

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Noemi Havlová

Úloha cytoplasmatické membrány a buněčné stěny v rezistenci bakterií ke kationtovým
antimikrobiálním peptidům

Role of cytoplasmic membrane and cell wall in bacterial resistance to cationic antimicrobial
peptides

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Gabriela Seydlová, Ph.D.

Praha, 2016

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, 18. 08. 2016

Noemi Havlová

Poděkování:

Velice bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Gabriele Seydlové, PhD. za trpělivost, pomoc, cenné rady a připomínky při sepisování této práce. Dále děkuji všem ostatním, za podporu, rady a připomínky.

Abstrakt:

Kationtové antimikrobiální peptidy jsou přirozenou součástí obranných systémů všech organismů. Vlastnosti těchto peptidů, jako je jejich struktura, náboj, amfipaticita a hydrofobicita, z nich činí slibné látky s potenciálem využití nejen v léčbě bakteriálních infekcí, ale i proti některým virům, parazitům, houbám a nádorovým buňkám. Jedním z možných zásahových míst těchto látek je cytoplazmatická membrána bakterií, kterou permeabilizují. Tento mechanismus účinku má několikero výhod. Antimikrobiální peptidy působí selektivně na membránu bakterií a nedochází tedy k poškození eukaryotických hostitelských buněk. Další výhodou je omezená možnost vzniku rezistentních kmenů bakterií, jelikož účinky antimikrobiálních peptidů nastupují okamžitě. Ovšem i přesto byly objeveny kmeny necitlivé na již používané antimikrobiální peptidy. Pomocí modifikace zásahového místa v bakteriální buňce jsou bakterie schopny zabránit účinkům antimikrobiálních peptidů. Je-li cílovým místem cytoplazmatická membrána, bakterie může pozměnit elektrostatické nebo strukturní vlastnosti membrány a antimikrobiální peptidy ztrácejí svou schopnost interakce a následné permeabilizace membrány. Porozumění mechanismům účinku antimikrobiálních peptidů a mechanismům, pomocí kterých se u bakterií rezistence proti nim vytvářejí, pomůže při výzkumu a hledání nových účinných antimikrobiálních látek.

Klíčová slova: kationtové antimikrobiální peptidy, rezistence, cytoplazmatická membrána, mechanismus účinku, fosfolipidy

Abstract:

Cationic antimicrobial peptides are part of the innate immune system of all organisms. Their properties such as structure, charge, amphipathicity and hydrophobicity make them promising agents with the potential for use not only in treatment of bacterial infections but also against some viruses, parasites, fungi and cancer cells. One of their possible targets is the cytoplasmic membrane, which they permeabilize. This mode of action has several advantages. The important feature of antimicrobial peptides is their selectivity for bacterial membranes, which makes them harmless to eukaryotic host cells. Another advantage is that the development of bacterial resistance against these peptides is more difficult since the action of antimicrobial peptides is rapid. Nevertheless, there appeared some bacterial strains that are insensitive to already used antimicrobial peptides. By using target modification resistant bacteria are able to prevent the bactericidal effects of the antimicrobial peptides. At the level of cytoplasmic membrane bacteria can alter its electrostatic or structural properties of membrane lipids and thus the antimicrobial peptides lose their ability to interact with the membrane and permeabilize it. Understanding the mode of action of antimicrobial peptides and mechanisms by which bacteria can develop resistance against the antimicrobial peptides can help in searching for new effective antimicrobial agents.

Key words: cationic antimicrobial peptides, resistance, cytoplasmic membrane, membrane permeabilization, mode of action, phospholipids

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Biologické membrány	9
2.1	Cytoplazmatická membrána bakterií	9
2.2	Fosfolipidy membránové dvouvrstvy	10
3	Charakteristika kationtových antimikrobiálních peptidů působících na cytoplazmatickou membránu.....	11
3.1	Struktura a konformace antimikrobiálních peptidů	11
3.2	Náboj kationtových antimikrobiálních peptidů a jeho vliv na aktivitu peptidu	13
3.3	Amfipaticita antimikrobiálních peptidů.....	14
3.4	Hydrofobicita	15
4	Mechanismy bakteriální lyze.....	15
4.1	Počáteční interakce AMP s bakteriální buňkou.....	16
4.1.1	Působení AMP na vnější membránu Gram negativních bakterií.....	17
4.1.2	Působení AMP na peptidoglykanovou vrstvu	17
4.2	Modely mechanismů účinků AMP na úrovni cytoplazmatické membrány	18
4.2.1	Model póru o struktuře barelu	19
4.2.2	Toroidní model	20
4.2.3	Kobercový model.....	21
4.2.4	Změna fyzikálních vlastností cytoplazmatické membrány	22
5	Mechanismy vytváření rezistence ke kationtovým antimikrobiálním peptidům	24
5.1	Elektrostatické a strukturní modifikace povrchu bakteriální buňky	25
5.1.1	Modifikace bakteriální buněčné stěny u Gram pozitivních bakterií	25
5.1.2	Modifikace fosfolipidů cytoplazmatické membrány u Gram pozitivních bakterií	26
5.1.3	Modifikace bakteriální buněčné stěny u Gram negativních bakterií.....	29
5.1.4	Modifikace na úrovni membránových fosfolipidů u Gram negativních bakterií.....	31
5.1.5	Změna fluidity cytoplazmatické membrány.....	32
6	Závěr	34
7	Literatura	35

Seznam použitých zkratek:

AMP	Antimikrobiální peptidy	Antimicrobial peptides
Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinóza	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
CL	Kardiolipin	Cardiolipin
CM	Cytoplazmatická membrána	Cytoplasmic membrane
LPS	Lipopolysacharidy	Lipopolysaccharides
LTA	Lipoteichoová kyselina	Lipoteichoic acid
MIC	Minimální inhibiční koncentrace	Minimal inhibitory concentration
MRSA	Kmen bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k meticilinu	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PC	Fosfatidylcholin	Phosphatidylcholine
PE	Fosfatidyletanolamin	Phosphatidylethanolamine
PG	Fosfatidylglycerol	Phosphatidylglycerol
PS	Fosfatidylserin	Phosphatidylserine
SM	Sfingomyelin	Sphingomyelin
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie	Transmission electron microscopy
VRE	Kmen bakterie <i>Enterococcus faecalis</i> rezistentní k vankomycinu	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecalis</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace	World Health Organisation
WTA	Teichoová kyselina	Wall teichoic acid
WT	Divoký kmen	Wild type

1 Úvod

K léčbě bakteriálních infekcí byla a stále jsou používána především antibiotika. Avšak díky jejich nadměrnému užívání v humánní i veterinární medicíně se zvyšuje výskyt rezistentních kmenů bakterií a konvenční antibiotika přestávají být účinná. Tento podnět vyvolal stav nouze, kdy se neustále hledají zdroje nových látek s antimikrobiálními účinky, které by mohly sloužit jako alternativa ke stávajícím antibiotikům. Během posledních deseti let se podstatně zintenzivnil zájem o tzv. antimikrobiální peptidy, které se zdají být vhodnými látkami s požadovanými účinky.

Antimikrobiální peptidy jsou látky vyskytující se přirozeně v obranných systémech prakticky všech organismů od bakterií a virů, přes rostliny, obojživelníky, ryby a hmyz až po savce. Tyto látky nejsou pouze baktericidní, ale také vykazují aktivitu proti houbám, virům, parazitům nebo některým nádorovým buňkám. Antimikrobiální účinky těchto peptidů jsou směřovány nejen na intracelulární, ale i na extracelulární cíle v bakteriální buňce. Pokud mají být antimikrobiální peptidy používány jako léčiva proti bakteriálním infekcím, musí být jejich účinek selektivní a na bakterie musejí působit tak, aby bylo pro ně obtížné si vytvořit rezistenci a účinek pro bakterie byl fatální.

V mé bakalářské práci se věnuji skupině kationtových antimikrobiálních peptidů, které interagují a účinkují na cytoplazmatickou membránu bakterií a způsobují její poškození, které je pro bakteriální buňku letální. Cytoplazmatická membrána, jakožto jediná membrána bakteriální buňky, na které probíhají všechny membránově vázané funkce, je pro bakteriální buňku esenciální. Proto mají tyto antimikrobiální peptidy veliký potenciál v budoucím využití proti patogenním bakteriím. Pro bakterii je těžké si vytvořit rezistenci na úrovni cytoplazmatické membrány díky její unikátnosti a specifčnosti. Pokud je membrána poškozena, dochází k úniku důležitých iontů a jiných molekul a dochází k lyzi buňky. Tyto antimikrobiální peptidy nemusí také překonávat cytoplazmatickou membránu, aby dosáhly svých intracelulárních cílů, ale působí hned na povrchu bakterie. Další významnou vlastností této skupiny antimikrobiálních peptidů je, že díky rozdílnému složení fosfolipidů u bakterií a eukaryotických buněk, dokáží antimikrobiální peptidy selektivně účinkovat na patogenní bakterie a nezpůsobovat poškození hostitelských buněk.

Cílem této bakalářské práce je tedy shrnout informace o kationtových antimikrobiálních peptidech, o jejich vlastnostech, které ovlivňují jejich mechanismus účinku, a mechanismech rezistence k antimikrobiálním peptidům na úrovni změny zásahového místa.

2 Biologické membrány

Biologické membrány obecně se skládají z dvouvrstvy fosfolipidů. Tyto složky jsou amfipatické, neboli složené jak z hydrofobní části, prezentované dvěma (popřípadě jedním) uhlovodíkovými řetězci, tak z hydrofilní hlavičky.

2.1 Cytoplazmatická membrána bakterií

Cytoplazmatická membrána jako dvouvrstva fosfolipidů se liší u jednotlivých druhů bakterií zastoupením tříd fosfolipidů, a to jak na úrovni rozdílného složení polárních hlaviček, tak mastných kyselin fosfolipidů. Cytoplazmatická membrána slouží jako bariéra, udržuje stabilitu vnitřního prostředí buňky a díky přítomnosti membránových proteinů vykazuje další funkce, jako je přenos látek, příjem signálů z vnějšího prostředí, enzymatickou aktivitu a další. U Gram pozitivních bakterií je ve vnějším listu cytoplazmatické membrány navíc zakotvena lipoteichoová kyselina (LTA), která následovně prostupuje peptidoglykanovou vrstvou. Mezi společné rysy membrán bakterií patří, že jsou tvořeny glycerofosfolipidy a celkový výsledný náboj na membráně je negativní (Epanand & Epanand 2009b).

V cytoplazmatické membráně bakterií nejsou fosfolipidy v celé ploše rozmístěny rovnoměrně, ale tvoří domény podobně jako je tomu u membrán savčích buněk, kde se vyskytují domény bohaté na cholesterol a sfingomyelin. Bakterie namísto cholesterolu obsahují jiné strukturně podobné látky - hopanoidy nebo karotenoidy, které v membráně plní obdobnou funkci jako cholesterol. Tyto látky regulují membránovou fluiditu a přispívají k její rigiditě (Saenz et al. 2012).

U modelových bakterií *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* v oblasti pólů buňky a budoucí dělicí přepážky se vyskytují domény bohaté na kardiolipin (CL), které soustřeďují funkce, jako je kontrola morfologických změn při dělení buňky (Mileykovskaya & Dowhan 2000; Kawai et al. 2004), nebo organizace proteinů zodpovědných za osmotickou regulaci (Tsatskis et al. 2005). Dále zprostředkovávají vazbu proteinů potřebných k dělení buňky MinD a FtsA k membráně. Dalším příkladem jsou domény bohaté na fosfatidyletanolamin (PE) vyskytující se v místě dělicí přepážky. Tvorba dělicího FtsZ prstence je závislá na přítomnosti PE (Mileykovskaya et al. 1998).

Lipidové rafty eukaryotických buněk obsahují také specifické proteiny, jako například flotillin. Tento membránově vázaný chaperon shromažďuje jiné proteiny do lipidových raftů, aby byly aktivní a mohly dimerizovat či dále interagovat (Bickel et al. 1997). Flotilliny jsou

tedy důležitou součástí struktury a organizace lipidových raftů. U bakterií byly také nalezeny homology flotillinu se stejnou funkcí jako v eukaryotické buňce. V bakterii *Bacillus subtilis* vznikají lipidové rafty, které jsou závislé na proteinech FloT (role v signálních drahách a sporulaci) (Donovan & Bramkamp 2009) a FloA a na syntéze skvalenu (López & Kolter 2010). Lipidové rafty mají mnoho funkcí jako je tvorba proteinových komplexů pro komunikaci nebo dimerizaci membránových kináz (KinC), sekreci proteinů, proteolýzu nebo buněčné dělení. Zdá se, že jsou tyto funkce lépe realizovatelné, pokud jsou potřebné proteiny fyzicky umístěné ve specifické části membrány označované jako funkční mikrodomény (Bramkamp & Lopez 2015).

2.2 Fosfolipidy membránové dvouvrstvy

Rozdíly v zastoupení fosfolipidů u různých druhů bakterií jsou veliké a mimo jiné ovlivňují účinnost antimikrobiálních látek na bakterie. Zastoupení jednotlivých tříd fosfolipidů se liší jak na úrovni rozdílného složení polárních hlaviček, tak mastných kyselin fosfolipidů.

