

**Wydział Biologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego

*mgr Monika Szadkowska*

**Charakterystyka nowych peptydów  
antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach  
pierwszorzędowych białek litycznych**

**Characteristics of novel antibacterial peptides  
hidden in primary sequences of lytic proteins**

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG  
Katedra Mikrobiologii

GDAŃSK 2023

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi  
Pani **dr hab. Magdalenie Płotce, prof. UG** za nieocenioną pomoc,  
przekazaną wiedzę, cierpliwość, poświęcony czas oraz  
atmosferę sprzyjającą efektywnej pracy naukowej.*

*Dziękuję również mojej **Mamie** za miłość, wyrozumiałość i  
wsparcie w dążeniu do realizacji moich marzeń.*

**Część wyników przedstawiona w niniejszej pracy została opublikowana w artykułach naukowych:**

- Plotka M., **Szadkowska M**, Håkansson M, Kovačič R, Al-Karadaghi S, Walse B, Werbowy O, Kaczorowska AK and Kaczorowski T. *Molecular characterization of a novel lytic enzyme LysC from Clostridium intestinale URNW and its antibacterial activity mediated by positively charged N-terminal extension*. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(14), <https://10.3390/ijms21144894> (IF = 6.208, 140 pkt MEiN)
- **Szadkowska M**, Olewniczak M, Kloska A., Jankowska E, Kapusta M, Rybak B, Wyrzykowski D, Zmudzinska W, Geldon A, Kocot A, Kaczorowska AK, Nierzwicki L, Makowska J, Kaczorowski T, Plotka M. *A novel cryptic clostridial peptide that kills bacteria by a cel membrane permeabilization mechanism*. Microbiology Spectrum 2022, <https://doi.org/10.1128/spectrum.01657-22> (IF = 9.043, 100 pkt MEiN)

**Pozostałe artykuły naukowe opublikowane podczas realizacji pracy doktorskiej:**

- Wons E, Koscielniak D, **Szadkowska M**, Sektas M. *Evaluation of GFP reporter utility for analysis of transcriptional slippage during gene expression*. Microb Cell Fact. 2018 Sep 21;17(1):150; <https://10.1186/s12934-018-0999-3> (IF = 6.352, 100 pkt MEiN)
- Aevansson A i in. *Going to extremes - a metagenomic journey into the dark matter of life*. FEMS Microbiol Lett. 2021, 24;368(12):fnab067; <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab067> (IF = 2.820, 70 pkt MEiN)
- Morzywolek A, Plotka M, Kaczorowska A-K, **Szadkowska M**, Kozłowski L.P, Wyrzykowski D, Makowska J, Waters J.J, Swift S.M, Donovan D.M, Kaczorowski T. *Novel lytic enzyme of prophage origin from Clostridium botulinum E3 strain Alaska E43 with bactericidal activity against Clostridial cells*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(17), 9536; <https://doi.org/10.3390/ijms22179536> (IF = 6.208, 140 pkt MEiN)

### **Badania naukowe prowadzono we współpracy z krajowymi ośrodkami naukowymi:**

- Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański – mikroskopia fluorescencyjna dr Małgorzata Kapusta
- Zespół Chemii Medycznej, Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański – synteza peptydów o działaniu antybakteryjnym dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG
- Pracownia Aparaturowa, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – analityczne ultrawiórowanie (AUC) dr Roman Szczepanowski
- Sekcja Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański – transmisyjna mikroskopia elektronowa dr hab. Magdaleną Narajczyk, prof. UG
- Sekcja Pomiarów Fizyko-Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański – pomiary z użyciem dichroizmu kołowego (CD) dr Danuta Augustin-Nowacka

### **Badania naukowe zostały sfinansowane przez Naukowe Centrum Nauki w ramach projektów:**

- Miniatura 3 nr 2019/03/X/NZ1/00394 „Analiza struktury i funkcji syntetycznych peptydów stanowiących N-terminalne regiony białek litycznych ze szczególnym uwzględnieniem nowego peptydu antybakteryjnego Intestinaliny”
- OPUS 20 nr 2020/39/B/NZ6/00589 „Analiza molekularna stabilności termicznej endolizyn z ekstremofilnych bakteriofagów na drodze zwalczania bakterii Gram-ujemnych”

## Spis treści

Spis treści.....	5
Wykaz stosowanych skrótów .....	8
Streszczenie.....	10
Summary.....	11
<b>1. WSTĘP .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Globalny problem oporności bakterii na antybiotyki .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Enzymy hydrolityczne peptydoglikanu .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Egzolizyny bakteryjne .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Endolizyny bakteryjne .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Autolizyny bakteryjne .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6. Białko LysC .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7. Peptydy antybakteryjne .....</b>	<b>25</b>
1.7.1. Właściwości strukturalne i fizykochemiczne AMPs .....	26
1.7.2. Podział peptydów antybakteryjnych.....	26
1.7.3. Mechanizmy działania AMPs .....	27
<b>1.8. Peptydy antybakteryjne ukryte w większych białkach .....</b>	<b>29</b>
<b>2. CEL PRACY .....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAŁY.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Szczepy bakteryjne .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Plazmidy bakteryjne.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3. Sekwencje aminokwasowe białek .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. Sekwencje aminokwasowe peptydów antybakteryjnych .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5. Płytki do hodowli komórkowych oraz przeprowadzanych doświadczeń .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6. Wzorce masowe.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7. Antybiotyki.....</b>	<b>38</b>
<b>3.8. Detergenty.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9. Podłoża wzrostowe .....</b>	<b>38</b>
<b>3.10. Odczynniki do elektroforezy poliakrylamidowej.....</b>	<b>40</b>
<b>3.11. Odczynniki stosowane do oczyszczania białek.....</b>	<b>41</b>
<b>3.12. Bufory wykorzystane do analizy białek.....</b>	<b>42</b>
<b>3.13. Bufory używane do określenia optimum aktywności .....</b>	<b>43</b>
<b>3.14. Odczynniki do pomiaru stężenia białka metodą Bradford.....</b>	<b>43</b>
<b>3.15. Odczynniki wykorzystane do analizy biofilmu .....</b>	<b>43</b>

<b>3.16. Odczynniki stosowane do mikroskopii fluorescencyjnej .....</b>	<b>44</b>
<b>4. METODY .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Transformacja plazmidowa komórek kompetentnych .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Nadprodukcja białka w systemie bakteriofaga T7 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.4. Oczyszczanie białka .....</b>	<b>46</b>
4.4.1. Liza komórek bakteryjnych .....	46
4.4.2. Chromatografia powinowactwa na złożu TALON.....	46
4.4.3. Dializa.....	46
4.4.4. Sączenie molekularne (SEC) .....	47
<b>4.5. Pomiar stężenia białka.....</b>	<b>47</b>
<b>4.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.....</b>	<b>47</b>
4.6.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego.....	47
4.6.2. Wykonanie prób do elektroforezy białkowej.....	48
4.6.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym.....	48
<b>4.7. Analiza bioinformatyczna .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8. Test antybakteryjne .....</b>	<b>49</b>
<b>4.9. Minimalne stężenie hamujące.....</b>	<b>49</b>
<b>4.10. Testy formowania biofilmu .....</b>	<b>50</b>
<b>4.11. Transmisyjna mikroskopia elektronowa .....</b>	<b>50</b>
<b>4.12. Mikroskopia fluorescencyjna.....</b>	<b>51</b>
<b>4.13. Spektroskopia dichroizmu kołowego .....</b>	<b>51</b>
<b>4.14. Analityczne ultrawiórowanie .....</b>	<b>52</b>
<b>4.15. Przygotowanie substratów bakteryjnych .....</b>	<b>52</b>
<b>4.16. Test redukcji zmętnienia .....</b>	<b>53</b>
<b>4.17. Określenie wpływu pH buforu na aktywność lityczną białka .....</b>	<b>53</b>
<b>4.18. Specyficzność substratowa .....</b>	<b>54</b>
<b>4.19. Analiza potencjału błonowego .....</b>	<b>54</b>
<b>5. WYNIKI .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej białka LysC i peptydu Intestinaliny.....</b>	<b>56</b>
5.1.1. Wartości IC <sub>50</sub> .....	56
5.1.2. Spektrum przeciwbakteryjne enzymu LysC i peptydu Intestinaliny .....	58
5.1.3. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC).....	60
5.1.4. Wpływ Intestinaliny (P30) na formowanie się biofilmu .....	61
5.1.5. Mikroskopia fluorescencyjna.....	63
5.1.6. Spadek potencjału błonowego .....	64
5.1.7. Struktura przestrzenna peptydu Intestinaliny .....	65
5.1.8. Analiza struktury oligomerycznej peptydu P30.....	65

