústní dutinu. Oblast peptidu nazvaná G2 zase odpovídá za účinek na membránu. Tyto dvě části peptidu jsou spojeny třemi glyciny (Eckert *et al.*, 2006). MIC proti *S. mutans* je 20 µg/ml, což se v porovnání s předchozími peptidomimetiky může zdát jako slabá aktivita, ale u jiných testovaných streptokoků, jako jsou např. *S. gordonii* nebo *S. sanguinis* byla MIC pětinašobně vyšší (Kaplan *et al.*, 2011). Při koncentraci odpovídající desetinásobku MIC nevykazuje hemolytickou aktivitu (Sullivan *et al.*, 2011). Tento peptid je nyní ve druhé fázi klinických testů, kde se ve formě ústní vody testuje jeho aktivita proti zubnímu kazu způsobenému *S. mutans* (Koo & Seo, 2019).



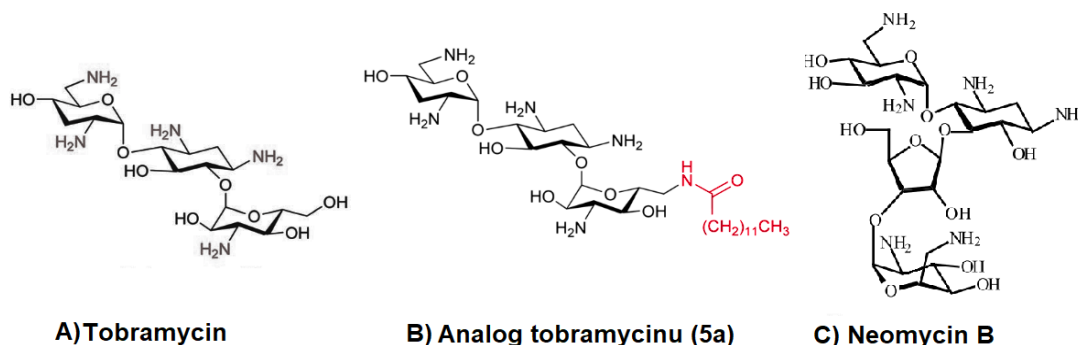
Obrázek 2.5 Skruktury peptidomimetik; A) LTX-109, B) Sekvence aminokyselin v peptidu D2A21, který je derivátem cecropinu, C) Sekvence cecropinu B, D) Sekvence peptidu C16G2, E) Sekvence peptidu CSP stimulujícího kompetenci u *S. mutans*. Oranžově jsou zvýrazněny oblasti C16, které jsou sekvenčně shodné u peptidu C16G2 a u peptidu CSP, zeleně je zvýrazněna oblast G2 odpovídající za účinek na membránu. Upraveno z Gazit *et al.*, 1995, Schwab *et al.*, 1999, Isaksson *et al.*, 2011 a Kaplan *et al.*, 2011.

### 2.2.2 Membránově aktivní látky nepeptidické povahy

Antimikrobiální látky nemusí být pouze peptidové povahy. V přírodě se vyskytují i malá nepeptidická antibiotika jako jsou například aminoglykosidy produkované streptomycetami nebo reutericyklin produkovaný *Lactobacillus reuteri*. Většinou se jedná o malé molekuly mimikující vlastnosti AMP. Mnoho nepeptidických antimikrobiálních látek je syntetizováno chemickou cestou, ale i přesto se mohou podobat některým přírodním molekulám, protože se jejich autoři inspirovali v přírodě. Malé molekuly mají výhodu oproti peptidům, protože se snadněji syntetizují, a proto jsou výhodnější pro průmyslovou produkci. Také se lépe vstřebávají do krevního řečiště a lépe se vylučují z těla (Ghosh & Haldar, 2015).

Typickým příkladem nepeptidických antibiotik jsou aminoglykosidy. Aminoglykosidy jsou chemicky aminosacharidy, které produkují bakterie rodu *Streptomyces*. Prvním izolovaným aminoglykosidem byl streptomycin izolovaný z bakterie *Streptomyces griseus* (Schatz *et al.*, 1944). Aminoglykosidy jsou ve fyziologickém prostředí kladně nabitě, proto se snadno váží na záporně nabitě bakteriální membrány, které permeabilizují, aby mohly proniknout dovnitř do buňky (Herzog & Fridman, 2014; Krause *et al.*, 2016). Uvnitř interagují s 30S podjednotkou ribozomu a způsobují nesprávné čtení RNA ústící v tvorbu nesprávně sbalených a nefunkčních proteinů (Weisblum & Davies, 1968; Benveniste & Davies, 1973). Některé úplně, jako např. gentamicin a paromomicin, inhibují elongaci proteinů (Tsai *et al.*,

2013). Inkorporace špatně sbalených membránových proteinů způsobuje poškození membrány (Anand & Davis, 1960; Davis *et al.*, 1986). Několik vědeckých skupin uvažovalo o přidání hydrofobních řetězců na alkoholové skupiny aminoglykosidů, které by mohlo vést k vytvoření aminoglykosidů, které membránu přímo rozruší už prvotní vazbou (Herzog & Fridman, 2014). Jedním z takto modifikovaných aminoglykosidů byl tobramycin (Obrázek 2.6A). Bylo vytvořeno několik různých analogů tobramycinu, ale amidový analog s připojeným dvanáctiuhlíkatým řetězcem byl nejslibnější (Obrázek 2.6B). Tento analog vykazoval větší antimikrobiální aktivitu (např. MIC u *Staphylococcus epidermidis* 8  $\mu\text{g/ml}$ ) než tobramycin (MIC *S. epidermidis* 128  $\mu\text{g/ml}$ ) a zároveň tento analog nebyl ani při čtyřnásobné MIC hemolytický (Herzog *et al.*, 2013). Další skupina vytvářela analogy neomycinu B (Obrázek 2.6C). U analogů, u nichž byly volné aminové skupiny guanylovány, byla obnovena účinnost vůči MRSA a vůči kmenům *P. aeruginosa* rezistentních k neomycinu (Bera *et al.*, 2010).



Obrázek 2.6 Porovnání aminoglykosidů; A) Tobramycin, B) Amidový analog tobramycinu s dvanáctiuhlíkatým řetězcem (červeně je označen řetězec lišící se od tobramycinu), C) Neomycin; Upraveno z Kotra *et al.*, 2005 a Herzog *et al.*, 2013.

Mezi přírodní nepeptidická antibiotika patří také reutericyklin, který je produkován bakterií *Lactobacillus reuteri* kmenem LTH2584 (Gänzle *et al.*, 2000). Chemicky se jedná o N-acyltetramovou kyselinu (Obrázek 2.7A). Reutericyklin je hydrofobní molekula (Höltzel *et al.*, 2000), která svým účinkem způsobuje ztrátu membránového potenciálu (Gänzle & Vogel, 2003). Inhibuje růst G<sup>+</sup> bakterií, proti *S. aureus* nebo proti *B. subtilis* vykazuje dokonce baktericidní účinek. G<sup>-</sup> bakterie jsou vůči tomuto antibiotiku necitlivé díky vnější membráně. Tuto hypotézu potvrdil pokus s mutantním kmenem *E. coli* s poruchou syntézy LPS, kdy tento mutant byl reutericyklinem inhibován v růstu na rozdíl od divokého kmene (Gänzle *et al.*, 2000). Chemická syntéza

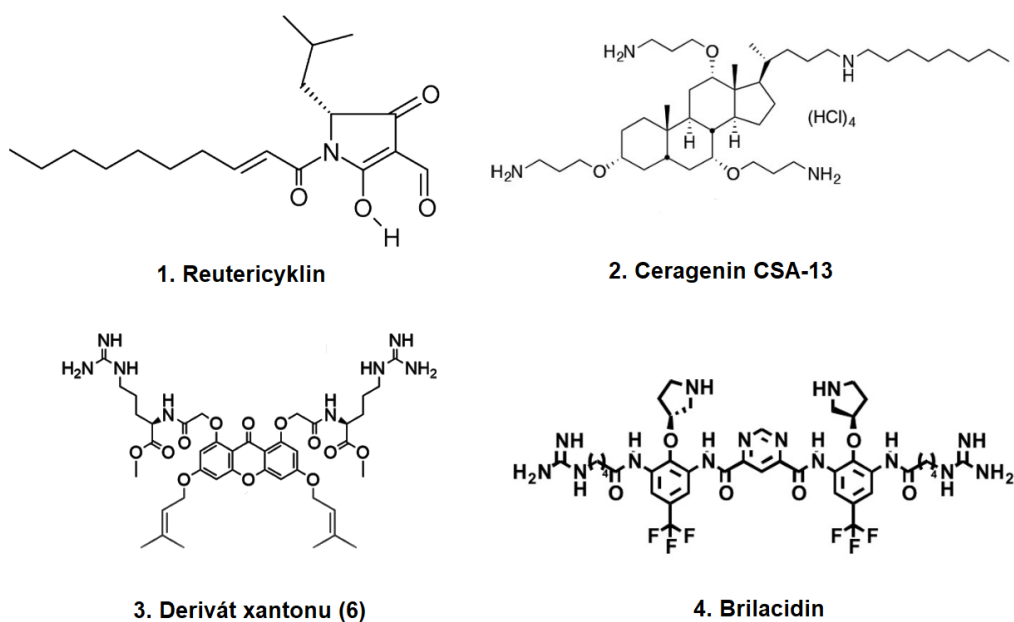
reutericyklinu je složitá kvůli jeho nestabilnímu N- $\alpha$ , $\beta$ -nenasycenému řetězci, proto bylo vytvořeno několik analogů obsahujících místo tohoto řetězce N-alkyl, N-aryl nebo N-alkenyl (Yendapally *et al.*, 2008). Některé z těchto analogů si zachovaly dobrou účinnost proti *S. aureus* (MIC 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ) v porovnání s původní molekulou (MIC 1,6  $\mu\text{g/ml}$ ). Vybrané analogy byly využity k experimentální léčbě kožní infekce způsobené *S. aureus* u myši, kdy došlo ke snížení CFU v infikovaných ranách (Hurdle *et al.*, 2009). Další pokus o syntézu jiných analogů byl ještě o něco úspěšnější než předcházející. Čtyři z 19 analogů měly čtyřikrát větší účinek proti MRSA než původní reutericyklin. U dvou z těchto analogů se objevil další mechanismus účinku proti bakteriím, a to inhibice syntézy DNA, RNA i proteinů (Cherian *et al.*, 2014). Tyto molekuly vypadají slibně pro možné terapeutické využití díky svým nízkým hemolytickým aktivitám a zároveň dobré antimikrobiální aktivitě, ale bude potřeba ještě dalších experimentů, aby se mohlo o případném terapeutickém využití uvažovat.

O cerageninech byla již zmínka v předchozí kapitole 0 jako o látkách, které preferují membrány tvořené z neutrálně nabitých fosfolipidů (Erand *et al.*, 2010). Jedná se o deriváty žlučové kyseliny s různým počtem navázaných aminových zbytků, které dávají molekule pozitivní náboj (Obrázek 2.7B) (Savage *et al.*, 2002). Jsou účinné proti  $G^+$  i  $G^-$  bakteriím, i když obecně jsou účinnější proti gram-pozitivním bakteriím. Cerageniny permeabilizují a depolarizují membránu, což je pro bakterie fatální. Jsou schopné také asociovat s vnější membránou  $G^-$  bakterií a permeabilizovat i ji. Jelikož cerageniny preferují neutrálně nabitě membrány, vykazují některé i hemolytickou aktivitu. Obecně lze říci, že čím větší má ceragenin antibakteriální účinek, tím více je i hemolytický (Savage *et al.*, 2002). Z vytvořených cerageninů byl nejslibnější CSA-13 (Erand *et al.*, 2010), který má také hemolytickou aktivitu, jež ale může být snížena tím, že se látka kovalentně naváže na magnetické nanočástice. Takto navázaný ceragenin vykazoval menší hemolytickou aktivitu a větší antimikrobiální aktivitu než původní volný (Niemirowicz *et al.*, 2015). CSA-13 byl také schopný zabíjet bakterie *P. aeruginosa* v biofilmu (Nagant *et al.*, 2013). Nově byla syntetizována druhá generace cerageninů, které mají ale velmi podobnou antibakteriální aktivitu jako původní CSA-13 – hodnoty se liší 0,5– 4krát. Látky jsou zatím v testování (Durnae *et al.*, 2016; Hashemi *et al.*, 2017; Olekson *et al.*, 2017; Bozkurt Guzel *et al.*, 2018).

Dalším příkladem nepeptidické molekuly s antibiotickým účinkem je xanton. Jedná se o molekulu složenou ze tří cyklů, z nichž dva jsou aromatické. Deriváty xantonu se

vyskytují v mnoha bakteriích, houbách, lišejnících a vyšších rostlinách jako sekundární metabolity (Masters & Bräse, 2012; Auranwiwat *et al.*, 2014). Tyto deriváty vykazují také mimo jiné antimikrobiální i antifungální aktivitu (Sundaram *et al.*, 1983; Inuma *et al.*, 1996). Jejich zásahovým místem je cytoplazmatická membrána bakterií. Způsobují narušení membrány vedoucí k vylití cytoplazmy (Koh *et al.*, 2013). Díky tomuto zjištění se začalo experimentovat s chemickými modifikacemi, kdy byly deriváty xantonu kompletně připravovány chemickou syntézou. Přidáváním různých substituentů bylo dosaženo zvýšení či snížení antimikrobiální aktivity proti  $G^+$  bakteriím.

Nejslibnější látka měla MIC u klinického izolátu *S. aureus* 0,39  $\mu\text{g/ml}$  a hemolytickou aktivitu  $\text{HC}_{50}$  19,6  $\mu\text{g/ml}$  (Koh *et al.*, 2016). Ještě úspěšnějších výsledků bylo dosaženo v druhé studii publikované touto skupinou. Syntetizovali symetrické molekuly, kdy si substituenty na prvním cyklu zrcadlově odpovídaly se substituenty na třetím cyklu (Obrázek 2.7C). Tímto postupem připravili dvě velmi slibné molekuly s dobrou antimikrobiální aktivitou proti testovaným kmenům MRSA (MIC 1,56 - 3,13  $\mu\text{g/ml}$ ) a zároveň velmi nízkou  $\text{HC}_{50}$  (750, resp. 2 000  $\mu\text{g/ml}$ ) (Lin *et al.*, 2017).



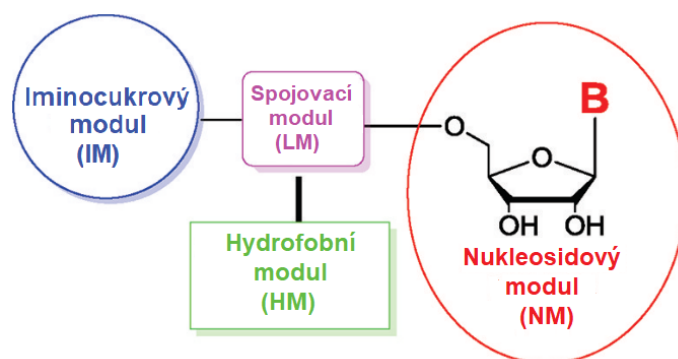
Obrázek 2.7 Nepeptidické antimikrobiální látky; A) Reutericyclin, B) Ceragenin CSA-13, C) Derivat xantonu číslo 6, D) Brilacidin; Upraveno z Gänzle *et al.*, 2004, Mensa *et al.*, 2014, Hashemi *et al.*, 2017 a Lin *et al.*, 2017.

Poslední zde zmíněnou látkou je klinicky velmi slibný brilacidin. Chemicky se jedná o arylamid nesoucí dvě guanidinové skupiny, dva pyrrolidiny a dvě trifluorometylové skupiny (Obrázek 2.7D). Jeho mechanismus účinku spočívá v depolarizaci membrány. Účinkuje proti  $G^+$  bakteriím (MIC *Streptococcus pneumoniae* 1  $\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus* 0,05  $\mu\text{g/ml}$ ) i proti  $G^-$  bakteriím (MIC *E. coli* 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , *P. aeruginosa* 1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) (Choi *et al.*, 2009; Kowalski *et al.*, 2016). Zároveň má nízkou hemolytickou aktivitu ( $\text{HC}_{50}$  56  $\mu\text{g/ml}$ ). Byl efektivní v léčbě zánětu u myši způsobeného *S. aureus* při intravenózním podání. Při dávce 2 mg/kg došlo ke snížení CFU *in vivo* o pět řádů (Choi *et al.*, 2009). Brilacidin má za sebou druhou fázi klinických testů, kde byl testován pro léčbu kožních infekcí. Tato studie prokázala bezpečnost a dobrou toleranci k brilacidinu (Scott & Tew, 2016). Brilacidin je také v preklinickém testování pro potenciální léčbu očních infekcí (Novack, 2014; Kowalski *et al.*, 2016).

### 2.3 Lipofosfonoxiny

Lipofosfonoxiny (LPPO, lipophosphonoxins) jsou malé syntetické molekuly, které byly vyvinuty na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky,

v. v. i. panem Ing. Dominikem Rejmanem, CSc. a jeho spolupracovníky (Rejman, 2012 - patent). Stejně jako předchozí zmíněné antimikrobiální látky (kapitola 2.2), jsou LPPO malé (molekulová hmotnost 700–1000 g/mol) amfipatické molekuly cílící na cytoplazmatickou membránu bakterií (Panova *et al.*, 2015). Celkem byly dosud připraveny čtyři generace LPPO. Molekuly prvních dvou generací LPPO se skládají ze čtyř modulů: iminocukrový, spojovací, hydrofobní a nukleosidový (Obrázek 2.8) (Rejman *et al.*, 2011).



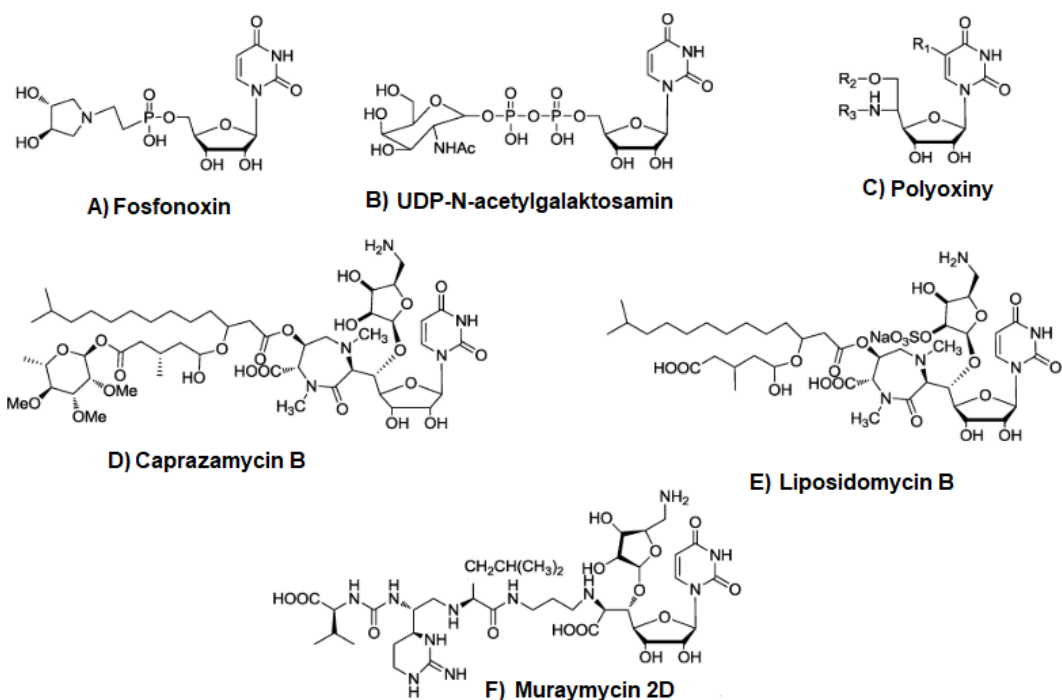
Obrázek 2.8 Schéma molekuly LPPO 1. a 2. generace; iminocukrový modul (IM), spojovací modul (LM), nukleosidový modul (NM) a hydrofobní modul (HM). Upraveno z Rejman *et al.*, 2011.

### 2.3.1 Vznik a vývoj LPPO

Lipofosfonoxiny vznikly z fosfonoxinů přidáním hydrofobního řetězce na fosfátovou skupinu. Fosfonoxiny (Obrázek 2.9A) byly syntetizovány jako antiprotozoikum proti prvokům rodu *Giardia*, kde inhibují glykosyl transferázu-syntázu buněčných stěn cyst. Fosfonoxiny se svojí strukturou podobají uridindifosfo(UDP)-N-acetylgalaktosaminu (Obrázek 2.9B), což je substrát této glykosyl transferázy-syntázy, která z něj vytváří poly  $\beta$ -1-3-N-acetylgalaktosamin. Pomocí této inhibice fosfonoxiny zabraňují vegetativnímu růstu prvoka a také brání tvorbě cyst (Suk *et al.*, 2007).

Fosfonoxiny se svou strukturou podobají některým antimikrobiálním látkám, mezi které patří polyoxiny, caprazamyciny, liposidomyciny nebo muraymyciny. Jak je vidět na Obrázek 2.9, všechny tyto látky ve své struktuře obsahují nukleosidovou skupinu, na které mají navázané další substituenty. Všechny tyto látky jsou produkovány bakteriemi rodu *Streptomyces*.





Obrázek 2.9 Porovnání struktur molekul podobných s fosfonoxiny; A) Fosfonoxin, B) UDP-N-acetylgalaktosamin, C) Polyoxiny, D) Caprazamycin B, E) Liposidomycin B, F) Muraymycin 2D. Upraveno z Rejman *et al.*, 2011.

Polyoxiny jsou látky produkované *Streptomyces cacaoi* (Isono *et al.*, 1965), které mají antifungální účinek (Isono *et al.*, 1967). Polyoxiny (Obrázek 2.9.C) mají podobnou strukturu jako UDP-N-acetylglukosamin, který je substrátem pro tvorbu chitinu, jenž tvoří buněčnou stěnu hub. Díky této strukturní podobnosti soupeří o aktivní místo enzymu chitin syntetázy a tím celou syntézu inhibují (Endo *et al.*, 1970; Hori *et al.*, 1971).

Caprazamyciny (Obrázek 2.9D) byly izolovány z kmene *Streptomyces* spp. MK730-62F2. Účinkují proti  $G^+$  bakteriím (např. *Streptococcus pneumoniae* MIC 1  $\mu\text{g/ml}$ ), ale také proti kmenům *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 6,25–12,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Při testech na myších nevykazoval žádnou toxicitu (Igarashi *et al.*, 2003). Mechanismem účinku je blokáce tvorby peptidoglykanu inhibicí translokázy Mray (Ishizaki *et al.*, 2013), která zabudovává UDP-N-acetylmuramovou kyselinu do vznikajícího peptidoglykanového řetězce (Bugg *et al.*, 2006).

Liposidomyciny (Obrázek 2.9E) jsou produkovány bakterií *Streptomyces griseosporus*. Stejně jako předchozí caprazamyciny účinkují proti *M. tuberculosis* (MIC 1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) (Isono *et al.*, 1985). Shodný je i mechanismus účinku, kdy také dochází k zabránění syntézy peptidoglykanu inhibicí translokázy Mray (Kimura *et al.*,

1989; Bugg *et al.*, 2006). Původní izolované liposidomyciny měly velmi slabý antimikrobiální účinek proti ostatním G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakteriím (MIC 100 µg/ml a více) (Isono *et al.*, 1985). Proto byly různě chemicky modifikovány, aby byly účinné i proti dalším bakteriím. U jednoho analogu, který měl místo původního diazepanového kruhu čtrnáctiuhlíkatý řetězec s koncovým aminem, bylo dosaženo MIC proti *S. aureus* 2,5 µg/ml a proti *E. coli* také 2,5 µg/ml (Dini *et al.*, 2002).

Poslední zmíněné v této skupině jsou muraymyciny (Obrázek 2.9F), které byly izolovány také ze *Streptomyces* sp. Mezi sebou se muramyciny odlišují aminocukrovou skupinou a mastnou kyselinou (McDonald *et al.*, 2002). Stejně jako caprazamyciny a liposidomyciny i muraymyciny inhibují translokázu MraY; (McDonald *et al.*, 2002; Bugg *et al.*, 2006). Dva nejaktivnější zástupci B8 a B9 mají MIC proti *S. aureus* 2 µg/ml (B8) a 6 µg/ml (B9), ale proti *E. coli* dosahují MIC 64 µg/ml (B8) a 32 µg/ml (B9) (Cuin *et al.*, 2018).

Díky podobnosti v chemické struktuře fosfonoxinů a těchto látek se očekávalo, že i fosfonoxiny by mohly mít antibakteriální účinek. Bohužel, toto očekávání nebylo naplněno. Negativní náboj na fosfonátové skupině pravděpodobně brání interakci s negativně nabitou bakteriální buňkou. K molekule fosfonoxinu byla proto připojena hydrofobní hexadecyloxypropyl esterová skupina, aby usnadnila interakci s membránou. Takto vytvořená molekula dostala název lipofosfonoxin (Rejman *et al.*, 2011).

### 2.3.1.1 1. generace LPPO

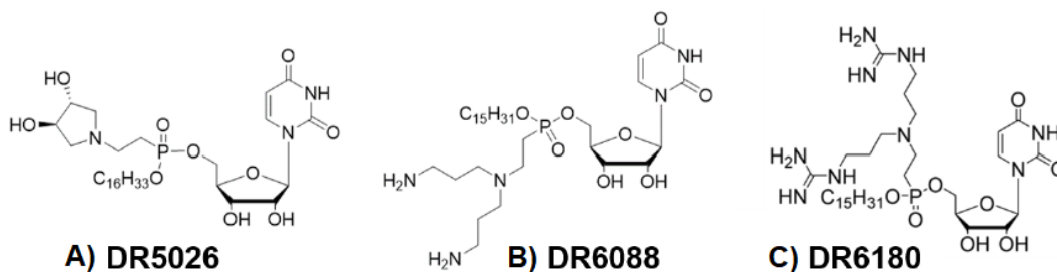
Na začátku bylo vytvořeno několik variant LPPO, které se lišily různými chemickými skupinami napříč moduly, a byla testována jejich antimikrobiální aktivita a cytotoxicita. V nukleosidovém modulu byl původní uridin zaměněn za cytidin, což vedlo ke zvýšení antimikrobiální aktivity (např. MIC u *E. faecalis* klesla z 12,5 µg/ml na 6,25 µg/ml). V iminocukrovém modulu byly testovány původní hydroxylované pyrrolidiny a piperidiny. U analogů s piperidiny došlo k drastickému snížení antimikrobiální aktivity (MIC u *E. faecalis* 200 µg/ml). V hydrofobním modulu byly testovány skupiny hexadecyloxypropylu, etylu, pivaloylthioethylu, tetradecylu, hexadecylu, octadecylu nebo eicosanyl esteru. Nejlepšího účinku dosahoval LPPO s hexadecyl esterovou skupinou (MIC *E. faecalis* 6,25 µg/ml, *B. subtilis* 3,13 µg/ml, *Streptococcus agalactiae* 1,56 µg/ml a *S. aureus* 6,25 – 12,5 µg/ml). Tento LPPO byl

vybrán pro další testování a byl označen DR5026 (Obrázek 2.10A) (Rejman *et al.*, 2011).