PE se vyskytuje ve větší míře v cytoplazmatické membráně Gram negativních bakterií než u Gram pozitivních bakterií (Lohner et al. 2001). U Gram pozitivních bakterií jsou hlavními lipidy cytoplazmatické membrány fosfatidylglycerol (PG) a CL. V cytoplazmatické membráně Gram negativních bakterií, jsou nejvíce zastoupeny fosfolipidy PE a PG. Zastoupení fosfolipidů u eukaryotických buněk je odlišné od bakterií a antimikrobiální peptidy (AMP) tak mohou působit selektivně pouze na bakteriální buňky. U erytrocytů, jakožto zástupce savčích buněk, se vnitřní list cytoplazmatické membrány skládá převážně z PE a ve vnějším listu je hlavním lipidem sfingomyelin (SM) a fosfatidylcholin (PC) (Epanand et al. 2006).

PC a PE obecně mají celkový výsledný náboj nulový. Naproti tomu PG, CL a fosfatidylserin (PS) nesou záporný náboj. Buněčné membrány většiny patogenních bakterií obsahují převážně PG, CL, PS a tím pádem mají vysokou hustotu negativního náboje. Fosfolipidy savčích erytrocytů, jako jsou PE, PC a SM, mají výsledný náboj neutrální (Dowhan 1997). Díky tomuto rozdílu může antimikrobiální peptid nesoucí pozitivní náboj být přitahován membránou bakterií a zároveň nepoškodovat membránu erytrocytů.

Odlišné zastoupení mastných kyselin je další rozdíl mezi Gram negativními a Gram pozitivními bakteriemi. Například u zástupce Gram negativních bakterií *Escherichia coli* je sn-1 pozice glycerolové kostry fosfolipidu obsazena převážně nasycenou mastnou kyselinou

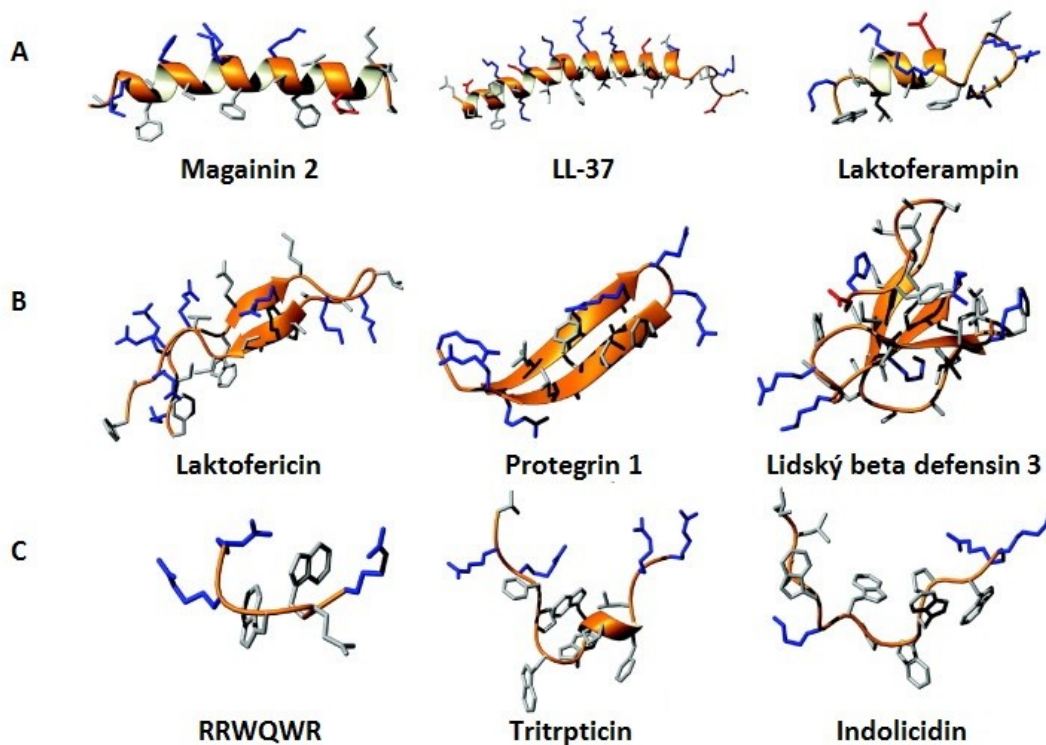
palmitovou (C16:0) a pozice sn-2 kyselinou palmitoolejovou (C16:1) nebo kyselinou olejovou (C18:1) (White et al. 1972). Naproti tomu fosfolipidy u zástupce Gram pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* obsahují majoritně anteiso- a iso- větvené mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků v řetězci – větvenou kyselinu pentadekanovou (C15:0) a margarovou (C17:0) (White & Frerman 1968).

3 Charakteristika kationtových antimikrobiálních peptidů působících na cytoplazmatickou membránu

Biologická aktivita antimikrobiálních peptidů je ovlivňována jak jejich strukturními, tak fyzikálními parametry. Mezi relevantní parametry patří velikost, sekvence, náboj, helicitá, celková hydrofobicita, amfipaticita a polární úhel (poměr polárních a nepolárních oblastí na AMP zaujímající strukturu alfa helixu) antimikrobiální látky. Modifikací jednoho z těchto parametrů může dojít k významným změnám ostatních parametrů a tím i k celkové aktivitě peptidů (Giangaspero et al. 2001).

3.1 Struktura a konformace antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy se většinou skládají z 12-50 aminokyselin, kde okolo 50 % z nich je hydrofobních a 2-9 aminokyselin jsou pozitivně nabitě lysiny nebo argininy, které udělují peptidu celkový kladný náboj. Některé AMP se skládají z L i D isomerů aminokyselin, které se liší svou prostorovou orientací (Bessalle et al. 1990). Sekvence antimikrobiálních peptidů jsou velmi různé a objevuje se zde absence určité homologie. Nicméně při jejich snaze interagovat s membránou zaujímají podobné konformační amfipatické struktury s oddělenými pozitivně nabitými hydrofilními a hydrofobními doménami. Příkladem struktur AMP mohou být amfipatické alfa helixy, beta skládané listy nebo jen vláknité peptidy nezaujímající běžnou konformaci (Obr. 1). Tyto struktury bývají nejčastějšími u AMP vyskytujících se v přírodě (Hancock 2001).

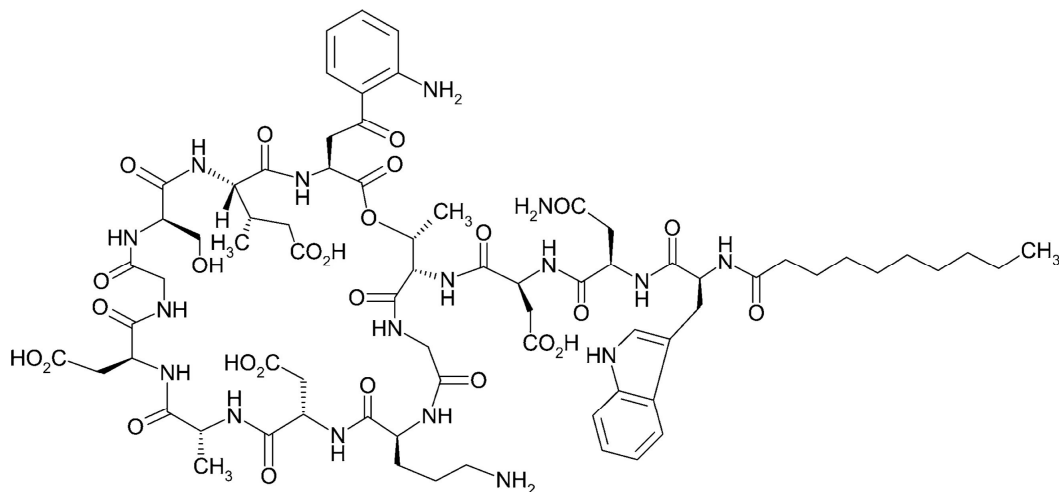


Obrázek 1: Nejběžnější struktury antimikrobiálních peptidů

Na obrázku jsou znázorněny 3D struktury AMP: (A) alfa helixy - např. mangainin 2, LL-37 ze skupiny cathelicidinů a laktoferampin, (B) beta skládané listy - např. laktofericin, protegrin 1, lidský beta defensin 3 a (C) vláknité peptidy, tj. peptidy obohacené o určitou aminokyselinu - např. RRWQWR (úsek laktofericinu zodpovědný za jeho antibakteriální aktivitu), tritrpticin (patřící do skupiny cathelicidinů), indolicidin (upraveno z Nguyen et al. 2011).

Vzhledem k velikému počtu peptidů s různou velikostí byla analýza sekvence odlišných antimikrobiálních peptidů v práci Tossi et al. (2000) prováděna pouze na prvních 20 aminokyselinách. Doména na N-konci byla označena jako esenciální a zároveň dostatečná pro antimikrobiální aktivitu AMP. Na první pozici od N-konce se nejčastěji objevoval glycin. Poskytuje rezistenci k aminopeptidázám a je vhodnou aminokyselinou zakončující N-konec v alfa helixu. Amidace na C-koncové doméně, která se také často vyskytovala u většiny peptidů i přes různý původ, působí proti karboxypeptidázám. Glycin byl také určen s vyšší četností na pozici 14. Lysin byl často nalezen na více pozicích, nejčastěji však na pozici 8. Na helixu bylo pozorováno rozložení hydrofobních aminokyselinových zbytků na jedné straně a polárních na straně druhé. Hydrofobní část obsahovala velké alifatické aminokyseliny, které se vyskytovaly na N-konci. Zde se také zřídka objevily aminokyseliny aromatické, které mají roli při interakci s membránou. Na C-konci se vyskytovaly menší aminokyseliny stabilizující helix, jako je např. alanin. V polární části peptidu je často zastoupen lysin a také serin, který se vyskytoval na pozici 4 (Tossi et al. 2000). Jako příklad primární struktury AMP můžeme

uvést jeden z nejpoužívanějších AMP proti rezistentním kmenům Gram pozitivních bakterií daptomycin (Obr. 2) (Tally & DeBruin 2000).



Obrázek 2: Struktura daptomycinu

Na obrázku je znázorněna chemická struktura lipopeptidu daptomycinu. Daptomycin se skládá ze 13 aminokyselin tvořících cyklický peptid a z postranního řetězce kyseliny dekanové. Producentem tohoto AMP je bakterie *Streptomyces roseosporus* (upraveno z Baltz et al. 2005).

3.2 Náboj kationtových antimikrobiálních peptidů a jeho vliv na aktivitu peptidu

Většina antimikrobiálních peptidů nese pozitivní náboj, který zpravidla dosahuje hodnot +2 až +9. Tato vlastnost je zásadní pro počáteční interakci AMP a záporně nabitých fosfolipidů v bakteriální membráně. V určitém rozsahu platí, že se zvyšujícím se kladným nábojem peptidu se zvyšuje i jeho antimikrobiální aktivita. Ovšem pokud se tato hranice, která se pro různé AMP liší, překročí, dochází ke zvýšení hemolytické aktivity a ke snížení antibakteriálního účinku. Příkladem může být syntetický peptid P19 o sekvenci 19 aminokyselin. P19 nesoucí náboj +5 nebo +6 účinkoval nejlépe na široké spektrum bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) s nízkou minimální inhibiční koncentrací (MIC). Snížením náboje na +3 aktivita tohoto peptidu klesla a při náboji +1 byl zcela neaktivní. A naopak i při zvýšení na hodnotu +8 se jeho aktivita proti bakteriím snížila, ale bylo zaznamenáno zvýšení účinků proti kvasinkám (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) (Giangaspero et al. 2001).

Studie zabývající se analogy antimikrobiálního peptidu z *Xenopus laevis* mangaininu II došla k závěru, že při náboji pohybujícím se od +3 do +7 a při zachování vhodných

hydrofobních vlastností postupné zvyšování kladného náboje na peptidu zlepšuje antimikrobiální účinky jak proti Gram pozitivním, tak Gram negativním bakteriím. Selektivní aktivita peptidu, za kterou považujeme nízký hemolytický a vysoký antimikrobiální účinek, také stoupala se zvyšujícím se nábojem. Pokud se u mangaininu překročila hranice kladného náboje +5, tak se zvýšila hemolytická aktivita a tím se i ztratila žádoucí selektivita (Dathe et al. 2001).

3.3 Amfipaticita antimikrobiálních peptidů

Amfipaticita je definována jako poměr hydrofilních a hydrofobních zbytků aminokyselin nebo domén v rámci peptidu. Většina antimikrobiálních peptidů má amfipatický charakter, který hraje zásadní roli při interakci s cílovou cytoplazmatickou membránou. Díky pozitivnímu náboji na polární straně se mohou navázat přes elektrostatické interakce s negativně nabitými hlavičkami fosfolipidů membrány bakterií. Opakující se hydrofobní části v AMP (Eisenberg et al. 1984) jsou optimální pro interakci s cytoplazmatickou membránou a následnou inserci do membrány přes hydrofobní interakce, což vede k narušení stability membrány, která tak ztrácí své bariérové vlastnosti (Hancock & Chapple 1999). Jelikož je cytoplazmatická membrána eukaryot více elektroneutrální, nejsou k ní AMP tolik přitahovány jako k membráně bakterií, jejichž náboj na povrchu membrány je záporně nabitý (viz kapitola 2.2) (Jiang et al. 2008).