5.1.9. Analityczne ultrawierowanie peptydu Intestinaliny (P30).....	66
<b>5.2. Badania <i>in silico</i> w poszukiwaniu białek wykazujących podobieństwo do LysC</b> .....	<b>68</b>
5.2.1. Białko PhiKo.....	69
5.2.2. Nadprodukcja i oczyszczanie białka PhiKo.....	70
5.2.3. Analiza czystości i oligomeryczności białka PhiKo.....	71
5.2.4. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka PhiKo .....	74
5.2.5. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej białka PhiKo i peptydu RAP-29 .....	76
5.2.6. Określenie minimalnego stężenia hamującego dla RAP-29.....	78
5.2.7. Analiza struktury oligomerycznej peptydu RAP-29.....	79
5.2.8. Analiza mechanizmu działania peptydu RAP .....	80
5.2.9. Aktywność białka PhiKo w zależności od stężenia.....	81
5.2.10. Określenie wpływu pH na aktywność białka PhiKo .....	82
5.2.11. Aktywność białka PhiKo w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0 .....	83
5.2.12. Specyficzność substratowa .....	84
5.2.13. Ocena aktywności PhiKo za pomocą mikroskopii elektronowej .....	85
<b>5.3. Aktywność przeciwbakteryjna GasC.....</b>	<b>87</b>
5.3.1. Podobieństwo białka GasC do autolizyny LysC.....	87
5.3.2. Nadprodukcja i oczyszczanie białka GasC .....	88
5.3.3. Aktywność przeciwbakteryjna białka GasC .....	89
5.3.4. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka GasC .....	90
5.3.5. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej peptydu VVR-20.....	92
5.3.5.1. Aktywność lityczna peptydu VVR-20.....	92
5.3.5.2. Określenie minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego dla VVR-20 .....	93
<b>5.4. Potencjalne białko lityczne CT4 .....</b>	<b>94</b>
5.4.1. Nadprodukcja i oczyszczanie białka CT4.....	94
5.4.2. Aktywność przeciwbakteryjna białka CT4.....	96
5.4.3. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka CT4 .....	97
5.4.4. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej peptydu IFR-20.....	98
5.4.4.1. Aktywność lityczna peptydu IFR-20 .....	98
5.4.4.2. Określenie minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego dla IFR-20 .....	99
<b>6. PODSUMOWANIE .....</b>	<b>100</b>
<b>7. DYSKUSJA .....</b>	<b>102</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>108</b>
<b>9. SUPLEMENT.....</b>	<b>119</b>
<b>10. SPIS TABEL I RYCIN.....</b>	<b>141</b>

## Wykaz stosowanych skrótów

- aa – (ang. *amino acids*) aminokwasy
- AMPs – (ang. *antimicrobial peptides*) peptydy antybakteryjne
- APS – (ang. *ammonium persulfate*) nadsiarczan amonu
- ATCC – (ang. *American Type Culture Collection*)
- BLASTP – (ang. *Basic Local Alignment Search Tool Proteins*)
- BSA – (ang. *bovine serum albumin*) surowicza albumina bydłęca
- CAMP – (ang. *Collection of Anti-Microbial Peptides*) kolekcja peptydów antybakteryjnych
- CBD – (ang. *cell wall binding domain*) domena wiążąca ścianę komórkową bakterii
- CFU – (ang. *colony forming unit*) jednostka tworząca kolonie
- DAPI – (4,6-diamidyno-2-fenylindol)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- DDM – (ang. *n-dodecyl β-D-maltoside*)
- DPC – (ang. *n-dodecylphosphocholin*)
- DSMZ – (ang. *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*)
- EAD – (ang. *enzymatically active domain*) domena aktywna enzymatycznie
- EDTA – sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczerwonego
- IPTG – izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd
- kDa – kilodalton
- KM – Katedra Mikrobiologii
- KPD – Kolekcja Plazmidów i Drobnoustrojów Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
- LDAO – (ang. *N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide*)
- LPS – (ang. *lipopolysaccharide*) lipopolisacharyd
- LTA – (ang. *lipoteichoic acid*) kwas lipoteichojuowy
- MEiN – Ministerstwo Edukacji i Nauki
- MD – (ang. *molecular dynamics*)
- NAM – kwas N-acetylmuraminowy
- NAG – N-acetyloglucozamina
- NCBI – (ang. *National Center for Biotechnology Information*) Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej
- OD – (ang. *optical density*) gęstość optyczna



PAGE – (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PDB – (ang. *Protein Data Bank*)

PG – (ang. *peptidoglycan*) peptydoglikan

pH – (ang. *potential of hydrogen* lub *power of hydrogen*) ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych

QCA – Química Clínica Aplicada

Ryc. – rycina

SD – (ang. *standard deviation*) odchylenie standardowe

SDS – sól sodowa siarczanu dodecyłu

SEC – (ang. *Size-exclusion chromatography*) chromatografia wykluczania

TEMED – N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina

Tris – trójhydroksymetyloaminometan

TUA – (ang. *teichuronic acids*) kwasy tejchuronowe

UCK – Uniwersyteckie Centrum Kliniczne

UG – Uniwersytet Gdański

WB – Wydział Biologii

WTA – (ang. *wall teichoic acids*) kwasy tejchojowe

WT – szczep typu dzikiego

VAPGH – (ang. *virion-associated peptidoglycan hydrolases*) hydrolazy peptydoglikanu związane z cząsteczkami faga

## Streszczenie

Wśród bakterii chorobotwórczych szybko rośnie oporność na antybiotyki, co staje się globalnym problemem zdrowia publicznego, który zagraża skuteczności terapii wielu chorób zakaźnych. Pod tym względem peptydy przeciwdrobnoustrojowe wydają się być interesującą alternatywą do zwalczania patogenów bakteryjnych. W pracy tej przedstawiłam szczegółową charakterystykę peptydu antybakteryjnego Intestinaliny (P30), którego sekwencja odpowiada N-terminalnej części enzymu LysC (aa 2-31) pochodzącego ze szczepu *Clostridium intestinale* URNW. Peptyd ten wykazuje aktywność bakteriobójczą wobec klinicznych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Mikroskopia fluorescencyjna i modelowanie komputerowe ujawniły, że oligomery peptydu tworzą kanały transbłonowe, które bezpośrednio angażują ujemnie naładowane głowy fosfolipidów błony komórkowej bakterii. Powoduje to zaburzenie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej, co może negatywnie wpływać na wiele procesów życiowych, takich jak synteza ATP, ruchliwość bakterii i transport składników odżywczych, a nieprawidłowości te mogą w konsekwencji prowadzić do utraty żywotności bakterii.