### 2.3.1.2 2. a 3. generace LPPO

První generace LPPO je účinná pouze proti  $G^+$  bakteriím, proti  $G^-$  bakteriím *P. aeruginosa* a *E. coli* vykazovala MIC vyšší jak 200  $\mu\text{g/ml}$  (Rejman *et al.*, 2011). Pro rozšíření antimikrobiálního spektra byla vytvořena druhá generace LPPO, která se od předchozí lišila především změnou iminocukrového modulu. Nejlepších aktivit dosáhly dvě látky: jedna s aminoskupinou označovaná jako DR6088 (Obrázek 2.10B) a druhá s guanidinovou skupinou v iminocukrovém modulu označovaná jako DR6180 (Obrázek 2.10C). Tyto látky vykazovaly aktivitu i proti  $G^-$  bakteriím (DR6088: MIC *E. coli* 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , *P. aeruginosa* 3,13  $\mu\text{g/ml}$ ; DR6180: MIC *E. coli* i *P. aeruginosa* 0,78  $\mu\text{g/ml}$ ) a zvýšenou aktivitu proti  $G^+$  bakteriím v porovnání s první generací (DR6088: MIC *S. aureus* 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , *B. subtilis* 3,13  $\mu\text{g/ml}$ ; DR6180: MIC *S. aureus* 3,13  $\mu\text{g/ml}$  a *B. subtilis* 0,39  $\mu\text{g/ml}$ ). Změnou v iminocukrovém modulu došlo ke zvýšení pozitivního náboje molekuly, což vedlo ke zlepšení počáteční interakce s membránou a také k rozšíření účinku na bakterie s nižší hodnotou celkového povrchového negativního náboje na povrchu membrány. Změny hydrofobního modulu ukázaly, že nejlepších antimikrobiálních aktivit dosahovaly analogy s nasyceným alkylovým řetězcem o délce 14 nebo 15 uhlíků (Seydlova *et al.*, 2017).

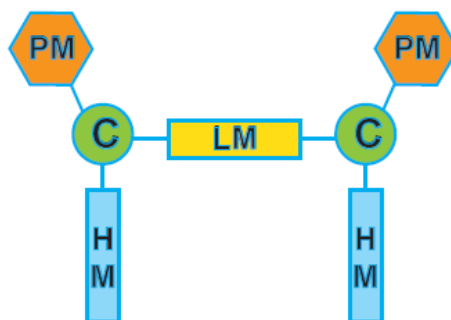
Vývoj LPPO pokračoval modifikacemi původních molekul, které měly za cíl zjednodušit molekulu LPPO. Vznikla tak i třetí generace. Tyto molekuly ale byly bohužel příliš toxické pro eukaryotní buňky, proto se nadále v jejich testování nepokračovalo. Třetí generace je tedy slepou vývojovou větví ve vývoji LPPO.



Obrázek 2.10 Zástupci první a druhé generace lipofosfonoxinů; A) DR5026 (zástupce první generace), B) DR6088 a C) DR6180 (zástupci druhé generace). Upraveno ze Seydlová *et al.*, 2017.

### 2.3.1.3 4. generace LPPO

Snaha vyvinout látky s co nejúčinnější antimikrobiální aktivitou a zároveň selektivitou vedla ke čtvrté generaci LPPO, která se od předchozích generací liší v tom, že je tvořena zrcadlově symetrickou molekulou (Obrázek 2.11) a také uspořádáním a složením jednotlivých modulů. Čtvrtá generace LPPO obsahuje následující moduly: hydrofobní, polární, konektor a spojovací.



Obrázek 2.11 Schéma molekuly čtvrté generace lipofosfonoxinů; PM: polární modul, C: konektor, LM: spojovací modul, HM: hydrofobní modul (Rejman, osobní komunikace, nepublikovaná data).

Jeden z dosud nejslibnějších nasyntetizovaných analogů je DR7072 (dále jen 7072). Tento analog účinkuje proti  $G^+$  bakteriím i  $G^-$  bakteriím (MIC v Tabulce 1) a zároveň má nízkou hemolytickou aktivitu ( $HC_{50}$  více než 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Polární modul tohoto analogu obsahuje aminové skupiny, spojovací modul nasycený alifatický řetězec o délce šesti uhlíků a hydrofobní modul nasycený osmiuhlíkatý alifatický řetězec. Mechanismus účinku tohoto analogu je předmětem této diplomové práce.

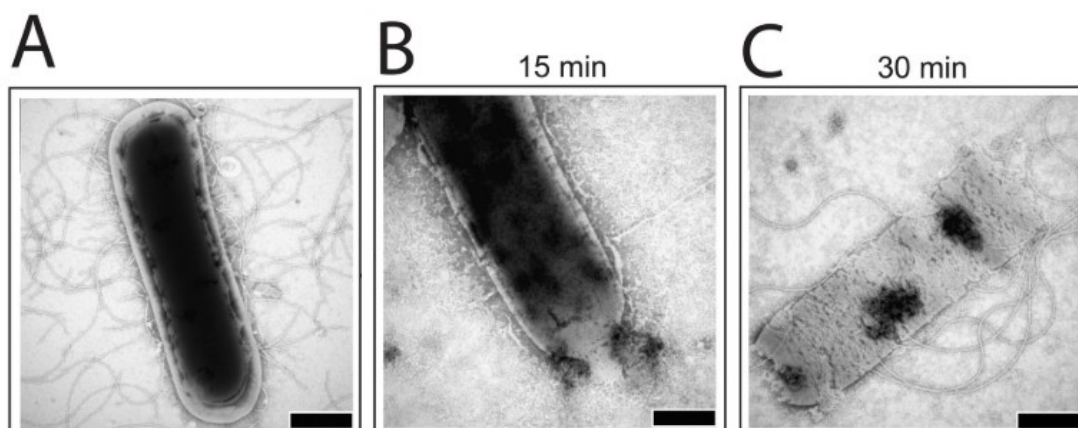
Pro porovnání vlivu délky alifatických řetězců na antibakteriální a hemolytickou aktivitu byly vybrány další dva analogy. Analog s označením DR7070 (dále jen 7070) se od analogu 7072 liší délkou spojovacího modulu, který činí deset uhlíků. Antibakteriální aktivitou se téměř rovná analogu 7072 (Tabulka 1), odlišuje se však svou vysokou hemolytickou aktivitou ( $HC_{50}$  6  $\mu\text{g/ml}$ ). Dalším analogem je DR7107 (dále jen 7107), který se od 7072 liší v délce hydrofobního modulu, který má délku pouze šest uhlíků. Oproti LPPO 7072 a 7070 vykazuje velmi malou aktivitu proti bakteriím (Tabulka 1) a zároveň není hemolytický ( $HC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ ) (Rejman, nepublikovaná data).

Tabulka 1 Minimální inhibiční koncentrace u testovaných LPPO

| MIC (µg/ml)                     | 7072 | 7070 | 7107  |
|---------------------------------|------|------|-------|
| <i>S. aureus</i> (CCM 4223)     | 0,5  | 0,5  | 8     |
| <i>E. faecalis</i> (CCM 4224)   | 1    | 0,5  | 128   |
| <i>E. coli</i> (CCM 3954)       | 0,5  | 0,5  | 32    |
| <i>P. aeruginosa</i> (CCM 3955) | 2    | 1    | > 128 |

### 2.3.2 Mechanismus účinku LPPO

Díky přítomnosti hydrofobního modulu bylo předpokládáno, že by LPPO 1. a 2. generace mohly interagovat s cytoplazmatickou membránou. Pomocí vodivostních měření na umělém systému planárních lipidických membrán (popis metody v kapitole 4.5) bylo zjištěno, že LPPO tvoří v membráně póry. Následující pokus s živými buňkami s použitím sondy propidium jodid (PI, propidium iodide) (popis metody v kapitole 4.6) potvrdil, že LPPO způsobují narušení membrány, díky kterému sonda pronikne dovnitř buňky. Celé toto pozorování bylo dovršeno snímkem z elektronového mikroskopu zobrazující buňky *B. subtilis* po inkubaci s 10 µg/ml LPPO. Jak je vidět na Obrázku 2.12, již po 15 minutách inkubace došlo k narušení membrány a výtoku cytoplazmy. Po 30 minutách došlo k úplnému rozpadu membrány (Panova *et al.*, 2015). Další pokusy ukázaly, že se LPPO 1. a 2. generace hromadí v cytoplazmatické membráně a neovlivňují syntézu DNA, RNA, proteinů, lipidů ani buněčné stěny (Panova *et al.*, 2015; Seydlova *et al.*, 2017).



Obrázek 2.12 Dezintegrace membrány buněk *Bacillus subtilis* po účinku LPPO; Znárodnění účinku látky DR5026 v koncentraci 10 µg/ml na buňky *B. subtilis*. A) Buňka bez účinné látky, B) Buňka po účinku látky po dobu 15 minut, C) Buňka po účinku látky po dobu 30 minut. Upraveno z Panova *et al.*, 2015.

Také byl testován potenciál vzniku rezistence proti LPPO. U první generace byly testovány bakterie *B. subtilis*, *E. faecalis* a *S. agalactiae*. Ani po 14 pasážích v subinhibiční koncentraci LPPO (0,5 µg/ml) nedošlo k významné změně MIC (Panova *et al.*, 2015). Potenciál vzniku rezistence u druhé generace byl testován na *P. aeruginosa*, u které ani po 20 pasážích v subinhibiční koncentraci (1,56 µg/ml) nedošlo ke změně MIC, která by indikovala vznik rezistence (Seydlova *et al.*, 2017).

### 2.3.3 Účinek LPPO na eukaryotní buňky a celé organizmy

Toxicita LPPO byla testována několika způsoby – testována byla metabolická aktivita udávající životaschopnost buňky, membránová integrita ukazující cytotoxicitu a aktivace kaspázy 3/7 vypovídající o apoptóze (Rejman *et al.*, 2011). LPPO první generace vykazovaly cytotoxicitu proti erytroidním progenitorovým buňkám až při koncentraci 31 µg/ml a více. Pokusy se sondou PI ukázaly, že LPPO nenarušují membránu myších makrofágů. Pomocí Amesova testu bylo potvrzeno, že LPPO této generace nejsou genotoxické. Na myším modelu při *per os* podání nevykazovaly žádný projev toxicity ani při maximální dávce (2 g/kg), při intraperitoneálním podání byla snášenlivost horší, a to pouze 50 mg/kg (Panova *et al.*, 2015).

Podobně jako první generace vykazuje i druhá generace LPPO toxicitu proti eukaryotním buňkám až při koncentraci nad 30 µg/ml. Testovány byly tři různé buněčné linie: BJ (normální primární lidské fibroblasty s limitovaným počtem dělení), RPE-1 (normální epiteliální imortalizované buňky z rohovky) a Hep G2 (buňky hepatocelulárního karcinomu) pomocí stejných tří typů testů zmíněných v předchozím odstavci. Druhá generace také nenarušuje membránu myších makrofágů (měřeno vstupem sondy PI do buněk). Při testech s Caco-2 monovrstvou buněk bylo zjištěno, že LPPO neprocházejí skrz buňky z apikální strany na bazolaterální a ani nezůstávají v buňkách. Hemolytická aktivita (HC<sub>50</sub>) u obou vybraných zástupců DR6088 a DR6180 byla 16 µg/ml, což odpovídá 2–4násobku MIC u různých bakterií. Testy snášenlivosti na myších při orálním podání ukázaly, že LPPO této generace nevykazují žádné syndromy toxicity (např. úbytek hmotnosti zvířete nebo následná smrt) ani při maximální dávce 2 g/kg. I při testu dráždivosti kůže na králících u nich nedošlo k žádným fyziologickým, morfologickým nebo behaviorálním změnám (Seydlova *et al.*, 2017).

### 3 Cíle

Cílem této diplomové práce bylo zjistit mechanismus účinku 4. generace LPPO a studovat vliv struktury LPPO na jejich aktivitu. Pro tuto strukturně-aktivitní studii byly vybrány tři zástupci LPPO. Prvním z nich je 7072, který vykazuje slabé antimikrobiální účinky a zároveň nízkou hemolytickou aktivitu. Aktivita tohoto LPPO byla porovnávána s hemolytickým LPPO 7070, který se liší od 7072 délkou spojovacího modulu o čtyři uhlíky, a s LPPO 7107 s nízkou antibakteriální aktivitou. Tento LPPO se od 7072 odlišuje o dva uhlíky kratším hydrofobním modulem. Pro testování vlivu LPPO na živé buňky byl modelovou  $G^+$  bakterií *S. aureus* a modelovou  $G^-$  bakterií *E. coli*.

Dílčí cíle:

- 1) Ověřit a porovnat pórtvornou aktivitu LPPO
- 2) Zjistit, zda odlišné fosfolipidové složení membrány ovlivňuje aktivitu LPPO
- 3) Zjistit, zda LPPO permeabilizují membránu a narušují membránový potenciál vybraných modelových bakterií
- 4) Zjistit, do jaké míry LPPO překonávají vnější membránu *E. coli* a jak jejich účinnost ovlivňuje přítomnost lipopolysacharidu
- 5) Zjistit vliv LPPO na životaschopnost bakterií

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité bakteriální kmeny

Pro pokusy byly použity následující kmeny bakterií:

*Escherichia coli* CCM 3954

*Escherichia coli* imp 4213 (Caetano *et al.*, 2011)

*Staphylococcus aureus* CCM 4223

Tyto kmeny byly uchovávány v kryokonzervách v 15% glycerolu v -80 °C. Z těchto konzerv byly bakterie vyočkovány na šikmé agary s Luria-Bertani (LB) médiem. Bakterie byly kultivovány přes noc ve 37 °C a následně uskladněny ve 4 °C po maximální dobu jednoho měsíce.

### 4.2 Příprava kultivačních půd

#### **Luria-Bertani médium**

Trypton: 10 g/l (Oxoid)

Kvasničný autolyzát: 5 g/l (Oxoid)

NaCl: 10 g/l (Lach-Ner)

Destilovaná voda

Agar (Oxoid) – příprava pevného média

Při přípravě pevných médií byl do LB média přidán agar na výslednou koncentraci 2 %.

### 4.3 Sterilizace

Média a vodné roztoky byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C v přetlaku vodní páry 0,12 MPa po dobu 20 minut. Pufr pro měření na planárních lipidických membránách a vnější pufr pro přípravu suspenze lipozómů byly sterilizovány filtrací (filtry Milliex GS s velikostí pórů 0,22 µm, Milipore), která zachytila i případné mechanické nečistoty, které by mohly narušovat měření. Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně 60 minut při 180 °C.



## 4.4 Kultivace bakteriálních kultur

Biomasa narostlá na šikmých agarrech byla zaočkována do 30 ml LB média v 250ml Erlenmayerově baňce a aerobně kultivována v horkovzdušné třepačce při teplotě 37 °C a otáčkách 180 rpm přes noc. Z této noční kultury byla zaočkována ranní kultura tak, aby měla výchozí optickou denzitu při 450 nm ( $OD_{450}$ ) = 0,05. Takto zaočkována kultura byla kultivována při stejných podmínkách (37 °C, 180 rpm) až do hodnoty  $OD_{450}$  = 0,5. Při dosažení této OD byla kultura centrifugována při 5 000 g po dobu 10 minut při 25 °C, aby došlo k oddělení buněk od média.

## 4.5 Vodivostní měření na planárních lipidických membránách

### Použitý materiál:

Pentan (Sigma-Aldrich)

Etanol (Penta)

Dekan (Sigma-Aldrich)

Butanol (Sigma-Aldrich)

Měřicí pufr: 1 M KCl (Sigma-Aldrich)

10 mM Tris (Sigma-Aldrich)

pH 7,4

Difytanoylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylcholin (Avanti Polar Lipids)

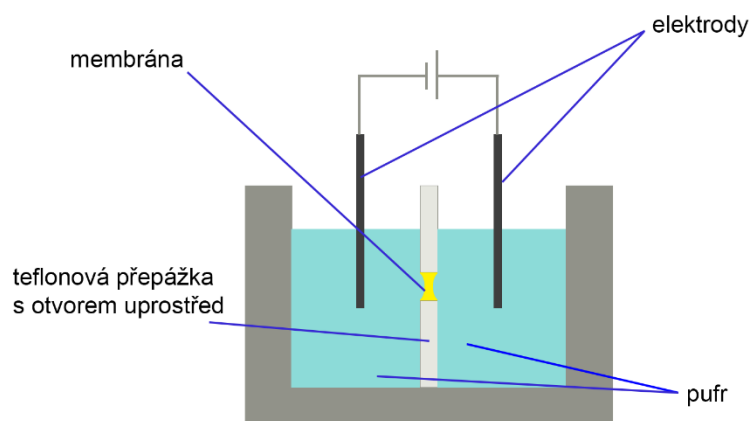
Diolelylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

LPPO: 1 mg/ml, destilovaná voda

Pomocí měření na planární lipidové membráně vytvořené ze syntetických fosfolipidů byl sledován pórotvorný účinek LPPO na úrovni jednotlivých molekul. Směs syntetických fosfolipidů napodobovala složení a náboj membrán bakterií nebo eukaryotních buněk. Na tomto umělém systému byl sledován vliv složení membrány a koncentrace LPPO na velikost a stabilitu pórů.

Měření probíhalo v teflonové komůrce, která je rozdělena teflonovou přepážkou s malým otvorem uprostřed (Obrázek 4.1). Otvor v přepážce měl plochu asi  $0,5 \text{ mm}^2$ . Před každým použitím byla komůrka vypláchnuta horkou vodou, denaturovaným etanolem, proudem vody z vodovodního kohoutku, destilovanou vodou a čistým etanolem a následně vysušena pentanem. Stejně byly promyty všechny součásti komůrky, elektrody a špendlík pro nanášení lipidů. Poté byl do obou oddělených částí komůrky přidán 1 ml pufru. Před každým měřením byla ověřena funkčnost a symetrie používaných Ag/AgCl elektrod a bylo nastaveno napětí na membráně na 50 mV. Fosfolipidová směs, která byla složena z 3% (w/v) roztoku fosfolipidů ve směsi dekan:butanol 9:1 (v/v), byla nanesena pipetou na skleněnou špendlíkovou hlavičku. Touto špendlíkovou hlavičkou byla směs přenesena přetažením přes otvor v přepážce, aby vytvořila tenkou fosfolipidovou dvouvrstvu. Pro kontrolu dostatečné stability membrán pro měření bylo vytvořeno a následně úmyslně zničeno několik membrán. Pokud membrány nepraskly po dobu nejméně 30 minut, byly považovány za dostatečně stabilní a mohlo se přejít k samotnému měření. Na *cis* stranu komůrky byly přidány LPPO na požadovanou koncentraci a objem komůrky byl důkladně promíchán automatickou pipetou.

Do systému bylo pomocí Ag/AgCl elektrod vkládáno napětí a proud procházející přes membránu byl zaznamenáván pomocí 10 nebo 100 GV/A zesilovače (MIT), sběrnou PCI kartou KPCI – 3108 (Keithley Instruments) a softwarem BLM2, který byl vytvořen na míru na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy panem Doc. RNDr. Jiřím Bokem, CSc. Pokud je membrána nenarušená, pohybuje se hodnota procházejícího proudu okolo nuly. Pokud ale dojde k vytvoření kanálu pórtvornou látkou, systém se stane vodivým a dojde ke skokovému nárůstu intenzity proudu, která je zaznamenána. Záznam proudu v čase byl poté manuálně vyhodnocen pomocí programu QuB (<https://qub.maelics.com/>).



Obrázek 4.1 Schéma teflonové komůrky

## 4.6 Sledování permeabilizace membrány živých buněk pomocí vstupu sondy propidium jodid

### Použitý materiál:

Propidium jodid: 20 mM (Sigma-Aldrich), dimethylsulfoxid (DMSO)

Pufr: 10mM 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetan sulfonová kyselina (HEPES) (Sigma-Aldrich)

0,5% glukóza (Penta)

Lipofosfonoxiny: 5 mg/ml, destilovaná voda

Melitin: 1mM (Sigma-Aldrich), destilovaná voda

Buňky *E. coli* CCM 3954  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml)

Buňky *S. aureus* CCM 4223  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $4 \times 10^7$  buněk/ml)

Buňky *E. coli* imp 4213 (Caetano *et al.*, 2011)  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml)

Pomocí měření s využitím sondy PI byla sledována schopnost LPPO permeabilizovat bakteriální membránu. Sonda sama o sobě do buňky neproniká. Pokud dojde k narušení membrány, PI vstupuje do buňky, kde se inkorporuje do molekul dvouřetězcových nukleových kyselin. Tím dojde ke zvýšení intenzity fluorescence, která je následně detekována (Hudson *et al.*, 1969; Wenzel *et al.*, 2015).

Pelet buněk, který byl získán centrifugací kultury bakterií (viz kapitola 4.4), byl promyt v pufru s glukózou. Po následné centrifugaci (5000 g, 25 °C, 10 min) byl odstraněn zbytek supernatantu, výsledný pelet byl resuspendován ve stejném pufru na finální  $OD_{450} = 0,2$  a k této suspenzi byla přidána sonda PI ve výsledné koncentraci 10  $\mu$ M.

Inkorporace sondy PI do buněk *S. aureus* byla měřena pomocí změny intenzity fluorescence zaznamenané pomocí spektrofluorometru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Vlnová délka excitačního záření byla měřena při 515 nm a intenzita emise 620 nm při použití filtrů 3RD500-530 pro excitaci a 3RD570LP pro emisi (Omega Optical). Štěrbiny byly nataveny na 5 nm. Měření probíhalo v křemenných kyvetách o rozměrech 10×10 mm, do kterých byly přidány 2 ml bakteriální kultury a magnetické míchátko. Obsah kyvety byl takto během měření promícháván. Po počátečním měření bazální intenzity fluorescence samotné bakteriální suspenze, které trvalo zhruba 30 sekund, byly do kyvety přidány LPPO ze zásobního roztoku v testovaných koncentracích. Jako pozitivní kontrola permeabilizace membrány sloužil melitin.

Kvůli časové náročnosti permeabilizačních pokusů se suspenzí buněk *E. coli* (kinetiky vstupu PI do buněk trvaly okolo 90 minut) probíhalo měření v plastové 96 jamkové mikrotitrační destičce. Do každé jamky byla přidána suspenze buněk o objemu 200  $\mu$ l. K této suspenzi byl přidán roztok LPPO na požadovanou výslednou koncentraci. Destička byla vložena do přístroje MicroMax 384 (Jobin Yvon, Horiba), který byl připojený ke spektrofluorometru FluoroMax-3. Pro měření byly použity stejné filtry i nastavení vlnových délek excitace a emise jako bylo popsáno výše. Štěrbiny byly nastaveny na 7 nm.

## 4.7 Sledování změny membránového potenciálu

### **Použitý materiál:**

3,3' - dipropylthiadikarbocyanin jodid ( $DiSC_3(5)$ ): 1mM (Sigma-Aldrich), DMSO

Pufr: 10mM HEPES (Sigma-Aldrich)

0,5% glukóza (Penta)

LPPO: 5 mg/ml, destilovaná voda

Melitin: 1mM (Sigma-Aldrich), destilovaná voda

Sodná sůl etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA): 0,5M (Sigma-Aldrich)

Buňky *E. coli* CCM 3954  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml)

Buňky *S. aureus* CCM 4223  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $4 \times 10^7$  buněk/ml)

Změna membránového potenciálu účinkem LPPO byla sledování pomocí sondy DiSC<sub>3</sub>(5), která se váže do polarizovaných membrán. Zabudováním sondy do membrány dojde ke snížení její intenzity fluorescence. Když dojde k porušení membránového potenciálu účinkem membránově aktivní látky, sonda se vyváže z membrány a dojde ke zvýšení intenzity fluorescence (Sims *et al.*, 1974).

Pelet buněk *E. coli* získaný centrifugací (viz kapitola 4.4) byl promyt v pufru. Po další centrifugaci (5000 g, 25 °C, 10 min) byl odstraněn supernatant a výsledný pelet byl resuspendován ve stejném pufru. K této suspenzi byl přidán roztok EDTA na finální koncentraci 10mM, aby došlo k narušení vnější membrány a k usnadnění přístupu sondy DiSC<sub>3</sub>(5) k cytoplazmatické membráně. Suspenze byla s EDTA inkubována po dobu 20 min na válcové míchačce zkumavek (MX-T6-S, DLAB). Následně byla suspenze centrifugována, aby došlo k odstranění EDTA. Supernatant byl slit a vzniklý pelet byl resuspendován v pufru s glukózou na výslednou  $OD_{450} = 0,2$ . K této suspenzi byla přidána sonda DiSC<sub>3</sub>(5) na výslednou koncentraci 1  $\mu$ M. Značení buněk sondou probíhalo ve tmě při pokojové teplotě v baňce míchané magnetickým míchadlem, které zajišťovalo vzdušnění suspenze, po dobu 90 minut. Příprava buněk *S. aureus* probíhala obdobně s vynecháním kroku s EDTA.

Měření intenzity fluorescence probíhalo pomocí spektrofluorometru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Vlnová délka excitačního záření byla 610 nm a intenzita fluorescence emisního záření byla měřena při 660 nm s použitím filtrů RPB590-610 pro excitaci a RPE650LP pro emisi (Omega Optical). Velikost štěrbin byla nastavena na 4 nm. Suspenze buněk byla měřena v křemenných kyvetách o rozměrech 10×10 mm v objemu 2 ml buněčné suspenze. Do kyvety bylo přidáno magnetické míchátko kvůli rovnoměrnému mísení. Nejdříve bylo zhruba 30 sekund měřeno pozadí samotné bakteriální kultury, následně byly do kyvety přidány LPPO ze zásobního roztoku na požadované koncentrace. Jako pozitivní kontrola permeabilizace membrány sloužil melitin.

## 4.8 Sledování permeabilizace vnější membrány bakterie *E. coli*

### Použitý materiál:

N-fenyl-1-naftylamin (NPN): 10mM (Sigma-Aldrich), metanol

Puf: 10mM HEPES (Sigma-Aldrich)

0,5% glukóza (Penta)

Lipofosfonoxiny: 1mg/ml, destilovaná voda

Polymyxin B: 20 mM (Sigma-Aldrich), destilovaná voda

Buňky *E. coli* CCM 3954  $OD_{450} = 0,2$  (odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml)

Pomocí sondy NPN byla sledována schopnost LPPO permeabilizovat vnější membránu *E. coli*. Tato sonda je hydrofobní a zabudovává se do hydrofobního prostředí membrán (Loh *et al.*, 1984). Při porušení vnější membrány dochází k zabudování NPN do narušené membrány, čímž dojde ke zvýšení intenzity fluorescence (Alakomi *et al.*, 2006).

Pelet buněk *E. coli* vytvořený centrifugací suspenze bakterií (viz kapitola 4.4), byl promyt v pufru. Po následné centrifugaci (5000 g, 25 °C, 10 min) byl odstraněn supernatant a výsledný pelet byl resuspendován ve stejném pufru na finální  $OD_{450} = 0,2$ . Do této suspenze byla přidána sonda NPN ve výsledné koncentraci 10  $\mu$ M.

Změna intenzity fluorescence sondy NPN byla měřena v 96 jamkových mikrotitračních destičkách v přístroji MicroMax 384, který byl připojený k spektrofluorometru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Vlnová délka excitačního záření byla nastavena na 350 nm a intenzita emise byla snímána při vlnové délce 420 nm bez použití optických filtrů. Štěrbiny byly nastaveny na 2,5 nm. Do každé jamky byla přidána suspenze buněk o objemu 200  $\mu$ l. Po změření bazální intenzity fluorescence ( $IF_0$ ) samotné bakteriální suspenze byly do jamek přidány LPPO ze zásobního roztoku na výslednou testovanou koncentraci. Poté byla změřena maximální hodnota intenzity fluorescence ( $IF_{max}$ ). Zároveň byla měřena intenzita fluorescence samotné sondy v pufru ( $IF_{pufr}$ ). Z těchto hodnot byla spočítána IF sondy NPN podle vztahu:

$$IF_{NPN} = (IF_{max} - IF_{pufr}) - (IF_0 - IF_{pufr})$$

Jako pozitivní kontrola permeabilizace vnější membrány sloužil polymyxin B.