Počet pozitivně nabitých zbytků aminokyselin a celkový náboj peptidu ovlivňují jak antimikrobiální, tak hemolytickou aktivitu peptidu. Se zvyšujícím se nábojem a tím i amfipaticitou se zvyšuje antimikrobiální aktivita peptidu. Antimikrobiální peptid V13K je alfa helikální peptid o 26 aminokyselinách obsahující lysin v centrální (pozice 13) části peptidu (Chen et al. 2005). Jeho celkový náboj je +7 s poměrem hydrofilních a hydrofobních zbytků aminokyselin 4,92. Při zvýšení jeho náboje na +8, +9, +10 se jeho amfipaticita zvyšovala na hodnoty 5,11, 5,18, 5,26 a zároveň se tedy zvyšovala antimikrobiální aktivita peptidu (Jiang et al. 2008).

Avšak lineární závislost se neuplatňuje na aktivitu hemolytickou. Při snížení hodnoty náboje pod +4, a tedy i amfipaticity, V13K nevykazoval žádné antimikrobiální ani hemolytické účinky. Zvyšováním amfipaticity a náboje až do +8 se jeho antimikrobiální aktivita postupně zvyšovala, ale zároveň si udržel nízkou hemolytickou aktivitu. Dalším zvýšením náboje na +9 a +10 se antimikrobiální aktivita také zvýšila, nicméně s ní i aktivita hemolytická (Jiang et al. 2008). AMP mají tedy určitou hranici optimálního pozitivního

náboje a amfipaticity, která když se překročí, pak jejich vlastnosti již nejsou vhodné díky zvýšené nežádoucí hemolytické aktivitě.

3.4 Hydrofobicita

Hydrofobicita peptidu vyjadřuje procentuální zastoupení hydrofobních aminokyselinových zbytků nebo i zbytků mastných kyselin v peptidu. Pro většinu AMP platí, že obsahují okolo 40-60 % hydrofobních zbytků. Tato vlastnost je důležitá a potřebná pro počáteční interakci AMP s membránou a pro rozsah inserce AMP do membrány. Vysoké procento hydrofobicity však na druhou stranu snižuje selektivní účinek AMP vůči bakteriálním buňkám (Wieprecht et al. 1997) a zvyšuje tedy nežádoucí aktivitu AMP proti buňkám eukaryotním (Chou et al. 2008).

Peptid vykazující vysokou hydrofobicitu má tendenci ve vodném prostředí oligomerizovat. Shluky peptidu potřebují vyšší energii na rozdělení, interakci a správnou inserci do membrány než monomery peptidu, což snižuje jejich schopnost interakce s membránou a celkovou antimikrobiální aktivitu. Příklad závislosti antimikrobiálních účinků na hydrofobicitě proteinu můžeme popsat opět na peptidu V13K. Jeho hydrofobicita byla zvyšována substitucí alaninu za leucin na nepolární části peptidu, nebo byla naopak snižována opačnou substitucí. Zvýšením hydrofobicity do optimální hodnoty lišící se u každého AMP antimikrobiální aktivita stoupá. Pokud se hydrofobicita zvýší nebo sníží za optimum daného peptidu, dojde ke snížení antimikrobiálních účinků (Chen et al. 2007) podobně jako u náboje peptidu.

4 Mechanizmy bakteriální lyze

Cílem AMP je zneškodnit patogenní bakteriální buňku tak, aby nemohla negativně působit na svého hostitele. Důležitou součástí tohoto cíle je však i požadavek, aby AMP působily selektivně a nedošlo k poškození hostitelské buňky a v neposlední řadě nedocházelo k vytvoření rezistence bakterií. AMP mají zásahová místa po celé bakteriální buňce. Mohou působit na cytoplazmatickou membránu, vnější membránu (Lehrer et al. 1989), peptidoglykanovou vrstvu (Hsu et al. 2004), ale i na cíle uvnitř buňky jako je syntéza DNA, RNA, enzymy a další (Boman et al. 1993; Patrzykat et al. 2002).

V současnosti se výzkum zaměřuje především na kationtové AMP, které působí na cytoplazmatickou membránu (CM). Je to z toho důvodu, že CM je pro bakterie esenciální a její narušení dokáže způsobit lyzi buňky – baktericidní účinek AMP je tedy z pravidla velmi rychlý. CM má poměrně jednoznačné a komplexní uspořádání, a proto je pro bakterii těžké si jednoduše vytvořit rezistenci na úrovni změny zásahového místa – složení cytoplazmatické membrány (Daugelavičius et al. 2000). Další výhodou AMP působících na cytoplazmatickou membránu je i skutečnost, že nemusejí tyto peptidy překonávat CM jakožto bariéru, která zabraňuje dosažení cílů uvnitř buňky (Nikaido 1994).

Hlavním mechanismem účinku AMP, jejichž zásahovým místem je cytoplazmatická membrána bakterií, je permeabilizace cytoplazmatické membrány a následná lyze bakteriální buňky nebo dokonce rozrušení membrány detergentním mechanismem. Narušení cytoplazmatické membrány způsobí ztrátu jejích bariérových vlastností. Dojde k úniku iontů, biopolymerů, nerovnováze elektrochemického gradientu, depolarizaci membrány a tím i k celkové destabilizaci buňky a následné buněčné smrti.

AMP mohou působit i na vnější membránu Gram negativních bakterií, kterou mohou například permeabilizovat nebo působit na její LPS, který se vyskytuje v jejím vnějším listu. Pokud antimikrobiální látky interagují s LPS ve vnější membráně, mohou způsobit inhibici syntézy LPS nebo blokaci průchodu látek z vnějšího prostředí do periplazmy a následně do buňky. Následky pro bakterii jsou poškozující nebo i smrtelné (Epanand et al. 2015). Jiné AMP působí na peptidoglykanovou vrstvu bakterií i cytoplazmatickou membránu zároveň - například AMP nisin (Wiedemann et al. 2001).

4.1 Počáteční interakce AMP s bakteriální buňkou

Počáteční interakce mezi AMP a povrchem bakteriální buňky začíná tím, že kladný náboj AMP je elektrostaticky přitahován záporně nabitým povrchem buněčné stěny (Jiang et al. 2008). Mezi tyto negativně nabitě části patří LPS u Gram negativních bakterií, teichoová a teichuronová kyselina u Gram pozitivních bakterií a peptidoglykanová vrstva. Pokud se AMP dostane do blízkosti cytoplazmatické membrány, dojde k elektrostatické interakci s negativně nabitými hlavičkami fosfolipidů. Počáteční interakce není většinou zprostředkována pomocí specifického receptoru. V AMP se vyskytují L i D isomery aminokyselin, které se liší prostorovou orientací a přesto se váží na povrch bakterie stejně účinně. Vazba AMP tedy nemůže být zprostředkována jedním receptorem, na který by se AMP navázaly (Merrifield et al. 1995; Wade et al. 1990). Nicméně jsou i takové AMP, které k interakci s membránou

receptor využívají. Příkladem je AMP nisin, který se specificky váže na lipid II, který je součástí syntézy peptidoglykanové vrstvy (Hsu et al. 2004). Dalším příkladem může být AMP microcin J25, jehož receptorem je transportér železa ve vnější membráně FhuA (Destoumieux-Garzón et al. 2005).

4.1.1 Působení AMP na vnější membránu Gram negativních bakterií

Mnoho AMP nemůže působit na Gram negativní bakterie právě díky přítomnosti vnější membrány, která slouží jako bariéra, přes kterou se nemohou AMP dostat ke svému zásahovému místu. Existuje však několik způsobů, jak AMP mohou vnější membránu překonat, interagovat s ní nebo na ni přímo působit a způsobit tak bakteriální lyzi.

Díky porinům, které se vyskytují ve vnější membráně, je membrána propustná pro některé molekuly, kterými mohou být i některé AMP (Pages et al. 2008). Pokud je vnější membrána narušena nebo ztratí svou kompaktní strukturu tím, že Mg^{2+} nebo Ca^{2+} ionty interagující s LPS jsou nahrazeny kladně nabitými AMP, pak se zvýší propustnost vnější membrány i pro větší molekuly (tzv. mechanismus „self-promoted uptake“) (Hancock 1997). Tím se mohou AMP dostat k cytoplazmatické membráně, kde realizují své antimikrobiální účinky (Lam et al. 2014).

AMP mohou zvýšit propustnost vnější membrány také tím, že inhibují aktivitu enzymu PagP. Tento enzym váže zbytek kyseliny palmitové na lipid A při syntéze LPS a tím činí vnější membránu méně propustnou a zabraňuje tak navázání AMP. Proto pokud AMP tento enzym inhibují, mohou vnější membránu překonat (Bishop et al. 2000).

Nicméně AMP mohou naopak způsobovat i snížení propustnosti vnější membrány. Tím, že se navážou na LPS na povrchu buňky, dojde k oboustranné blokaci transportu látek dovnitř i ven z buňky, které by za podmínek bez přítomnosti AMP přes membránu volně procházely (například ionty). To může vést k poškození až smrti bakteriální buňky (Epanand et al. 2009a).

4.1.2 Působení AMP na peptidoglykanovou vrstvu

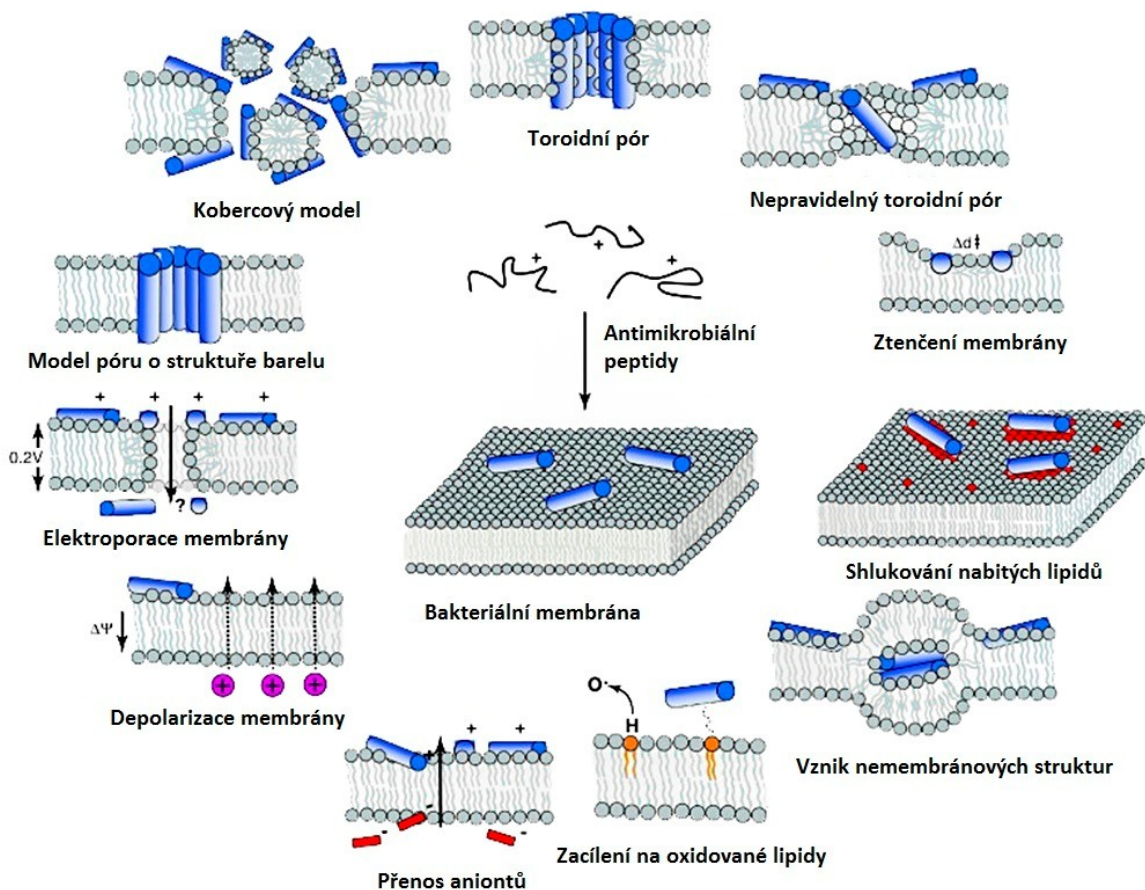
Jelikož je peptidoglykanová vrstva propustná pro AMP (Demchick & Koch 1996), tak neslouží jako bariéra, kterou AMP musejí narušit. Peptidoglykan AMP nezadržuje a ty tak volně projdou k cytoplazmatické membráně, kde poté účinkují. Nicméně existují AMP, které za své cílové místo mají právě peptidoglykanovou vrstvu (Hsu et al. 2004).