W celu poszukiwania białek podobnych do białka litycznego LysC przeprowadziłam analizy *in silico*, które umożliwiły wyodrębnienie trzech potencjalnych białek litycznych: PhiKo, GasC oraz CT4 pochodzących odpowiednio z: bakteriofaga phiKo *Thermus thermophilus* HB27, bakterii *Clostridium gasigenes* oraz bakterii *Clostridium manihotivorum* CT4. Następnie wykonałam analizy bioinformatyczne z użyciem programu CAMP w celu poszukiwań regionów, które mogą odpowiadać „ukrytym” w sekwencjach lizyn peptydom antybakteryjnym. W celu zbadania potencjału przeciwbakteryjnego wybranych białek i peptydów (nazwanych RAP-29, VVR-20 i IFR-20) przeprowadziłam testy antybakteryjne m. in. wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923.

Zarówno peptyd Intestinalina (P30), jak również peptyd RAP-29 ukryty w sekwencji aminokwasowej białka PhiKo wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą. Przeprowadzone badania mogą być zatem pomocne w poszukiwaniu nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które w przyszłości mają szansę zastąpić dotychczasowe antybiotyki.

## Summary

Among pathogenic bacteria, resistance to antibiotics is rapidly growing, becoming a global public health problem that threatens the effectiveness of therapy of many infectious diseases. In this respect, antimicrobial peptides seem to be an interesting alternative to combat bacterial pathogens. In this work, I presented a detailed characterization of the antibacterial peptide Intestinalin (P30), whose sequence corresponds to the N-terminal part of the LysC enzyme (aa 2-31) from the *Clostridium intestinale* URNW strain. This peptide exhibits bactericidal activity against clinical strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Fluorescence microscopy and computer modelling revealed that the peptide oligomers form transmembrane channels that directly engage the negatively charged phospholipid heads of the bacterial cell membrane. This disrupts the electrochemical gradient of the cell membrane, which can negatively affect many vital processes, such as ATP synthesis, bacterial motility and nutrient transport, and these abnormalities may consequently lead to the loss of bacterial viability.

In order to search for proteins similar to the lytic protein LysC, I conducted *in silico* analyses that enabled the selection of three potential lytic proteins: PhiKo, GasC and CT4, derived from the bacteriophage phiKo of *Thermus thermophilus* HB27, *Clostridium gasigenes* and *Clostridium manihotivorum* CT4, respectively. Then, I performed bioinformatics analyses using the CAMP program to search for regions that may correspond to antibacterial peptides "hidden" in the lysins sequences. In order to test the antibacterial potential of selected proteins and peptides (named RAP-29, VVR-20 and IFR-20), I conducted antibacterial tests, e.g., against *A. baumannii* CRAB KPD 205 and *S. aureus* ATCC 25923.

Both the Intestinalin (P30) peptide, and the RAP-29 peptide hidden in the amino acid sequence of the PhiKo protein show high bactericidal activity. The conducted research may therefore be helpful in the search for new antimicrobial peptides, which in the future have a chance to replace the existing antibiotics.

# 1. WSTĘP

## 1.1. Globalny problem oporności bakterii na antybiotyki

Przez tysiąclecia na całym świecie ludzie chorowali na infekcje bakteryjne, które często przeradzały się w epidemie i powodowały śmierć milionów z nich. Z powodu ograniczonej technologii, jak i braku dostatecznej wiedzy na temat chorób zakaźnych walka z bakteriami przez długi czas była mało skuteczna. Najważniejszym osiągnięciem medycyny XX wieku uważa się odkrycie antybiotyków, dzięki którym udało się zwalczyć takie choroby jak: cholera, kiła, dżuma i gruźlica (Mohr, 2016).

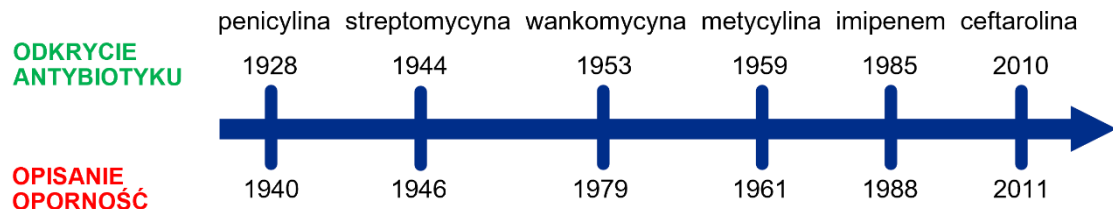
Pierwszym odkrytym antybiotykiem była penicylina, kiedy to w 1928 roku Sir Alexander Fleming wykazał, że działa przeciwbakteryjnie na gronkowce tj. *Staphylococcus aureus* i inne Gram-dodatnie patogeny (Fleming, 1980). Niestety masowa produkcja oraz nadużywanie stosowania antybiotyków przez ludzi doprowadziło do poważnego problemu jakim jest wzrost oporności bakterii na stosowane leki, co spowodowało najważniejsze zagrożenie zdrowia publicznego XXI wieku (Jian et al., 2021). Antybiotykooporność to zdolność bakterii do przeciwstawienia się działaniu antybiotyku, poprzez tworzenie mechanizmów obronnych, często nabytych na drodze horyzontalnego transferu genów. Mając na uwadze szybkość zmienności genetycznej, drobnoustroje z łatwością tworzą nowe mechanizmy maskujące, które pozwalają na wytworzenie oporności przed działaniem leków. Powoduje to wzrost zakażeń lekoopornych, które zagrażają zdrowiu, a nawet życiu ludzi i zwierząt (Larsson & Flach, 2022).

Zgodnie z danymi zgromadzonymi w 2016 r. przez zespół badaczy J. O’Neilla rocznie z powodu infekcji powodowanych przez bakterie odporne na stosowane antybiotyki umarło około 700 tysięcy ludzi na całym świecie (O’Neill, 2016). Zestawienia z 2019 roku pokazują, że problem znacząco narastał i już w 2019 r. z powodu infekcji wywołanych antybiotykoopornością zmarło 1,27 miliona ludzi (Murray et al., 2022). Europejskie Centrum Kontroli i Profilaktyki Chorób (ECDC, ang. *European Centre for Diseases Prevention and Control*) szacuje, że rocznie około 33 tys. osób umiera w wyniku braku skutecznego środka terapeutycznego (Cassini et al., 2019). W 2014 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) opublikowała raport pt. „Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe: Globalny raport dotyczący nadzoru 2014”, w którym ostrzegała przed pogłębiającą się antybiotykoopornością

bakterii, nadmiernym wypisywaniem recept na antybiotyki, nadużywaniu ich przez ludzi, jak również perspektywie nastania ery post-antybiotykowej, kiedy to nawet łagodna infekcja może zagrażać życiu człowieka (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>).