## 4.9 Příprava lipozómů

### **Použitý materiál:**

Sefadex G-50 medium (Sigma-Aldrich)

Chloroform (Sigma-Aldrich)

Vnitřní pufr: 50 mM 5(6)-karboxyfluorescein (Sigma-Aldrich)

5 mM HEPES (Sigma-Aldrich)

pH 7,4

Vnější pufr: 100 mM NaCl (Lach-Ner)

5 mM HEPES (Sigma-Aldrich)

0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich)

pH 7,4

Diolelylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylcholin (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Polykarbonátové membránové filtry – velikost pórů 100 nm (Avestin)

Podložky filtrů (Whatman)

Požadovaná směs fosfolipidů (1,5 mg) rozpuštěná v chloroformu byla převedena do zábrusových zkumavek. K této směsi byl přidán 1 ml chloroformu, aby se fosfolipidy dobře promísily a rozprostřely po ploše spodní části zkumavky. Chloroform byl odpařen na rotační vakuové odparce (INGOS RVO 400) při teplotě 37 °C, tlaku okolo 210 bar a při otáčkách 280 rpm. Odpařování probíhalo až do vytvoření tenkého lipidového filmu na stěnách zkumavky. K tomuto filmu bylo přidáno 1,5 ml vnitřního pufru obsahujícího fluorescenční sondu karboxyfluorescein (CF, carboxyfluorescein). Zkumavky s touto směsí byly zahřívány při teplotě 37 °C po dobu 5 minut a následně 10 minut třepány na laboratorní třepačce opatřené platformou na zkumavky. Tyto kroky

byly opakovány šestkrát. Vytvořená suspenze vícevrstevných a nestejně velkých lipozómů byla pomocí zařízení pro přípravu lipozómů (Avanti Polar Lipids) protlačena jedenáctkrát přes polykarbonátový filtr se 100 nm póry, čímž vznikly jednovrstevné lipozómy o požadované velikosti. Tato suspenze byla následně přefiltrována na koloně se Sefadexem G-50, aby došlo k oddělení volné sondy od vytvořených lipozómů. Sefadex G-50 byl před filtrací tři hodiny hydratován ve vnějším pufru (1,9 g Sefadexu a 40 ml pufru). Frakce přefiltrovaných lipozómů byly jímány do 1,5ml plastových zkumavek. Dále byla zjišťována koncentrace lipidů v jednotlivých jímáných frakcích pomocí stanovení koncentrace anorganického fosfátu (viz kapitola 4.10). Frakce s nejvyšší koncentrací byly naředěny vnějším pufrem na výslednou koncentraci 10  $\mu\text{M}$  fosfátu v suspenzi lipozómů. Tato suspenze byla následně použita k měření lyze účinkem LPPO (viz kapitola 4.11).

## 4.10 Stanovení koncentrace anorganického fosfátu

### **Použitý materiál:**

Kyselina chloristá ( $\text{HClO}_4$ ): 70 % (v/v) (Penta)

Kyselina askorbová: 10 % (w/v) (Lach-Ner)

Molybdenan amonný: 2,5 % (w/v) (Lach-Ner)

Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 0,2 mM (Fluka)

Deionizovaná voda

Koncentrace anorganického fosfátu byla stanovena kolorimetricky pomocí reakce molybdenanu amonného s fosforečnanem v přítomnosti kyselin askorbové a chloristé. Touto reakcí vzniká fosfomolybdenová modř, jejíž intenzita je dále stanovována spektrofotometricky. Koncentrace fosfátu ve frakcích lipozómů byla odečtena z připravené kalibrační přímky.

Do skleněných zkumavek, které byly pětkrát vypláchnuty tekoucí vodou, pětkrát destilovanou vodou a vysušeny, bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  přefiltrovaných lipozómů a 0,5 ml kyseliny chloristé. Tato směs byla mineralizována po dobu jedné hodiny při 180  $^\circ\text{C}$ . Následně bylo ke směsi přidáno 3,4 ml deionizované vody a 0,5 ml roztoku molybdenanu amonného. Směs byla důkladně promíchána na laboratorní míchače vortex. Nakonec byla ke směsi přidána 10% kyselina askorbová v objemu 0,5 ml a směs

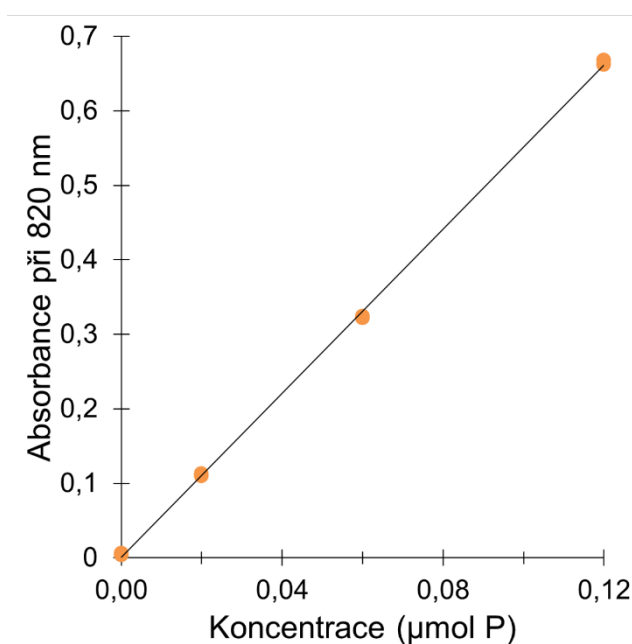


byla opět řádně promíchána. Zkumavky s tímto obsahem byly následně inkubovány ve vodní lázni o teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Po ochlazení vzorků byla měřena absorbance při 820 nm oproti destilované vodě na spektrofotometru (Beckman Coulter DU730). Koncentrace fosfátu ve vzorcích lipozómů byla poté odečtena z kalibrační přímky, která byla získána měřením absorbance roztoků o známé koncentraci fosfátu.

#### *Příprava kalibrační přímky*

Do skleněných pět krát destilovanou vodou vypláchnutých a vysušených zkumavek byla přidána voda a roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tak, aby výsledná koncentrace fosfátu byla 0  $\mu\text{mol}$ , 0,02  $\mu\text{mol}$ , 0,06  $\mu\text{mol}$  a 0,12  $\mu\text{mol}$ . Dále bylo do zkumavek přidáno 0,5 ml  $\text{HClO}_4$  a 0,5 ml roztoku molybdenanu amonného a zkumavka byla řádně promíchána. Nakonec bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny askorbové a zkumavky byly také umístěny na 5 minut do vodní lázně o teplotě 100 °C. Po vychladnutí jim byla změřena absorbance při 820 nm a z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační přímka (Obrázek 4.2.)

Pro každé stanovení koncentrace fosfátu v lipozómech byla vytvořena nová kalibrační přímka. Jednotlivé body kalibrační přímky byly stanovovány v duplikátech.



Obrázek 4.2 Kalibrační přímka

### 4.11 Sledování úniku fluorescenční sondy z lipozómů

#### **Použitý materiál:**

Triton X-100 (Serva)

LPPO: 5 mg/ml; destilovaná voda

Lipopolysacharid *E. coli* O111:B4: 5 mg/ml (Sigma-Aldrich)

Lipozómy: suspenze o koncentraci fosfátu 10 $\mu$ M

Permeabilizace membrány způsobená LPPO byla sledována pomocí úniku fluorescenční sondy CF z lipozómů. CF uzavřený v lipozómech je v takové koncentraci, kdy molekuly CF mezi sebou tvoří dimery a tím je fluorescence CF zhasena, tzn., že intenzita fluorescence je slabá. Když dojde k narušení lipozómů membránově aktivními látkami, sonda se vyleje do okolního roztoku, vyřídí se a dojde k nárůstu intenzity fluorescence (Chen & Knutson, 1988).

Intenzita fluorescence v suspenzi lipozómů o objemu 2 ml byla měřena v křemenných kyvetách o rozměru 10 $\times$ 10 mm pomocí spektrofluorometru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Do kyvety bylo přidáno magnetické míchátko a během celého měření byla suspenze míchána. Vlnová délka excitačního záření byla 480 nm a intenzita fluorescence emisního záření byla měřena při 515 nm bez použití filtrů. Štěrbiny byly nastaveny na 2 nm. Na začátku každého měření byla nejprve změřena bazální intenzita fluorescence po dobu asi 20 s ( $IF_0$ ). Pak bylo přidáno požadované množství LPPO. Když nárůst intenzity fluorescence v průběhu měření dosáhl fáze plató ( $IF$ ), byl k suspenzi přidán Triton X-100 na výslednou koncentraci 0,2 %, aby bylo dosaženo úplné lyze všech lipozómů. Touto lyzí došlo k uvolnění veškeré sondy a dosažení maximální intenzity fluorescence ( $IF_{max}$ ). Naměřená data byla následně normalizována a vyjádřena v procentech podle rovnice:

$$\text{Procento lyze} = \frac{IF - IF_0}{IF_{max} - IF_0} \times 100$$

Ke sledování vlivu LPS, který se vyskytuje ve vnější membráně G<sup>-</sup> bakterií, na účinek LPPO byl LPS přidán k suspenzi již vytvořených lipozómů na koncentraci LPS 20  $\mu$ g/ml. LPS byl inkubován s lipozómy po dobu 10 minut. Dále měření probíhalo stejně jako v předchozím odstavci.

## 4.12 Vliv LPPO na životaschopnost bakterií

### **Použitý materiál:**

LPPO 7072: 1 mg/ml, destilovaná voda

Pevné půdy s LB médiem

Pufr: 10mM HEPES

0,5% glukóza (Penta)

Buňky *E. coli* CCM 3954 OD<sub>450</sub> = 0,2 (odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml)

Buňky *S. aureus* CCM 4223 OD<sub>450</sub> = 0,2 (odpovídá  $4 \times 10^7$  buněk/ml)

Pro sledování vlivu LPPO na životaschopnost bakterií byla použita metoda stanovení počtu živých bakterií výsevem (CFU) po vystavení účinku LPPO v čase. Pelet buněk vytvořený centrifugací (viz kapitola 4.4) byl promyt pufrém, resuspendován a znovu stočen v centrifuze (5 000 g, 20 min, 20 °C). Supernatant byl odstraněn a buňky byly naředěny pufrém na OD<sub>450</sub> = 0,2.

K suspenzi buněk byl přidán LPPO 7072 ve finální koncentraci 10 µg/ml. V časech 0, 1, 2, 5 a 10 minut od přidavku LPPO byla odebraná alikvóta buněk naředěna desítkovou ředící řadou a po 100 µl byly bakterie patřičných ředění vysety na misky s pevnou kultivační půdou. Každý výsev byl proveden v triplikátu. Misky byly inkubovány přes noc ve 37 °C a výsledný počet živých bakterií byl vyjádřen jako CFU, resp. CFA (colony forming ability, procento přeživších vzhledem k původnímu počtu buněk).

## 5 Výsledky

### 5.1 Sledování pórotvorného účinku LPPO na planární lipidické membráně

Cílem těchto experimentů bylo ověřit pórotvornou aktivitu vybraných LPPO a vliv koncentrace a fosfolipidového složení membrány na tuto aktivitu.

#### 5.1.1 Koncentrační závislost pórotvorné aktivity LPPO 7072

Koncentrační závislost schopnosti látky 7072 tvořit póry byla testována na negativně nabitých membránách tvořených difytanoilfosfatidylglycerolem (DPhPG).

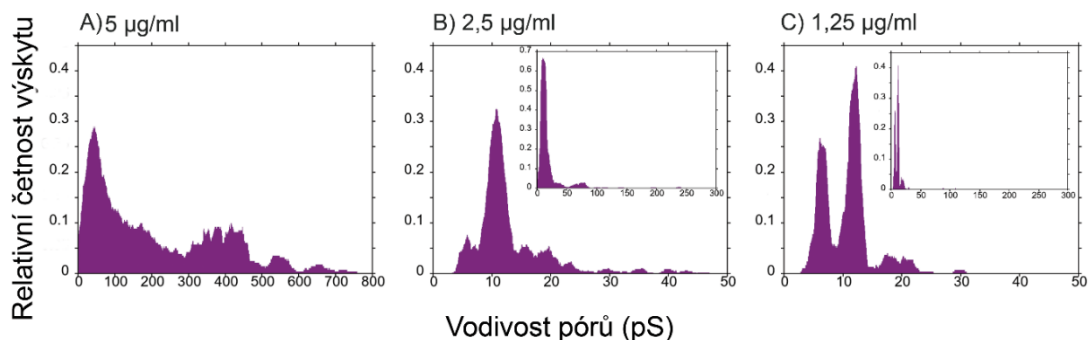
Bylo potvrzeno, že látka 7072 má schopnost tvořit póry, jejichž velikost, distribuce a četnost se lišila v závislosti na použité koncentraci, která byla 5, 2,5 nebo 1,25  $\mu\text{g/ml}$ . U koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  se nejčastěji vyskytovaly póry s vodivostí  $42 \pm 29$  pS (Obrázek 5.1A), nejmenší pór měl vodivost 7 pS a největší 1 263 pS. Rozpětí vodivosti u koncentrace 2,5  $\mu\text{g/ml}$  bylo od 4 do 496 pS. Při této koncentraci se nejčastěji vyskytovaly póry s vodivostí  $11 \pm 1,7$  pS (Obrázek 5.1B). Při koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  se nejhojněji vyskytovaly póry s vodivostí  $6 \pm 1,1$  pS a  $12 \pm 1,1$  pS (Obrázek 5.1C), kdy nejmenší pór dosahoval vodivosti 4 pS a největší 109 pS. Detaily pórotvorných aktivit jsou vypsány v Tabulce 2.

Tabulka 2 Rozsah vodivosti a nejčastější vodivostní stavy v závislosti na koncentraci LPPO 7072

| Koncentrace<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Rozsah<br>vodivosti (pS) |       | Nejčastější vodivostní stavy řazené od<br>nejvyšší četnosti výskytu (pS) |              |              |              | Počet<br>událostí |
|-------------------------------------|--------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
|                                     | Min                      | Max   | 1.                                                                       | 2.           | 3.           | 4.           |                   |
| 5                                   | 7                        | 1 263 | $42 \pm 29$                                                              | $172 \pm 22$ | $427 \pm 35$ | $378 \pm 21$ | 286               |
| 2,5                                 | 4                        | 496   | $11 \pm 1,7$                                                             | $6 \pm 0,7$  | $7 \pm 0,8$  | $16 \pm 1,6$ | 453               |
| 1,25                                | 4                        | 109   | $12 \pm 1,1$                                                             | $6 \pm 1,1$  | $18 \pm 1,3$ | $21 \pm 1,3$ | 296               |

Při porovnání výsledných třech histogramů (Obrázek 5.1) jednotlivých vyhodnocených událostí je na první pohled patrný rozdíl v rozložení četností vodivosti. U koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  je distribuce vodivostních stavů velmi široká, zatímco u koncentrace 2,5  $\mu\text{g/ml}$  většina vodivostních stavů, kromě jednotlivých výjimek, končí

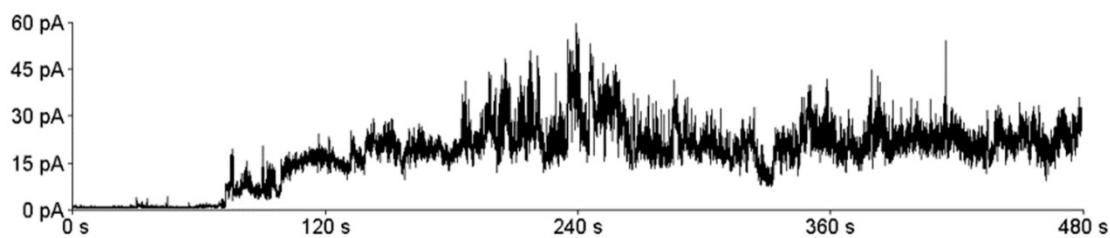
u 45 pS a u koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  se dokonce v histogramu nevyskytují žádné póry s vodivostí větší než 35 pS.



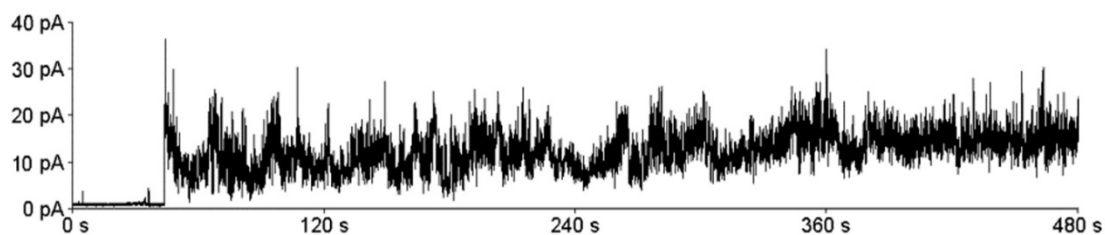
Obrázek 5.1 Histogramy četností vodivostních stavů LPP0 7072 na DPhPG membráně; A) Koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$ , velikost binu 25 pS, celkový počet událostí  $n = 286$ ; B) Koncentrace 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , velikost binu 1 pS,  $n = 453$ . Vložený obrázek zobrazuje rozsah vodivostí do 300 pS, velikost binu 5 pS; C) Koncentrace 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , velikost binu 1 pS,  $n = 296$ . Vložený obrázek ukazuje rozsah vodivostí do 300 pS, velikost binu 1 pS. Pro měření byl použit pufr obsahující 1M KCl a 10 mM Tris s pH 7,4. Vkládané napětí bylo 50 mV.

V závislosti na koncentraci se lišily i fenotypy pozorovaných pórů. Látka 7072 při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  dosahovala na membráně větších rozsahů měřeného proudu (Obrázek 5.2A). U většiny vytvořených pórů nedocházelo k jejich uzavření. Záznam proudu v čase vykazoval vysokou úroveň šumu, což bylo dáno kumulací velkého množství otevřených pórů na membráně, jednotlivé události byly obtížněji rozeznatelné. Při koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  se vyskytovaly dva fenotypy pórů. Jeden byl velmi podobný záznamu pozorovaném při použití koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 5.2B), tyto typy pórů rovněž setrávaly v otevřeném stavu. Druhý typ záznamu zobrazuje póry dosahující řádově menších hodnot proudu. Na rozdíl od předchozího typu tyto póry měly zřetelně odlišitelné stavy otevření a zavření. I póry tohoto typu setrávaly častěji v otevřeném stavu (Obrázek 5.2C). Podobně vypadá i typický záznam zobrazující koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , kde se vyskytovaly také dobře rozeznatelné malé pravidelné póry (Obrázek 5.2D), jejichž doba života otevřeného stavu byla od jednotek po stovky sekund.

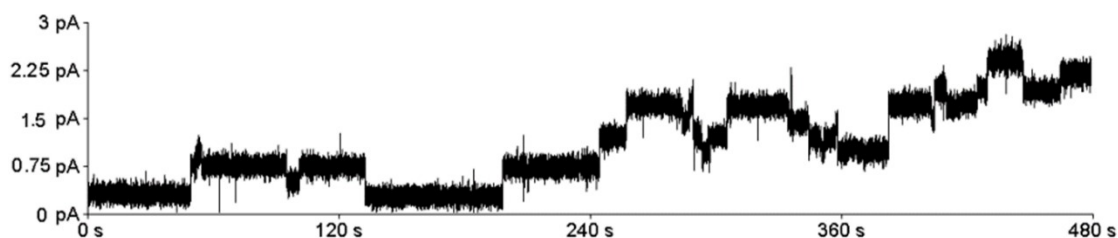
A) 5  $\mu\text{g/ml}$



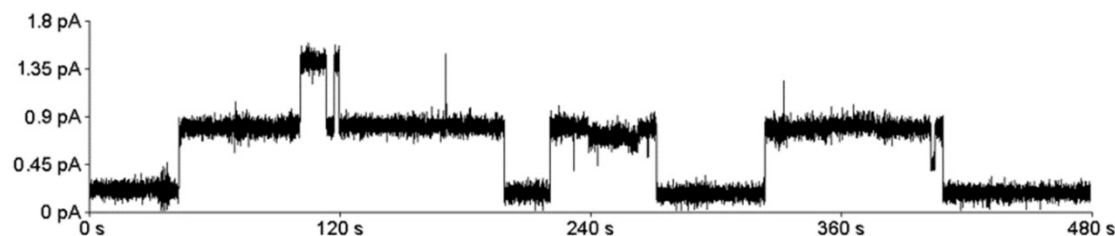
B) 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (velké póry)



C) 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (malé póry)



D) 1,25  $\mu\text{g/ml}$



Obrázek 5.2 Typické záznamy pórů LPPO 7072 na DPhPG membránách; A) Koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$ ; B) Koncentrace 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , záznam zobrazující velké šumící póry; C) Koncentrace 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , záznam zobrazující malé pravidelné póry; D) Koncentrace 1,25  $\mu\text{g/ml}$ .

Experimenty potvrdily pórotvornou aktivitu LPPO 7072, která je koncentračně závislá – velikost koncentrace LPPO 7072 má vliv na vodivost i na fenotyp tvořených pórů. Při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  se vyskytují velké póry s vysokým šumem a se širokou distribucí velikostí vodivostních stavů. Při koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  se vyskytují dva fenotypy pórů: velké s vysokou úrovní šumu a pravidelné malé. Zřetelně převažují póry o vodivosti  $11 \pm 1,7$  pS. Póry při koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  jsou malé a pravidelné, nejčastější jsou dvou vodivostí:  $6 \pm 1,1$  a  $12 \pm 1,1$  pS.

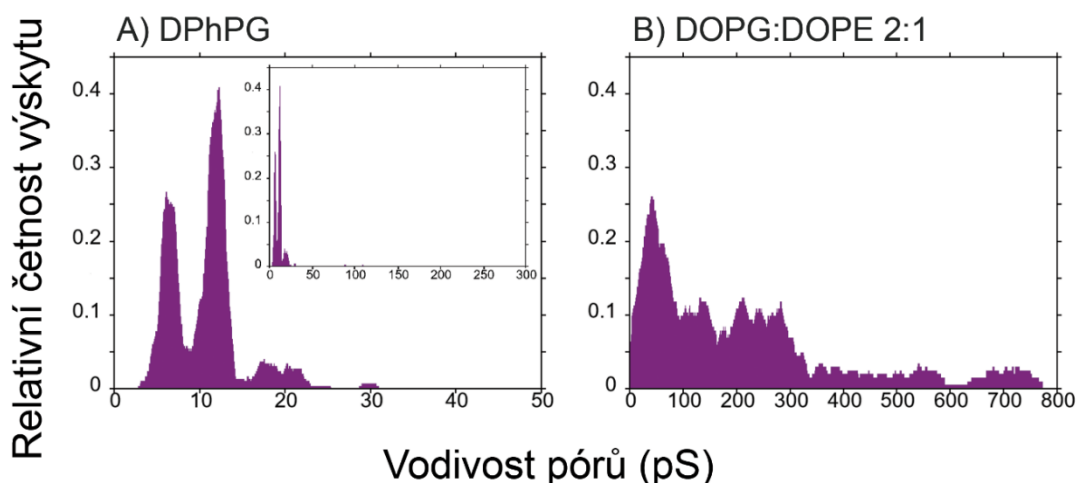
### 5.1.2 Vliv fosfolipidového složení membrány na aktivitu LPPO 7072

Cílem těchto pokusů bylo zjistit, zda fosfolipidové složení membrány, které ovlivňuje její celkový náboj, má vliv na pórtvornou aktivitu látky 7072. Pro tento pokus byly vybrány tři směsi fosfolipidů – diolelylfosfatidylglycerolu (DOPG) a diolelylfosfatidyletanolaminu (DOPE) v poměru 2:1, která napodobuje náboj membrány  $G^+$  bakterií. Dále směs DOPE:DOPG 2:1 napodobující fosfolipidovým složením náboj membrány  $G^-$  bakterií a směs diolelylfosfatidylcholinu (DOPC) a DOPE také v poměru 2:1 napodobující nenabitě eukaryotické membrány. Pro tyto srovnávací pokusy byla vybrána koncentrace LPPO 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , jelikož se při této koncentraci tvořily malé pravidelné póry na membráně z DPhPG (viz kapitola 5.1.1).

Rozdílné chování LPPO 7072 bylo sledováno již při porovnání výše zmíněné membrány z DPhPG a membrány tvořené směsí DOPG:DOPE v poměru 2:1. Tyto dvě membrány se odlišují nejen přítomností neutrálně nabitě etanolaminové fosfolipidové hlavičky v druhé sledované membráně, ale také v mastné kyselině použitého fosfolipidu, kdy lipidy v první zmíněné membráně obsahují větvený fytanoyl a v druhé mononenasyčenou kyselinu olejovou.

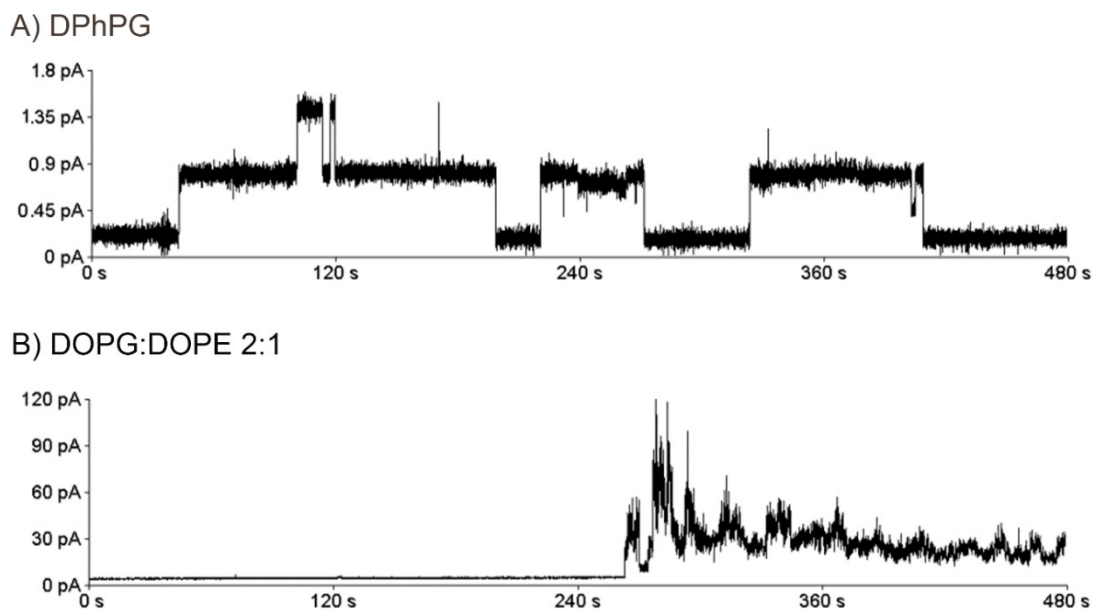
Jak bylo popsáno v předchozí kapitole 5.1.1, na DPhPG membráně se při použití 1,25  $\mu\text{g/ml}$  7072 nejčastěji vyskytovaly vodivostní stavy o velikosti  $6 \pm 1,1$  a  $12 \pm 1,1$  pS, přičemž celkový rozsah velikostí pozorovaných událostí byl 4–109 pS. Až na výjimečné jednotlivé události se převažující většina událostí vyskytovala pod hranicí 35 pS (viz vložený histogram v Obrázku 5.3A). U membrán tvořených z DOPG:DOPE je na první pohled patrné rozdílné rozložení nejčtetnějších vodivostních stavů a daleko širší celková distribuce vodivostních stavů (Obrázek 5.3B). Majoritní výskyt událostí se nalézal až do 300 pS, s menší četností se ale vyskytovaly události až do 800 pS. Nejčtetnější póry měly vodivost  $40 \pm 23$  pS, nejmenší zaznamenaný pór měl 16 pS a největší 16 637 pS.