AMP, které působí na peptidoglykanovou vrstvu, se zaměřují na blokaci syntézy peptidoglykanu. Například Fosfomycin inhibuje enzym UDP-N-acetylglukosamin enolpyruvyl transferázu (MurA), který se účastní syntézy peptidoglykanu (Skarzynski et al. 1996). Dalším příkladem je nisin, který se váže na prekurzor syntézy peptidoglykanu lipid II. Jeho účinky zahrnují jak inhibici syntézy peptidoglykanu, tak pórotvornou aktivitu v cytoplazmatické membráně (Hsu et al. 2004). Lipid II slouží jako receptor pro nisin a také pomáhá při jeho pórotvorné aktivitě (Brötz et al. 1998). Při syntéze peptidoglykanu je lipid II udržován v cytoplazmatické membráně a právě tam ho nisin rozpozná a dokáže tak tuto membránu narušit (Wiedemann et al. 2001).

Povrchové struktury peptidoglykanové vrstvy, jako jsou LTA, velmi silně interagují s AMP. Je to díky zápornému náboji na fosfátu, který se objevuje v každé repetitivní podjednotce LTA. Při interakci s LTA mohou být AMP vychytány a nejsou tak již schopny dosáhnout svého cíle. Na druhou stranu však některé AMP (mellitin, LL-37) mohou vykazovat své baktericidní účinky na cytoplazmatickou membránu právě díky počáteční interakci s LTA, která slouží jako první krok k zachycení AMP a jejich následným antimikrobiálním účinkům (Bucki & Janmey 2006).

4.2 Modely mechanismů účinků AMP na úrovni cytoplazmatické membrány

Po primární elektrostatické interakci AMP s hlavičkami lipidů v cytoplazmatické membráně musí AMP v membráně dosáhnout tzv. prahové koncentrace. Prahová koncentrace je minimální koncentrace AMP potřebná k tomu, aby se projevily jejich antimikrobiální účinky (Huang 2000). Bylo navrženo několik modelů mechanismů, jak se AMP insertují do membrány a následně zde účinkují (Obr. 3). AMP vytvářejí například v membráně pór o struktuře barelu, pór toroidní či nepravidelný toroidní nebo jsou membránu schopny rozrušit až detergentním způsobem (kobercový model). Dále jsou schopny způsobit ztenčení membrány nebo vyvolat vznik agregátů negativně nabitých fosfolipidů, se kterými interagují, a tak způsobit destabilizaci membrány. Přítomnost AMP může také způsobit vznik nemembránových struktur ve dvouvrstvě fosfolipidů, depolarizaci nebo elektroporaci membrány. Některé AMP jsou rovněž např. schopny interakce se specifickými lipidy membrány. Tyto účinky AMP a zásadní narušení cytoplazmatické membrány následně vede k lyzi bakteriální buňky. V této kapitole se budu zabývat pouze několika vybranými modely mechanismu účinků AMP, které byly doposud nejvíce popsány a často rozpoznávány při studiu AMP.



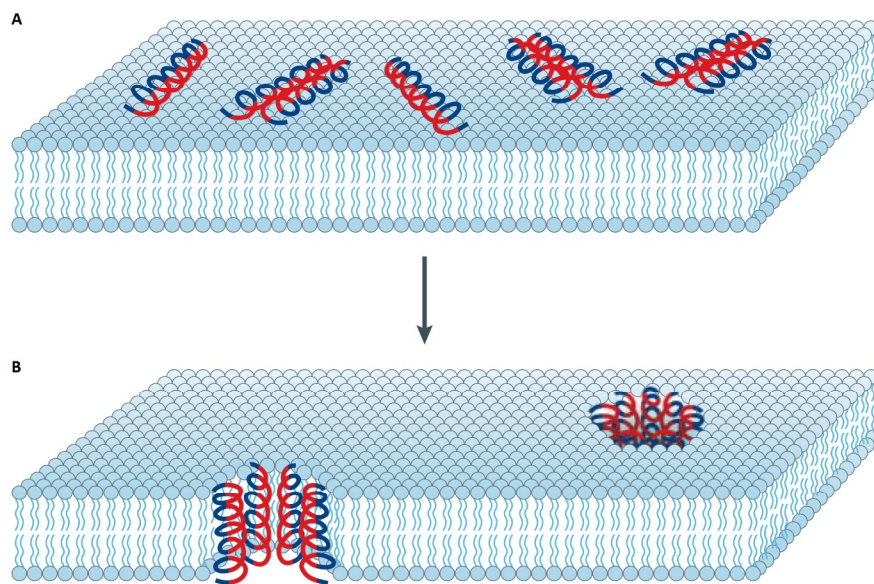
Obrázek 3: Modely mechanismu účinku AMP

Způsob inserce a následného porušení membrány pomocí AMP je možné mnoha způsoby. Na obrázku je znázorněno několik příkladů permeabilizace a desorganizace membrány indukované AMP (upraveno z Nguyen et al. 2011).

4.2.1 Model póru o struktuře barelu

Jako jeden z prvních modelů byl navržen model vzniku póru tvořený strukturou barelu (barrel-stave model), kdy se peptidy insertují do lipidové dvojvrstvy a vytvoří transmembránový pór o struktuře barelu (Obr. 4). Vnitřek póru tvoří polární část AMP a vnější část pak nepolární části, které interagují hydrofobními přitažlivými silami s acylovými řetězci lipidů membrány (Hancock & Chapple 1999). Prvním krokem vzniku póru je interakce mezi monomery AMP a hlavičkami fosfolipidů. Během navázání dojde ke konformační změně AMP, která způsobí rozestoupení hlaviček lipidů od sebe, čímž se vytvoří místo pro inserci dalších peptidů. Hydrofobní část peptidu se insertuje do lipidové dvouvrstvy a čím hlouběji se insertuje, tím se zvětšuje povrch interagujících hydrofobních částí peptidu s membránou. Inzerce je usnadněna díky interakci kladně nabitých aminokyselin AMP, které se vyskytují v blízkosti negativně nabitých fosfolipidových hlaviček (Yeaman & Yount

2003). Jakmile je dosaženo prahové koncentrace AMP, peptidy se začnou shlukovat a insertovat hlouběji do membrány do jejího vnitřního listu. Navázáním dalších monomerů může dojít k dalšímu rozšíření a stabilizaci póru (Teixeira et al. 2012). Tento model je tvořen více hydrofobními AMP, jako je alameticin, jehož producentem je houba *Trichoderma viride* (Vedovato & Rispoli 2007), zervamicin produkovaný houbou *Emericellopsis salmosynnemata* (Shenkarev et al. 2002) nebo pardaxin izolován ze slizových žláz ryby *Pardachirus marmoratus* (Porcelli et al. 2004).



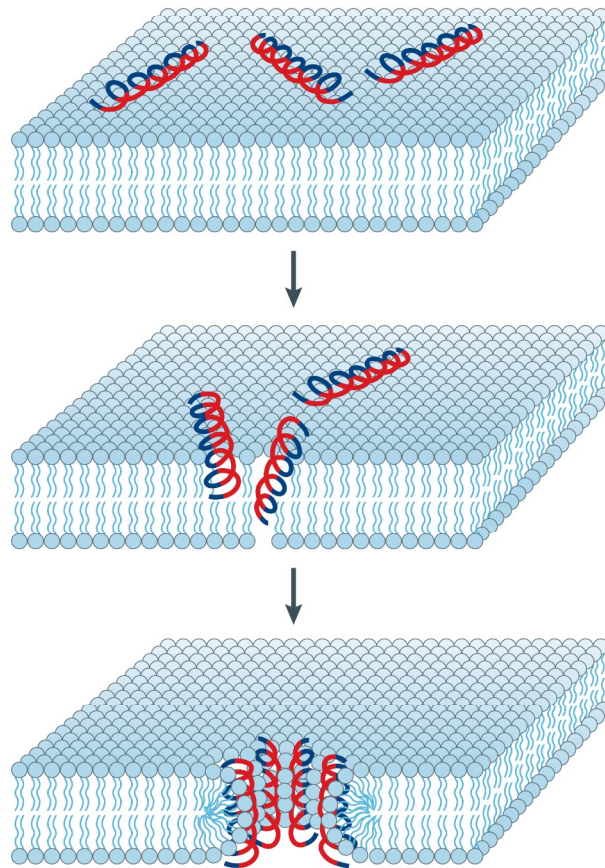
Obrázek 4: Model póru tvořeným strukturou barelu

Obrázek schematicky znázorňuje mechanismus tvorby póru se strukturou barelu. Je zde znázorněna lipidová dvojvrstva (světle modré fosfolipidy) s AMP (červeno-modré helixy), které interagují rovnoběžně s membránou (A) až do dosažení prahové koncentrace. Poté dojde k inserci AMP do lipidové dvouvrstvy (B), kde tvoří pór. Vnitřek póru tvoří hydrofilní části AMP (červená část) a vnější část hydrofobní skupiny (modrá část) (upraveno z Brogden 2005).

4.2.2 Toroidní model

Toroidní model popisuje mechanismus, kdy se AMP insertují do cytoplazmatické membrány a způsobí ohnutí a propojení vnějšího listu membrány s vnitřním. Tohoto modelu využívají alfa helikální peptidy (například magainin, PGLa), které jsou na začátku orientovány paralelně k povrchu membrány (Hara et al. 2001a). Díky přítomnosti hydrofobních zbytků na navázaném AMP dojde k posunu hlaviček fosfolipidů, k narušení hydrofobní oblasti a vzniku pozitivního zakřivení membrány (Hara et al. 2001b). To vede k destabilizaci membrány a možné další interakci s dalšími monomery AMP. Po dosažení prahové koncentrace dojde k orientaci peptidu kolmo k membráně a k vytvoření póru.

Ohnutím dojde k propojení vnějšího a vnitřního listu membrány a pór se tedy skládá jak z AMP, tak fosfátových hlaviček lipidů (Obr. 5). Tohoto modelu tvorby póru využívají AMP magaininy, které mají původ v kůži žab druhu *Xenopus laevis*, nebo protegriny (Yang et al. 2001) izolovány z prasečích leukocytů (Shafer et al. 1998).



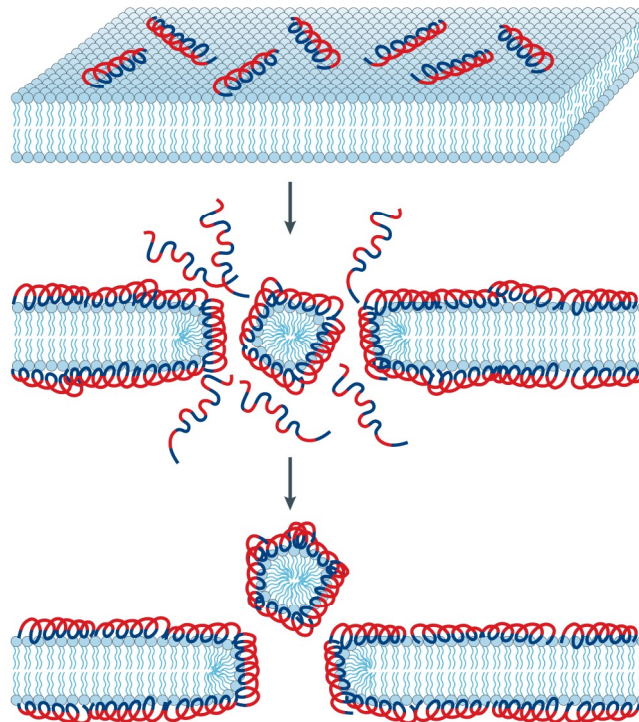
Obrázek 5: Mechanismus vzniku toroidního póru

Obrázek znázorňuje účinek AMP (červeno-modré helixy) na lipidovou dvouvrstvu (světle modré fosfolipidy), kde AMP vytvářejí toroidní pór. Po elektrostatické interakci AMP s lipidovou dvouvrstvou dojde k inserci AMP, ohnutí listů membrány a vytvoření toroidního póru. Vnitřek póru je tvořen hlavičkami fosfolipidů a hydrofilními zbytky (červená barva) AMP (upraveno z Brogden 2005).

4.2.3 Kobercový model

AMP se vážou na povrch cytoplazmatické membrány a pokrývají jí jako koberec. Po dosažení prahové koncentrace začnou AMP membránu narušovat. Na rozdíl od modelu póru se strukturou barelu, v kobercovém modelu nemusí AMP pronikat do hydrofobního core lipidové dvouvrstvy, ale kladně nabitě aminokyseliny peptidu interagují pouze s fosfolipidy, a to opět díky elektrostatické interakci mezi kladně nabitými AMP a záporně nabitými hlavičkami fosfolipidů. AMP začnou formovat přechodné díry a vzniká místo pro interakci dalších peptidů, dokud se nerozruší membrána detergentním způsobem případně i za tvorby

směsných micel AMP a lipidů membrány (Obr. 6) (Pouny et al. 1992). Tímto způsobem účinkuje např. AMP dermaseptin původem z žab druhu *Phylomedusa sauvagii* (Pouny et al. 1992; Galanth et al. 2009) nebo cecropin izolován z molů druhu *Hyalophora cecropia* (Gazit et al. 1995).