Problem związany z opornością bakterii na antybiotyki obserwowano w ciągu kilku lat od wprowadzenia penicyliny na rynek (Ryc. 1). Naukowcy Abraham i Chain w 1940 roku oświadczyli, że bakterie *Escherichia coli* (ówcześnie nazywane *Bacterium coli*) mogą neutralizować działanie penicyliny poprzez produkcję penicylinazy (Abraham & Chain, 1940). Efekt ten potwierdzono również w 1942 roku dla Gram-dodatnich mikroorganizmów, kiedy to dla czterech szczepów *S. aureus* odnotowano oporność na penicylinę wśród leczonych pacjentów (Rammelkamp & Maxon, 2016). Szybko idąca oporność dotyczy również innych bakterii. Odkryta w 1944 roku streptomycyna była skutecznym lekiem na gruźlicę, a pierwszą oporność *Mycobacterium tuberculosis* zaobserwowano już w dwa lata od momentu jej odkrycia (Ryc. 1) (Okamoto et al., 2007). W ciągu kilku lat liczba zakażeń spowodowanych *S. aureus* opornych na penicylinę drastycznie wzrosła, a gronkowiec bardzo szybko rozprzestrzenił się ze środowiska szpitalnego do społeczności poza lecznictwem szpitalnym. Z końcem lat 60-tych więcej niż 80% szczepów *S. aureus* zarówno szpitalnych, jak i tych poza szpitalami wykazało oporność na penicylinę (Lowy, 2003). Odkrycie wankomycyny w 1953 roku niosło nadzieję na odnalezienie leku, któremu rozwój oporności już nie zagraża. Niestety z upływem lat opisano pierwsze szczepy odporne na ten antybiotyk (Ryc. 1) (Hiramatsu et al., 1997). Szybkie szerzenie się oporności na wankomycynę chwilowo zatrzymano dzięki odkryciu metycyliny, którą wprowadzono na rynek w 1959 roku. Natomiast już dwa lata później pojawiały się informacje z Wielkiej Brytanii dotyczące szczepów gronkowca złocistego opornych na metycylinę (MRSA, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (Ryc. 1) (Enright et al., 2002). Dopiero 1981 roku odkryto mechanizm obronny bakterii, który polegał na produkcji w szczepach opornych białek wiążących penicylinę (PBPs, ang. *penicillin-binding proteins*) o znacznie niższym powinowactwie do metycyliny w porównaniu do szczepów wrażliwych (Hartman & Tomasz, 1981). Antybiotykiem zaliczanym do  $\beta$ -laktamów jest imipenem, który został odkryty 1985 roku i skutecznie zwalczał bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (Lyon J.A., 1985). Pierwszą oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na imipenem zanotowano 1988 roku (Ryc. 1) (McCarthy, 2020). Ceftarolina odkryta w 2010 roku działa bakteriobójczo wobec

szczepów opornych na metycylinę oraz szczepów niewrażliwych na penicylinę (Steed & Rybak, 2010). Niestety już rok później odnotowano pierwszą oporność *Staphylococcus* na ten antybiotyk (Saravolatz et al., 2011). Ciągły „wyścig” pomiędzy bakteryjnymi mechanizmami obronnymi, a odkrywaniem nowych antybiotyków trwa po dzisiejszy dzień.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający odkrycie antybiotyku i pierwszą zaobserwowaną oporność u bakterii; zmodyfikowano na podstawie Keita et al., 2022.

Pomimo, iż poznaliśmy mechanizmy powstawania i rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów bakterii, nie umiemy spowolnić lub całkowicie wyeliminować tych procesów. Przy pomocy coraz szybszego rozwoju technologii oraz nowych strategii bioinformatycznych można łatwiej poszukiwać lepszych alternatyw dla antybiotyków (Jagusztyn-Krynicka, 2017). Narastający problem antybiotykooporności przyczynił się do poszukiwań przez naukowców na całym świecie środków przeciwbakteryjnych, które mogłyby zastąpić antybiotyki. Alternatywą dla terapii antybiotykowej w walce z patogennymi bakteriami są m. in.: enzymy hydrolizujące peptydoglikan i peptydy antibakteryjne.

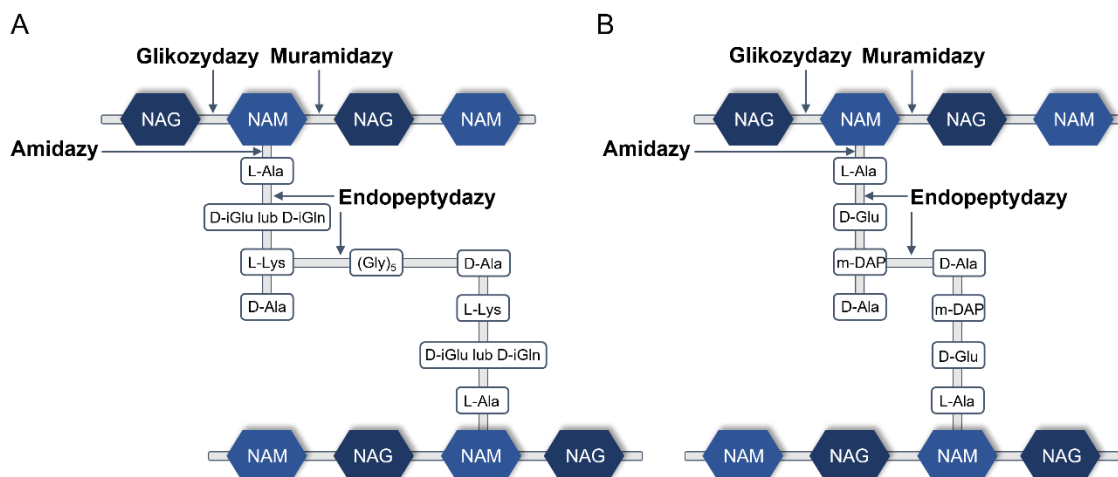
## 1.2. Enzymy hydrolityczne peptydoglikanu

Peptydoglikan (PG), inaczej mureina jest charakterystycznym i niezbędnym elementem ściany komórkowej bakterii, która znajduje się na zewnątrz błony komórkowej niemalże każdego drobnoustroju (Vollmer et al., 2008). PG zbudowany jest z powtarzającej się jednostki disacharydu, N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (NAM), połączonych wiązaniem  $\beta(1\rightarrow4)$  O-glikozydowym oraz tetrapeptydu i często mostka poprzecznego. Tetrapeptyd przyłączony jest do grupy karboksylowej NAM i składa się z reszt L- i D- aminokwasów. U *S. aureus* są to aminokwasy: L-alanina, kwas D-izoglutaminowy (w przypadku niektórych szczepów gronkowca zastąpiony D-izoglutaminą), L-lizyna oraz D-alanina. W przypadku bakterii

Gram-ujemnych takich jak *Escherichia coli* w miejsce L-lizyny występuje najczęściej kwas diaminopimelinowy (meso-DAP), a u bakterii z rodzaju *Thermus* L-ornityna (L-Orn) (Vollmer et al., 2008). Mostki poprzeczne również różnią się w zależności od danego organizmu. U *S. aureus* poprzeczny mostek peptydowy występuje pomiędzy L-lizyną, a D-alaniną sąsiadujących łańcuchów i jest segmentem zawierającym pięć glicyn (Ryc. 2 A) (Rogers et al., 1980). Przykładowo *Escherichia coli* nie posiada mostka poprzecznego, a D-alanina jednego łańcucha połączona jest bezpośrednio z kwasem diaminopimelinowym (meso-DAP) łańcucha sąsiedniego tetrapeptydu (Ryc. 2 B) (Samaszko-Fierteck et al., 2015).