Nejmenší zaznamenaná hodnota vodivosti u DOPG:DOPE membrán je tedy vyšší než nejčtetnější hodnota vodivosti u DPhPG membrán. DPhPG membrány zdaleka nedosahují takových maximálních hodnot vodivosti, jaké byly pozorovány na DOPG:DOPE membránách při stejné použité koncentraci LPPO 7072.



Obrázek 5.3 Histogramy četností vodivostních stavů LPPO 7072 na membránách tvořených DPhPG a DOPG:DOPE; A) Membrána tvořená z DPhPG, velikost binu 1 pS,  $n = 296$ . Vložený obrázek zobrazuje rozsah vodivosti do 300 pS, velikost binu 1 pS; B) Membrána tvořená z DOPG:DOPE v poměru 2:1, velikost binu 25 pS,  $n = 219$ . Pro měření byl použit pufr tvořený 1M KCl a 10 mM Tris při pH 7,4. Vložené napětí bylo 50 mV.

Dramatický rozdíl je i ve fenotypu vytvořených pórů v membráně. Na membráně z DPhPG se při koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  vyskytovaly malé pravidelné póry, které měly omezenou dobu života otevřeného stavu (Obrázek 5.4A). Takový typ pórů se naopak na membráně z DOPG:DOPE téměř nevyskytoval. Póry dosahovaly vyšších hodnot proudů a také vyšší úroveň šumu, která byla způsobena hromaděním otevřených pórů (Obrázek 5.4B).



Obrázek 5.4 Typický záznam pórů LPPO 7072 na membránách tvořených DPhPG a DOPG:DOPE; A) Membrána tvořená DPhPG, vyskytují se malé pravidelné póry; B) Membrána tvořená DOPG:DOPE v poměru 2:1, vyskytují se velké póry s výrazným šumem.



Z těchto měření vyplývá, že látka 7072 tvoří na membráně z DOPG:DOPE větší póry než na membráně složené z DPhPG. Póry na membráně z DPhPG se na rozdíl od těch na membráně z DOPG:DOPE zavírají.

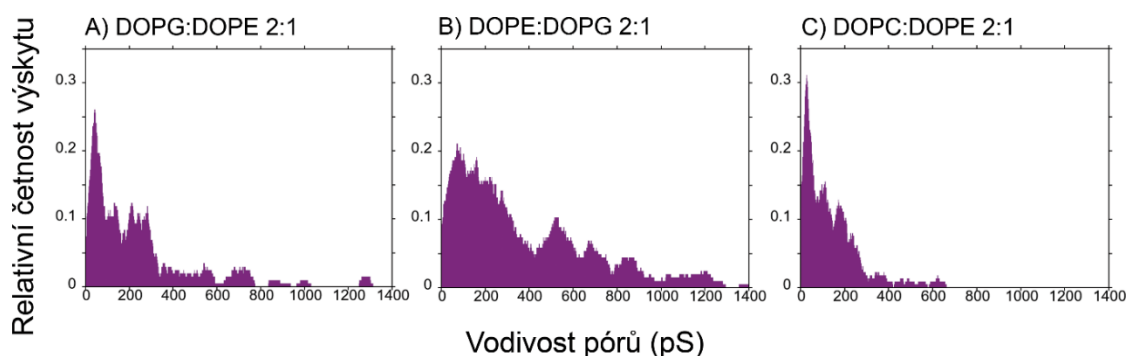
Pokud se podíváme na srovnání pórů tvořených na membránách z binárních směsí olejovaných fosfolipidů, které se liší celkovým nábojem neseným polárními hlavičkami, jsou pozorované rozdíly v pórotvorné aktivitě LPO 7072 již menší. Jak bylo výše zmíněno, na membráně z DOPG:DOPE byl s nejvyšší četností pozorován vodivostní stav o velikosti  $40 \pm 23$  pS (Obrázek 5.5A), nejnižší zaznamenaná vodivost byla 16 pS a nejvyšší 16 637 pS. Převážná většina pórů dosahovala vodivosti do 800 pS, nad tuto hodnotu se relativní četnost rapidně snížila na méně než 0,05. Menší populace pórů dosahovala vodivosti mezi 1 500 pS a 2 000 pS (data nejsou v histogramu zobrazena). Vodivosti nad 2 000 pS se ale vyskytovaly sporadicky. U membrán složených z DOPE:DOPG fosfolipidů bylo viditelné široké spektrum vodivostních stavů s rozsahem až do 3 000 pS. Nejčtenější póry dosahovaly vodivosti  $79 \pm 30$  pS (Obrázek 5.5B), přičemž celkový rozsah vodivosti byl od 9 pS do 15 128 pS. V nenabitě membráně z DOPC:DOPE tvořil LPO 7072 póry s podstatně nižším rozsahem vodivosti, a to od 7 do 641 pS (Obrázek 5.5C), kdy nejčtenější póry měly vodivost  $27 \pm 21$  pS. Srovnání pórotvorné aktivity na všech třech testovaných typech membrán jsou shrnuty v Tabulce 3.

*Tabulka 3 Rozsah vodivosti a nejčtenější vodivostní stavy látky 7072 na třech typech membrán*

| Fosfolipidové složení (2:1) | Rozsah vodivosti (pS) |        | Nejčtenější vodivostní stavy řazené od nejvyšší četnosti výskytu (pS) |              |              |              | Počet událostí |
|-----------------------------|-----------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
|                             | Min                   | Max    | 1.                                                                    | 2.           | 3.           | 4.           |                |
| <b>DOPG:DOPE</b>            | 16                    | 16 637 | $40 \pm 23$                                                           | $137 \pm 19$ | $210 \pm 22$ | $282 \pm 14$ | 219            |
| <b>DOPE:DOPG</b>            | 9                     | 15 128 | $79 \pm 30$                                                           | $157 \pm 20$ | $209 \pm 62$ | $526 \pm 59$ | 323            |
| <b>DOPC:DOPE</b>            | 7                     | 641    | $27 \pm 21$                                                           | $104 \pm 28$ | $176 \pm 31$ | $231 \pm 19$ | 225            |

Membrány z DOPE:DOPG se od ostatních dvou typů membrán liší čtenějším výskytem pórů o vyšších vodivostech, výčet všech vodivostních stavů je bez přerušení rozprostřen téměř až k 1 400 pS. U membrán z DOPG:DOPE jsou  $\frac{3}{4}$  vodivostních stavů do 800 pS, relativní četnost dalších vodivostních stavů je méně než 0,03. Podstatný rozdíl v četnosti výskytu vodivostních stavů oproti předchozím typům membrán je u membrán z DOPC:DOPE, kde převažují póry s vodivostí do 300 pS.

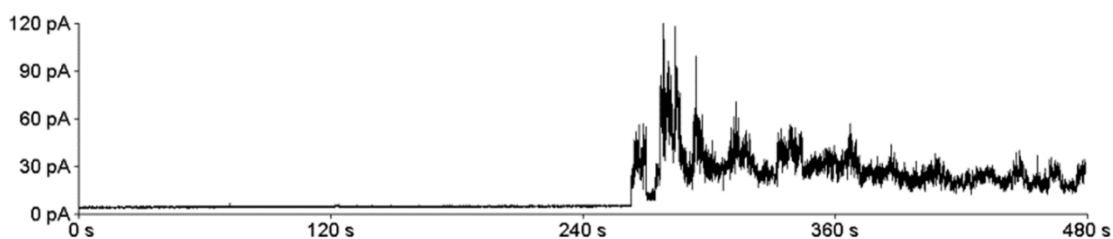
Velké póry s vodivostí nad 700 pS pozorované u předchozích typů membrán se zde nevyskytují vůbec. Maximum u tohoto typu membrány je 25krát nižší než maxima zbylých dvou typů membrán. Membrány z DOPG:DOPE a DOPC:DOPE mají výrazný vrchol nejčtenější vodivosti, který dosahuje zhruba o polovinu vyšší četnosti než ostatní vodivostní stavy. U DOPE:DOPG je rozdíl mezi nejčtenější vodivostí a ostatními vodivostmi mnohem menší.



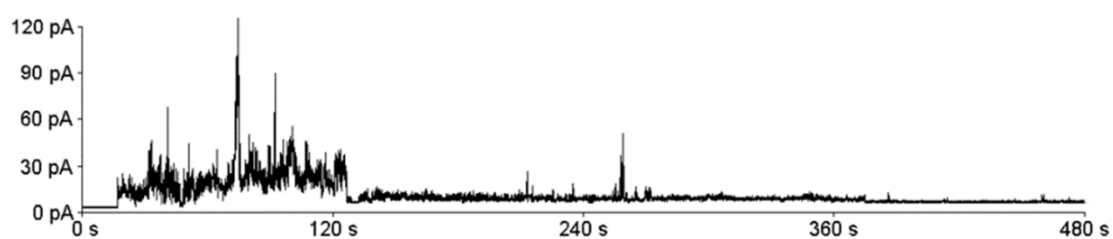
*Obrázek 5.5 Histogramy četnostní vodivostních stavů LPPO 7072 na třech typech membrán; A) Membrána z DOPG:DOPE v poměru 2:1, velikost binu 25 pS, n = 219; B) Membrána z DOPE:DOPG v poměru 2:1, velikost binu 50 pS, n = 323; C) Membrána z DOPC:DOPE v poměru 2:1, velikost binu 20 pS, n = 225. Měření byla prováděna v pufru o složení: 1M KCl, 10 mM Tris a pH 7,4. Vkládané napětí bylo 50 mV.*

Fenotyp pórů na membránách složených z DOPG:DOPE a DOPE:DOPG (Obrázek 5.6A,B) byl velmi podobný. Póry na membráně z DOPG:DOPE se většinou nezavíraly a hromadily se, na membráně z DOPE:DOPG docházelo k zavírání i nezavírání pórů stejně často. Typický záznam membrány tvořené z DOPC:DOPE zobrazuje spíše výskyt menších pórů s nižší úrovní šumu než předchozí membrány (Obrázek 5.6C). I zde častěji docházelo k jevu, kdy se jednou otevřené póry již nezavíraly.

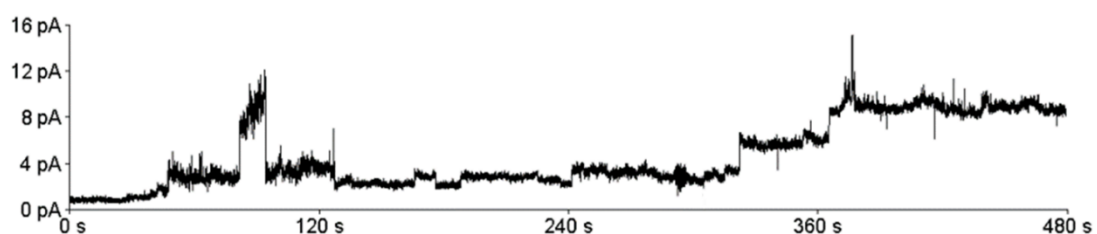
A) DOPG:DOPE 2:1



B) DOPE:DOPG 2:1



C) DOPC:DOPE 2:1



Obrázek 5.6 Porovnání typických záznamů pórů LPPO 7072 na třech různých membránách; A) Membrána z DOPG:DOPE; B) Membrána z DOPE:DOPG; C) Membrána z DOPC:DOPE.

Závěrem lze tedy shrnout, že látka 7072 tvoří větší póry se širší distribucí vodivostních stavů na membránách složených z DOPG:DOPE a DOPE:DOPG, které napodobují složení lipidů bakteriální membrány, než na membránách z DOPC:DOPE napodobujících neutrální cytoplazmatickou membránu eukaryot.

### 5.1.3 Porovnání pórtvorné aktivity LPPO 7072, 7070 a 7107

Následující experimenty měly ověřit vliv struktury LPPO na jejich pórtvornou aktivitu. Testovány byly LPPO 7072, 7070 a 7107 (viz kapitola 2.3.1.3). Tyto látky se od sebe liší délkou spojovacího modulu, který je u LPPO 7072 dlouhý šest uhlíků a u LPPO 7070 deset uhlíků. Jejich hydrofobní moduly mají shodně délku osm uhlíků. V antimikrobiální aktivitě se látky neliší, ale tento rozdíl ve struktuře vede k zásadnímu rozdílu v hemolytické aktivitě, kdy  $HC_{50}$  je u látky 7072 162  $\mu\text{g/ml}$  a u látky 7070 pouhých 6  $\mu\text{g/ml}$ . Pórtvorná aktivita obou látek byla testována v koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  na membráně z DOPC:DOPE v poměru 2:1, abychom ověřili, zda má tento

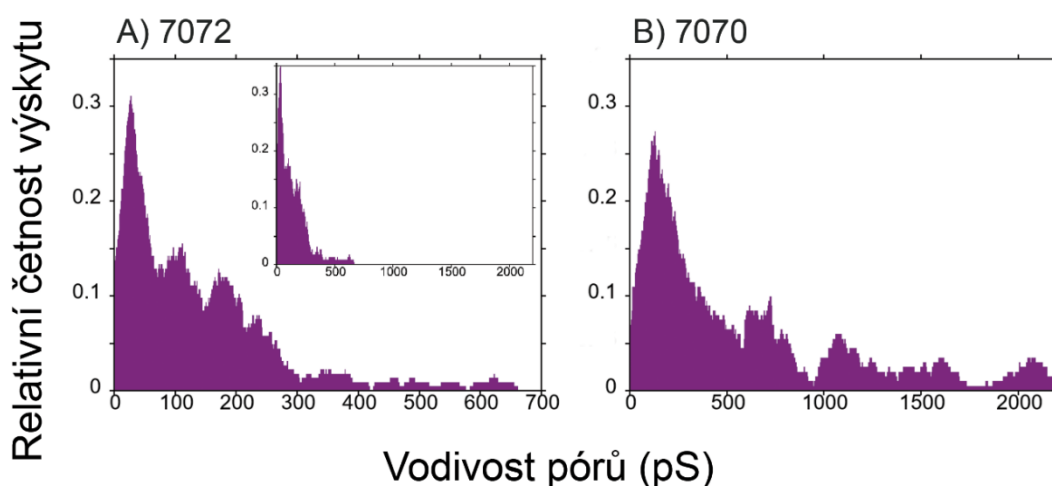
rozdíl v hemolytické aktivitě podstatu v rozdílné pórtvorné aktivitě na neutrální membráně napodobující složení cytoplazmatické membrány eukaryot.

U látky 7072 byl na DOPC:DOPE membráně pozorován rozsah vodivostních stavů od 7 pS až po 641 pS (Obrázek 5.7A), přičemž s nejvyšší četností se vyskytovaly póry o velikosti  $27 \pm 21$  pS. Druhý nejčtenější vodivostní stav dosahoval vodivosti  $104 \pm 28$  pS (Tabulka 4). Celkový rozsah vodivostí pro látku 7070 byl mnohem širší, a to od 28 pS do 18 340 pS (Obrázek 5.7B). Nejčteněji se vyskytovaly póry o velikosti  $123 \pm 59$  pS, druhý nejčtenější stav dosahoval  $719 \pm 24$  pS.

Tabulka 4 Rozsah vodivosti a nejčtenější vodivostní stavy látek 7072 a 7070 na membráně z DOPC:DOPE

| LPPO | Rozsah vodivosti (pS) |        | Nejčtenější vodivostní stavy řazené od nejvyšší četnosti výskytu (pS) |              |              |              | Počet událostí |
|------|-----------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
|      | Min                   | Max    | 1.                                                                    | 2.           | 3.           | 4.           |                |
| 7072 | 7                     | 641    | $27 \pm 21$                                                           | $104 \pm 28$ | $176 \pm 31$ | $231 \pm 19$ | 225            |
| 7070 | 28                    | 18 340 | $123 \pm 59$                                                          | $719 \pm 24$ | $629 \pm 57$ | $792 \pm 52$ | 235            |

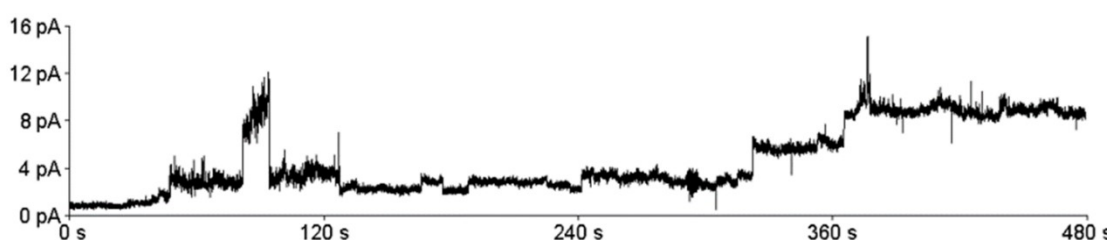
Opět je vidět dramatický rozdíl v celkovém rozložení vodivostních stavů. U látky 7072 se za vodivostí 641 pS již žádný další vodivostní stav nevyskytoval, zatímco u látky 7070 distribuce pokračuje až do 3 500 pS a ojediněle se vyskytovaly i další, ještě větší póry.



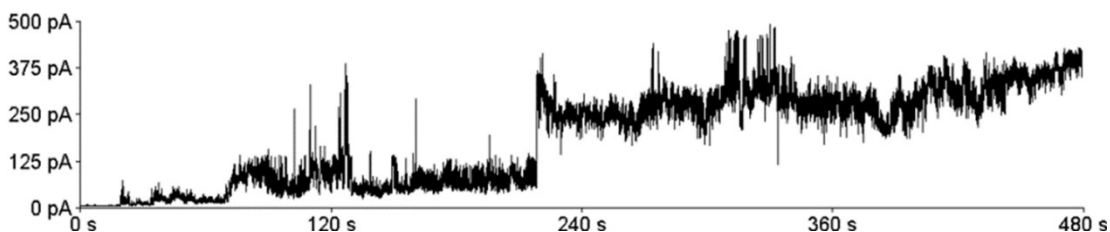
Obrázek 5.7 Histogramy četností vodivostních stavů látek 7072 a 7070 tvořených na membráně z DOPC:DOPE; A) LPPO 7072, velikost binu 20 pS,  $n = 225$ . Vložený obrázek zobrazuje rozsah vodivosti do 2 200 pS, velikost binu 20 pS; B) LPPO 7070, velikost binu 70 pS,  $n = 235$ .

Při porovnání typických záznamů proudu v čase je patrný rozdíl ve velikosti i fenotypu jednotlivých událostí. Zatímco u látky 7072 se vyskytují i malé pravidelné póry (Obrázek 5.8A), u látky 7070 můžeme pozorovat četné události s vysokým proudem a vysokou úrovní šumu (Obrázek 5.8B), kterou způsobovalo hromadění neuzavírajících se pórů, které na membráně převažovaly.

A) 7072



B) 7070



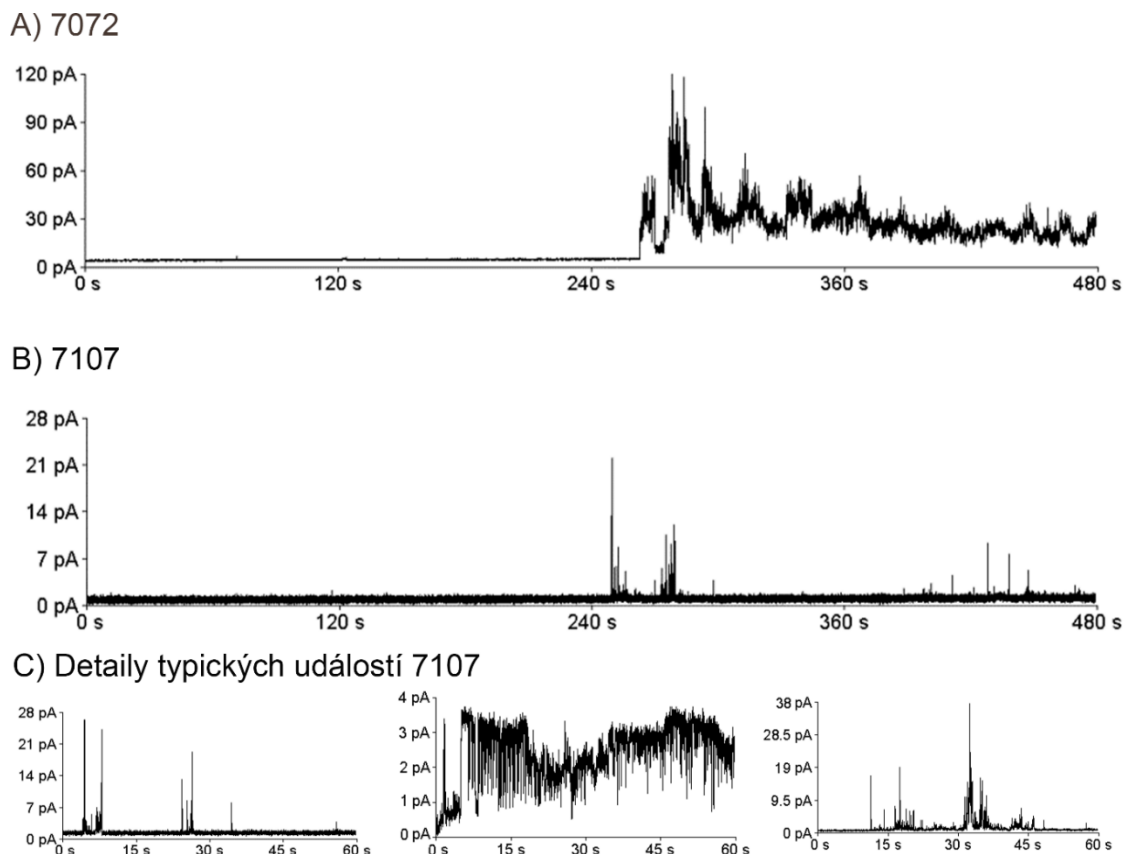
Obrázek 5.8 Porovnání typických záznamů látek 7072 a 7070 na DOPC:DOPE membráně; a) LPPO 7072; B) LPPO 7070.

Tyto pokusy tedy potvrdily, že látka 7070 je na membráně z DOPC:DOPE řádově aktivnější než látka 7072.

Posledním dílčím pokusem bylo srovnání LPPO 7072 a 7107 lišících se v délce řetězce hydrofobního modulu, kdy látka 7107 má tento řetězec o dva uhlíky kratší než látka 7072. Tento rozdíl vede k významnému poklesu antimikrobiální aktivity LPPO 7107 oproti 7072. Proto pokusy probíhaly na DOPG:DOPE (2:1) membráně napodobující náboj  $G^+$  bakterií a při koncentraci LPPO 1,25  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivita látky 7072 v membráně z DOPG:DOPE byla již prezentována v podkapitole 5.1.2 (Obrázek 5.5A).

Po přidavku látky 7107 k membráně tvořené z DOPG:DOPE (2:1) nebylo téměř možné pozorovat a vyhodnotit žádné vodivostní události, a tak z tohoto měření nebylo možné vytvořit histogram. Záznam proudu v čase byl většinu času klidný v porovnání s látkou 7072 (Obrázek 5.9A) pouze s občasnými nespécifickými disturbancemi membrány (Obrázek 5.9B), které ale nebylo možné vyhodnotit, protože se většinou nejednalo o póry. Z hlediska fenotypu se tyto události vyskytovaly ve třech typech,

kteřé jsou zobrazené v detailu na Obrázku 5.9C. Častým jevem byl také pouze zvýšený šum membrány. Za celou dobu měření bylo možné vyhodnotit zhruba 10 pórů, zatímco u látky 7072 bylo za stejných podmínek za stejnou dobu měření vyhodnoceno 219 pórů. Ani při zdvojnásobení koncentrace látky 7107 na 2,5  $\mu\text{g/ml}$  nedošlo ke změně v počtu tvořených pórů.



Obrázek 5.9 Porovnání typických záznamů proudu v čase pro látky 7072 a 7107 na membráně z DOPG:DOPE; A) Typický záznam chování LPPO 7072; B) Typický záznam chování LPPO 7107; C) Detaily tří typů událostí vyskytujících se na membráně vystavené účinku LPPO 7107.

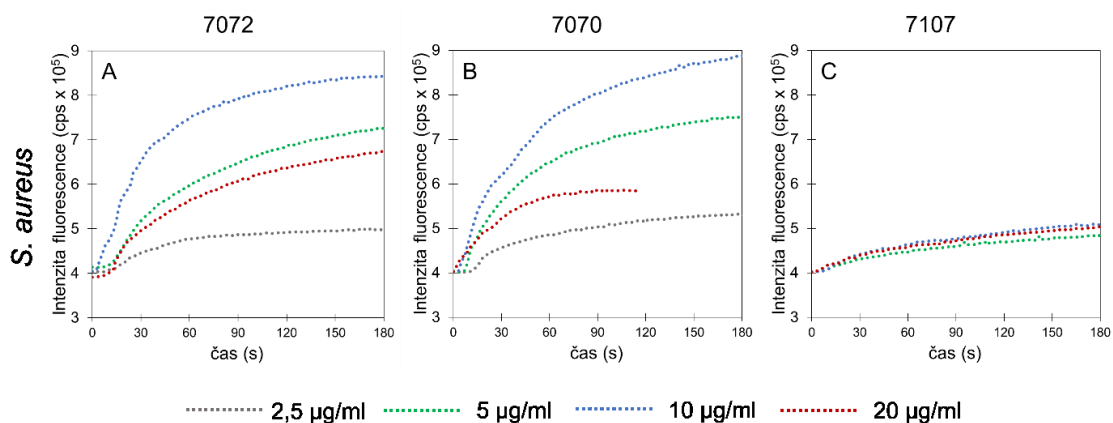
Výsledky měření tedy potvrdily, že podstata slabé účinnosti LPPO 7107 na testovaných bakteriích (Tabulka 1) spočívá ve ztrátě pórtvorné aktivity.

## 5.2 Sledování permeabilizačního účinku LPPO na živých buňkách pomocí sondy propidium jodid

K ověření schopnosti LPPO tvořit póry v membránách živých buněk byla použita sonda PI (kapitola 4.6). Pokud dojde ke zvýšení intenzity fluorescence, znamená to, že pórtvorná látka dokáže vytvořit dostatečně velký pór, aby se PI dostal dovnitř buňky,

kde se váže do dvouřetězcových nukleových kyselin a tím dojde k nárůstu jeho intenzity fluorescence.