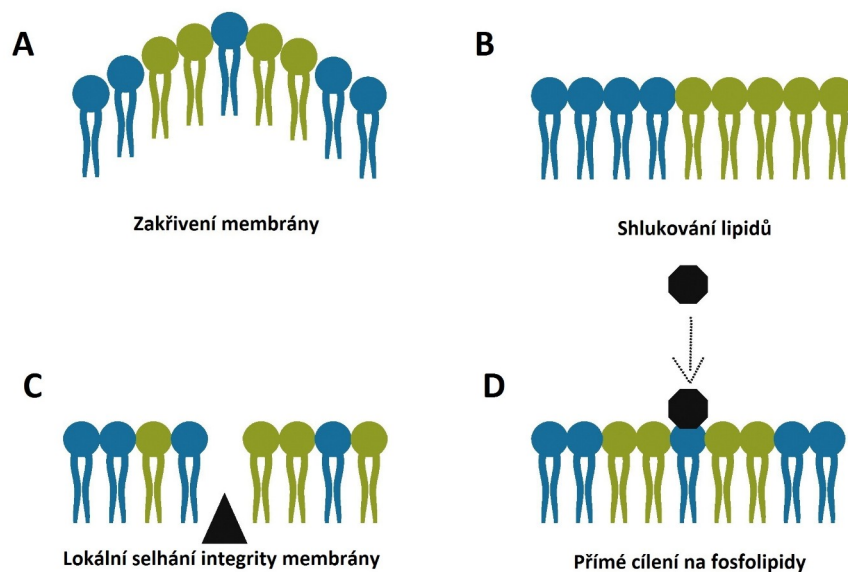


Obrázek 6: Mechanismus koberecového modelu

Obrázek znázorňuje koberecový model mechanismu účinku AMP (červeno-modré helixy). AMP nejdříve interagují s povrchem lipidové dvouvrstvy (světle modré fosfolipidy). Poté membránu naruší a pokryjí celý její povrch jako koberec. Hydrofobní část AMP je znázorněna modře, hydrofilní červeně. Vytvoří se póry v membráně za tvorby micel (upraveno z Brogden 2005).

4.2.4 Změna fyzikálních vlastností cytoplazmatické membrány

AMP nemusí způsobovat jen permeabilizaci cytoplazmatické membrány pomocí pórů, ale mohou také měnit fyzikální vlastnosti membrány (Scherer et al. 2015). Příkladem může být změna rozložení fosfolipidů nebo fosfolipidových domén v cytoplazmatické membráně, změna zakřivení membrány, změna fluidity, nebo přímá interakce AMP s jednotlivými fosfolipidy, což vede k modifikacím biofyzikálních vlastností membrány (Obr. 7). Tyto změny nemusí probíhat samostatně, ale mohou se vzájemně doplňovat a následně vést k lyzi buňky nebo vytvoření dočasných defektů, které umožní přístup AMP k intracelulárním cílům (Epanand et al. 2015).



Obrázek 7: Vliv AMP na fyzikální vlastnosti cytoplazmatické membrány

AMP mohou změnit fyzikální vlastnosti cytoplazmatické membrány jako je (A) její zakřivení, (B) způsobovat shlukování lipidů do domén obohacených o konkrétní fosfolipid, (C) lokální selhání integrity membrány (tzv. fenomén „packing defects“), kdy defekty vzniklé na hranici domén způsobí částečnou nebo celkovou ztrátu bariérové funkce membrány nebo (D) mohou přímo cílit na specifické fosfolipidy v membráně, což vede k dalším modifikacím a destabilizaci membrány (upraveno z Epanand et al. 2015).

Shlukování lipidů do domén udržuje fyziologicky nerovnoměrné rozdělení lipidů po membráně (viz kapitola 2.1). Pokud se působením AMP naruší domény s důležitými funkcemi pro bakterii nebo se lipidy přeskupí do domén nových, může dojít k destabilizaci membrány až k buněčné smrti. Nové domény vznikají díky shlukování záporně nabitých fosfolipidů s kladně nabitými AMP (Epanand et al. 2009b). Takovouto interakcí dojde k defektům způsobujícím zvýšenou permeabilitu membrány, což může vést až k narušení elektrochemického gradientu (díky průtoku protonů nebo i větších polárních molekul) až k vytvoření póru a následně k usmrcení bakterie (Epanand & Epanand 2009a).

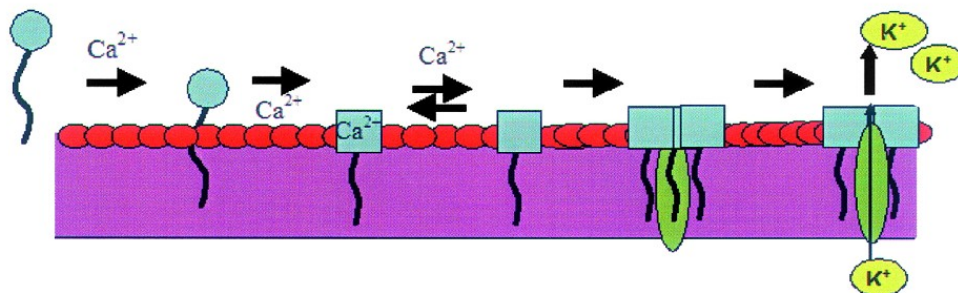
Mechanismus tvorby segregovaných mikrodomén, tzv. „lateral phase separation“, je další z několika mechanismů, jak AMP způsobují přechodné narušení membrány. Tento mechanismus je více účinný proti Gram negativním bakteriím než proti Gram pozitivním z důvodu zastoupení jak záporně nabitých lipidů, tak lipidů s výsledným neutrálním nábojem. Pokud je membrána složena ze záporně nabitých lipidů, ke kterým se vážou AMP, a lipidů s celkovým neutrálním nábojem, mohou některé AMP například oligomery acyllysiny (OAK) s mnohonásobným kladným nábojem interagovat se záporně nabitými fosfolipidy a vyvolat tak vznik dvou oddělených shluků fosfolipidů. Vytvoří se defekty fázového rozhraní mezi doménami záporně nabitých lipidů, které interagují s AMP, a lipidy s neutrálním výsledným nábojem. Toto nemusí být sice pro buňku smrtelné, ale buňka musí dokázat přemístit

fosfolipidy z jiné části membrány dříve, než se defekty stanou nevratné, na což nemá bakterie dostatek času (Epanand et al. 2008).

5 Mechanizmy vytváření rezistence ke kationtovým antimikrobiálním peptidům

Výskyt rezistentních kmenů bakterií na stávající antibiotika či AMP komplikuje léčbu bakteriálních onemocnění. Rezistence vznikají odlišnými způsoby a různou rychlostí i přesto, že se má za to, že vůči AMP je vznik rezistence méně pravděpodobný. Příkladem může být vznik rezistence na klinicky používaný AMP daptomycin (Obr. 2), který se preferenčně váže na cytoplazmatickou membránu Gram pozitivních bakterií do oblastí budoucího dělicího septa a membránu porušuje. Za přítomnosti Ca^{2+} iontů, které pomáhají při interakci s membránou, a PG v membráně, na kterém je jeho aktivita závislá (Hachmann et al. 2011), se insertuje do membrány a oligomerizuje. Způsobí depolarizaci membrány, únik draselných iontů (Obr. 8) a následnou buněčnou lyzi (Silverman et al. 2003). Kromě těchto účinků na membráně také aktivuje proteiny buněčného dělení DivIVA, což vede k chybnému určení pozice budoucího dělení buňky, dochází ke změně syntézy peptidoglykanu, a to způsobí defekty na buněčné stěně. Tyto účinky následně vedou k buněčné smrti (Pogliano et al. 2012).

Daptomycin byl uveden na trh léčiv roku 2003 jako léčebný přípravek na kožní a tkáňové infekce způsobené bakterií *Staphylococcus aureus*, kmenem rezistentním k meticilinu (MRSA). První zprávy o rezistenci se objevily již roku 2005, kdy u dvou pacientů nedošlo k úspěšné léčbě osteomyelitidy způsobené *S. aureus* MRSA (Hayden et al. 2005). Jelikož jsou bakterie schopny vytvořit rezistenci mnoha způsoby, je potřeba porozumět mechanismům rezistence a následně hledat antimikrobiální látky, na které je pro bakterii obtížné rezistenci vytvořit. Hlavním principem, jak bakterie chrání svou cytoplazmatickou membránu před účinkem AMP, je změna zásahového místa AMP, a to nejčastěji snížením celkového záporného náboje na povrchu buňky, využitím efluxních pump k odstraňování AMP ven z buňky nebo změnou fluidity CM. Následující kapitoly práce se věnují strukturním a biochemickým modifikacím cytoplazmatické membrány a buněčné stěny, které jsou zásahovým místem skupiny AMP, jimiž se bakalářská práce zabývá.



Obrázek 8: Mechanismus účinku AMP daptomycinu

Daptomycin účinkuje na cytoplazmatickou membránu Gram pozitivních bakterií za přítomnosti Ca^{2+} iontů, které pomáhají při interakci s membránou. Svým lipofilním ocáskem se insertuje do membrány a po oligomerizaci způsobí její depolarizaci a únik draselných iontů (Silverman et al. 2003) (upraveno z Steenbergen et al. 2005).

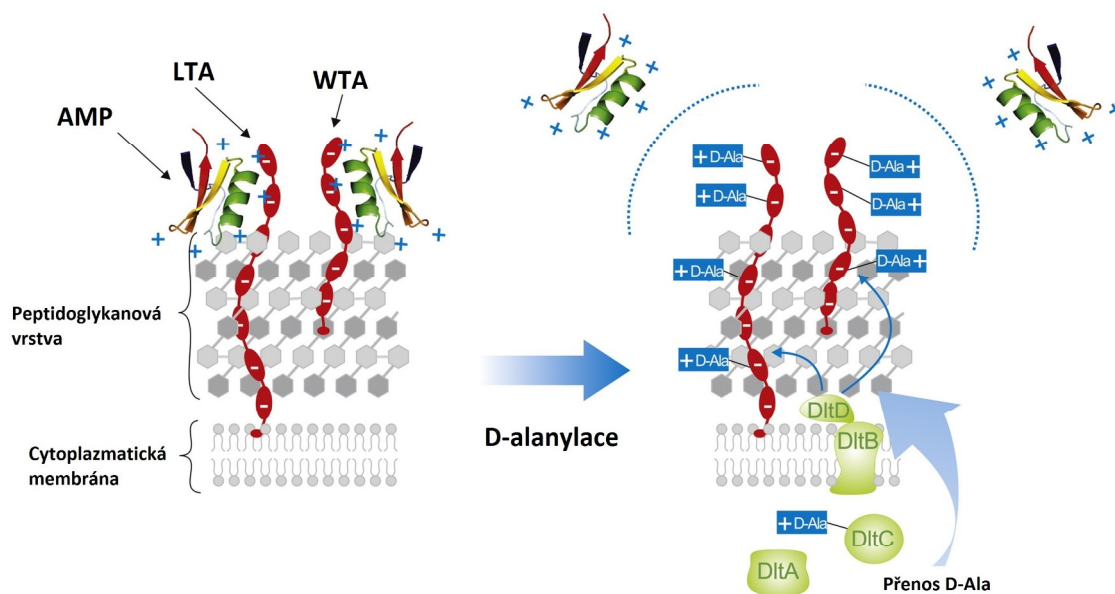
5.1 Elektrostatické a strukturní modifikace povrchu bakteriální buňky

Povrch bakteriální buňky je z pravidla více záporně nabitý, než povrch eukaryotické buňky (viz kapitola 2.2) a má tedy větší předpoklad k elektrostatické interakci s kladně nabitými AMP. Inkorporací molekul s kladným nábojem na místa počátečních interakcí (cytoplazmatická membrána a vnější membrána) jsou kladně nabitě AMP k bakteriální buňce přitahovány s menší elektrostatickou přitažlivou silou. Tím se zabrání počáteční interakci s AMP a jejich následným pórtvorným účinkům. Obecně Gram negativní bakterie bývají více rezistentní k antimikrobiálním peptidům než bakterie Gram pozitivní, a to díky přítomnosti vnější membrány sloužící jako bariéra, kterou antimikrobiální látky musí překonat, aby se dostaly k cytoplazmatické membráně (Epanand et al. 2015). Díky rozdílné stavbě buněčné stěny Gram negativních a Gram pozitivních bakterií se liší i povrchové struktury bakterie, kterou jsou při vzniku rezistence modifikovány. U Gram negativních bakterií dochází k modifikaci LPS. Naopak u Gram pozitivních bakterií je rezistence realizována modifikací LTA nebo PG v membráně. Tyto modifikace jsou popisovány v následujících kapitolách.

5.1.1 Modifikace bakteriální buněčné stěny u Gram pozitivních bakterií

Gram pozitivní bakterie dokáží zmenšit hustotu svého celkového negativního náboje na povrchu buňky prostřednictvím modifikace povrchových, záporně nabitých struktur (lipoteichoové a teichoové kyseliny) a tím zabránit elektrostatickým interakcím s kladně nabitými AMP. U rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* dochází k neutralizaci náboje na LTA v buněčné stěně pomocí inkorporace D-Ala do glycerolové podjednotky (Obr. 9).