Hydrolazy peptydoglikanu są enzymami, które budują i rozkładają PG bakterii, jak również pełnią istotną funkcję w metabolizmie ściany komórkowej, czy adsorpcji oraz uwolnieniu bakteriofagów (wirusów infekujących komórki bakterii) do środowiska. Pierwszym odkrytym enzymem powodującym hydrolizę peptydoglikanu był lizozym (muramidaza), który Prof. A. Fleming stosował w 1922 roku jako środek antybakteryjny jeszcze przed odkryciem penicyliny (Swaminathan et al., 2011). Hydrolazy peptydoglikau można przyporządkować do trzech grup ze względu na miejsce cięcia PG:

- a) Amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe rozszczepiają wiązanie amidowe, które występuje pomiędzy NAM, a peptydem (głównie L-alaniną) bakteryjnego PG
- b) Glikozydazy to enzymy które mają zdolność do hydrolizy wiązania glikozydowego:
  - N-acetyloglukozaminidazy hydrolizują wiązanie  $\beta$ -1,4-glikozydowe peptydoglikanu za NAG
  - N-acetylmuramidazy (znane również jako muramidazy, lizozymy) tną wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe, pomiędzy cząsteczkami NAM i NAG w łańcuchach PG
- c) Endopeptydazy rozrywają wiązanie peptydowe występujące pomiędzy poszczególnymi aminokwasami w łańcuchach bocznych (Mondal et al., 2020).



Ryc. 2. Schemat budowy peptydoglikanu na przykładzie (A) *Staphylococcus aureus* oraz (B) *Escherichia coli*. Strzałkami oznaczono miejsca działania enzymów litycznych o różnej specyficzności; zmodyfikowano na podstawie Samaszko-Fiertek et al., 2015.

Oprócz miejsca cięcia hydrolaz peptydoglikanu, bardzo istotne jest ich pochodzenie (Schmelcher et al., 2012). Amidazy, glikozylazy, muramidazy oraz peptydazy można podzielić na egzolizyny (bakteriocyny) i autolizyny pochodzenia bakteryjnego oraz endolizyny produkowane przez bakteriofagi (Vermassen et al., 2019).

### 1.3. Egzolizyny bakteryjne

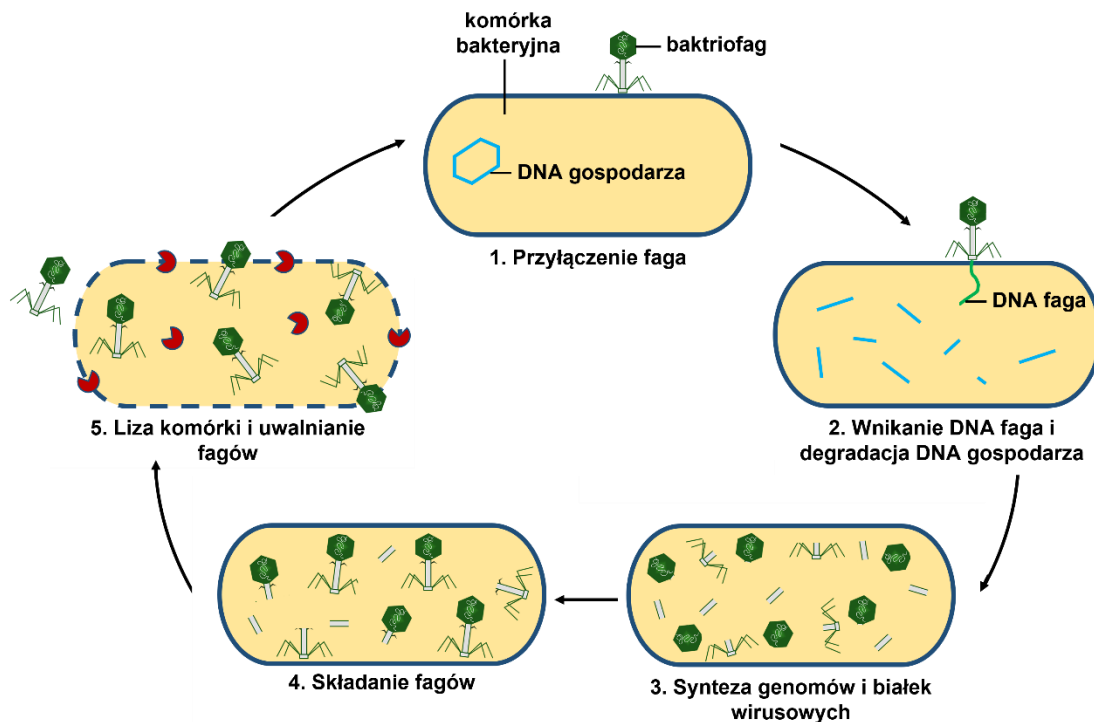
Pierwszą grupą związków antybakteryjnych są egzolizyny, inaczej znane jako bakteriocyny. To substancje białkowe, które są produkowane i wydzielane przez bakterie Gram-dodatnie (podzielone na klasy: I – lantibiotyki zawierające nietypowe aminokwasy, takie jak lantionina, II – bakteriocyny nielantibiotykowe, III – bakteriocyny wysokocząsteczkowe oraz IV – kompleksy białkowo-lipidowe i białkowo-węglowodanowe) oraz Gram-ujemne (kolicyny i mikrocyne) w celu zwalczania innych drobnoustrojów (Gwiazdowska et al. 2005). Aktywność większości bakteriocyn jest możliwa dzięki występowaniu receptorów w ścianie komórkowej bakterii, z którymi oddziałują. Jednym z mechanizmów ich działania jest destabilizacja i permeabilizacja błony komórkowej ściany komórkowej bakterii poprzez tworzenie przejściowych kompleksów poracyjnych i kanałów jonowych, co poprzedzają interakcje z kwasami teichojowymi (WTA), lipoteichojowymi (LTA) oraz teichuronowymi (TUA) bakterii Gram-dodatnich, czy elementami błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych (Moll et al., 1999). Istotnym faktem jest to, że dana bakteria, która wytwarza konkretną



bakteriocynę, jest jednocześnie oporna na jej działanie. Potencjał terapeutyczny bakteriocyn został potwierdzony w badaniach klinicznych (Nishie et al., 2012). Pierwszym takim enzymem była kolicyna, kiedy w 1925 roku podczas badań nad *E. coli* belgijski mikrobiolog Andre'a Gratia dostrzegł, że substancja wydzielana przez bakterie ma działanie bakteriobójcze w stosunku do różnych szczepów tego samego gatunku bakterii (Daw & Falkiner, 1996). Innym z lepiej poznanych enzymów jest lizostafina wydzielana przez *Staphylococcus simulans*, która tnie specyficznie mostek pięcioglicynowy w PG bakterii. Działa ona bakteriobójczo na bakterie *Staphylococcus aureus*, szczególnie na *S. aureus* opornego na metycylinę (MRSA, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (Bastos et al., 2010). Innym przykładem enzymu o działaniu bakteriobójczym, który dobrze działa na szczepy MRSA jest nizyna pochodząca z *Lactobacillus lactis*. Nizyna posiada status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) i pod nazwą handlową Nisaplin® stosowana jest jako konserwant żywności. Ponadto laktocyna, wytwarzana przez bakterie mlekowe, działa bakteriobójczo na wankomycynooporne enterokoki (Piper et al., 2009).

#### 1.4. Endolizyny bakteryjne

W celu skutecznego zakażenia komórki bakteryjnej bakteriofagi kodują enzymy, takie jak hydrolazy peptydoglikanu związane z cząsteczkami faga (VAPGH; ang. *virion-associated peptidoglycan hydrolases*), które są kluczowe w początkowym etapie procesu infekcji (Briers, 2019). Kolejne enzymy lityczne bakteriofagów, zwane endolizynami, są z kolei niezbędne do uwalniania fagów z komórki gospodarza w trakcie cyklu litycznego. Obejmuje on: (1) adsorpcję bakteriofaga na powierzchni komórki bakteryjnej (2) transport materiału genetycznego bakteriofaga do wnętrza komórki (3) degradację DNA gospodarza oraz syntezę bakteriofagowego materiału genetycznego i białek (4) składanie wirionów i pakowanie materiału genetycznego do wnętrza kapsydów (5) uwalnianie potomnych cząstek fagowych co związane jest z lizą komórki gospodarza (Ryc. 3).