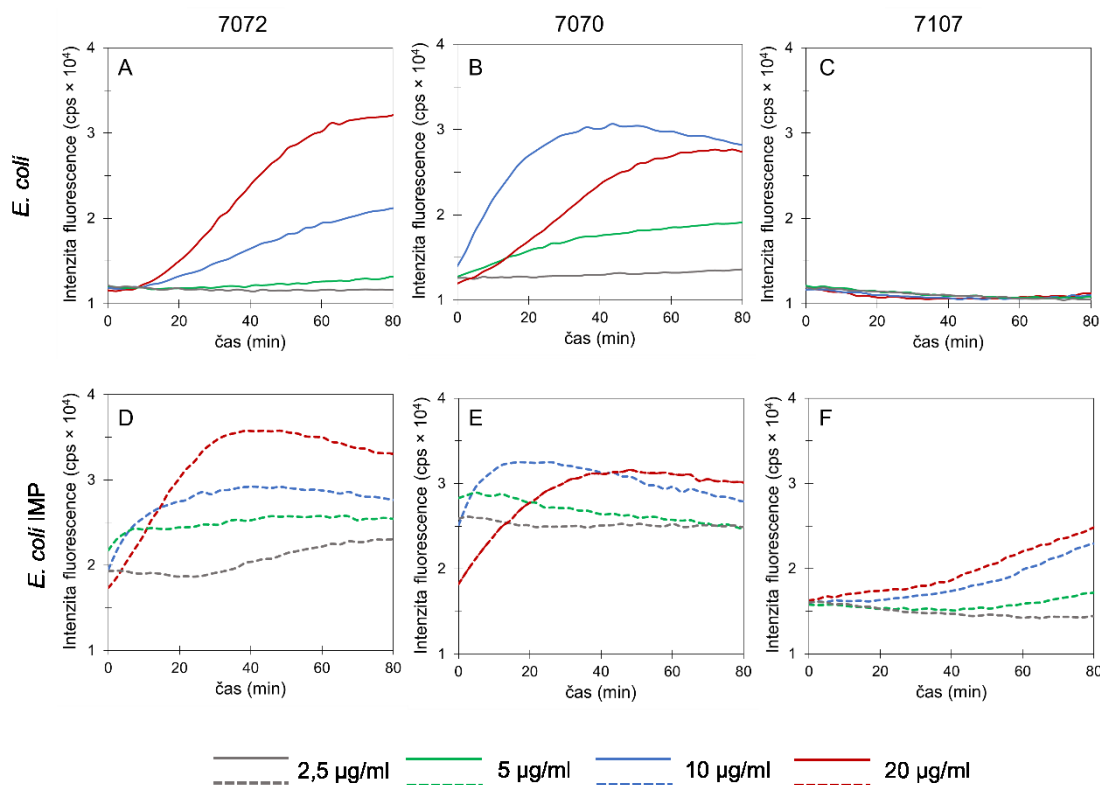
Pro sledování účinku LPPO na  $G^+$  bakterie byla modelem bakterie *S. aureus*. Všechny testované látky vykazovaly permeabilizační aktivitu proti této bakterii, která byla s výjimkou látky 7071 koncentračně závislá. Látky 7072 a 7070 (Obrázek 5.10A,B) byly nejvíce účinné při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Při této koncentraci byl patrný strmější nástup kinetiky i celkově nejvyšší maximum dosažené intenzity fluorescence (IF, fluorescence intensity). U obou látek byla maxima IF u koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  vyšší než u 20  $\mu\text{g/ml}$ . U látky 7070 byl rozdíl mezi maximy těchto koncentrací 1,3násobný. Nejnižší IF a nejmírnější nástup kinetiky byly u obou látek naměřeny při koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Srovnání maximálních hodnot IF u látek 7072 a 7070 ukazuje, že látka 7070 obecně dosahuje vyšších celkových maxim než látka 7072 (s výjimkou koncentrace 20  $\mu\text{g/ml}$ ). Když porovnáme grafy výsledků jednotlivých LPPO, je na první pohled patrné, že látka 7107 měla oproti zbylým dvěma LPPO velmi slabou pórortvornou aktivitu, a to dokonce bez ohledu na použitou koncentraci (Obrázek 5.10C).



Obrázek 5.10 Srovnání permeabilizačního účinku zástupců LPPO na buňky *S. aureus*; A) LPPO 7072; B) LPPO 7070; C) LPPO 7107; Reprezentativní křivky byly vybrány z pěti nezávislých měření.

Modelovou bakterií pro sledování účinku LPPO na  $G^-$  bakterie byla *E. coli*. Permeabilizační aktivitu proti této bakterii vykazovaly jen látky 7072 a 7070. U látky 7072 je patrná koncentrační závislost u koncentrací 5, 10 a 20  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 5.11A), kdy dvojnásobné zvýšení koncentrace látky způsobilo 1,5násobný nárůst IF v maximum. Tento nárůst ale neplatí při porovnání koncentrací 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$ , kde je rozdíl nejvyšších dosažených hodnot velmi malý. Látka 7070 dosahovala nejvyšší účinnosti při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , u které je patrný i strmější nárůst kinetiky (Obrázek 5.11B).

Zvýšení koncentrace na 20 µg/ml způsobilo pozvolnější nástup kinetiky, ale výsledné maximum bylo téměř srovnatelné s účinkem koncentrace 10 µg/ml. Při koncentraci 2,5 µg/ml došlo pouze k nepatrné změně IF. U látky 7107 nebyla pozorována žádná permeabilizační aktivita napříč všemi testovanými koncentracemi (Obrázek 5.11C).



Obrázek 5.11 Srovnání permeabilizačního účinku LPPO na buňky divokého kmene *E. coli* 3954 a mutantního kmene *E. coli* IMP; A, D) LPPO 7072; B, E) LPPO 7070; C, F) LPPO 7107; Plné křivky zobrazují kinetiky pro bakterii *E. coli* 3954, přerušované čáry kinetiky pro *E. coli* IMP. Reprezentativní křivky byly vybrány ze dvou nezávislých měření prováděných v triplicátech. Kvůli časové náročnosti při manipulaci během přípravy vzorků došlo k prodlevě, a tak nebylo možné zachytit nástupy kinetik u mutantního kmene.

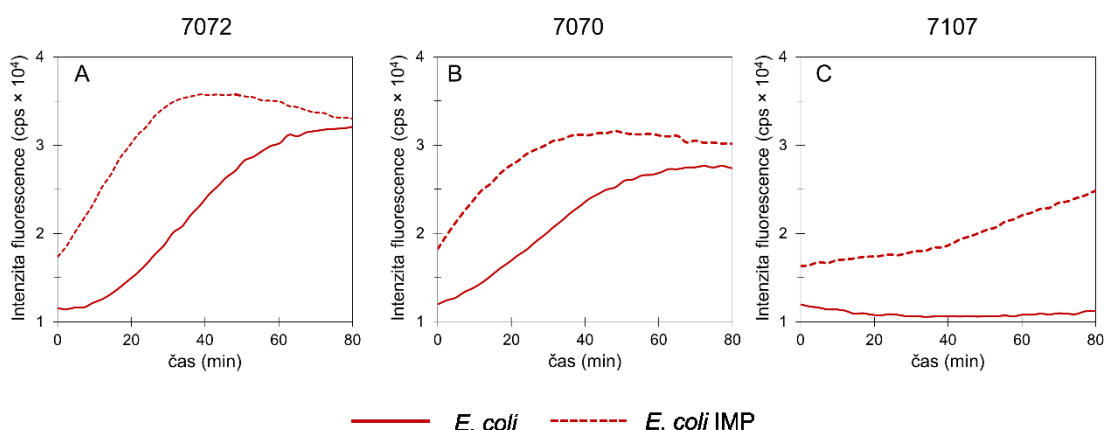
Pro zjištění vlivu integrity vnější membrány na účinek LPPO byl použit kmen *E. coli* imp 4213 (dále jen *E. coli* IMP) nesoucí mutaci v genu pro protein LptD (Caetano *et al.*, 2011), který spolu s proteinem LptE zajišťuje správné sestavení LPS (Chng *et al.*, 2010). Kvůli této mutaci má daný kmen propustnou vnější membránu. Kinetiky vstupu PI do buněk tohoto mutantního kmene vykazují u všech látek koncentrační závislost a také obecně vyšší účinnost než u divokého kmene 3954 (Obrázek 5.11D-F). Koncentrační závislost byla pro látky 7072 a 7070 obdobná jako u divokého kmene 3954, celkový průběh kinetik byl ale rychlejší. U látky 7107 (Obrázek 5.11F), která byla vůči *E. coli* 3954 neaktivní (Obrázek 5.11C), byl proti kmenu IMP pozorován slabý, ale koncentračně závislý účinek. Nejvyšší použitá



koncentrace 20  $\mu\text{g/ml}$  dosahovala zhruba srovnatelného účinku jako koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  látek 7072 a 7070.

Kinetiky vstupu sondy PI do buněk bakterie *E. coli* se v porovnání se *S. aureus* lišily svou rychlostí: kinetiky u *S. aureus* potřebovaly pro dosažení maxima řádově desítky sekund, zatímco u *E. coli* se jednalo o desítky minut. U látky 7072 bylo nejvyšší maximum IF u *S. aureus* při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ , u *E. coli* při 20  $\mu\text{g/ml}$ . U *S. aureus* naopak zvýšení koncentrace na 20  $\mu\text{g/ml}$  vyvolalo menší permeabilizační účinek. Znatelný rozdíl v aktivitě byl pozorován při použití koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$ , kdy u *S. aureus* se aktivity při 5 a 20  $\mu\text{g/ml}$  podobaly, ale u *E. coli* vyvolala tato koncentrace velmi malý permeabilizační účinek. U obou bakterií byla látka 7070 nejaktivnější při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Dvojnásobné zvýšení koncentrace na 20  $\mu\text{g/ml}$  způsobilo pokles její aktivity u *S. aureus*. Permeabilizační účinek látky 7070 při 5  $\mu\text{g/ml}$  byl u *S. aureus* větší než u *E. coli*. Látka 7107 vykazovala velmi slabou permeabilizační aktivitu u *S. aureus* na rozdíl od *E. coli*, která k účinku této látky citlivá vůbec nebyla.

Z porovnání kinetik obou kmenů *E. coli* při koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 5.12) je velmi dobře patrné, že u všech látek byla kinetika vstupu sondy do buňky u *E. coli* IMP rychlejší než u divokého kmene. Také maximum IF dosahovalo u všech látek u *E. coli* IMP vyšších hodnot než u divokého kmene. U mutantního kmene vykazovala látka 7107 nárůst IF u všech koncentrací, zatímco u divokého kmene s plnou integritou vnější membrány k žádné změně nedošlo.



Obrázek 5.12 Srovnání permeabilizačního účinku LPPO na buňky divokého kmene *E. coli* 3954 a mutantního kmene *E. coli* IMP; A) LPPO 7072; B) LPPO 7070; C) LPPO 7107. Plnou čarou jsou znázorněny kinetiky pro bakterii *E. coli* 3954, čárkovaně kinetiky pro bakterii *E. coli* IMP. Všechny křivky reprezentují koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Všechny testované LPPO vykazovaly permeabilizační aktivitu proti *S. aureus* i proti *E. coli* IMP, přičemž *S. aureus* byl vůči permeabilizačnímu účinku všech LPPO

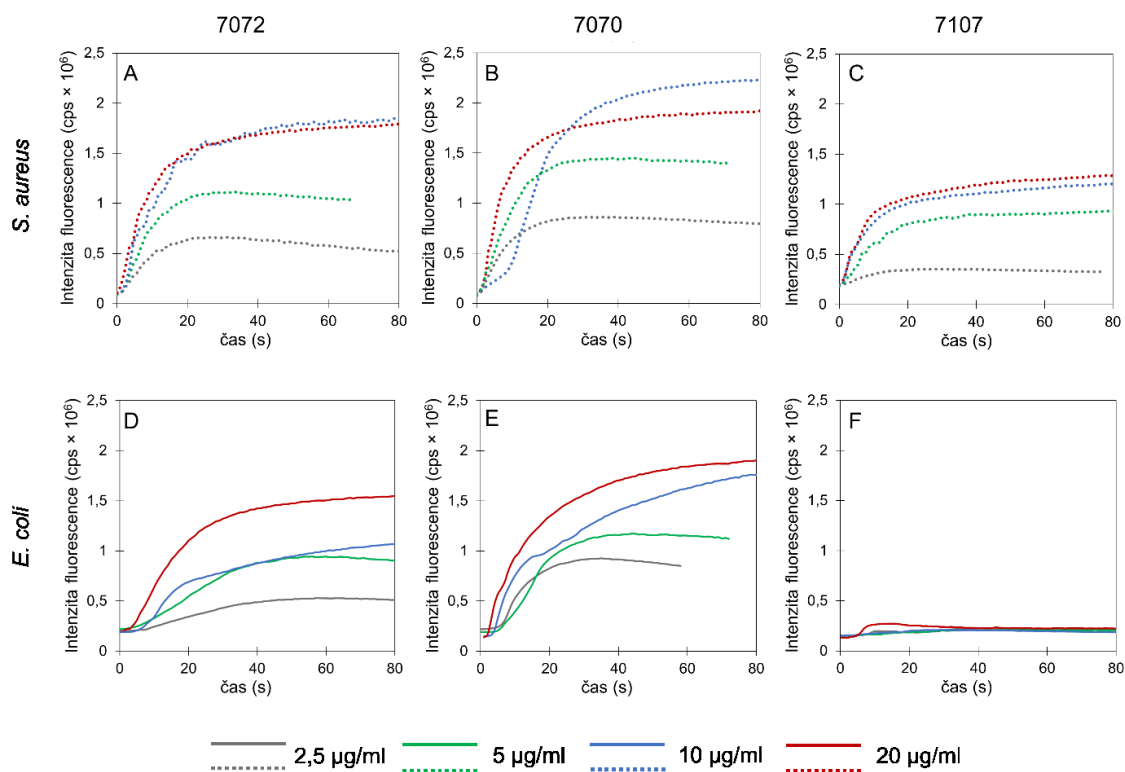
náchylnější. Kinetiky vstupu sondy PI do buněk byly u *S. aureus* řádově rychlejší než u obou kmenů *E. coli*. Také mutantní kmen *E. coli* s porušenou integritou vnější membrány byl vůči účinku LPPO citlivější než divoký kmen 3954. LPPO 7107 vykazoval nízkou nebo žádnou aktivitu v porovnání s LPPO 7072 a 7070.

### 5.3 Vliv LPPO na membránový potenciál bakterií

Cílem následujících experimentů bylo zjistit, zda LPPO depolarizují membránu testovaných bakterií *S. aureus* a *E. coli*. K tomuto účelu byla použita sonda DiSC<sub>3</sub>(5) (kapitola 4.7), která se váže do hyperpolarizovaných membrán, kde je intenzita její fluorescence zhasena. Pokud dojde k narušení membrány vedoucí k depolarizaci, sonda se vyváže z membrány a zvýší se intenzita její fluorescence.

Na Obrázek 5.13 je vidět, že všechny LPPO mají schopnost depolarizovat cytoplazmatickou membránu obou bakterií. Výjimku tvoří pouze látka 7107, která nevykazovala proti *E. coli* žádný účinek (Obrázek 5.13F). Kinetiky všech tří látek u *S. aureus* vykazovaly koncentrační závislost – míra depolarizace membrány postupně stoupala od koncentrace 2,5 až po 10 µg/ml. Maximum IF u koncentrací 10 a 20 µg/ml pak dosahovalo téměř stejných hodnot (Obrázek 5.13A, B, C). Shodné chování vykazovala i látka 7107, ale její účinnost byla ve srovnání s látkou 7072 asi poloviční. Stejně jako tomu bylo u vstupu sondy PI do buněk (kapitola 5.2), také i v těchto pokusech byla látka 7070 nejúčinnější při použití koncentrace 10 µg/ml a zdvojnásobení koncentrace naopak vedlo ke snížení její účinnosti.

Při použití látek 7072 a 7070 proti *E. coli* byla patrná koncentrační závislost účinku – nejnižší konečné IF bylo dosaženo u koncentrace 2,5 µg/ml a nejvyšší při koncentraci 20 µg/ml (Obrázek 5.13D, E). Největší účinek na depolarizaci membrány byl pozorován u látky 7070. Látka 7107 byla proti *E. coli* téměř neúčinná. Nepatrný nárůst IF byl vidět pouze u koncentrace 20 µg/ml. Ostatní koncentrace neměly na membránový potenciál žádný vliv.



Obrázek 5.13 Vliv LPPO na membránový potenciál bakterií *S. aureus* a *E. coli*; A, B) LPPO 7072; B, E) LPPO 7070; C, F) LPPO 7107. Tečkovanou čarou jsou zobrazeny křivky pro bakterii *S. aureus*, plnou čarou křivky pro bakterii *E. coli*. Reprezentativní křivky byly vybrány ze tří nezávislých pokusů měřených v duplikátech.

Všechny tři látky vykazovaly větší depolarizační účinek proti bakteriím *S. aureus*. U této bakterie byly kinetiky při použití všech koncentrací látek strmější než u *E. coli*. U *S. aureus* způsobovala látka 7072 při koncentracích 10 a 20 µg/ml stejnou míru depolarizace, u *E. coli* byla depolarizace při 20 µg/ml vyšší než při 10 µg/ml. Látka 7070 byla u *S. aureus* neúčinnější při koncentraci 10 µg/ml, u *E. coli* zase dosahovala nejvyšší depolarizace při 20 µg/ml. *S. aureus* vykazoval větší citlivost proti látce 7107 než *E. coli*, která byla k této látce téměř necitlivá, stejně jako tomu bylo při měření vstupu sondy PI (kapitola. 5.2).

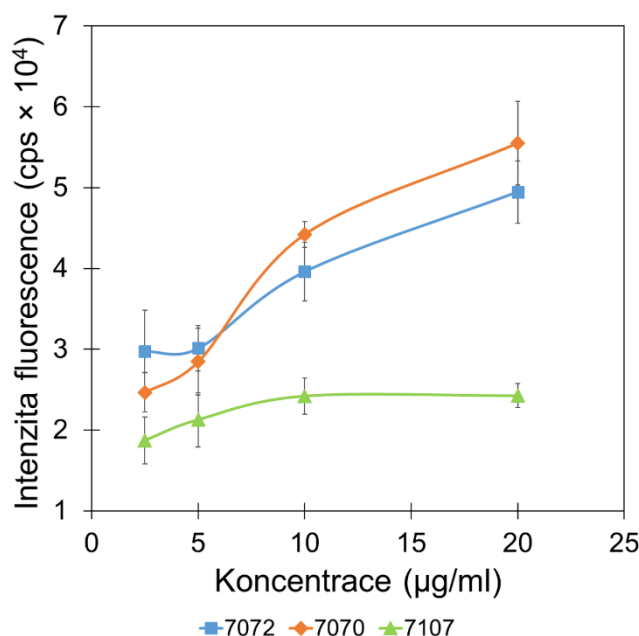
LPPO 7072 a 7070 svým účinkem způsobují depolarizaci membrány u obou testovaných bakterií. LPPO 7107 způsobuje depolarizaci membrány u *S. aureus*, ale téměř neúčinkuje na *E. coli*. Účinek všech tří LPPO je závislý na použité koncentraci.

## 5.4 Schopnost LPPO rozrušovat vnější membránu *E. coli*

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda LPPO 4. generace dezintegrují vnější membránu *E. coli*. Použitá sonda NPN se zabudovává do hydrofobního prostředí narušené vnější membrány, čímž dojde ke zvýšení intenzity fluorescence. Čím více je membrána poškozena, tím více sondy se naváže do membrány a tím vyšší je i IF (kapitola 4.8).

Na grafu (Obrázek 5.14) je vidět, že všechny látky způsobily v určitém rozsahu dezintegraci vnější membrány a že tato aktivita byla koncentračně závislá. Při použití látky 7072 při koncentracích 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  bylo dosaženo téměř shodného účinku, zvýšení koncentrace na 10, resp. 20  $\mu\text{g/ml}$  vyvolalo postupný asi 1,3násobný nárůst IF. Látka 7070 vykazovala velmi obdobné chování jako 7072, ale její celková účinnost byla mírně vyšší – při zvýšení koncentrace z 5 na 10  $\mu\text{g/ml}$  došlo k 1,6násobnému zvýšení IF. Nejnižší účinnosti opět dosahovala látka 7107, která vykazovala jen slabé rozrušení vnější membrány *E. coli*, a to de facto bez ohledu na použitou koncentraci.

Všechny LPPO vykazovaly permeabilizační aktivitu vůči vnější membráně *E. coli*. Největší míru depolarizace způsobil LPPO 7070, nejslabší aktivitu vykazoval LPPO 7107.

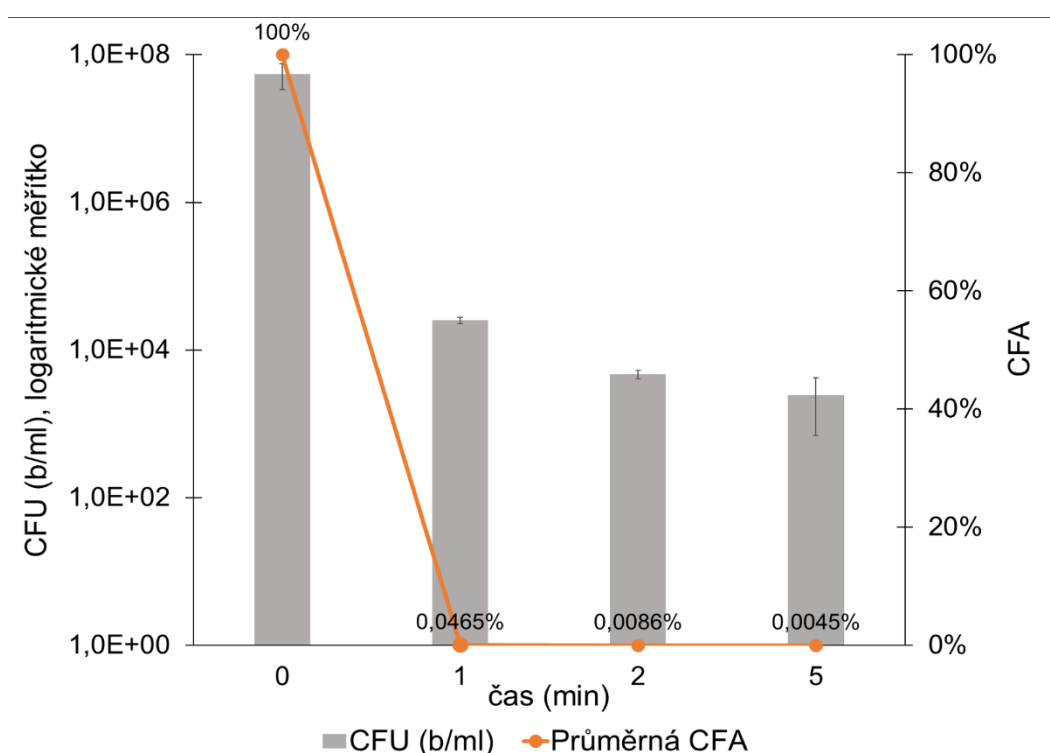


Obrázek 5.14 Vliv LPPO na vnější membránu *E. coli*. Data reprezentují průměrné hodnoty (tři nezávislé pokusy provedené v triplicátech) se směrodatnými odchylkami.

## 5.5 Vliv LPPO 7072 na životaschopnost bakterií

Cílem následujícího pokusu bylo zjistit, jak účinek LPPO ovlivňuje životaschopnost bakterií *S. aureus* a *E. coli*. Testován byl LPPO 7072 v koncentraci 10 µg/ml.

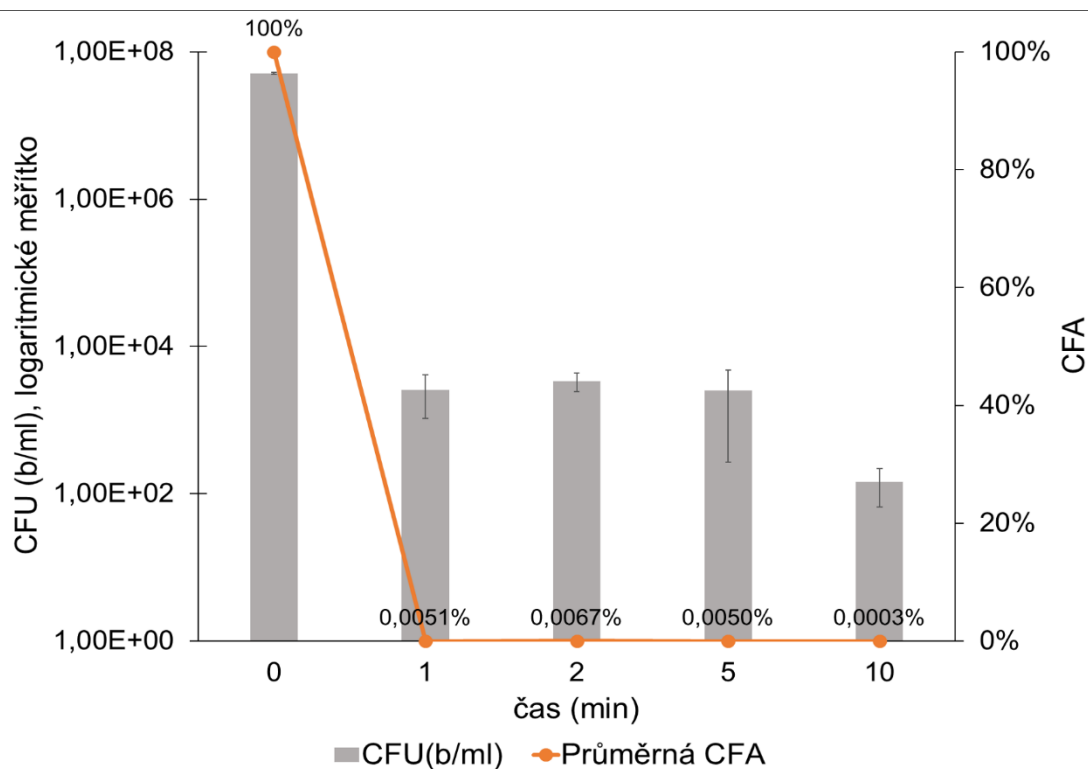
Výsledky sledování počtu živých bakterií *S. aureus*, které byly vystaveny účinku LPPO 7072 o koncentraci 10 µg/ml v čase, ukazují, že již po první minutě působení (Obrázek 5.15) došlo k prudkému poklesu CFU, který znamenal propad CFA téměř na nulu. V dalších časech se již tento účinek jen mírně prohluboval.



Obrázek 5.15 Vliv LPPO 7072 na životaschopnost buněk *S. aureus*. Graf znázorňuje průměrné hodnoty (se směrodatnými odchylkami) získané ze tří nezávislých pokusů prováděných v triplikátech.

Také při sledování počtu živých buněk *E. coli*, které byly vystavené působení LPPO 7072, došlo již po první minutě k rapidnímu poklesu CFU o čtyři řády, a tedy k propadu CFA na nulu (Obrázek 5.16). Rozdíl CFU po 1., 2. a 5. minutě byl minimální, po celkově 10 minutách došlo k poklesu CFU ještě o jeden řád vůči původnímu počtu buněk.

LPPO 7072 má při koncentraci 10 µg/ml velmi rychlý baktericidní účinek, který se u buněk *S. aureus* a *E. coli* téměř neliší.



Obrázek 5.16 Vliv LPPO 7072 na životaschopnost buněk *E. coli*. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty (se směrodatnými odchylkami) získané ze tří nezávislých pokusů prováděných v triplicátech.