Produkty *dltABCD* operonu esterifikují karboxylové skupiny D-Ala, kde zůstane volný pozitivně nabitý amin, čímž dojde ke snížení celkového záporného náboje molekuly LTA (Peschel et al. 1999). Při použití AMP LL37 se zjistilo, že D-alanylací dochází u rezistentních kmenů ke zvýšení pevnosti (dvacetinásobně) a hustoty bakteriální buněčné stěny. Buněčná stěna se neztlušťuje, jak tomu v případě rezistence ke kationtovým AMP také může být (Dorschner et al. 2006), ale vnitřní lamina buněčné stěny se jeví při pozorování v TEM (transmisní elektronová mikroskopie) jako více elektrondensní. Sníží se propustnost bakteriální stěny a AMP nejsou schopny překonat tuto bariéru, aby se dostaly k cytoplazmatické membráně (Saar-Dover et al. 2012).



Obrázek 9: D-alanylace lipoteichoové kyseliny

Na obrázku je znázorněn proces D-alanylace kyseliny lipoteichoové (LTA) a teichoové (WTA). Produkty *dltABCD* operonu navážou D-Ala na glycerové podjednotky LTA a WTA. Tím se sníží celkový záporný náboj těchto molekul a AMP nejsou elektrostaticky přitahovány k membráně (upraveno z Maria-Neto et al. 2015).

5.1.2 Modifikace fosfolipidů cytoplazmatické membrány u Gram pozitivních bakterií

Další možností, jak elektrostaticky odpuzovat kladně nabitě AMP od povrchu bakteriální buňky, je modifikace záporného náboje na cytoplazmatické membráně, a to konkrétně navázáním L-Lys nebo D-Ala k PG v cytoplazmatické membráně (Obr. 10). Tím se výsledný záporný náboj na membráně sníží a AMP jsou k membráně přitahovány slaběji. Výběr konkrétní aminokyseliny lysinu, alaninu nebo i argininu (Roy & Ibba 2009) závisí na druhu

probíhá pomocí enzymu Cls, která ze dvou molekul PG syntetizuje kardiolipin. Za stresových podmínek, jako jsou nepříznivé podmínky pro růst nebo přítomnost antimikrobiální látky, může podíl CL v membráně dosáhnout ze 2 % až 25 % (Short a White 1972). Pokud je tedy bodovou mutací v transmembránových doménách N-konce enzymu změněna aktivita Cls, může dojít k narušení funkce Cls a ke změně syntézy kardiolipinu. Peleg se svými kolegy spekuluje, že mutace v každém z genů *cls*, *pgsA*, *mprF*, vede ke snížení negativního náboje na membráně, což vede k neúčinnému navázání daptomycinu (Peleg et al. 2012).

AMP daptomycin se klinicky používá i k léčbě infekcí způsobených kmeny bakterie *Enterococcus faecalis* rezistentními k vankomycinu (označované jako VRE, vancomycin-resistant enterococci). Objevují se však VRE kmeny, které jsou k daptomycinu rezistentní. Mechanismus rezistence těchto kmenů spočívá v tom, že zabraňují vazbě daptomycinu do jeho cíle – dělicího septa. Dochází u nich k rozrušení a redistribuci kardiolipinových mikrodomén v membráně, které se vyskytují právě v místě dělicího septa. Děje se tak díky aminokyselinové delecii v transmembránovém proteinu LiaF, který se účastní regulačního systému odpovědi na působení antimikrobiální látky, kdy způsobuje přemístění fosfolipidů v membráně a udržuje tak homeostázi v buňce. Následující změny v enzimech glycerofosforyl diester fosfodiesteráza a kardiolipin syntáza vedou ke změně zastoupení fosfolipidů v membráně a dochází k podstatnému snížení podílu PG. Daptomycin se tedy nemůže navázat na membránu, oligomerizovat a účinně ji poškodit (Tran et al. 2013).

Absence určitého fosfolipidu v CM bakterie může způsobovat i přirozenou rezistenci bakterií k AMP, protože v membráně chybí zásahové místo pro AMP. Tímto mechanismem byla vysvětlena rezistence Gram negativní *Escherichia coli* k AMP daptomycinu oproti citlivým kmenům Gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Daptomycin vykazuje baktericidní aktivitu proti většině Gram pozitivních bakterií (Silverman et al. 2003). Jelikož se zastoupení záporně nabitých fosfolipidů v cytoplazmatické membráně liší u Gram pozitivních bakterií a Gram negativních bakterií (u *Escherichia coli* je menší než u Gram pozitivních bakterií), daptomycin je proti *Escherichia coli* neaktivní, protože nemůže interagovat a dále narušit CM Gram negativních bakterií. Zásahové místo pro účinek antibiotika daptomycinu tedy v *E. coli* chybí (Randall et al. 2013).

5.1.3 Modifikace bakteriální buněčné stěny u Gram negativních bakterií

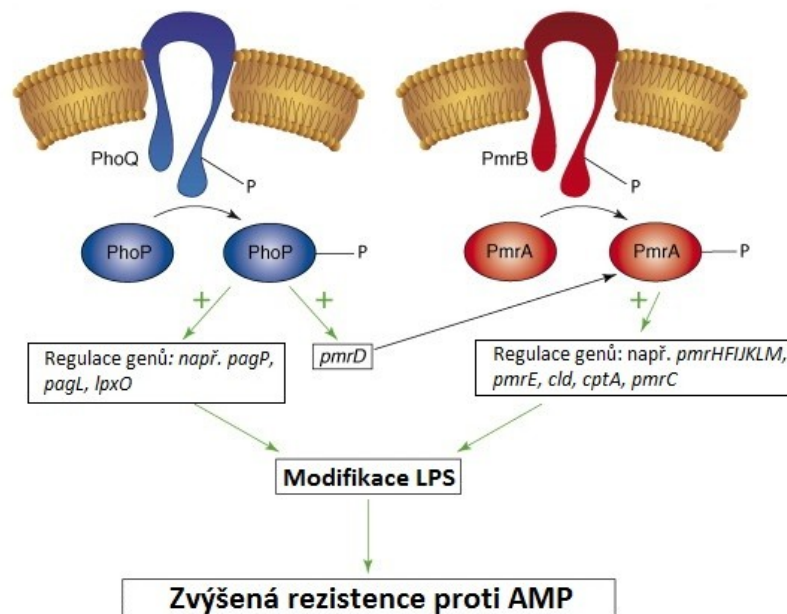
I u Gram negativních bakterií se uplatňuje mechanismus rezistence k AMP na základě zábrany elektrostatických interakcí, tj. snížením hustoty celkového negativního náboje na povrchu buňky. U bakterie *Salmonella* Typhimurium je rezistence vytvořena modifikací LPS, a to konkrétně fosfátových skupin na pozicích 1 a 4' lipidu A nebo sacharidového core, kde dochází k připojení PE nebo kladně nabitě arabinózy (Ara4N) (Zhou et al. 2001). Tyto modifikace jsou zprostředkovány PE transferázou PmrC, která modifikuje lipid A, a CptA modifikující sacharidové core heptózy I (Tamayo et al. 2005). Ovšem modifikace pomocí Ara4N jsou častější než modifikace pomocí PE, které nejsou ve vytvoření rezistence tak účinné (Lee et al. 2004). Nicméně existují příklady jiných bakterií, které na fosfátovou skupinu lipidu A vážou galaktosamin, jako je tomu u bakterie *Francisella novicida* (Llewellyn et al. 2012), aminokyselinu glycin, jako je tomu u bakterie *Vibrio cholerae* (Hankins et al. 2012), nebo PE v případě bakterie *Neisseria gonorrhoeae* prostřednictvím produktu genu lptA (Lewis et al. 2009).

Další způsob, jak u bakterií vzniká rezistence k AMP na úrovni bakteriální buněčné stěny, byl popsán u bakterie *Francisella tularensis*. Tato bakterie využívá k odstranění negativně nabitých zbytků za účelem snížení negativního náboje na povrchu buňky fosfatázu LpxF, která odstraňuje 4' fosfát na lipidu A (Wang et al. 2007).

Salmonella Typhimurium a ostatní Gram negativní bakterie využívají k vytvoření rezistence k AMP několik regulačních systémů. K regulaci změn na vnější membráně využívají dvoukomponentový regulační systém PhoPQ (Obr. 11), který se primárně účastní regulace exprese genů potřebných k virulenci (Miller et al. 1989). PhoQ je membránově vázaná kináza, která přijímá signály z okolního prostředí, jako je subletální koncentrace AMP (Bader et al. 2003), nízké pH nebo nízká koncentrace hořčíku (Mg^{2+}) (Vescovi et al. 1996). Při výskytu těchto signálů dojde k fosforylaci cytoplazmatické komponenty PhoP, která reguluje transkripci druhého regulačního systému PmrAB a ten poté aktivuje geny pmrHFIJKLM a pmrE (Gunn et al. 2000). Pomocí PhoP se aktivuje protein PmrD, který se váže na DNA vazebný protein PmrA a chrání ho před defosforylací a tím i jeho inaktivací (Mitrophanov et al. 2008). PmrB je další membránově vázaná kináza, která reaguje na vysokou koncentraci železa (Fe^{3+}) a nízké pH a poté aktivuje cytoplazmatický regulátor PmrA. Geny operonu pmrHFIJKLM a pmrE jsou zodpovědné za syntézu L-arabinózy a za polymyxinovou rezistenci v případě *Salmonella* Typhimurium nebo za rezistenci na AMP colistin u bakterie *Klebsiella pneumoniae* (Jayol et al. 2015). Při aktivaci

těchto genů vzniká rezistence přidáním Ara4N na lipid A, čímž se zvýší kladný náboj na LPS, a tím je AMP k buňce slaběji přitahován (Gunn 2001).

PhoPQ systém také aktivuje palmitoyltransferázu PagP vyskytující se ve vnější membráně (Bishop et al. 2000), která připojuje palmitát z fosfolipidu na fosfát lipidu A (Guo et al. 1998). Tím se zvýší nepropustnost vnější membrány a AMP nejsou schopny počáteční interakce s povrchem buňky (Murata et al. 2007).



Obrázek 11: Dvoukomponentový regulační systém PhoPQ

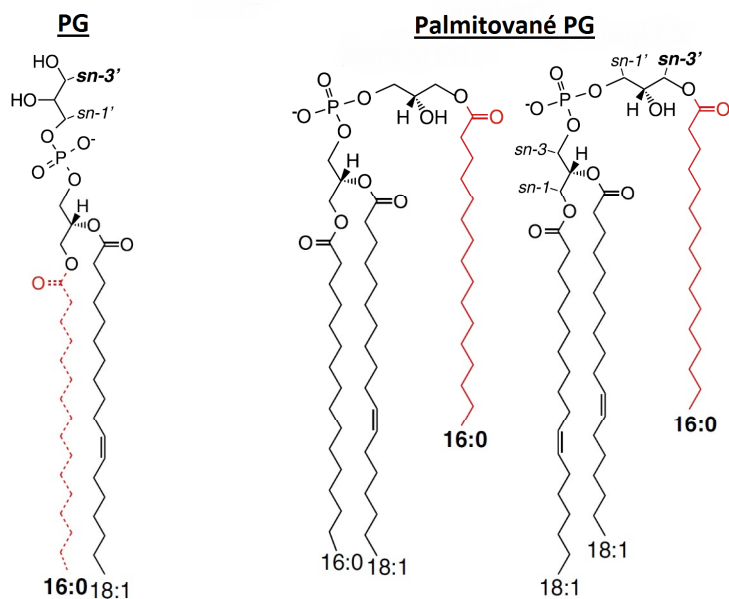
Na obrázku je znázorněna dráha dvoukomponentového regulačního systému PhoPQ. PhoQ je membránově vázaná kináza přijímající signály z okolního prostředí. Po přijetí signálu dojde k fosforylaci cytoplazmatické komponenty PhoP, která reguluje transkripci druhého regulačního systému PmrAB a dalších genů jako je *pagP*, *pagL*, *lpxO*. Pomocí PhoP se také aktivuje protein PmrD, který chrání PmrA před defosforylací a tím i jeho inaktivací. Ten poté aktivuje geny *pmrHFIJKLM*, *pmrE*, *cld*, *cptA*, *pmrC*. Aktivace těchto genů vede k modifikaci LPS a tím ke zvýšení rezistence bakterií proti AMP (upraveno z Gunn 2008).

Další možnost, jak modifikovat LPS a tím zajistit rezistenci bakterie k AMP, představuje modifikace délky O-antigenů. O-antigen tvoří součást bariéry vnějšího listu vnější membrány a svou přítomností dokáže odstínit negativní náboje na LPS (Matamouros & Miller 2015). *Salmonella Typhimurium* dokáže tvořit krátké LPS s O-antigenem složeným z 15 oligosacharidových podjednotek, dlouhé LPS s O-antigenem obsahujícím 16-35 oligosacharidových podjednotek nebo dokonce velmi dlouhé řetězce, které mají přes 100 oligosacharidů (Murray et al. 2003). Syntéza O-antigenů a kontrola jeho délky je regulována proteiny PbgE, Wzz a FepE, které jsou pod kontrolou regulačního systému PmrAB (Farizano

et al. 2012). Pokud u bakterie *Salmonella* Typhimurium chybí O-antigen, bakterie je citlivá k AMP (např. polymyxinu B). Čím delší řetězce O-antigenu bakterie produkuje, tím je více rezistentní (Hölzer et al. 2009). V přítomnosti velice dlouhých řetězců byla zaznamenána silná rezistence na polymyxin B (Pescaretti et al. 2011).