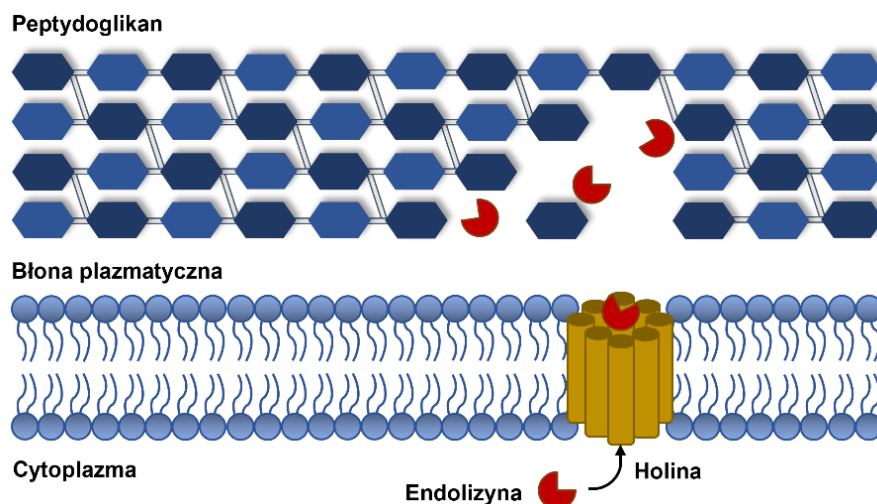


Ryc. 3. Etapy cyklu litycznego bakteriofaga; zmodyfikowano na podstawie <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/lytic-cycle>.

Podczas końcowego etapu cyklu litycznego bakteriofagów dzięki endolizynom możliwa jest liza komórki bakteryjnej poprzez destabilizację ściany komórkowej (Fischetti, 2018). Proces ten zazwyczaj w dużym stopniu wymaga zaangażowania dodatkowych białek takich jak holiny. Formują one pory w błonie komórkowej bakterii, ułatwiając endolizynom degradację ściany komórkowej (Ryc. 4). Przy zróżnicowanych sekwencjach pierwszorzędowych charakterystyczne cechy holin to obecność jednej do trzech hydrofobowych domen transbłonowych oraz hydrofilowej, dodatnio naładowanej domeny C-terminalnej (Grabowski et al., 2021). Białka te są małe (zazwyczaj do 130 reszt aminokwasowych), ale pory przez nie tworzone pozwalają na transport białek do 500 kDa. Geny kodujące zarówno endolizyny, jak i holiny podlegają później ekspresji w końcowych etapach namnażania faga (Woźnica et al., 2015). Nie można również zapominać o pinholinach, które poprzez depolaryzację błony komórkowej aktywują tzw. endolizyny SAR. Jest to kolejny kanoniczny system pinholina – endolizyna SAR (ang. *signal anchor release*). Endolizyny SAR w nieaktywnej formie zakotwiczone są w błonie komórkowej, a depolaryzacja błony powoduje ich uwolnienie i ułatwia przybranie konformacji aktywnej enzymatycznie umożliwiającej cięcie peptydoglikanu (Young, 2014).

Pod względem budowy endolizyny różnią się w zależności od rodzaju bakterii, które atakują. Endolizyny bakteriofagów bakterii Gram-dodatnich mają zazwyczaj budowę modułową i posiadają N-terminalną domenę katalityczną EAD (ang. *enzymatically active domain*) oraz C-terminalną domenę wiążącą ścianę komórkową bakterii CBD (ang. *cell wall binding domain*) (Schmelcher et al., 2012). Uważa się, że część endolizyn pozostaje związana ze szczątkami komórek w wyniku oddziaływania CBD z ligandami na ich powierzchni co zapobiega rozprzestrzenianiu się enzymu i degradacji ścian komórkowych bakterii jeszcze nie zainfekowanych przez bakteriofaga (Loessner i in., 2002). Oczywiście istnieją endolizyny, które mają więcej niż jedną domenę EAD lub kilka CBDs. Przykładowo enzym PlyC jest holoenzymem składającym się z dziewięciu podjednostek, jednej podjednostki katalitycznej EAD o dwóch aktywnościach: glikozydazy i endopeptydazy oraz ośmiu identycznych domen CBD (numer akcesyjny PDB: 4F88).

Endolizyny pochodzące od bakteriofagów infekujących komórki bakterii Gram-ujemnych są zazwyczaj małe (15-20 kDa) i składają się z jednej domeny EAD. Oczywiście i tu występują wyjątki, jak choćby endolizyny KZ144 i EL188 posiadające N-terminalną domenę CBD i C-terminalną domenę EAD (Briers et al., 2007).



Ryc. 4. Model działania endolizyny na ściany komórkowe bakterii Gram-dodatnich; zmodyfikowano na podstawie Mondal et al., 2020.

Uważa się, że bakteriofagowe enzymy lityczne, wykazują większą skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych ze względu na występowanie błony zewnętrznej, która ogranicza bezpośredni kontakt endolizyny z cienką warstwą PG. W przypadku braku błony zewnętrznej u bakterii Gram-dodatnich endolizyny mają możliwość bezpośredniego oddziaływania z PG, powodując dużo łatwiejsze niszczenie komórki bakteryjnej (Schmelcher et al., 2010). Swego czasu stosowanie endolizyn ograniczało się tylko do bakterii Gram-dodatnich (Gutiérrez & Briers, 2020). Prowadzone badania doprowadziły jednak do rozwoju wielu metod mających na celu osłabienie błony zewnętrznej. Wykorzystuje się zarówno działanie czynników chemicznych takich jak kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), słabe kwasy: jabłkowy, cytrynowy, czy wodorowęglan sodu (Abhisingha et al., 2023), jak również metody biologii molekularnej w celu fuzji endolizyn z peptydami o aktywności destabilizującej błony komórkowe (Kocot et al., 2023). Daje to nadzieję na zwalczenie za pomocą hydrolaz peptydoglikanowych również patogenów Gram-ujemnych (Schmelcher et al., 2012).

Uważa się, że istotną zaletą endolizyn nad antybiotykami jest ich duża swoistość, co skutkuje ograniczeniem ich działania antybakteryjnego do określonego rodzaju, gatunku czy serotypu danej bakterii. Dotyczy to jednak zwłaszcza endolizyn bakteriofagów bakterii Gram-dodatnich ze względu na obecność domeny CBD, a w mniejszym stopniu endolizyn posiadających tylko domenę katalityczną (Schmelcher et al., 2010). Do kolejnych mocnych stron endolizyn jako środków przeciwbakteryjnych zaliczamy małe prawdopodobieństwo wystąpienia oporności bakteryjnej, a także wysoką aktywność enzymatyczną, dzięki której liza komórek bakteryjnych może wystąpić już w ciągu kilku minut, a nawet sekund (Son et al., 2012).

Przykładem takich substancji są: endolizyna pochodząca z bakteriofaga C<sub>1</sub> infekującego komórki *Streptococcus* szczep 26RP66 działająca na  $\beta$ -hemolizujące paciorkowce grupy A (Nelson et al., 2001) oraz endolizyna Pal bakteriofaga Dp-1 infekującego pneumokoki, która zwalcza 15 najczęściej występujących serotypów *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler et al., 2001).