## 5.6 Měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů po působení LPPO

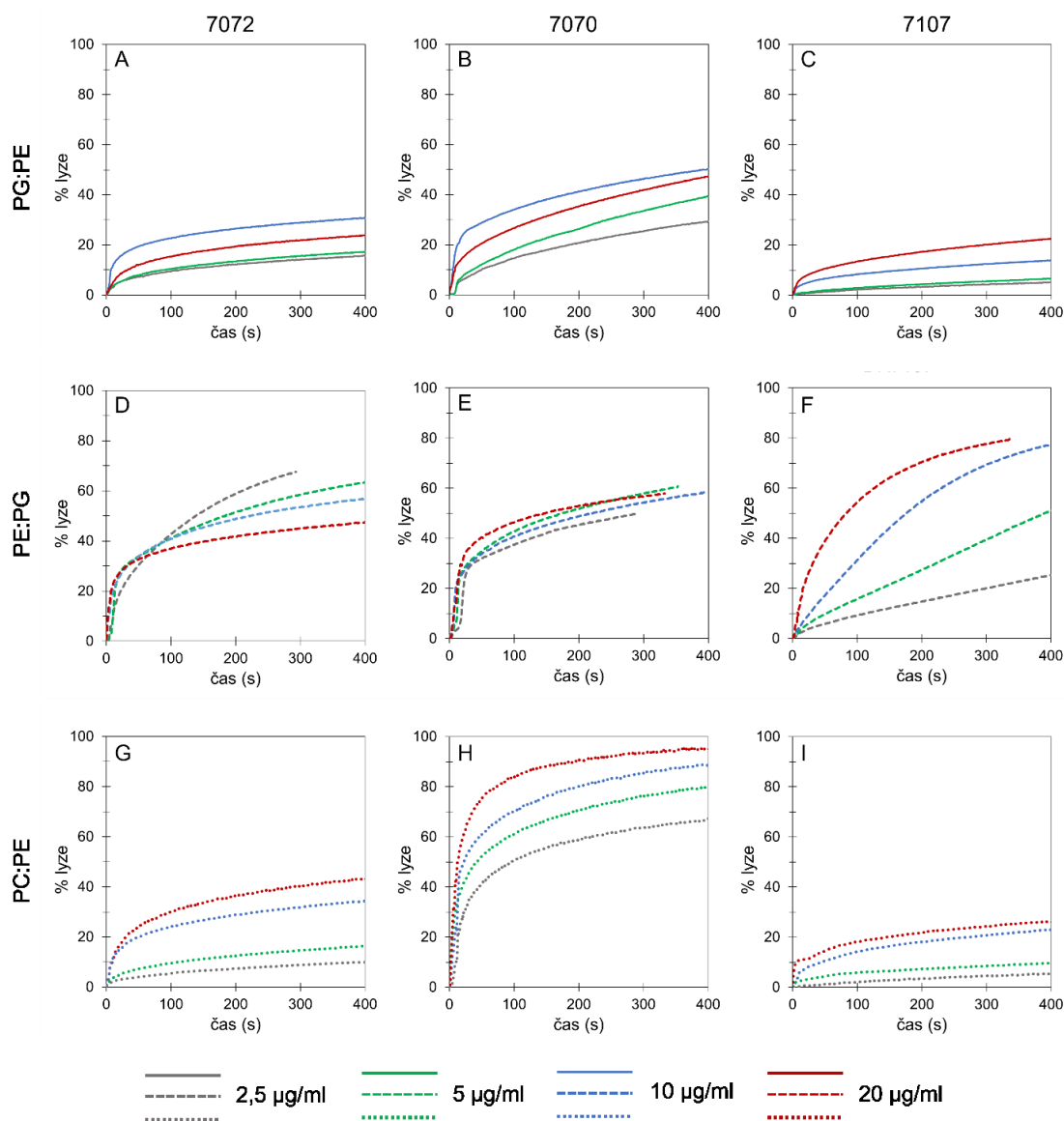
Pomocí měření úniku fluorescenční sondy CF z lipozómů bylo zjišťováno, zda má určité složení fosfolipidů v membráně lipozómů vliv na permeabilizační aktivitu LPPO. Druhým cílem těchto pokusů bylo zjistit, zda přítomnost LPS ovlivňuje permeabilizační aktivitu LPPO.

### 5.6.1 Vliv fosfolipidového složení na permeabilizační účinek LPPO

Celkem byla testována tři různá složení fosfolipidů v lipozómech, která měla napodobovat rozdílné náboje na membránách  $G^+$  a  $G^-$  bakterií a eukaryotních buněk. Lipozomy tvořené směsí DOPG:DOPE v poměru 2:1 (dále jen PG:PE) napodobovaly zastoupením fosfolipidů membránu  $G^+$  bakterií. Fosfolipidová směs DOPE:DOPG v poměru 2:1 (dále jen PE:PG) měla napodobovat složení membrány  $G^-$  bakterií. Lipozomy tvořené směsí DOPC:DOPE v poměru 2:1 (dále jen PC:PE) napodobovaly fosfolipidové složení membrány eukaryotních buněk.

Kinetiky lyze lipozómů složených z PG:PE měly při použití látek 7072 a 7070 (Obrázek 5.17A, B) velmi podobné průběhy. Obě tyto látky vykazovaly pouze slabou koncentrační závislost. Koncentrace 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  měly u látky 7072 stejný účinek a maximální úroveň lyze činila asi 17 %, u látky 7070 byl rozdíl mezi maximy při těchto koncentracích vyšší (29%, resp. 39% lyze). Při zdvojnásobení koncentrace na 10  $\mu\text{g/ml}$  bylo dosaženo nejvyšší míry lyze, kdy u 7072 byla pozorována maximálně 31% lyze a u 7070 50% lyze. Látka 7107 vykazovala jen slabou permeabilizační aktivitu a největší míry lyze bylo dosaženo při koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  a to 23 % (Obrázek 5.17C). Ze všech testovaných LPPO dosahovala látka 7070 nejvyššího účinku.

U lipozómů složených z PE:PG měly látky 7072 a 7070 opět velmi podobné průběhy kinetik. Odlišovaly se ale v účinnostech použitých koncentrací. U látky 7072 došlo k fenoménu, kdy snížení koncentrace vyvolalo zvýšení účinku – při koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  dosahovala lyze 68 % a u 20  $\mu\text{g/ml}$  47 % (Obrázek 5.17D). Změna koncentrace látky 7070 téměř neovlivnila permeabilizační účinek na lipozómy, který se pohyboval mezi 50 a 60 % lyze bez ohledu na použitou koncentraci (Obrázek 5.17E). Látka 7107 vykazovala silnou koncentrační závislost. Při nejnižší měřené koncentraci (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) byla lyze 25%, s rostoucí koncentrací se zvyšovala i účinnost lyze, která dosáhla 80 % při koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  (Obrázek 5.17F). Podobně vysoké míry lyze bylo dosaženo i při koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se zvyšující se koncentrací rostla i celková rychlost dosažení maxima lyze. Na těchto lipozómech dosáhla látka 7107 v porovnání se zbylými dvěma LPPO nejvyššího procenta lyze.



Obrázek 5.17 Vliv fosfolipidového složení na účinek LPPO; A, D, G) LPPO 7072; B, E, H) LPPO 7070; C, F, I) LPPO 7107; Plnou čarou jsou označeny kinetiky lyze lipozómů složených z PG:PE, čárkovanou čarou kinetiky lyze lipozómů složených z PE:PG a tečkovanou čarou kinetiky lyze lipozómů složených z PC:PE. U lipozómů složených z PG:PE a PE:PG jsou zobrazeny reprezentativní křivky vybrané z tří nezávislých měření prováděných v duplikátech. U lipozómů složených z PC:PE jsou reprezentativní křivky vybrány ze dvou nezávislých měření provedených v duplikátech.

U lipozómů složených z PC:PE byla účinnost lyze koncentračně závislá u všech tří LPPO. Průběhy kinetik látek 7072 a 7107 si byly podobné (Obrázek 5.17G, I), ale maxima u látky 7107 dosahovala zhruba polovičních hodnot lyze látky 7072. Kinetiky při koncentracích 2,5 a 5 µg/ml se příliš nelišily – v maximu dosahovaly lyze 16 %, resp. 10 %. Zvýšení koncentrace na 10 µg/ml vyvolalo u obou látek větší skok v účinnosti, kdy u látky 7072 byla celková míra lyze 34 % a u látky 7107 23 %. Nejvyšší míry lyze (43 %, resp. 26 %) bylo dosaženo u obou látek při koncentraci 20 µg/ml.



Látka 7070 vykazovala na těchto lipozómech největší aktivitu. Od předchozích látek se lišila prudkým nástupem kinetiky i konečnou mírou lyze. Nejvyšší míry lyze bylo dosaženo při koncentraci 20 µg/ml a to 97 % (Obrázek 5.17H). S klesající koncentrací se účinnost lyze snižovala – při nejnižší měřené koncentraci (2,5 µg/ml) dosáhla 67 %.

Kinetiky lyze lipozómů způsobené LPPO se lišily napříč složením lipozómů. Látky 7072 a 7107 byly nejučinnější na lipozómech složených z PE:PG, zatímco LPPO 7070 způsoboval největší míru lyze na lipozómech z PC:PE. U látky 7072 se nejučinnější koncentrace měnila v závislosti na fosfolipidovém složení lipozómů. Látka 7070 vykazovala na lipozómech z PG:PE a z PC:PE koncentrační závislost, na rozdíl od lipozómů z PE:PG, kde se účinnost s rostoucí koncentrací příliš neměnila. Nejučinnější koncentrace u lipozómů složených z PG:PE byla 10 µg/ml, zatímco u lipozómů z PC:PE byla 20 µg/ml. Látka 7107 byla nejvíce aktivní na lipozómech z PE:PG, kde při koncentracích 10 a 20 µg/ml dosahovala vyšší procentuální míry lyze než předchozí dva LPPO. Kinetiky u lipozómů složených z PG:PE nebo z PC:PE si byly u látky 7107 velmi podobné jak tvarem, tak dosaženými maximy. Největší rozdíly mezi zástupci LPPO byly u lipozómů z PC:PE, kde látka 7070 dosahovala nejvyšších procent lyze.

Všechny LPPO indukovaly lyzi všech tří složení lipozómů. LPPO obecně dosahovaly větších účinků na lipozómech z PE:PG než na těch z PG:PE. LPPO 7070, který vykazuje velkou hemolytickou aktivitu, dosahoval největší aktivity na lipozómech složených z PC:PE.

### 5.6.2 Vliv přítomnosti LPS v lipozómech na aktivitu LPPO

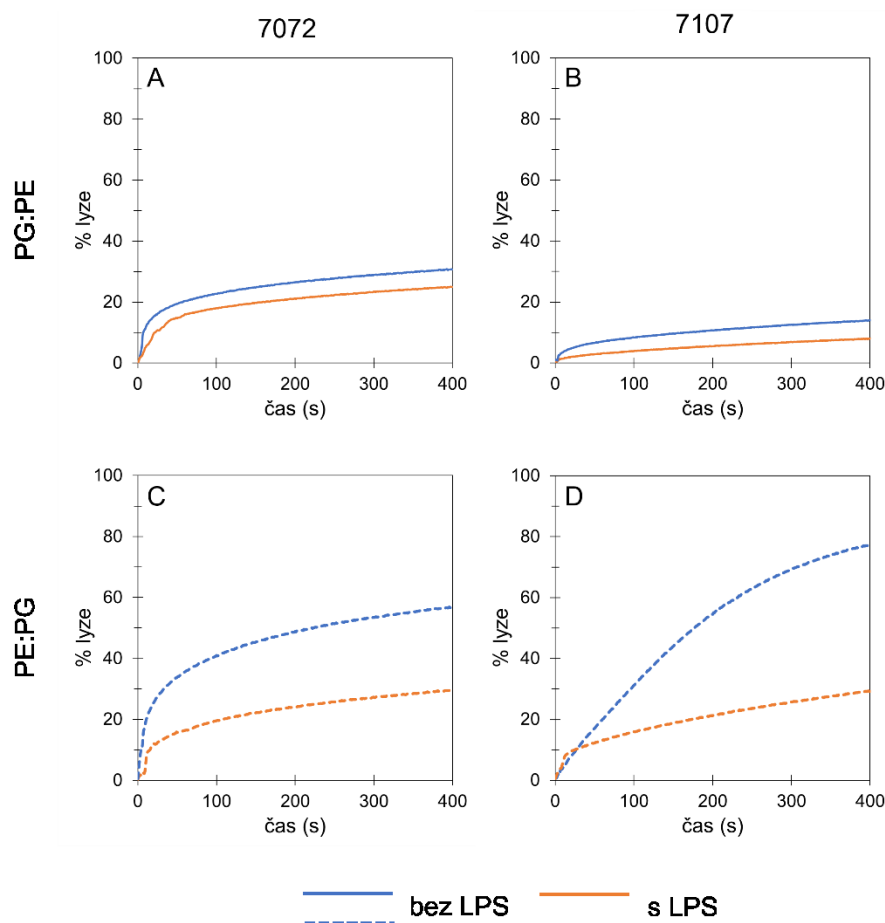
Cílem tohoto dílčího pokusu bylo zjistit, zda přítomnost LPS v lipozómech ovlivňuje aktivitu LPPO. Testovány byly LPPO 7072 a 7107 v koncentraci 10 µg/ml na lipozómech z PG:PE a PE:PG, které byly před přidavkem LPPO preinkubovány s LPS v koncentraci 20 µg/ml.

Při použití látky 7072 na lipozómy složené z PG:PE způsobila přítomnost LPS pokles celkové míry lyze z 31 % na 25 % (Obrázek 5.18A). U látky 7107 došlo přítomností LPS k poklesu ze 14 % na 8 % (Obrázek 5.18B). LPS v lipozómech neovlivnil tvar kinetik.

Přítomnost LPS v lipozómech z PE:PG měla na permeabilizační účinek LPPO markantnější vliv než u předchozích lipozómů. Při použití látky 7072 pokleslo celkové procento lyze z 57 % na 30 % (Obrázek 5.18C). U látky 7107 došlo přítomností LPS

nejen k propadu celkové míry lyze ze 78 % na 29 %, ale také ke změně průběhu kinetiky – rychlý nástup se po 20 s zpomalil a v další fázi lyze už narůstal velmi pozvolně (Obrázek 5.18D).

Přítomnost LPS snížila míru lyze lipozómů vyvolanou účinkem obou LPPO 7072 i 7107, přičemž u membrány složené z PE:PG byl tento rozdíl výraznější.



Obrázek 5.18 Vliv přítomnosti LPS na aktivitu LPPO 7072 a 7107; A, C) LPPO 7072; B, D) LPPO 7107; Plnou čarou jsou vykresleny kinetiky lyze lipozómů složených z PG:PE, čárkovaně jsou vykresleny kinetiky lyze lipozómů složených z PE:PG. Reprezentativní křivky lyze lipozómů bez LPS byly vybrány ze tří nezávislých měření prováděných v duplikátech. Reprezentativní křivky lyze lipozómů v přítomnosti LPS jsou vybrány ze dvou nezávislých pokusů prováděných v duplikátech.

## 6 Diskuze

Lipofosfonoxiny jsou malé syntetické amfipatické molekuly, jejichž zásahovým místem je cytoplazmatická membrána bakterií. Molekuly LPPO z první a druhé generace byly monomerní, zatímco LPPO čtvrté generace zkoumaných v této diplomové práci tvoří molekulu jakýsi dimer – molekula je tvořena ze dvou symetrických částí analogických k původním molekulám LPPO 1. a 2. generace propojených spojovacím modulem. Zatím nejslibnější zástupce s označením 7072 vykazuje velmi dobrou antibakteriální aktivitu a zároveň nízkou hemolytickou aktivitu. Tento zástupce obsahuje ve svém hydrofobním modulu osm uhlíků a ve spojovacím modulu šest uhlíků. Pro porovnání vlivu struktury na aktivitu LPPO byli vybráni další dva zástupci – hemolytický 7070 a LPPO se slabou antimikrobiální aktivitou 7107. LPPO 7070 má na rozdíl od LPPO 7072 spojovací modul dlouhý deset uhlíků, LPPO 7107 se naopak liší v hydrofobním modulu, který obsahuje pouze šest uhlíků. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda tyto rozdíly ve sktruktuře stojí za rozdílnou aktivitou těchto LPPO.

Pomocí pokusů na umělých membránových systémech (planární lipidické membrány a lipozómy) byla ověřována pórtvorná aktivita LPPO a dále, zda a jak je tato aktivita ovlivněna koncentrací látky a složením membrány. Pomocí vodivostních měření na planární membráně bylo zjištěno, že na jednosložkových záporně nabitých membránách z DPhPG je aktivita LPPO 7072 koncentračně závislá. Nejčtenější vodivostní stavy byly při koncentracích 1,25 a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  téměř shodné (zaokrouhleně obojí  $12 \pm 2$  pS) a také si odpovídaly v nejnižším naměřeném vodivostním stavu: 4 pS. Tato data naznačují, že pro vytvoření póru je pravděpodobně potřeba určité minimální množství molekul LPPO. Obě koncentrace se lišily v rozsahu vodivostí, kdy při 2,5  $\mu\text{g/ml}$  měl největší naměřený pór zhruba čtyřikrát větší vodivost než u 1,25  $\mu\text{g/ml}$ . Nejvyšší měřená koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  dosahovala vodivostí v rozsahu 7–1 260 pS. S rostoucí koncentrací se rozšiřovala distribuce vodivostních stavů, z čehož se dá usuzovat, že se v membráně při vyšší koncentraci LPPO tvoří větší póry o vyšším počtu jednotek v oligomeru. Koncentrace měla vliv i na fenotyp pórů, kdy při nejnižší testované koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  docházelo k tvorbě malých pravidelných pórů s nízkou hodnotou šumu proudu a s ostře rozlišitelnými stavy otevření a zavření póru (Obrázek 5.2D). Doba života otevřeného stavu póru se pohybovala mezi jednotkami až

stovkami sekund. Naopak při 5  $\mu\text{g/ml}$  se takovéto póry nevyskytovaly vůbec, a naopak byly přítomny velké póry s vysokou hodnotou šumu (Obrázek 5.2A), které se neuzavíraly a svým hromaděním zvyšovaly celkovou vodivost membrány. U prostřední koncentrace (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) se objevovaly oba typy pórů. Přítomnost malých pravidelných pórů u obou nižších koncentrací odpovídá hypotéze, že pro vytvoření póru je potřeba minimální definované množství monomerů. Pro zjištění přesné stechiometrie LPPO tvořících pórů by byla potřeba ještě podrobnější analýza koncentrační závislosti pórotvorného účinku, popř. vizualizace LPPO v membráně například pomocí fluorescenčně značených LPPO.

Dalším dílčím pokusem bylo porovnání účinku LPPO na membrány o různém složení lipidů. Nejprve byl porovnáván jednosložkový systém tvořený DPhPG a dvousložková membrána tvořená DOPG:DOPE v poměru 2:1. Na dvousložkové membráně z DOPG:DOPE vykazoval LPPO 7072 při koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$  širokou distribuci vodivostních stavů (16–16 600 pS) na rozdíl od jednosložkové membrány, kde převážná většina pórů dosahovala vodivosti do 35 pS. Takto velký rozdíl v aktivitě LPPO může být dán nerovnoměrným mísením fosfolipidů ve dvousložkové membráně. Negativně nabitě fosfolipidy se mohou shlukovat a tvořit lipidové mikrodomény (Vanounou *et al.*, 2003), které se odlišují tloušťkou a rigiditou a na jejichž rozhraní může docházet k lokální diskontinuitě membrány, která by mohla usnadňovat tvorbu větších pórů (Jean-François *et al.*, 2008; Epanand *et al.*, 2009; El Khoury *et al.*, 2017). I samotné membránově aktivní látky mohou způsobovat segregaci fosfolipidů v membráně. Příkladem může být AMP  $\alpha/\beta$  peptid II, který pravděpodobně způsobuje segregaci negativně nabitých fosfolipidů (Epanand *et al.*, 2006), podobný účinek má i antimikrobiální peptid kateslyn (Jean-François *et al.*, 2008) nebo fragment lidského katecidinu označený K-12 (Epanand *et al.*, 2009). Shlukování konkrétního fosfolipidu, v tomto případě kardiolipinu, způsobuje i derivát neaminu 3',6-dinonylneamin (El Khoury *et al.*, 2017).

Vliv na zvýšenou aktivitu LPPO ve dvousložkové membráně oproti jednoduchému systému by mohla mít i mastná kyselina fosfolipidu, která spolu s polární částí ovlivňuje teplotu fázového přechodu fosfolipidu. Při této teplotě dochází k přechodu membrány z gelového do fluidního stavu. Pro správnou funkci musí být membrána ve fluidním stavu, ale s rostoucí teplotou okolí se zvyšuje i fluidita a příliš fluidní membrána je i více propustná. DPhPG obsahuje větvený fytanoyl, díky němuž je teplota

fázové přechodu tohoto fosfolipidu 41 °C (www.avantilipids.com). Oba fosfolipidy DOPG a DOPE obsahují nenasycenou kyselinu olejovou, jejíž dvojná vazba snižuje teplotu fázového přechodu. Tato teplota činí u molekuly fosfolipidu DOPG -18 °C, u DOPE to je -16 °C (www.avantilipids.com). Při laboratorní teplotě 25 °C byla tedy dvousložková membrána s kyselinou olejovou fluidnější než fytanoylovaná jednosložková membrána, což mohlo mít také vliv na tvorbu pórů.

Následující pokus na umělých membránových systémech spočíval ve sledování vlivu náboje membrány na aktivitu LPPO 7072. Aktivita LPPO byla sledována na membránách tvořených kombinací dvou fosfolipidů – DOPG:DOPE (2:1), kdy je membrána tvořena majoritně negativně nabitým PG, dále DOPE:DOPG (2:1), kdy jsou 2/3 membrány tvořeny elektroneutrálním PE, a DOPC:DOPE (2:1), tj. pouze nenabitými fosfolipidy mimikujícími nenabitě eukaryotické membrány. Na planárních lipidických membránách z DOPG:DOPE nebo DOPE:DOPG fosfolipidů vykazoval LPPO 7072 velmi podobnou aktivitu (rozsah vodivosti 16–16 600 pS, resp. 9–15 100 pS). Oproti tomu na nenabitě membráně z DOPC:DOPE fosfolipidů byla jeho aktivita výrazně menší (vodivosti 7–640 pS). Tento pokus potvrzuje výchozí hypotézu, že LPPO 7072 bude více aktivní na nabitých membránách než na nenabitých, což může vysvětlovat jeho dobrou antimikrobiální aktivitu a zároveň nízkou hemolytickou aktivitu.

Vliv náboje fosfolipidů membrány na aktivitu LPPO byl také testován na lipozómech, kde se sledoval únik fluorescenční sondy CF z lipozómů po účinku LPPO. Všechny LPPO vykazovaly na lipozómech jednozásahový mechanismus účinku. Na lipozómech tvořených z DOPG:DOPE a DOPE:DOPG (Obrázek 5.17A,D) se účinek LPPO lišil více, než ukazovaly výsledky z měření na planárních systémech. Zatímco na DOPE:DOPG membráně dosahoval LPPO 7072 maximálně 70% lyze, na lipozómech z DOPG:DOPE byla největší míra lyze pouze 38 %. Na lipozómech z DOPC:DOPE fosfolipidů (Obrázek 5.17G) dosahovala maximální lyze 54 %. Tyto rozdílné výsledky mohou mít několik důvodů. Ačkoliv je rozpětí vodivosti látky 7072 na planárních membránách z DOPG:DOPE a DOPE:DOPG téměř totožné, nevypovídá přesně o celkové aktivitě. Na membránách z DOPG:DOPE měla pouze desetina všech pórů vodivost vyšší než 1 000 pS, u membrány z DOPE:DOPG měla čtvrtina všech pórů vodivost nad 1 000 pS. Na planárních lipidických membránách procházely skrze póry ionty draslíku a chlóru. Při měření na lipozómech se používá sonda CF. Jelikož má molekula CF molekulární hmotnost 376 g/mol, potřebuje ve srovnání s ionty K<sup>+</sup> nebo

Cl<sup>-</sup> dostatečně velký pór na to, aby jím prošla skrz membránu ven do okolního prostředí. Jelikož se na membráně z DOPE:DOPG tvoří dvakrát více pórů s vodivostí nad 1 000 pS, dá se předpokládat, že i na lipozómech stejného složení se bude tvořit větší množství velkých pórů než na membráně lipozómů z DOPG:DOPE. Většími póry bude sonda CF pronikat snadněji a tím bude dosahovat vyšší intenzity fluorescence, která vypovídá o míře lyze.

Vliv na rozdílnou aktivitu LPPO 7072 na membránách z DOPG:DOPE v planárním uspořádání při vodivostních měřeních a na lipozómech může mít i přítomnost rozpouštědla (směs dekanu a butanolu 9:1), ve kterém jsou rozpouštěny fosfolipidy tvořící planární lipidickou membránu. Přítomnost rozpouštědla ovlivňuje celkovou tloušťku membrány (Fettiplace *et al.*, 1971), a tedy i zabudování molekul pórotvorné látky, které tvoří oligomer póru. Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu je i celková plocha membrány, na kterou LPPO cílí. Plocha planární membrány je asi 0,5 mm<sup>2</sup>, zatímco plocha lipozómů při koncentraci lipidů 10 μM činí zhruba 42 cm<sup>2</sup>. U planárních systémů se testovala koncentrace 1,25 μg/ml, u lipozómů byla největší testovaná koncentrace 20 μg/ml. Na takto velké ploše lipozómů se mohlo stát, že se molekuly LPPO nesetkaly a nemohly tedy vytvořit oligomerní pór anebo v případě, že se setkalo jen menší množství monomerů, vytvořily se pouze malé póry, kterými nemohla sonda CF uniknout. Aby byl účinek na plochu srovnatelný, musel by být počet LPPO na plochu stejný, tudíž při měření s lipozómy by musela být použita koncentrace 10,5 mg/ml. Mohlo se také stát, že od určité koncentrace preferují molekuly LPPO interakci mezi sebou v roztoku před vazbou do membrány, tudíž vyšší koncentrace vedla k nižší účinnosti v porovnání s účinkem nižší koncentrace. U LPPO 4. generace nebyla však dosud stanovena kritická micelární koncentrace, tj. koncentrace, při které molekuly látky spolu vytvářejí micely.

V neposlední řadě můžeme uvažovat, že vliv na rozdílnou aktivitu LPPO 7072 na planární membráně a lipozómech z DOPG:DOPE může mít i stabilita lipozómů o daném složení. Při přípravě lipozómů z DOPC:DOPE byl výtěžek dvakrát nižší v porovnání s lipozómy z DOPG:DOPE a 1,6krát nižší než u lipozómů z DOPE:DOPG. Odlišná stabilita by mohla být dána přítomností PG v DOPG:DOPE lipozómech. Molekuly obou fosfolipidů PG i PC mají tvar válce, ale liší se nábojem, kdy PG nese záporný náboj a náboj na PC je neutrální. Simulace molekulární dynamiky PG a PE fosfolipidů v membráně ukázala, že PG vytváří s PE silné iontové vazby, díky čemuž je

membrána kompaktnější a snižuje se její permeabilita (Zhao *et al.*, 2008). Významnou roli na stabilitu membrány má mísitelnost fosfolipidů lišících se polární hlavičkou ve směsi. Bylo zjištěno, že PE je zcela mísitelný s PG a CL – s těmito fosfolipidy je schopný vytvářet uniformní binární směsi (v poměru 1:1). Naopak fosfolipidy PC a PE spolu ve stejném poměru nevytváří homogenní směs pravděpodobně kvůli slabým interakcím mezi polárními hlavami. PE pravděpodobně tvoří preferenčně interakce s jiným PE než PC, což naznačuje, že PE vytváří v takové směsi domény (Shin *et al.*, 1995). Další vliv může mít i zakřivení membrány lipozómů v porovnání s planární membránou. Například antimikrobiálnímu peptidu dermaseptinu B2 usnadňuje pozitivní zakřivení membrány jeho inserce (Galanth *et al.*, 2009), u tritricinu má zakřivení membrány vliv na jeho sekundární strukturu (Bozelli *et al.*, 2012).