5.1.4 Modifikace na úrovni membránových fosfolipidů u Gram negativních bakterií

Modifikace fosfolipidů vnější membrány Gram negativních bakterií mohou také přispívat k rezistenci bakterií na AMP. Dvoukomponentový systém PhoPQ a PagP palmitoyltransferáza (viz kapitola 5.1.3) jsou využívány nejen pro modifikace LPS, ale také pro modifikace fosfolipidů membrány. Regulační systém PhoPQ aktivuje enzym PagP, který může přidat zbytek kyseliny palmitové z pozice sn-1 glycerofosfolipidů na pozici sn-3' fosfolipidů pomocí transesterifikace (Hwang et al. 2002). Přítomnost těchto modifikovaných PG, které mají navázanou další mastnou kyselinu v oblasti polární hlavičky fosfolipidu (Obr. 12), vede ke snížení polaritu vnějšího listu vnější membrány a zvýšení její hydrofobicity. To způsobuje nižší permeabilitu membrány, nižší fluiditu a zvýšení její bariérové funkce - stane se nepropustnou pro AMP, které poté nemohou dosáhnout svého cíle (Dalebroux & Miller 2014).



Obrázek 12: Struktura fosfatidylglycerolu (PG) a palmitovaných PG.

Obrázek znázorňuje strukturu fosfatidylglycerolu a modifikovaného palmitovaného fosfatidylglycerolu. Zbytek kyseliny palmitové je přenesen pomocí enzymu PagP z donorových glycerofosfolipidů z pozice *sn*-1 na skupinu *sn*-3' akceptorových fosfatidylglycerolů (upraveno z Dalebroux & Miller 2014).

Fosfolipidy cytoplazmatické membrány mohou být u rezistentních Gram negativních bakterií také modifikovány podobně, jako jsou u Gram pozitivních bakterií (viz. 5.1.2). Dochází ke snížení celkového záporného náboje na cytoplazmatické membráně a ke snížení elektrostatické přitažlivosti kladně nabitých AMP. Příkladem může být bakterie *Rhizobium tropici*, která využívá genu *lpiA* (homolog genu *mprF* u Gram pozitivních bakterií), jehož produkty přenáší lysin na PG (Sohlenkamp et al. 2007).

5.1.5 Změna fluidity cytoplazmatické membrány

Kromě modifikací, které způsobují změnu celkového náboje na povrchu buňky, může být interakce s AMP a tím i citlivost bakterie na jejich účinky snížena modifikací mastných kyselin nebo fosfátových hlaviček lipidů v cytoplazmatické membráně, což vede ke změně její fluidity. Při nárůstu zastoupení nenasycených mastných kyselin se fluidita membrány zvyšuje díky přítomnosti dvojných vazeb, které snižují interakce mezi mastnými kyselinami. Naopak za přítomnosti nasycených mastných kyselin je cytoplazmatická membrána kompaktnější a více rigidní, AMP není schopen inserce a bakterie se stává rezistentní (Kumariya et al. 2015).

Některé bakterie (rod *Salmonella*) jsou schopné snížit fluiditu vnější membrány tím, že zvýší její hydrofobicitu. Toho je dosaženo navázáním zbytků kyseliny palmitové na lipid A nebo PG. Membrána se stane méně fluidní díky zvýšenému počtu hydrofobních interakcí mezi dalšími přidanými mastnými kyselinami na lipidu A (Guo et al. 1998). Bakterie se tak ubrání interakci a následným účinkům AMP (kapitola 5.1.3 a 5.1.4).

Jiné bakterie, jako například kmen bakterie *Listeria monocytogenes*, rezistentní k antibiotiku nisinu, si vytvořily rezistenci k tomuto AMP tím, že mají odlišné zastoupení mastných kyselin a hlaviček fosfolipidů v cytoplazmatické membráně, než kmen senzitivní k nisinu (WT). Cytoplazmatické membrány rezistentních kmenů obsahovaly až o 10 % větší podíl nasycených mastných kyselin než WT, což vedlo ke snížení membránové fluidity (Mazzotta & Montville 1997). Také tento rezistentní kmen za růstu v přítomnosti nisinu obsahoval více PE a méně CL a PG než WT nebo rezistentní kmen za absence nisinu. Celkový podíl CL a PG v membráně byl u rezistentního kmene menší a tím pádem měla membrána menší celkový záporný náboj, což zamezilo elektrostatické interakci s AMP (Crandall & Montville 1998). Odlišné zastoupení mastných kyselin nebo rozdílné zastoupení fosfolipidů tedy vede k vytvoření rezistence díky snížení membránové fluidity a díky menšímu celkovému zápornému náboji na membráně, čímž se zabrání interakci a inserci AMP (Crandall & Montville 1998).

Některé kmeny bakterie *Staphylococcus aureus* si dokázaly vytvořit rezistenci na tPMP (thrombin-induced platelet microbicidal proteins), malý kationtový antimikrobiální peptid, produkovaný krevními destičkami (Mishra et al. 2011a). U těchto rezistentních kmenů převažuje zastoupení nenasycených mastných kyselin. Přítomnost dvojných vazeb v mastných kyselinách zvyšuje fluiditu cytoplazmatické membrány. To vede k rezistenci na AMP pravděpodobně tím, že není schopen interagovat s membránou (Bayer et al. 2000). Kmen bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní k melitinu, si vytvořil rezistenci i na daptomycin, tPMP a lidský neutrofilní peptid hNP-1. Fenotypově tyto rezistentní kmeny měly tlustší buněčnou stěnu a vyšší fluiditu membrány (Mishra et al. 2011a).

U některých Gram pozitivních bakterií (např. *Staphylococcus aureus*) se rezistence vytvoří nadprodukcí určitých látek (karotenoidů), které zvyšují rigiditu membrány. Staphyloxantin, karotenoid membrány *Staphylococcus aureus* (Mishra et al. 2011b), modifikuje cytoplazmatickou membránu tak, že stabilizuje mastné kyseliny membránových lipidů (Wisniewska & Subczynski 1998). To vede ke zvýšení membránové rigidity a ke snížení citlivosti na AMP.

6 Závěr

Výzkum zaměřující se na porozumění strukturních a funkčních vlastností AMP se během posledních let velice rozšířil. Jelikož jsou AMP součástí obranných systémů všech organismů, jejich nepřeberné množství je nadějí pro budoucí vývoj nových účinných léků. Porozumění jejich vlastnostem nám pomůže také při návrhu a přípravě syntetických látek, které ještě rozšíří možnosti využití AMP v léčbě. Další velkou výhodou AMP je jejich široké spektrum různých mechanismů účinků působících na širokou škálu bakterií a jiných patogenních organismů. AMP se nemusí používat pouze samostatně, ale mohou být využívány ke kombinované léčbě s jinými antimikrobiálními látkami. Právě díky schopnosti např. permeabilizace cytoplazmatické membrány, se mohou jiné účinné látky snadno dostat dovnitř buňky ke svým intracelulárním cílům. Rozdíl ve stavbě buněk bakterií a buněk navíc hostitelských zajišťuje, že AMP jsou skoro neškodné pro hostitelské buňky. Pokud pochopíme, jak AMP fungují, můžeme například zlepšit jejich selektivní účinek, aby se nežádoucí účinky proti hostitelským buňkám úplně eliminovaly.

Vznik rezistentních kmenů bakterií je sice přirozený, avšak nesprávným a nadměrným užíváním antibiotik se výskyt rezistence zrychluje. Některé rezistence jsou velmi efektivní a musí se dále hledat nové látky, které tyto rezistence překonají. Za velkou výhodu se považuje skutečnost, že na AMP působící na cytoplazmatickou membránu se rezistence nevytváří tak snadno jako na často používaná konvenční antibiotika. Modifikace cytoplazmatické membrány, jako příklad mechanismu vzniku rezistence není pro bakterii výhodnou změnou. Naopak změnit stavbu své membrány je pro ni komplikované z důvodu přítomnosti mnoha životně důležitých funkcí. I přesto se však rezistence i na tyto typy látek objevují.

Podle dat z roku 2012 dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) jsou stále infekční choroby hlavní příčinou úmrtí v rozvojových zemích a celkově čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na světě (www.who.int). Ve zprávě z roku 2014 dále WHO varuje, že svět spěje do tzv. postantibiotické éry, kdy se běžná infekční onemocnění mohou stát opět smrtelnými (www.who.int). Zkoumáním a porozuměním AMP a zlepšením některých jejich vlastností můžeme dosáhnout vývoje nových účinných látek pro boj s bakteriálními onemocněními, které překonají nárůst rezistentních bakteriálních kmenů.

7 Literatura

- Bader, M.W., Navarre, W.W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J.G., McClelland, M., Fang, F.C. & Miller, S.I., 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Molecular Microbiology*, 50(1), pp.219–230.
- Baltz, R.H., Miao, V. & Wrigley, S.K., 2005. Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Natural Product Reports*, 22(6), pp.717–741.
- Bayer, A.S., Prasad, R., Chandra, J., Koul, A., Smriti, M., Varma, A., Skurray, R.A., Firth, N., Brown, M.H., Koo, S.-P., Yeaman, M.R. & Koul, A., 2000. *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infection and Immunity*, 68(6), pp.3548–3553.
- Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P. & Lodish, H.F., 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), pp.13793–13802.
- Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I. & Raetz, C.R., 2000. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*, 19(19), pp.5071–5080.
- Boman, H.G., Agerberth, B. & Boman, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin-p1 and pr-39, 2 antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*, 61(7), pp.2978–2984.
- Bramkamp, M. & Lopez, D., 2015. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), pp.81–100.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), pp.238–250.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G. & Sahl, H.G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30(2), pp.317–327.
- Bucki, R. & Janmey, P.A., 2006. Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), pp.2932–2940.
- Crandall, A.D. & Montville, T.J., 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), pp.231–237.
- Dalebroux, Z.D. & Miller, S.I., 2014. Salmonellae PhoPQ regulation of the outer membrane to resist innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 17(1), pp.106–113.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M., 2001. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2-3), pp.146–150.
- Daugelavičius, R., Bakiene, E. & Bamford, D.H., 2000. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

- 44(11), pp.2969–2978.
- Demchick, P. & Koch, A.L., 1996. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(3), pp.768–773.
- Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S. & Boulanger, P., 2005. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: Role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *The Biochemical Journal*, 389(Pt 3), pp.869–76.
- Donovan, C. & Bramkamp, M., 2009. Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology*, 155(6), pp.1786–1799.
- Dorschner, R.A., Lopez-Garcia, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V. & Gallo, R.L., 2006. The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *The FASEB Journal*, 20(1), pp.35–42.
- Eisenberg, D., Weiss, R.M. & Terwilliger, T.C., 1984. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(1), pp.140–144.
- Eband, R.F., Sarig, H., Mor, A. & Eband, R.M., 2009a. Cell-wall interactions and the selective bacteriostatic activity of a miniature oligo-acyl-lysyl. *Biophysical Journal*, 97(8), pp.2250–2257.
- Eband, R.F., Schmitt, M. a, Gellman, S.H. & Eband, 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*, 1758(9), pp.1343–50.
- Eband, R.F., Wang, G., Berno, B. & Eband, R.M., 2009b. 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.
- Eband, R.M. & Eband, R.F., 2009a. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Molecular BioSystems*, 5(6), pp.580–587.
- Eband, R.M. & Eband, R.F., 2009b. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(1), pp.289–294.
- Eband, R.M., Rotem, S., Mor, A., Berno, B. & Eband, R.F., 2008. Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. *Journal of the American Chemical Society*, 130(43), pp.14346–14352.
- Eband, R.M., Walker, C., Eband, R.F. & Magarvey, N.A., 2015. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(5), pp.980–987.
- Ernst, C.M., Kuhn, S., Slavetinsky, C.J., Krismer, B., Heilbronner, S., Gekeler, C., Kraus, D., Wagner, S. & Peschel, A., 2015. The lipid-modifying multiple peptide resistance factor is an oligomer consisting of distinct interacting synthase and flippase subunits. *mBio*, 6(1), pp.1–9.
- Ernst, C.M., Staubitz, P., Mishra, N.N., Yang, S.J., Hornig, G., Kalbacher, H., Bayer, A.S., Kraus, D. & Peschel, A., 2009. The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathogens*, 5(11), e1000660.
- Farizano, J. V., Pescaretti, M.D.L.M., López, F.E., Hsu, F.F. & Delgado, M.A., 2012. The

- PmrAB system-inducing conditions control both lipid A remodeling and O-antigen length distribution, influencing the *Salmonella* typhimurium-host interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(46), pp.38778–38789.
- Galanth, C., Abbassi, F., Lequin, O., Ayala-Sanmartin, J., Ladram, A., Nicolas, P. & 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.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G. & Shai, Y., 1995. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34(36), pp.11479–11488.
- Giangaspero, A., Sandri, L. & Tossi, A., 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *European Journal of Biochemistry*, 268, pp.5589–5600.
- Gunn, J.S., 2001. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *Journal of Endotoxin Research*, 7, pp.57–62.
- Gunn, J.S., 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: Lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in Microbiology*, 16(6), pp.284–290.
- Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K. & Miller, S.I., 2000. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, 68(11), pp.6139–6146.
- Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M. & Miller, S.I., 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, 95(2), pp.189–198.
- Hachmann, A.B., Sevim, E., Gaballa, A., Popham, D.L., Antelmann, H. & Helmmann, J.D., 2011. Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp.4326–4337.
- Hancock, R.E.W., 2001. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases*, 1(3), pp.156–164.
- Hancock, R.E.W., 1997. Peptide antibiotics. *Lancet*, 349(9049), pp.418–422.
- Hancock, R.E.W. & Chapple, D.S., 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), pp.1317–1323.
- Hankins, J. V., Madsen, J.A., Giles, D.K., Brodbelt, J.S. & Trent, M.S., 2012. Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), pp.8722–7.
- Hara, T., Kodama, H., Kondo, M., Wakamatsu, K., Takeda, A., Tachi, T. & Matsuzaki, K., 2001b. Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. *Biopolymers*, 58, pp.437–446.
- Hara, T., Mitani, Y., Tanaka, K., Uematsu, N., Takakura, A., Tachi, T., Kodama, H., Kondo, M., Mori, H., Otaka, A., Nobutaka, F. & Matsuzaki, K., 2001a. Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: A cross-linking study. *Biochemistry*, 40(41), pp.12395–12399.