### 1.5. Autolizyny bakteryjne

Ostatnią grupą są autolizyny, enzymy o aktywności litycznej, które produkuje komórka bakteryjna. Zaangażowane są w procesy komórkowe w tym wzrost, podział komórek, a także modyfikacje ściany komórkowej i dojrzewanie PG

(J. Takahashi et al., 2002). Przykładowo, *E. coli* posiada trzy autolizyny AmiA, AmiB i AmiC o aktywności amidaz, które odpowiadają za prawidłowy podział komórek, a potrójny mutant delecyjny  $\Delta amiA, \Delta amiB, \Delta amiC$  wykazuje charakterystyczny fenotyp komórek filamentujących, gdzie komórki bakteryjne po podziale pozostają złączone razem i nie ulegają rozdzieleniu (Do et al., 2020). Endopeptydazy CwIO oraz LytE *Bacillus subtilis* poprzez rozrywanie wiązań PG wspomagają z kolei osiągnięcie wydłużonego kształtu komórki. Delecja jednego z genów powoduje powstanie komórek krótszych, a delecja obu genów jest dla komórki bakteryjnej letalna (Hashimoto i in., 2012). Autolizyny są naturalnie wytwarzane oraz występują we wszystkich bakteriach posiadających PG (Blackman et al., 1998), a także podlegają ścisłemu mechanizmowi aktywacji, co zapobiega lizie komórki macierzystej (Brogan & Rudner, 2023). Dobrze scharakteryzowaną autolizyną o aktywności amidazy, która rozcina wiązanie pomiędzy resztą NAM, a N-końcową resztą L-alaniny (Ryc. 2) jest białko LysC pochodzące z *Clostridium intestinale* URNW (Plotka et al., 2020). Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej LysC wykazała największe podobieństwo do endolizyn bakteriofagowych Ph2119 i Ts2631 wywodzących się z bakteriofagów infekujących komórki ekstremofilnej bakterii *Thermus scotoductus* oraz do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan tzw. białek PGRP (Ryc. 5) (Plotka et al., 2020).

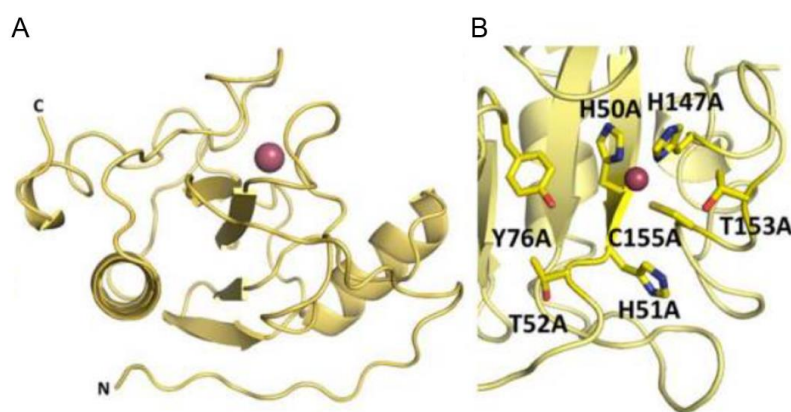
LysC <i>C.intestinale</i>	1	MKNLLRRIRRKLRNKESRSDVIKTPKIVEVNYTWAT-----PLSYNFNFNMIYVHHHTVD
Ph2119 <i>T.scotoductus</i>	1	-----MRIIEPWNRWYRQKG--VYRIRGTPEHYIVVHHHTAG
Ts2631 <i>T.scotoductus</i>	1	-----MRIIEPWNRWYRQKR--AYRVRLTEIHYVIVHHHTAG
PhiKo <i>T.thermophilus</i>	1	-----MNWIDFWR---SKKP-TWRHRPVDEA-YIVVHHHTAG
Amidase <i>C.perfringens</i>	41	FSKINRDESYRDIYKKNISNRGLEKMRQELDIKEVDYKWSGLKKGNSPK-RLIIHHSAT
Pglyrp2 <i>M.musculus</i>	336	SQEQLAQVATLATKEFTE--AFLGCPAIEHRCRFWGAAPYRGHPTERLRLPLGFLYVHHHTV
PGRP-SC1a/b-like <i>D.hydei</i>	1	--MVSKAVFALVLAFLVLCGQYAVQGVYVVSKAEWGGRAPNY-RVAIIGNYLNyaiIHHTAG
↓		
LysC <i>C.intestinale</i>	55	NN-----MTPQKIDEIHF-KQGWSSGIGYHFIYRKDGTIYGRPEPNAVGSHPAGVN
Ph2119 <i>T.scotoductus</i>	35	PVD-----QAPEVIRDFHEKGRGPHIGYHYLVYQDGRVYKTLPNNAIPICVREBN
Ts2631 <i>T.scotoductus</i>	35	BEN-----QTPEAKRYHEEARGWPHIGYHYLVYRDGRVYKTLPNNAVPICVREBN
PhiKo <i>T.thermophilus</i>	32	PVD-----QAPQAIWDYHVKVKGWPHGQYHFLVYHDCITVVKMLPLSAQPICVGEYN
Amidase <i>C.perfringens</i>	100	DTP-----ESPEDLHKFH-LDNGWSGIGYHFIREDGTIYKGRDENVIGAHAKNAN
Pglyrp2 <i>M.musculus</i>	359	PAPGCTTFQSCPADMRSMQRFHQDVRKDDIGYSFVVGSDGYLYCGRGMHWVGAHTRGYN
PGRP-SC1a/b-like	58	--NYCETRASCAQQLRNIIQSYHMDSLGWPDIIGYNFLIGGDAVYEGRGWNSMGAHAAEWN
↓		
LysC <i>C.intestinale</i>	104	ARAFHASEGNFNEEYVTFQQMSTLI-ALSR-----YLMNKYNITDLKRHKD---VRQ
Ph2119 <i>T.scotoductus</i>	86	PVSLCIAAVGDEFSGPAWEDNAPGWK-ALLE---LKDALVKAYPKAVLVLHKE---LTQ
Ts2631 <i>T.scotoductus</i>	86	PVSLCVAAVGDDEFSG-VWEDDAPGWR-ALWE---LKQALAKAYPKALFVLHKN---LVP
PhiKo <i>T.thermophilus</i>	83	HLAICIALVGNFVGGYFPEWNERAPGWKSLAWLVRELKRKHDGSLRLRVRHKD---LRP
Amidase <i>C.perfringens</i>	149	YNTLFCICIEGNFEKEGLNEAQNSLV-KLGT-----YLSLKYPIKDILEHRE---VVD
Pglyrp2 <i>M.musculus</i>	419	SRGEGVAFVGNVTGSLFNEAALNTVFDALPSCAIRAGLIRPDY---KLLGHRQ---LVL-
PGRP-SC1a/b-like	116	PVSLCISIEFGNFNWDTLFENMIASAQ-GLLNDAVNRGQLASGY---ILYGHHRQ---VSA
↓		
LysC <i>C.intestinale</i>	153	TECPGNFPFEEIKAKLNVK-----
Ph2119 <i>T.scotoductus</i>	136	TECPGVLSW-GMVAEKGGK-----
Ts2631 <i>T.scotoductus</i>	135	TECPGRLTW-ELIQRKGGGQ-----
PhiKo <i>T.thermophilus</i>	139	TKCPGIVTW-EEALVRGGVPQEQVETLKVGVIA
Amidase <i>C.perfringens</i>	199	TLCPGKLFPIDNKRSSIIIEIKNM-----
Pglyrp2 <i>M.musculus</i>	479	TECPGNALF-NLLRTWPHFTEVE-----
PGRP-SC1a/b-like	168	TECPGTHIW-NEIRGWSHWRA-----

Ryc. 5. Porównanie sekwencji aminokwasowej enzymu litycznego LysC z sekwencjami endolizyn: Ph2119 oraz Ts2631, a także amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowej z *Clostridium perfringens* oraz eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan. Porównanie sekwencji przeprowadzono przy pomocy programu Clustal Omega. Czarne tło wskazuje na konserwowane aminokwasy w sekwencjach porównywanych białek. Czerwone strzałki wskazują reszty His50, Tyr76, His147, Thr153 i Cys155 LysC (numer akcesyjny GenBank: ERK30183.1), które są istotne dla aktywności amidazy (Plotka et al., 2020).