Posledním z pokusů na umělých membránových systémech bylo porovnání aktivity LPPO 7072 s LPPO 7070 a 7107. Hemolytický LPPO 7070 vykazoval na planární membráně z DOPC:DOPE fosfolipidů široký rozsah vodivosti od 28 pS do 18 300 pS. LPPO 7072 měl na membráně tohoto složení mnohem menší rozsah pozorovaných pórů a to 7–640 pS. Tento výsledek je ve shodě s měřením aktivity LPPO 7070 na lipozómech stejného fosfolipidového složení, kde byl s 97% celkovou mírou lyze neúčinnějším lipofosfonoxinem (Obrázek 5.17H). Z těchto výsledků vyplývá, že za hemolytickou aktivitou tohoto LPPO může stát jeho preference k nenabitým membránám. Na lipozómech z DOPG:DOPE a DOPE:DOPG (Obrázek 5.17B, E) byl LPPO 7070 téměř stejně aktivní, což koreluje s jeho aktivitou na membránách živých bakteriálních buněk sledovanou pomocí hodnoty MIC (Tabulka 1). LPPO 7107 nevykazoval na planární membráně z DOPG:DOPE fosfolipidů žádnou pórotvornou aktivitu (Obrázek 5.9) a na lipozómech z DOPG:DOPE a DOPC:DOPE vykazoval pouze slabou aktivitu. Na lipozómech z DOPE:DOPG byl LPPO 7107 neaktivnější (Obrázek 5.17F). Při dalším testování by bylo vhodné změřit aktivitu tohoto LPPO i na planárních lipidických membránách z DOPE:DOPG a zjistit, zda i na planární membráně bude dosahovat podobné vyšší aktivity jako na lipozómech. Zatím se můžeme domnívat, že mu zakřivení membrány lipozómů usnadňuje pórotvornou aktivitu na rozdíl od planární membrány. Dále je možné, že tento LPPO preferuje membrány bohaté na PE, stejně jako duramycin, cinnamycin (Navarro *et al.*, 1985; Märki *et al.*, 1991) nebo cyklotidy (Henriques *et al.*, 2012), a proto je na membránách z DOPE:DOPG aktivnější než na těch, kde je PE v menším procentuálním zastoupení.

Výchozí hypotézou pro měření na umělých lipidických systémech bylo, že LPPO 7072 bude na nabitých membránách napodobujících membrány bakterií více aktivní než na těch neutrálních napodobujících eukaryotické membrány. Tato hypotéza se potvrdila při měřeních na planárních lipidických membránách i pomocí měření úniku sondy CF z lipozómů složených z DOPE:DOPG a DOPC:DOPE fosfolipidů. U LPPO 7070 jsme předpokládali, že jeho vysoká hemolytická aktivita se bude odrážet ve vyšší aktivitě na neutrálně nabitých membránách. Tato hypotéza byla potvrzena jak na planárních systémech, tak na lipozómech. LPPO 7107 byl na lipozómech s převažujícím PG nebo PC velmi málo aktivní, což také odpovídá naší hypotéze, která vychází ze slabé aktivity proti bakteriím (MIC Tabulka 1) i z nízkých hodnot hemolytické aktivity.

Dalším cílem této práce bylo porovnat účinek všech tří zástupců LPPO na  $G^+$  bakterie, kde byl modelem *S. aureus*, a na  $G^-$  bakterie zastoupené bakterií *E. coli*. Pórotvorná aktivita LPPO byla na živých bakteriálních buňkách testována pomocí fluorescenčních sond PI a DiSC<sub>3</sub>(5). Kinetiky vstupu sondy PI do buněk po účinku LPPO měly u *S. aureus* a *E. coli* rozdílný časový průběh, kdy u *S. aureus* trvaly řádově jen desítky sekund, zatímco u *E. coli* desítky minut. Dosažená maxima nelze mezi oběma bakteriemi srovnat kvůli rozdílnému způsobu uspořádání experimentu (měření v kyvetě vs. v mikrotitrační destičce – viz kapitola 4.6). Pokusy s bakterií *S. aureus* za použití sondy PI ukázaly, že LPPO 7072 a 7070 vytvářejí v membráně této bakterie póry, a naopak v souladu se známými hodnotami MIC je látka 7107 vůči této bakterii neaktivní (Obrázek 5.10). Z těchto měření lze usuzovat, že LPPO 7072 a 7070 vytváří v membráně *S. aureus* dostatečně velké póry, kterými projde molekula PI. Permeabilizační aktivitu potvrzuje i experiment se sondou DiSC<sub>3</sub>(5), kdy účinek LPPO 7072 a 7070 vedl ke ztrátě membránového potenciálu *S. aureus* (Obrázek 5.13A, B). U LPPO 7107 nedošlo k významnému nárůstu intenzity fluorescence při použití sondy PI, ale při použití sondy DiSC<sub>3</sub>(5) došlo ke zvýšení intenzity fluorescence značící porušení membránového potenciálu (Obrázek 5.13C). Můžeme usuzovat, že LPPO 7107 zřejmě vytváří v membráně *S. aureus* póry malého průměru, kterými projde sice proton, ale do kterého už se nevejde molekula PI, která má molekulovou hmotnost 668 g/mol. Baktericidní aktivitu LPPO 7072 potvrdil i pokus sledující změnu CFU při inkubaci buněk s tímto LPPO. Již po první minutě působení poklesla hodnota CFU téměř o čtyři řády (Obrázek 5.15), což znamená, že vlivem LPPO 7072 zahynulo více



jak 99 % bakterií. Tento výsledek je tedy ve shodě s velmi rychlým časovým průběhem kinetik sledujících pórtvornou aktivitu této látky.

U bakterie *E. coli* se kinetiky sond PI a DiSC<sub>3</sub>(5) v čase velmi lišily. Sonda PI potřebovala k dosažení maxima intenzity fluorescence 40–80 minut, zatímco u sondy DiSC<sub>3</sub>(5) bylo potřeba k dosažení maxima 40–80 sekund. Tento výrazný rozdíl v čase může být způsoben rozdílným výpovědním mechanismem sond. Zatímco sonda PI nejdříve musí proniknout do buňky, následně se navázat na dvoušroubovici nukleové kyseliny, čímž dojde k nárůstu IF, u sondy DiSC<sub>3</sub>(5) intenzita fluorescence závisí na vyvázání sondy z hyperpolarizované membrány v důsledku narušení membránového potenciálu vytvořením póru. Její odpověď tedy může být obecně rychlejší. Můžeme usuzovat, že LPPO tvoří v membráně G<sup>-</sup> bakterií takové póry, kterými snadno projde proton, ale již ne molekula PI. Jelikož došlo ke zvýšení IF sondy PI, znamená to, že muselo dojít k navázání sondy na dvoušroubovici nukleové kyseliny. V průběhu tohoto desítky minut trvajících měření mohlo dojít působením LPPO k rozpadu membrány a vylití obsahu cytoplazmy do vnějšího prostředí, kde se volná sonda PI mohla navázat na uniklou DNA z buňky a tím došlo ke zvýšení její IF. K ověření těchto domněnek by bylo potřeba buňky po měření s PI stočit, aby bylo vidět, kde PI zůstal navázaný. Sonda PI zbarvuje roztok do růžova. Pokud by se dostala dovnitř buněk, byl by pelet vzniklý centrifugací růžový. Pokud by bylo zvýšení IF způsobeno vazbou PI na DNA lyzovaných buněk, obarvený by byl supernatant a žádný pelet by se nevytvořil.

Měření se sondou DiSC<sub>3</sub>(5) ukazují, že LPPO 7072 a 7070 narušují membránový potenciál buněk *E. coli* (Obrázek 5.13D, E). Nárůst IF sondy u *E. coli* dosahuje o trochu menších maxim než u bakterie *S. aureus*, což může být způsobeno přítomností vnější membrány. Molekuly LPPO musejí nejdříve překonat vnější membránu a až poté se dostanou k vnitřní cytoplazmatické membráně, kterou depolarizují. Kinetiky hynutí *E. coli* v přítomnosti LPPO 7072 ukázaly, že stejně jako u *S. aureus* došlo již po první minutě inkubace k rapidnímu poklesu CFU o čtyři řády, a tedy k propadu CFA na nulu (Obrázek 5.16). Tyto výsledky naznačují, že LPPO 7072 a 7070 vytvářejí ve vnitřní membráně *E. coli* póry s malým průměrem, kterými těžko prochází sonda PI, ale které propouští minimálně protony. Ztráta membránového potenciálu je tedy pravděpodobně příčinou smrti buněk. Na rozdíl od předchozích dvou LPPO je látka 7107 proti *E. coli* téměř neúčinná. U obou měření s fluorescenčními sondami nedošlo k nárůstu IF značící pórtvornou aktivitu (Obrázek 5.11C; Obrázek 5.13F). Tato látka

tedy pravděpodobně není schopna vnější membránu překonat a vytvořit tak pór ve vnitřní cytoplazmatické membráně. Tuto rozdílnou schopnost by bylo možné přisuzovat odlišnosti ve struktuře testovaných LPPO – LPPO 7107 má pouze šestiuhlíkatý hydrofobní modul na rozdíl od LPPO 7072 a 7070, jejichž hydrofobní modul má osm uhlíků. Je možné, že monomery LPPO 7107 kvůli krátkému hydrofobnímu modulu nemohou překonat hydrofobní prostředí vnější membrány nebo se kvůli krátkému hydrofobnímu úseku v protilehlých listech membrány obtížně potkávají, aby vytvořily kanál.

Pro ověření schopnosti LPPO překonávat vnější membránu *E. coli* byla použita sonda NPN, která se váže do narušené vnější membrány, a tím dojde ke zvýšení její IF. Oba LPPO 7072 a 7070 narušovaly vnější membránu téměř stejnou měrou na rozdíl od LPPO 7107, který na integritu vnější membrány neměl téměř žádný vliv (Obrázek 5.14). Pro ověření role vnější membrány v účinnosti LPPO byl dále pomocí sondy PI sledován permeabilizační účinek LPPO na kmen *E. coli* imp 4213, který má mutaci v syntéze LPS, kvůli čemuž má tento kmen propustnou vnější membránu (Caetano *et al.*, 2011). Pokusy ukázaly, že tento fenotyp ovlivnil permeabilizační aktivitu LPPO – kinetiky mutantního kmene *E. coli* byly rychlejší a dosahovaly vyšších maxim IF než kinetiky u divokého kmene (Obrázek 5.11D, E). Dokonce při použití neúčinného LPPO 7107 byla na mutantním kmenu pozorována slabá permeabilizační aktivita (Obrázek 5.11F), což potvrzuje domněnku z předchozího odstavce, že neaktivita LPPO 7107 vůči  $G^-$  bakteriím může být dána jeho neschopností překonávat jejich vnější membránu. Stejný fenomén vykazuje i antibiotikum reutericyklin, který neúčinkoval na  $G^-$  bakterie, ale byl účinný vůči mutantním kmenům *E. coli*, které měly poruchu v syntéze základního i specifického polysacharidu LPS (Gänzle *et al.*, 2000).

Ve shodě s těmito závěry jsou i výsledky pokusů na lipozómech, které obsahovaly ve svých membránách LPS (Obrázek 5.18). LPS byl přidán k lipozómům tvořených z DOPG:DOPE v poměru 2:1, resp. 1:2. U obou testovaných LPPO 7072 a 7107 došlo přítomností LPS k poklesu aktivity, který byl navíc mnohem výraznější na lipozómech z DOPE:DOPG 2:1. U LPPO 7107 došlo k více jak dvojnásobnému poklesu aktivity. Ze všech těchto měření vyplývá, že LPS ovlivňuje aktivitu LPPO. LPPO 7072 i 7070 narušují vnější membránu  $G^-$  bakterií, ale obecně je jejich aktivita proti těmto bakteriím menší než proti  $G^+$ . Určitá část LPPO je pravděpodobně „spotřebována“ k narušení vnější membrány, a tudíž k vnitřní membráně se jich dostane méně než při stejné

koncentraci u  $G^+$ . Dalším faktorem může být vliv přítomnosti samotného LPS, který může znesnadňovat přístup LPPO k membráně, anebo je přímo vyvazovat. Nejvíce je přítomností vnější membrány ovlivněna aktivita LPPO 7107, který není schopný narušovat vnější membránu  $G^-$  bakterií, což je pravděpodobnou příčinou toho, že jsou vůči němu  $G^-$  bakterie necitlivé.

Obečně z pokusů vyplývá, že látky 7072 a 7070 mají na modelové bakterie více méně stejný účinek. To se shoduje s MIC těchto látek proti *E. coli* i *S. aureus*, kdy u obou bakterií dosahují obě látky MIC 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (Tabulka 1). Oba LPPO 7072 a 7070 mají baktericidní aktivitu – LPPO tvoří v membráně póry a bakterie následně hynou z důvodu ztráty membránového potenciálu. Výsledky pokusů jsou v souladu i s antibakteriální aktivitou LPPO 7107, jehož MIC proti *S. aureus* činí 8  $\mu\text{g/ml}$  (Tabulka 1), což se shoduje s jeho slabou pórotvornou aktivitou v membráně této bakterie. Proti *E. coli* vykazuje MIC 32  $\mu\text{g/ml}$  (Tabulka 1), což odpovídá jeho neúčinnosti proti této bakterii i při maximální použité koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Neaktivita LPPO 7107 je pravděpodobně způsobena schopností tvořit jen malé póry v membráně a také neschopností překonat bariéru vnější membrány. Naopak velká aktivita LPPO 7070 v nenabitých membránách je v souladu s jeho vysokou hemolytickou aktivitou, která je pravděpodobně způsobena jeho silnou preferencí k nenabitým membránám.

## 7 Shrnutí

- Všechny testované LPPO vykazují pórotvornou aktivitu na membráně, která je ovlivněná strukturou LPPO a složením cílové membrány.
- Pórotvorná aktivita LPPO 7072 a 7070 má širokou distribuci vodivostí pórů, a to od jednotek až po několik tisíc pS. LPPO 7107 vykazuje na planární membráně pouze slabou nebo žádnou aktivitu.
- Aktivita LPPO 7072 je koncentračně závislá. Tento LPPO tvoří na jednosložkové membráně z DPhPG při koncentraci 1,25 µg/ml pravidelné, ostře ohraničené póry s nízkou vodivostí (do 30 pS). Při koncentraci 5 µg/ml se vyskytují velké póry s vodivostí v řádech desítek až tisíců pS s vysokou hodnotou šumu. Oba typy pórů se vyskytují při koncentraci 2,5 µg/ml.
- LPPO 7070 tvoří na membráně z DOPC:DOPE 2:1 póry o vodivostech od 28 pS do 18 000 pS, zatímco látka 7072 za stejných podmínek pouze v rozmezí 7 až 640 pS.
- Působením LPPO dochází u buněk ke ztrátě membránového potenciálu.
- LPPO 7072 a 7070 vykazují proti *S. aureus* a *E. coli* téměř stejnou aktivitu. Buňky *S. aureus* jsou k účinku LPPO 7107 slabě citlivé.
- Buňky *E. coli* jsou k účinku LPPO 7107 necitlivé. Důvodem je pravděpodobně neschopnost této látky překonat vnější membránu.
- LPPO způsobují únik fluorescenční sondy CF z lipozómů. Míra permeabilizace membrány závisí na membránovém složení lipozómu a na koncentraci LPPO.
- Přítomnost LPS snižuje účinnost lyze lipozómů způsobené LPPO.
- Baktericidní účinek LPPO je velmi rychlý – bakterie ošetřené LPPO 7072 hynou již v první minutě inkubace.

## 8 Použitá literatura

- Alakomi, H. L., Paananen, A., Suihko, M. L., Helander, I. M. a Saarela, M. (2006) 'Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp. 4695–4703. doi: 10.1128/AEM.00142-06.
- Anand, N. a Davis, B. D. (1960) 'Damage by streptomycin to the cell membrane of *Escherichia coli*', *Nature*, 185(4705), pp. 22–23. doi: 10.1038/185022a0.
- Auranwiwat, C., Trisuwan, K., Saiai, A., Pyne, S. G. a Ritthiwigrom, T. (2014) 'Antibacterial tetraoxygenated xanthenes from the immature fruits of *Garcinia cowa*', *Fitoterapia*, 98, pp. 179–183. doi: 10.1016/j.fitote.2014.08.003.
- Bach, J. N. a Bramkamp, M. (2013) 'Flotillins functionally organize the bacterial membrane', *Molecular Microbiology*, 88(6), pp. 1205–1217. doi: 10.1111/mmi.12252.
- Ballweber, L. M., Jaynes, J. E., Stamm, W. E. a Lampe, M. F. (2002) 'In vitro microbicidal activities of cecropin peptides D2A21 and D4E1 and gel formulations containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), pp. 34–41. doi: 10.1128/AAC.46.1.34-41.2002.
- Banning, A., Tomasovic, A. a Tikkanen, R. (2011) 'Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins', *Current Protein & Peptide Science*, 12(8), pp. 725–735. doi: 10.2174/138920311798841708.
- Barbeta, B. L., Marshall, A. T., Gillon, A. D., Craik, D. J. a Anderson, M. A. (2008) 'Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4), pp. 1221–1225. doi: 10.1073/pnas.0710338104.
- Baussanne, I., Bussière, A., Halder, S., Ganem-Elbaz, C., Ouberaï, M., Riou, M., Paris, J. M., Ennifar, E., Mingeot-Leclercq, M. P. a Décout, J. L. (2010) 'Synthesis and antimicrobial evaluation of amphiphilic neamine derivatives', *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(1), pp. 119–127. doi: 10.1021/jm900615h.
- Benveniste, R. a Davies, J. (1973) 'Structure-activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4(4), pp. 402–409. doi: 10.1128/AAC.4.4.402.
- Bera, S., Zhanel, G. G. a Schweizer, F. (2010) 'Antibacterial activity of guanidinylated neomycin B- and kanamycin A-derived amphiphilic lipid conjugates', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), pp. 1224–1227. doi: 10.1093/jac/dkq083.
- Bergstrom, J. D., Kurtz, M. M., Rew, D. J., Amend, A. M., Karkas, J. D., Bostedor, R. G., Bansal, V. S., Dufresne, C., VanMiddlesworth, F. L., Hensens, O. D., Liesch, J. M., Zink, D. L., Wilson, K. E., Onishi, J., Milligan, J. A., Bills, G., Kaplan, L., Omstead, M. N. a Jenkins, R. G. (1993) 'Zaragozic acids: A family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(1), pp. 80–84. doi: 10.1073/pnas.90.1.80.
- Boman, H. G. (1991) 'Antibacterial peptides: Key components needed in immunity', *Cell*, 65(2), pp. 205–207. doi: 10.1016/0092-8674(91)90154-Q.
- Bozelli, J. C., Sasahara, E. T., Pinto, M. R. S., Nakaie, C. R. a Schreier, S. (2012) 'Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrypticin to lipid membranes', *Chemistry and Physics of Lipids*. Elsevier Ireland Ltd, 165(4), pp. 365–373. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2011.12.005.
- Bozkurt Guzel, C., Oyardi, O. a B. Savage, P. (2018) 'Comparative in vitro antimicrobial activities of CSA-142 and CSA-192, second-generation ceragenins, with CSA-13 against various microorganisms', *Journal of Chemotherapy*. Taylor & Francis, 30(6–8), pp. 332–337. doi: 10.1080/1120009X.2018.1534567.
- Bramkamp, M. a Lopez, D. (2015) 'Exploring the existence of lipid rafts in bacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), pp. 81–100. doi: 10.1128/mubr.00036-14.
- Brogden, K. A. (2005) 'Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?', *Nature*

*Reviews Microbiology*, 3(3), pp. 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.

Browman, D. T., Hoegg, M. B. a Robbins, S. M. (2007) ‘The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers’, *Trends in Cell Biology*, 17(8), pp. 394–402. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.005.

Bugg, T., Lloyd, A. a Roper, D. (2006) ‘Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase (MraY) as a target for antibacterial agents and antibacterial proteins’, *Infectious Disorders - Drug Targets*, 6(2), pp. 85–106. doi: 10.2174/187152606784112128.

Caetano, T., Krawczyk, J. M., Mösker, E., Süßmuth, R. D. a Mendo, S. (2011) ‘Lichenicidin biosynthesis in *Escherichia coli* : licFGEHI immunity genes are not essential for lantibiotic production or self-protection’, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), pp. 5023–5026. doi: 10.1128/AEM.00270-11.

Chalekson, C. P., Neumeister, M. W. a Jaynes, J. (2003) ‘Treatment of infected wounds with the antimicrobial peptide D2A21’, *Journal of Trauma*, 54(4), pp. 770–774. doi: 10.1097/01.TA.0000047047.79701.6D.

Chen, C. H. a Lu, T. K. (2020) ‘Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications’, *Antibiotic*, 9(1), pp. 2–20. doi: 10.3390/antibiotics9010024.

Chen, L. a Tai, P. C. (1987) ‘Effects of antibiotics and other inhibitors on ATP-dependent protein translocation into membrane vesicles’, *Journal of Bacteriology*, 169(6), pp. 2373–2379. doi: 10.1128/jb.169.6.2373-2379.1987.

Chen, R. F. a Knutson, J. R. (1988) ‘Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: Energy transfer to nonfluorescent dimers’, *Analytical Biochemistry*, 172(1), pp. 61–77. doi: 10.1016/0003-2697(88)90412-5.

Cherian, P. T., Wu, X., Maddox, M. M., Singh, A. P., Lee, R. E. a Hurdle, J. G. (2014) ‘Chemical modulation of the biological activity of reutericyclin: A membrane-active antibiotic from *Lactobacillus reuteri*’, *Scientific Reports*, 4(4721), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep04721.

Chng, S. S., Ruiz, N., Chimalakonda, G., Silhavy, T. J. a Kahne, D. (2010) ‘Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), pp. 5363–5368. doi: 10.1073/pnas.0912872107.

Choi, S., Isaacs, A., Clements, D., Liu, D., Kim, H., Scott, R. W., Winkler, J. D. a DeGrado, W. F. (2009) ‘De novo design and in vivo activity of conformationally restrained antimicrobial arylamide foldamers’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), pp. 6968–6973. doi: 10.1073/pnas.0811818106.

Clejan, S., Krulwich, T. A., Mondrus, K. R. a Seto-Young, D. (1986) ‘Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* spp.’, *Journal of Bacteriology*, 168(1), pp. 334–340. doi: 10.1128/jb.168.1.334-340.1986.

Craik, D. J., Daly, N. L., Bond, T. a Waine, C. (1999) ‘Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif’, *Journal of Molecular Biology*, 294(5), pp. 1327–1336. doi: 10.1006/jmbi.1999.3383.

Cuin, Z., Wang, X., Koppermann, S., Thorson, J. S., Ducho, C. a Van Lanen, S. G. (2018) ‘Antibacterial muraymycins from mutant strains of *Streptomyces* sp. NRRL 30471’, *Journal of Natural Products*, 81(4), pp. 942–948. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Davis, B. D., Chen, L. a Tai, P. C. (1986) ‘Misread protein creates membrane channels: An essential step in the bactericidal action of aminoglycosides’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16), pp. 6164–6168. doi: 10.1073/pnas.83.16.6164.

\*Dias, C. a Rauter, A. P. (2019) ‘Membrane-targeting antibiotics: Recent developments outside the peptide space’, *Future Medicinal Chemistry*, 11(3), pp. 211–228. doi: 10.4155/fmc-2018-0254.

Dini, C., Didier-Laurent, S., Drochon, N., Feteanu, S., Guillot, J. C., Monti, F., Uridat, E., Zhang, J. a Aszodi, J. (2002) ‘Synthesis of sub-micromolar inhibitors of MraY by exploring the region originally occupied by the diazepamone ring in the liposidomycin structure’, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*

Letters, 12(8), pp. 1209–1213. doi: 10.1016/S0960-894X(02)00109-9.

Donovan, C. a Bramkamp, M. (2009) 'Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue', *Microbiology*, 155(6), pp. 1786–1799. doi: 10.1099/mic.0.025312-0.

Dunbar, L. M., Tang, D. M. a Manausa, R. M. (2008) 'A review of telavancin in the treatment of complicated skin and skin structure infections (cSSSI)', *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), pp. 235–244. doi: 10.2147/term.s1843.

Dunkley Jr., E. A., Clejan, S., Guffanti, A. A. a Krulwich, T. A. (1988) 'Large decreases in membrane phosphatidylethanolamine and diphosphatidylglycerol upon mutation to duramycin resistance do not change the protonophore resistance of *Bacillus subtilis*', *Biochimica et Biophysica Acta*, 943(1), pp. 13–18. doi: 10.1016/0167-8809(88)90072-2.

Durnace, B., Wnorowska, U., Pogoda, K., Deptuła, P., Wa tek, M., Piktel, E., Głuszek, S., Gu, X., Savage, P. B., Niemirowicz, K. a Bucki, R. (2016) 'Candidacidal activity of selected ceragenins and human cathelicidin LL-37 in experimental settings mimicking infection sites', *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0157242.

Eckert, R., He, J., Yarbrough, D. K., Qi, F., Anderson, M. H. a Shi, W. (2006) 'Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp. 3651–3657. doi: 10.1128/AAC.00622-06.

Endo, A., Kakiki, K. a Misato, T. (1970) 'Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D.', *Journal of Bacteriology*, 104(1), pp. 189–196. doi: 10.1128/jb.104.1.189-196.1970.

Epanand, R. F., Schmitt, M. A., Gellman, S. H. a Epanand, R. M. (2006) 'Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two  $\alpha/\beta$ -antimicrobial peptides', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), pp. 1343–1350. doi: 10.1016/j.bbmem.2006.01.018.

Epanand, R. F., Wang, G., Berno, B. a Epanand, R. M. (2009) 'Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), pp. 3705–3714. doi: 10.1128/AAC.00321-09.

Epanand, R. F., Pollard, J. E., Wright, J. O., Savage, P. B. a Epanand, R. M. (2010) 'Depolarization, bacterial membrane composition, and the antimicrobial action of ceragenins', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), pp. 3708–3713. doi: 10.1128/AAC.00380-10.

Epanand, R. F., Savage, P. B. a Epanand, R. M. (2007) 'Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins)', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(10), pp. 2500–2509. doi: 10.1016/j.bbmem.2007.05.023.

Epanand, R. M. a Epanand, R. F. (2011) 'Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents', *Journal of Peptide Science*, 17(5), pp. 298–305. doi: 10.1002/psc.1319.

Fettiplace, R., Andrews, D. M. a Haydon, D. A. (1971) 'The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes', *The Journal of Membrane Biology*, 5(3), pp. 277–296. doi: 10.1007/BF01870555.

Flemming, K., Klingenberg, C., Cavanagh, J. P., Sletteng, M., Stensen, W., Svendsen, J. S. a Flægstad, T. (2009) 'High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), pp. 136–145. doi: 10.1093/jac/dkn464.

Fredenhagen, A., Fendrich, G., Märki, F., Märki, W., Gruner, J. a Raschdorf, F. (1990) 'Duramycins B and C, two new lanthionine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2. Structural revision of duramycin and cinnamycin', *The Journal of Antibiotics*, 43(11), pp. 1403–1412. doi: 10.7164/antibiotics.43.1403.

Galanth, C., Abbassi, F., Lequin, O., Ayala-Sanmartin, J., Ladram, A., Nicolas, P. a Amiche, M. (2009) 'Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: Interplay between helix - hinge - helix structure and membrane curvature strain', *Biochemistry*, 48(2), pp. 313–327. doi: 10.1021/bi802025a.