- Hayden, M.K., Rezai, K., Hayes, R. a, Lolans, K., Quinn, J.P. & Weinstein, R. a, 2005. Development of daptomycin resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), pp.5285–5287.
- Hölzer, S.U., Schlumberger, M.C., Jäckel, D. & Hensel, M., 2009. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 77(12), pp.5458–5470.
- Hsu, S.-T.D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A.G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M.J.J. & van Nuland, N.A.J., 2004. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(10), pp.963–7.
- Huang, H.W., 2000. Action of antimicrobial peptides : Two-state model. *Biochemistry*, 39(29), pp.25–30.
- Chen, Y., Guarneri, M.T., Vasil, A.I., Vasil, M.L., Mant, C.T. & Hodges, R.S., 2007. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), pp.1398–1406.
- Chen, Y., Mant, C.T., Farmer, S.W., Hancock, R.E.W., Vasil, M.L. & Hodges, R.S., 2005. Rational design of alfa-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), pp.12316–12329.
- Chou, H.T., Kuo, T.Y., Chiang, J.C., Pei, M.J., Yang, W. Ter, Yu, H.C., Lin, S. Bin & Chen, W.J., 2008. Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(2), pp.130–138.
- Jayol, A., Nordmann, P., Brink, A. & Poirel, L., 2015. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), pp.2780–2784.
- Jiang, Z., Vasil, A.I., Hale, J.D., Hancock, R.E.W., Vasil, M.L. & Hodges, R.S., 2008. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), pp.369–383.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H. & Matsumoto, K., 2004. Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *Journal of Bacteriology*, 186(5), pp.1475–1483.
- Klein, S., Lorenzo, C., Hoffmann, S., Walther, J.M., Storbeck, S., Piekarski, T., Tindall, B.J., Wray, V., Nimtz, M. & Moser, J., 2009. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology*, 71(3), pp.551–565.
- Kumariya, R., Sood, S.K., Rajput, Y.S., Saini, N. & Garsa, A.K., 2015. Increased membrane surface positive charge and altered membrane fluidity leads to cationic antimicrobial peptide resistance in *Enterococcus faecalis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(6), pp.1367–1375.
- Lam, N.H., Ma, Z. & Ha, B.-Y., 2014. Electrostatic modification of the lipopolysaccharide layer: Competing effects of divalent cations and polycationic or polyanionic molecules. *Soft Matter*, 10(38), pp.7528–44.

- Lee, H., Hsu, F.F., Turk, J. & Groisman, E.A., 2004. The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 186(13), pp.4124–4133.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S.L., Ganz, T. & Selsted, M.E., 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, 84(2), pp.553–561.
- Lewis, L.A., Choudhury, B., Balthazar, J.T., Martin, L.E., Ram, S., Rice, P.A., Stephens, D.S., Carlson, R. & Shafer, W.M., 2009. Phosphoethanolamine substitution of lipid A and resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to cationic antimicrobial peptides and complement-mediated killing by normal human serum. *Infection and Immunity*, 77(3), pp.1112–1120.
- Llewellyn, A.C., Zhao, J., Song, F., Parvathareddy, J., Xu, Q., Napier, B.A., Laroui, H., Merlin, D., Bina, J.E., Cotter, P.A., Miller, M.A., Raetz, C.R.H. & Weiss, D.S., 2012. NaxD is a deacetylase required for lipid A modification and *Francisella* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 86(3), pp.611–627.
- Lohner, K., Latal, A., Degovics, G. & Garidel, P., 2001. Packing characteristics of a model system mimicking cytoplasmic bacterial membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 111(2), pp.177–92.
- López, D. & Kolter, R., 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes and Development*, 24(17), pp.1893–1902.
- Maria-Neto, S., de Almeida, K.C., Macedo, M.L.R. & Franco, O.L., 2015. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(11), pp.3078–3088.
- Matamouros, S. & Miller, S.I., 2015. *S. Typhimurium* strategies to resist killing by cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(11), pp.3021–3025.
- Mazzotta, A.S. & Montville, T.J., 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *Journal of Applied Microbiology*, 82(1), pp.32–38.
- Merrifield, R.B., Juvvadi, P., Andreu, D., Ubach, J., Boman, A. & Boman, H.G., 1995. Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), pp.3449–53.
- Mileykovskaya, E. & Dowhan, W., 2000. Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange. *Journal of Bacteriology*, 182(4), pp.1172–1175.
- Mileykovskaya, E., Sun, Q., Margolin, W. & Dowhan, W., 1998. Localization and function of early cell division proteins in filamentous *Escherichia coli* cells lacking phosphatidylethanolamine. *Journal of Bacteriology*, 180(16), pp.4252–7.
- Miller, S.I., Kukral, A.M. & Mekalanos, J.J., 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(13), pp.5054–5058.
- Mishra, N.N., Liu, G.Y., Yeaman, M.R., Nast, C.C., Proctor, R.A., McKinnell, J. & Bayer, A.S., 2011b. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), pp.526–531.

- Mishra, N.N., McKinnell, J., Yeaman, M.R., Rubio, A., Nast, C.C., Chen, L., Kreiswirth, B.N. & Bayer, A.S., 2011a. *In vitro* cross-resistance to daptomycin and host defense cationic antimicrobial peptides in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), pp.4012–4018.
- Mitrophanov, A.Y., Jewett, M.W., Hadley, T.J. & Groisman, E.A., 2008. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000233.
- Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S.I. & Nikaido, H., 2007. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(20), pp.7213–7222.
- Murray, G.L., Attridge, S.R. & Morona, R., 2003. Regulation of *Salmonella* typhimurium lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Molecular Microbiology*, 47(5), pp.1395–1406.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. & Vogel, H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), pp.464–472.
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264(5157), pp.382–388.
- Pages, J.M., James, C.E. & Winterhalter, M., 2008. The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), pp.893–903.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V. & Hancock, R.E.W., 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(3), pp.605–614.
- Peleg, A.Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A.M., Rubio, A., Cameron, D.R., Pillai, S., Moellering, R.C. & 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), e28316.
- Pescaretti, M.D.L.M., López, F.E., Morero, R.D. & Delgado, M. A, 2011. The PmrA/PmrB regulatory system controls the expression of the wzzfepE gene involved in the O-antigen synthesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 157(2011), pp.2515–2521.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. & Götz, F., 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp.8405–8410.
- Pogliano, J., Pogliano, N. & Silverman, J.A., 2012. Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *Journal of Bacteriology*, 194(17), pp.4494–4504.
- Porcelli, F., Buck, B., Lee, D., Hallock, K.J., Ramamoorthy, A. & Veglia, G., 2004. Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44), pp.45815–45823.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y., 1992. Interaction of antimicrobial

- dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), pp.12416–12423.
- Randall, C.P., Mariner, K.R., Chopra, I. & O’Neill, A.J., 2013. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), pp.637–639.
- Roy, H. & Ibba, M., 2009. Broad range amino acid specificity of RNA-dependent lipid remodeling by multiple peptide resistance factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(43), pp.29677–29683.
- Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P. & Shai, Y., 2012. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B *Streptococcus* by increasing the cell wall density. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002891.
- Saenz, J.P., Sezgin, E., Schwille, P. & 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.
- Shafer, W.M., Qu, X., Waring, a J. & Lehrer, R.I., 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), pp.1829–1833.
- Shenkarev, Z.O., Balashova, T.A., Efremov, R.G., Yakimenko, Z.A., Ovchinnikova, T. V., Raap, J. & Arseniev, A.S., 2002. Spatial structure of zervamicin IIB bound to DPC micelles: Implications for voltage-gating. *Biophysical Journal*, 82(2), pp.762–771.
- Short, S.A. & White, D.C., 1972. Biosynthesis of cardiolipin from phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 109(2), pp.820–826.
- Scherer, K.M., Spille, J.H., Sahl, H.G., Grein, F. & Kubitscheck, U., 2015. The lantibiotic nisin induces Lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding. *Biophysical Journal*, 108(5), pp.1114–1124.
- Silverman, J. a, Perlmutter, N.G., Howard, M. & Shapiro, H.M., 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), pp.2538–2544.
- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S.E., Kelly, V. a & Duncan, K., 1996. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure*, 4(12), pp.1465–74.
- Slavetinsky, C.J., Peschel, A. & Ernst, C.M., 2012. Alanyl-phosphatidylglycerol and lysyl-phosphatidylglycerol are translocated by the same MprF flippases and have similar capacities to protect against the antibiotic daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), pp.3492–3497.
- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K. a, Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., Raetz, C.R.H. & Geiger, O., 2007. The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20(11), pp.1421–1430.
- Steenbergen, J.N., Alder, J., Thorne, G.M. & Tally, F.P., 2005. Daptomycin: A lipopeptide

- antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), pp.283–288.
- Tally, F.P. & DeBruin, M.F., 2000. Development of daptomycin for Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(4), pp.523–526.
- Tamayo, R., Choudhury, B., Septer, A., Merighi, M., Carlson, R. & Gunn, J.S., 2005. Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *Journal of Bacteriology*, 187(10), pp.3391–3399.
- Teixeira, V., Feio, M.J. & Bastos, M., 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), pp.149–177.
- Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A., 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), pp.4–30.
- Tran, T.T., Panesso, D., Mishra, N.N., Mileykovskaya, E., Guan, Z., Munita, J.M., Reyes, J., Diaz, L., Weinstock, G.M., Murray, B.E., Shamoo, Y., Dowhan, W., Bayer, A.S. & Arias, C.A., 2013. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. *mBio*, 4(4), pp.1–10.
- Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W. & Wood, J.M., 2005. The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(50), pp.41387–41394.
- Vedovato, N. & Rispoli, G., 2007. A novel technique to study pore-forming peptides in a natural membrane. *European Biophysics Journal*, 36(7), pp.771–778.
- Véscovi, E.G., Soncini, F.C. & Groisman, E.A., 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: Environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84(1), pp.165–174.
- Wade, D., Boman, A., Wählin, B., Drain, C.M., Andreu, D., Boman, H.G. & Merrifield, R.B., 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), pp.4761–4765.
- Wang, X., Ribeiro, A.A., Guan, Z., Abraham, S.N. & Raetz, C.R.H., 2007. Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), pp.4136–41.
- White, D.A., Lennarz, W.J. & Schnaitman, C.A., 1972. Distribution of lipids in the wall and cytoplasmic membrane subfractions of the cell envelope of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 109(2), pp.686–690.
- White, D.C. & Frerman, F.E., 1968. Fatty acid composition of the complex lipids of *Staphylococcus aureus* during the formation of the membrane-bound electron transport system. *Journal of Bacteriology*, 95(6), pp.2198–2209.
- Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., De Kruijff, B. & Sahl, H.G., 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(3), pp.1772–1779.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W.L., MacDonald, D.L. &

- Bienert, M., 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, 36(20), pp.6124–6132.
- Wisniewska, A. & Subczynski, W.K., 1998. Effects of polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368(2), pp.235–246.
- Yang, L., Harroun, T. a, Weiss, T.M., Ding, L. & Huang, H.W., 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, 81(3), pp.1475–1485.
- Yeaman, M.R. & Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), pp.27–55.
- Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I. & Raetz, C.R.H., 2001. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(46), pp.43111–43121.

Internetové zdroje:

WHO. *Antimicrobial resistance*. [online]. 2015 [cit. 2016-08-15]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

WHO. *The top 10 causes of death*. [online]. 2014 [cit. 2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>