Gänzle, M. G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. a Hammes, W. P. (2000) 'Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584', *Applied and Environmental Microbiology*,

- 66(10), pp. 4325–4333. doi: 10.1128/AEM.66.10.4325-4333.2000.
- Gänzle, M. G. (2004) 'Reutericyclin: Biological activity, mode of action, and potential applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), pp. 326–332. doi: 10.1007/s00253-003-1536-8.
- Gänzle, M. G. a Vogel, R. F. (2003) 'Studies on the mode of action of reutericyclin', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(23), pp. 1305–1307. doi: 10.1128/AEM.69.2.1305-1307.2003.
- Ghosh, C. a Haldar, J. (2015) 'Membrane-active small molecules: designs inspired by antimicrobial peptides', *ChemMedChem*, 10(10), pp. 1606–1624. doi: 10.1002/cmdc.201500299.
- Gurjar, M. (2015) 'Colistin for lung infection: an update', *Journal of Intensive Care*, 3(3), pp. 511–515. doi: 10.1186/s40560-015-0072-9.
- Hachmann, A.-B., Angert, E. R. a Helmann, J. D. (2009) 'Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), pp. 1598–1609. doi: 10.1128/AAC.01329-08.
- Hancock, R. E. W. a Scott, M. G. (2000) 'The role of antimicrobial peptides in animal defenses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), pp. 8856–8861. doi: 10.1073/pnas.97.16.8856.
- Hara, T., Kodama, H., Kondo, M., Wakamatsu, K., Takeda, A., Tachi, T. a Matsuzaki, K. (2001) 'Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue', *Biopolymers*, 58(4), pp. 437–446. doi: 10.1002/1097-0282(20010405)58:4<437::AID-BIP1019>3.0.CO;2-I.
- Hashemi, M. M., Rovig, J., Weber, S., Hilton, B., Forouzan, M. M. a Savage, B. (2017) 'Susceptibility of colistin-resistant gram-negative bacteria to antimicrobial peptides and ceragenins', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), pp. 1–6. doi: 10.1128/AAC.00292-17.
- Hasim, S., Allison, D. P., Mendez, B., Farmer, A. T., Pelletier, D. A., Retterer, S. T., Campagna, S. R., Reynolds, T. B. a Doktycz, M. J. (2018) 'Elucidating duramycin's bacterial selectivity and mode of action on the bacterial cell envelope', *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2018.00219.
- Henriques, S. T., Huang, Y. H., Castanho, M. A. R. B., Bagatolli, L. A., Sonza, S., Tachedjian, G., Daly, N. L. a Craik, D. J. (2012) 'Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), pp. 33629–33643. doi: 10.1074/jbc.M112.372011.
- Herzog, I. M., Feldman, M., Eldar-Boock, A., Satchi-Fainaro, R. a Fridman, M. (2013) 'Design of membrane targeting tobramycin-based cationic amphiphiles with reduced hemolytic activity', *MedChemComm*, 4(1), pp. 120–124. doi: 10.1039/c2md20162c.
- Herzog, I. M. a Fridman, M. (2014) 'Design and synthesis of membrane-targeting antibiotics: From peptides- to aminosugar-based antimicrobial cationic amphiphiles', *MedChemComm*. Royal Society of Chemistry, 5(8), pp. 1014–1026. doi: 10.1039/c4md00012a.
- Higgins, D. L., Chang, R., Debatov, D. V., Leung, J., Wu, T., Krause, K. M., Sandvik, E., Hubbard, J. M., Kaniga, K., Schmidt, D. E., Gao, Q., Cass, R. T., Karr, D. E., Benton, B. M. a Humphrey, P. P. (2005) 'Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), pp. 1127–1134. doi: 10.1128/AAC.49.3.1127-1134.2005.
- Höltzel, A., Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P. a Jung, G. (2000) 'The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: Reutericyclin, a new tetramic acid', *Angewandte Chemie - International Edition*, 39(15), pp. 2766–2768. doi: 10.1002/1521-3773(20000804)39:15<2766::AID-ANIE2766>3.0.CO;2-G.
- Hori, M., Kakiki, K., Suzuki, S. a Mlsato, T. (1971) 'Studies on the mode of action of polyoxins part iii. Relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition', *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(8), pp. 1280–1291. doi: 10.1080/00021369.1971.10860064.
- Hudson, B., Upholt, W. B., Deviny, J. a Vinograd, J. (1969) 'The use of an ethidium analogue in the



dye-buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: The variation of the superhelix density of mitochondrial DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 62(3), pp. 813–820. doi: 10.1073/pnas.62.3.813.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. a Boman, H. G. (1980) 'Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*', *European journal of biochemistry / FEBS*, 106(1), pp. 7–16. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x.

Hurdle, J. G., Yendapally, R., Sun, D. a Lee, R. E. (2009) 'Evaluation of analogs of reutericyclin as prospective candidates for treatment of staphylococcal skin infections', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), pp. 4028–4031. doi: 10.1128/AAC.00457-09.

Igarashi, M., Nakagawa, N., Doi, N., Hattori, S., Naganawa, H. a Hamada, M. (2003) 'Camprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp.', *Journal of Antibiotics*, 56(6), pp. 580–583. doi: 10.7164/antibiotics.56.580.

Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R. a Miyauchi, K. I. (1996) 'Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(8), pp. 861–865. doi: 10.1111/j.2042-7158.1996.tb03988.x.

Isaksson, J., Brandsdal, B. O., Engqvist, M., Flaten, G. E., Svendsen, J. S. M. a Stensen, W. (2011) 'A synthetic antimicrobial peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical impact on membrane disruption', *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(16), pp. 5786–5795. doi: 10.1021/jm200450h.

Ishizaki, Y., Hayashi, C., Inoue, K., Igarashi, M., Takahashi, Y., Pujari, V., Crick, D. C., Brennan, P. J. a Nomoto, A. (2013) 'Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase *WecA*, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45', *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), pp. 30309–30319. doi: 10.1074/jbc.M113.492173.

Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y. a Suzuki, S. (1965) 'Studies on polyoxins, antifungal antibiotics', *Agricultural and Biological Chemistry*, 29(9), pp. 848–854. doi: 10.1080/00021369.1965.10858475.

Isono, K., Nagatsu, J., Kobinata, K., Sasaki, K. a Suzuki, S. (1967) 'Studies on polyoxins, antifungal antibiotics', *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(2), pp. 190–199. doi: 10.1271/bbb1961.31.190.

Isono, K., Uramoto, M., Kusakabe, H., Kimura, K. I., Izaki, K., Nelson, C. C. a McCloskey, J. A. (1985) 'Liposidomycins: Novel nucleoside antibiotic which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis', *Journal of Antibiotics*, 18(11), pp. 1617–1621. doi: 10.7164/antibiotics.38.1617.

Jean-François, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M. H. a Dufourc, E. J. (2008) 'Aggregation of cateslytin  $\beta$ -sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides?', *Biochemistry*, 47(24), pp. 6394–6402. doi: 10.1021/bi800448h.

Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. a Anderson, M. (2001) 'Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp. 10614–10619. doi: 10.1073/pnas.191366898.

Kanai, A. a Natori, S. (1989) 'Cloning of gene cluster for sarcotoxin I, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina*', *FEBS Letters*, 258(2), pp. 199–202. doi: 10.1016/0014-5793(89)81652-7.

Kaplan, C. W., Sim, J. H., Shah, K. R., Kolesnikova-Kaplan, A., Shi, W. a Eckert, R. (2011) 'Selective membrane disruption: Mode of action of C16G2, a specifically targeted antimicrobial peptide', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), pp. 3446–3452. doi: 10.1128/AAC.00342-11.

Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L. a Klausner, R. D. (1982) 'The concept of lipid domains in membranes', *Journal of Cell Biology*, 94(1), pp. 1–6. doi: 10.1083/jcb.94.1.1.

Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R. M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N. K., Hoyland, C. N., Ogasawara, N., Lewis, R. J., Vollmer, W., Daniel, R. A. a Errington, J. (2011) 'A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 30(24), pp. 4931–4941. doi: 10.1038/emboj.2011.358.

- Khadka, N. K., Aryal, C. M. a Pan, J. (2018) 'Lipopolysaccharide-dependent membrane permeation and lipid clustering caused by cyclic lipopeptide colistin', *ACS Omega*, 3(12), pp. 17828–17834. doi: 10.1021/acsomega.8b02260.
- El Khoury, M., Swain, J., Sautrey, G., Zimmermann, L., Van Der Smissen, P., Décout, J. L. a Mingeot-Leclercq, M. P. (2017) 'Targeting bacterial cardiolipin enriched microdomains: An antimicrobial strategy used by amphiphilic aminoglycoside antibiotics', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-10543-3.
- Kimura, K. ichi, Miyata, N., Kawanishi, G., Kamio, Y. a Isono, K. (1989) 'Liposidomycin C inhibits phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* Y-10', *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(7), pp. 1811–1815. doi: 10.1271/bbb1961.53.1811.
- Koh, J. J., Qiu, S., Zou, H., Lakshminarayanan, R., Li, J., Zhou, X., Tang, C., Saraswathi, P., Verma, C., Tan, D. T. H., Tan, A. L., Liu, S. a Beuerman, R. W. (2013) 'Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1828(2), pp. 834–844. doi: 10.1016/j.bbmem.2012.09.004.
- Koh, J. J., Zou, H., Lin, S., Lin, H., Soh, R. T., Lim, F. H., Koh, W. L., Li, J., Lakshminarayanan, R., Verma, C., Tan, D. T. H., Cao, D., Beuerman, R. W. a Liu, S. (2016) 'Nonpeptidic amphiphilic xanthone derivatives: Structure-activity relationship and membrane-targeting properties', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(1), pp. 171–193. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01500.
- Koo, H. B. a Seo, J. (2019) 'Antimicrobial peptides under clinical investigation', *Peptide Science*, 111(5), pp. 1–15. doi: 10.1002/pep2.24122.
- Kotra, L. a Mobashery, S. (2005) 'A renaissance of interest in aminoglycoside antibiotics', *Current Organic Chemistry*, 5(2), pp. 193–205. doi: 10.2174/1385272013375698.
- Kowalski, R. P., Romanowski, E. G., Yates, K. A. a Mah, F. S. (2016) 'An independent evaluation of a novel peptide mimetic, Brilacidin (PMX30063), for ocular anti-infective', *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), pp. 23–27. doi: 10.1089/jop.2015.0098.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R. a Connolly, L. E. (2016) 'Aminoglycosides: An overview', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a027029.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N. a Straus, S. K. (2018) 'Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*', *Biomolecules*, 8(1). doi: 10.3390/biom8010004.
- Kumar, S., Dahiya, R., Khokra, S. L., Mourya, R., Chennupati, S. V. a Maharaj, S. (2017) 'Total synthesis and pharmacological investigation of cordyheptapeptide A', *Molecules*, 22(6), pp. 1–14. doi: 10.3390/molecules22060682.
- Kylsten, P., Samakovlis, C. a Hultmark, D. (1990) 'The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection.', *The EMBO Journal*, 9(1), pp. 217–224. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08098.x.
- Leadbetter, M. R., Adams, S. M., Bazzini, B., Fatheree, P. R., Karr, D. E., Krause, K. M., Lam, B. M. T., Linsell, M. S., Nodwell, M. B., Pace, J. L., Quast, K., Shaw, J. P., Soriano, E., Trapp, S. G., Villena, J. D., Wu, T. X., Christensen, B. G. a Judice, J. K. (2004) 'Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: Discovery of telavancin (TD-6424)', *Journal of Antibiotics*, 57(5), pp. 326–336. doi: 10.7164/antibiotics.57.326.
- Lee, J. Y., Boman, A., Chuanxin, S., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V. a Boman, H. G. (1989) 'Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), pp. 9159–9162. doi: 10.1073/pnas.86.23.9159.
- Lee, T.-H., N. Hall, K. a Aguilar, M.-I. (2016) 'Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: A focus on the role of membrane structure', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), pp. 25–39. doi: 10.2174/1568026615666150703121700.
- Leontiadou, H., Mark, A. E. a Marrink, S. J. (2006) 'Antimicrobial peptides in action', *Journal of the American Chemical Society*, 128(37), pp. 12156–12161. doi: 10.1021/ja062927q.

- Lin, S., Koh, J. J., Aung, T. T., Lim, F., Li, J., Zou, H., Wang, L., Lakshminarayanan, R., Verma, C., Wang, Y., Tan, D. T. H., Cao, D., Beurman, R. W., Ren, L. a Liu, S. (2017) 'Symmetrically substituted xanthone amphiphiles combat gram-positive bacterial resistance with enhanced membrane selectivity', *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(4), pp. 1362–1378. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01403.
- Loh, B., Grant, C. a Hancock, R. E. W. (1984) 'Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(4), pp. 546–551. doi: 10.1128/AAC.26.4.546.
- Lopez, D. a Koch, G. (2017) 'Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview', *Current Opinion in Microbiology*, 36(0), pp. 76–84. doi: 10.1016/j.mib.2017.02.001.
- López, D. a Kolter, R. (2010) 'Functional microdomains in bacterial membranes', *Genes and Development*, 24(17), pp. 1893–1902. doi: 10.1101/gad.1945010.
- Ludtke, S., He, K. a Huang, H. (1995) 'Membrane thinning caused by magainin 2', *Biochemistry*, 34(51), pp. 16764–16769. doi: 10.1021/bi00051a026.
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L. a Huang, H. W. (1996) 'Membrane pores induced by magainin', *Biochemistry*, 35(43), pp. 13723–13728. doi: 10.1021/bi9620621.
- Märki, F., Hänni, E., Fredenhagen, A. a van Oostrum, J. (1991) 'Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2', *Biochemical Pharmacology*, 42(10), pp. 2027–2035. doi: 10.1016/0006-2952(91)90604-4.
- Masters, K. S. a Bräse, S. (2012) 'Xanthenes from fungi, lichens, and bacteria: The natural products and their synthesis', *Chemical Reviews*, 112(7), pp. 3717–3776. doi: 10.1021/cr100446h.
- Matsuzaki, K. (1998) 'Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1376(3), pp. 391–400. doi: 10.1016/S0304-4157(98)00014-8.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K. I., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K. a Epanand, R. M. (1998) 'Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2', *Biochemistry*, 37(34), pp. 11856–11863. doi: 10.1021/bi980539y.
- McDonald, L. A., Barbieri, L. R., Carter, G. T., Lenoy, E., Lotvin, J., Petersen, P. J., Siegel, M. M., Singh, G. a Williamson, R. T. (2002) 'Structures of the muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors', *Journal of the American Chemical Society*, 124(35), pp. 10260–10261. doi: 10.1021/ja017748h.
- Mensa, B., Howell, G. L., Scott, R. a DeGrado, W. F. (2014) 'Comparative mechanistic studies of brilacidin, daptomycin, and the antimicrobial peptide LL16', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), pp. 5136–5145. doi: 10.1128/AAC.02955-14.
- Meyer, C. E. a Reusser, F. (1967) 'A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*', *Experientia*, 23(2), pp. 85–86. doi: 10.1007/BF02135929.
- Mileykovskaya, E. a Dowhan, W. (2009) 'Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(10), pp. 2084–2091. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.04.003.
- Miura, Y. (2020) 'NMR studies on the conformation, stability and dynamics of alamethicin in methanol', *European Biophysics Journal*, 49(1), pp. 113–124. doi: 10.1007/s00249-019-01418-8.
- Mohamed, Y. F., Abou-Shleib, H. M., Khalil, A. M., El-Guink, N. M. a El-Nakeeb, M. A. (2014) 'Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant gram-negative isolates', *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), pp. 381–388. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.007.
- Muraih, J. K., Harris, J., Taylor, S. D. a Palmer, M. (2012) 'Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: Stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(3), pp. 673–678. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.027.
- Nagant, C., Pitts, B., Stewart, P. S., Feng, Y., Savage, P. B. a Dehaye, J. P. (2013) 'Study of the effect of

antimicrobial peptide mimic, CSA-13, on an established biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* ', *MicrobiologyOpen*, 2(2), pp. 318–325. doi: 10.1002/mbo3.77.

Navarro, J., Chabot, J., Sherrill, K., Aneja, R., Zahler, A. a Racker, E. (1985) 'Interaction of duramycin with artificial and natural membranes', *Biochemistry*, 24(17), pp. 4645–4650. doi: 10.1021/bi00338a025.

Nguyen, L. T., Haney, E. F. a Vogel, H. J. (2011) 'The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action', *Trends in Biotechnology*, 29(9), pp. 464–472. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.

Niemirowicz, K., Surel, U., Wilczewska, A. Z., Mystkowska, J., Piktel, E., Gu, X., Namiot, Z., Kulakowska, A., Savage, P. B. a Bucki, R. (2015) 'Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles', *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12951-015-0093-5.

Nilsson, A. C., Janson, H., Wold, H., Fugelli, A., Andersson, K., Håkangård, C., Olsson, P. a Olsen, W. M. (2015) 'Ltx-109 is a novel agent for nasal decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* ', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), pp. 145–151. doi: 10.1128/AAC.03513-14.

Novack, G. D. (2014) 'Eyes on new product development: Trabecular meshwork', *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 30(2–3), pp. 83–84. doi: 10.1089/jop.2014.1505.

O'Connell, K. M. G., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G. P. C. a Spring, D. R. (2013) 'Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials', *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(41), pp. 10706–10733. doi: 10.1002/anie.201209979.

Oh, D., Sun, J., Nasrolahi Shirazi, A., Laplante, K. L., Rowley, D. C. a Parang, K. (2014) 'Antibacterial activities of amphiphilic cyclic cell-penetrating peptides against multidrug-resistant pathogens', *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), pp. 3528–3536. doi: 10.1021/mp5003027.

Olekson, M. A., You, T., Savage, P. B. a Leung, K. P. (2017) 'Antimicrobial ceragenins inhibit biofilms and affect mammalian cell viability and migration in vitro', *FEBS Open Bio*, 7(7), pp. 953–967. doi: 10.1002/2211-5463.12235.

Oren, Z. a Shai, Y. (1998) 'Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides', *Biopolymers*, 47(6), pp. 451–463. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F.

Otvos, L., Insug, O., Rogers, M. E., Consolvo, P. J., Condie, B. A., Lovas, S., Bulet, P. a Blaszczyk-Thurin, M. (2000) 'Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides', *Biochemistry*, 39(46), pp. 14150–14159. doi: 10.1021/bi0012843.

Pandey, R. C., Cook, J. C. a Rinehart, K. L. (1977) 'High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II', *Journal of the American Chemical Society*, 99(26), pp. 8469–8483. doi: 10.1021/ja00468a016.

Panova, N., Zborníková, E., Pohl, R., Kolá, M., Látal, T., Lovecká, P., Barvík, I., Krásný, L. a Rejman, D. (2015) 'Insights into the mechanism of action of bactericidal lipophosphonoxins', *PLoS ONE*, 10(12), pp. 1–28. doi: 10.1371/journal.pone.0145918.

Park, C. B., Kim, H. S. a Kim, S. C. (1998) 'Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(1), pp. 253–257. doi: 10.1006/bbrc.1998.8159.

Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V. a Hancock, R. E. W. (2002) 'Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli* ', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), pp. 605–614. doi: 10.1128/AAC.46.3.605-614.2002.

Peleg, A. Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A. M., Rubio, A., Cameron, D. R., Pillai, S., Moellering, R. C. a Eliopoulos, G. M. (2012) 'Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus* ', *PLoS ONE*, 7(1), p. e28316. doi: 10.1371/journal.pone.0028316.

- Pillai, A., Ueno, S., Zhang, H., Lee, J. M. a Kato, Y. (2005) 'Cecropin P1 and novel nematode cecropins: A bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*', *Biochemical Journal*, 390(1), pp. 207–214. doi: 10.1042/BJ20050218.
- Plotkin, P., Patel, K., Uminski, A. a Marzella, N. (2011) 'Telavancin (Vibativ), a new option for the treatment of gram-positive infections', *P and T*, 36(3), pp. 127–138.
- Pränting, M., Lööv, C., Burman, R., Göransson, U. a Andersson, D. I. (2010) 'The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against gram-negative bacteria', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), pp. 1964–1971. doi: 10.1093/jac/dkq220.
- Qian, S., Wang, C., Yang, L. a Huang, H. W. (2008) 'Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis', *Biophysical Journal*, 94(9), pp. 3512–3522. doi: 10.1529/biophysj.107.126474.
- Rejman, D. (2012) 'Lipophosphonoxins, method of their preparation and use', *EP Patent 0879946A2*, 1(19), pp. 1–31. Available at: <http://info.sipcc.net/files/patent/fulltext/EP/200605/EP2099194A1/EP2099194A1.PDF>.
- Rejman, D., Pohl, R. a Nyc, O. (2011) 'Lipophosphonoxins: New modular molecular structures with significant antibacterial properties', *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(22), pp. 7884–7898.
- Rottem, S. a Markowitz, O. (1979) 'Carotenoids act as reinforcers of the *Acholeplasma laidlawii* lipid bilayer', *Journal of Bacteriology*, 140(3), pp. 944–948. doi: 10.1128/JB.140.3.944-948.1979.
- Sáenz, J. P., Sezgin, E., Schwille, P. a Simons, K. (2012) 'Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), pp. 14236–14240. doi: 10.1073/pnas.1212141109.
- Sáenz, J. P., Grosser, D., Bradley, A. S., Lagny, T. J., Lavrynenko, O., Broda, M. a Simons, K. (2015) 'Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), pp. 11971–11976. doi: 10.1073/pnas.1515607112.
- Saravolatz, L. D., Pawlak, J., Johnson, L., Bonilla, H., Saravolatz, L. D., Fakih, M. G., Fugelli, A. a Olsen, W. M. (2012) 'In vitro activities of LTX-109, a synthetic antimicrobial peptide, against methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, daptomycin-nonsusceptible, and linezolid-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), pp. 4478–4482. doi: 10.1128/AAC.00194-12.
- Savage, P. B., Li, C., Taotafa, U., Ding, B. a Guan, Q. (2002) 'Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics', *FEMS Microbiology Letters*, 217(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/S0378-1097(02)01036-4.
- Schatz, A., Bugle, E. a Waksman, S. A. (1944) 'Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 55(1), pp. 66–69. doi: 10.1097/01.blo.0000175887.98112.fe.
- Schwab, U., Gilligan, P., Jaynes, J. a Henke, D. (1999) 'In vitro activities of designed antimicrobial peptides against multidrug-resistant cystic fibrosis pathogens', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), pp. 1435–1440. doi: 10.1128/aac.43.6.1435.
- Scott, R. W. a Tew, G. N. (2016) 'Mimics of host defense proteins; strategies for translation to therapeutic applications', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(5), pp. 576–589. doi: 10.2174/15680266166661607.
- Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E. a Marrink, S. J. (2008) 'Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(10), pp. 2308–2317. doi: 10.1016/j.bbmem.2008.06.007.
- Seydlova, G., Pohl, R., Ehn, M., Panova, N., Sudzinova, P. a Rejman, D. (2017) 'Lipophosphonoxins II: Design, synthesis, and properties of novel broad spectrum antibacterial agents', *Journal of Medicinal Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00355.
- Shin, K., Maeda, H., Fujiwara, T. a Akutsu, H. (1995) 'Molecular miscibility of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in binary mixed bilayers with acidic phospholipids studied by 2H- and 31P-

- NMR', *BBA - Biomembranes*, 1238(1), pp. 42–48. doi: 10.1016/0005-2736(95)00111-F.
- Simons, K. a Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature*, 387(6633), pp. 569–572. doi: 10.1038/42408.
- Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C. H. a Hoffman, J. F. (1974) 'Mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles', *Biochemistry*, 13(16), pp. 3315–3330. doi: 10.1021/bi00713a022.
- Singer, S. J. a Nicolson, G. L. (1972) 'The fluid mosaic model of the structure of cell membranes', *Science*, 175(4023), pp. 720–731. doi: 10.1126/science.1229322
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. a Boman, H. G. (1981) 'Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity', *Nature*, 292(11), pp. 246–248. doi: 10.1038/292246a0.
- Suk, D. H., Rejman, D., Dykstra, C. C., Pohl, R., Pankiewicz, K. W. a Patterson, S. E. (2007) 'Phosphonoxins: Rational design and discovery of a potent nucleotide anti-Giardia agent', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(10), pp. 2811–2816. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.02.063.
- Sullivan, R., Santarpia, P., Lavender, S., Gittins, E., Liu, Z., Anderson, M. H., He, J., Shi, W. a Eckert, R. (2011) 'Clinical efficacy of a specifically targeted antimicrobial peptide mouth rinse: Targeted elimination of *Streptococcus mutans* and prevention of demineralization', *Caries Research*, 45(5), pp. 415–428. doi: 10.1159/000330510.
- Sundaram, B. M., Gopalakrishnan, C., Subramanian, S., Shankaranarayanan, D. a Kameswaran, L. (1983) 'Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*', *Planta Medica*, 48(1), pp. 59–60. doi: 10.1055/s-2007-969882.
- Svangård, E., Burman, R., Gunasekera, S., Lövborg, H., Gullbo, J. a Göransson, U. (2007) 'Mechanism of action of cytotoxic cyclotides: Cycloviolacin O2 disrupts lipid membranes', *Journal of Natural Products*, 70(4), pp. 643–647. doi: 10.1021/np070007v.
- Swain, J., Khoury, M. El, Kempf, J., Briée, F., Van Der Smissen, P., Décout, J. L. a Mingeot-Leclercq, M. P. (2018) 'Effect of cardiolipin on the antimicrobial activity of a new amphiphilic aminoglycoside derivative on *Pseudomonas aeruginosa*', *PLoS ONE*, 13(8), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0201752.
- Torrent, M., Navarro, S., Moussaoui, M., Nogués, M. V. a Boix, E. (2008) 'Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans', *Biochemistry*, 47(11), pp. 3544–3555. doi: 10.1021/bi702065b.
- Tsai, A., Uemura, S., Johansson, M., Puglisi, E. V., Marshall, R. A., Aitken, C. E., Korlach, J., Ehrenberg, M. a Puglisi, J. D. (2013) 'The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation', *Cell Reports*, 3(2), pp. 497–508. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.027.
- Vanounou, S., Parola, A. H. a Fishov, I. (2003) 'Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into different domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids', *Molecular Microbiology*, 49(4), pp. 1067–1079. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03614.x.
- Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S. a Matsubashi, M. (1987) 'Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 169(11), pp. 4935–4940. doi: 10.1128/jb.169.11.4935-4940.1987.
- Wang, C. K., Wacklin, H. P. a Craik, D. J. (2012) 'Cyclotides insert into lipid bilayers to form membrane pores and destabilize the membrane through hydrophobic and phosphoethanolamine-specific interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), pp. 43884–43898. doi: 10.1074/jbc.M112.421198.
- Weisblum, B. a Davies, J. (1968) 'Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome.', *Bacteriological reviews*, 32(4), pp. 493–528. doi: 10.1128/mmbr.32.4\_pt\_2.493-528.1968.
- Wenzel, M., Senges, C. H. R., Zhang, J., Suleman, S., Nguyen, M., Kumar, P., Chiriac, A. I., Stepanek, J. J., Raatschen, N., May, C., Krämer, U., Sahl, H. G., Straus, S. K. a Bandow, J. E. (2015) 'Antimicrobial

peptides from the aurein family form ion-selective pores in *Bacillus subtilis*', *ChemBioChem*, 16(7), pp. 1101–1108. doi: 10.1002/cbic.201500020.

Wimley, W. C. (2010) 'Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model', *ACS Chemical Biology*, 5(10), pp. 905–917. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Yeaman, M. R. a Yount, N. Y. (2003) 'Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance', *Pharmacological reviews*, 55(1), pp. 27–55. doi: 10.1124/pr.55.1.2.27.

Yendapally, R., Hurdle, J. G., Carson, E. I., Lee, R. B. a Lee, R. E. (2008) 'N-substituted 3-acetyltetramic acid derivatives as antibacterial agents', *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(5), pp. 1487–1491. doi: 10.1021/jm701356q.

Zasloff, M. (1987) 'Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), pp. 5449–5453. doi: 10.1073/pnas.84.15.5449.

Zasloff, M. (2002) 'Antimicrobial peptides of multicellular organisms', *Nature*, 415(6870), pp. 389–395. doi: 10.1038/415389a.

Zhang, H. M., Li, Z., Tsudome, M., Ito, S., Takami, H. a Horikoshi, K. (2005) 'An alkali-inducible flotillin-like protein from *Bacillus halodurans* C-125', *Protein Journal*, 24(2), pp. 125–131. doi: 10.1007/s10930-004-1519-3.

Zhao, W., Róg, T., Gurtovenko, A. A., Vattulainen, I. a Karttunen, M. (2008) 'Role of phosphatidylglycerols in the stability of bacterial membranes', *Biochimie*, 90(6), pp. 930–938. doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.025.

\* označení sekundární citace

#### **Internetové zdroje**

Avanti Lipids, *Phase transition temperatures for glycerophospholipids* [online], Dostupné zde: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps> [cit. 14.7.2020]

QuB program, Dostupný zde: <https://qub.maelics.com/>