## 1.6. Białko LysC

Co ciekawe zarówno bakteriocyiny, endolizyny, jak i autolizyny mogą mieć podobną strukturę przestrzenną. Przykładowo, białko LysC wymienione powyżej jest amidazą N-acetylmuramylo-L-alaninową, podobnie jak endolizyny ekstremofilne Ts2631 i Ph2119 (Plotka et al., 2020). Według bazy danych InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe posiadają trzy możliwe typy domen katalitycznych: (A) Amidazy\_2 (rodzina: IPR002502), (B) Amidazy\_3 (rodzina: IPR002508) oraz (C) Amidazy\_5 (rodzina: IPR008044) (Vermassen et al., 2019).

Bardzo często za aktywność amidaz typu 2 odpowiedzialne są kofaktory w postaci jonów dwuwartościowych metali. Pierwszy raz taką współzależność omówiono na przykładzie lizozymu bakteriofaga T7, który posiada cztery konserwowane aminokwasy: His<sup>17</sup>, Tyr<sup>46</sup>, His<sup>122</sup>, Cys<sup>130</sup> odpowiedzialne za wiązanie Zn<sup>2+</sup>, które są niezbędne do aktywności litycznej białka (Cheng et al., 1994). Przeprowadzone badania krystalograficzne białka LysC pokazały, że region katalityczny zawiera atom cynku koordynowany przez aminokwasy His<sup>50</sup>, His<sup>147</sup> i Cys<sup>155</sup>, odpowiadające resztom aminokwasowym His<sup>17</sup>, His<sup>122</sup> i Cys<sup>130</sup> lizozymu T7, który to motyw jest triadą katalityczną charakterystyczną dla amidaz typu 2 (Ryc. 5) (Plotka et al., 2020).



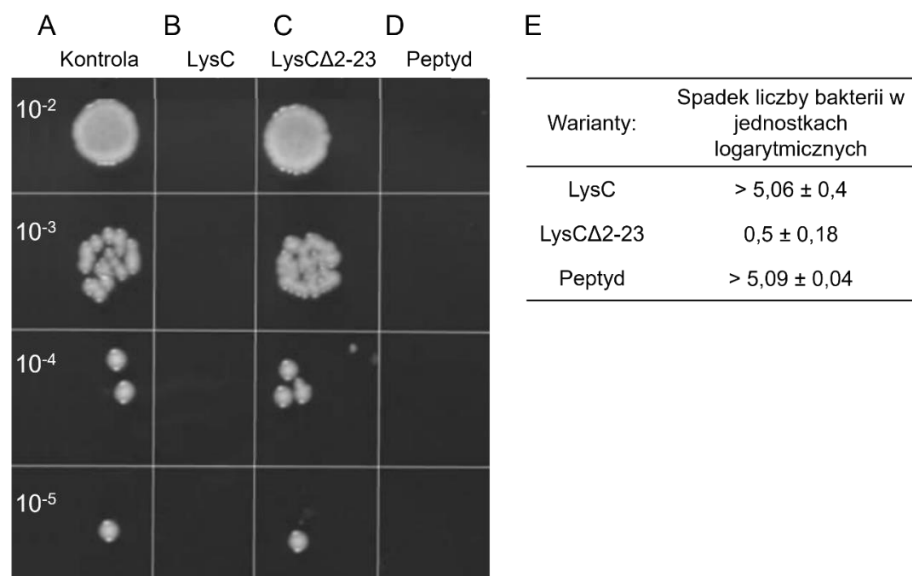
Ryc. 6. Struktura przestrzenna białka LysC (numer akcesyjny PDB: 6SSC) (A) Białko LysC wykazuje konserwatywną architekturę domeny katalitycznej, w tym miejsce wiążące Zn<sup>2+</sup> (kolor różowy). (B) Miejsce katalityczne białka LysC złożone jest z trzech reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za koordynację Zn<sup>2+</sup>: His<sup>50</sup>, His<sup>147</sup> i Cys<sup>155</sup> oraz kolejnych reszt aminokwasowych konserwowanych w sekwencji białka: Thr<sup>52</sup>, His<sup>51</sup>, Tyr<sup>76</sup> i Thr<sup>153</sup> (Plotka et al., 2020).

Badania wykazały aktywność białka litycznego LysC wobec komórek *Clostridium intestinale* DSM 6191, *Clostridium sporogenes* DSM 767, *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Jednak mutageneza miejscowo-specyficzna miejsca katalitycznego nie spowodowała obniżenia aktywności przeciwbakteryjnej białka (Plotka et al., 2020). Uzyskane wyniki sugerowały więc mechanizm aktywności antybakteryjnej LysC niezależny od obecności centrum katalitycznego charakterystycznego dla amidaz typu 2. Zwrócono więc uwagę na N-terminalny region białka bogaty w reszty argininy i lizyny nadające temu odcinkowi silny ładunek dodatni (Plotka et al., 2020). Doniesienia literaturowe sugerują, że dodatnio



naładowane regiony białek litycznych mogą odpowiadać za destabilizację błon bakteryjnych, a co za tym idzie za aktywność przeciwdrobnoustrojową tych białek (Gutiérrez & Briers, 2020).

Wykazano, że białko LysC ma wysoką aktywność lityczną wobec szczepu *S. aureus* ATCC 25923 (Ryc. 7 A i 7 B), natomiast wariant delecyjny białka LysC o nazwie LysC $\Delta$ 2-23 (pozbawiony N-terminalnych aminokwasów 2-23) nie wykazywał takiej aktywności (Ryc. 7C). Kolejnym krokiem była więc synteza peptydu na podstawie N-terminalnej sekwencji białka LysC składającego się z 30 reszt aminokwasowych. Peptyd ten, nazwany Intestinaliną, spowodował wyraźną redukcję żywotności bakterii (Ryc. 7 D) wynoszącą > 5 jednostek logarytmicznych (Ryc. 7 E), aktywność podobną jak w przypadku białka typu WT (Ryc. 7 E).



Ryc. 7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białek LysC i LysC $\Delta$ 2–23 oraz peptydu Intestinaliny przeciwko *S. aureus* ATCC 25923. Bakterie w logarytmicznej fazie wzrostu (OD<sub>600</sub> = 0.5) łączono z białkami w stężeniu końcowym 500  $\mu$ g/ml lub peptydem (20  $\mu$ g/ml) w objętości 300  $\mu$ l w 20 mM buforze HEPES, pH 7,4. Próbkę inkubowano 1.5 h w 37°C, a następnie 10-krotne rozcieńczenia seryjne (A) kontroli lub próbek z (B) LysC, (C) LysC $\Delta$ 2–23 oraz (D) 30 aa peptydem Intestinaliną w objętości 5  $\mu$ l nanoszono na podłoże TSA (ang. *Tryptic Soy Agar*), inkubowano w 37°C przez 18 h, a następnie fotografowano; (E) Seryjne 10-krotne rozcieńczenia próbki kontrolnej oraz reakcji z LysC, LysC $\Delta$ 2-23 i peptydem Intestinaliną w objętości 100  $\mu$ l wysiewano w postaci murawy na płytce z podłożem TSA. Po nocnej inkubacji liczone CFU, a aktywność antybakteryjną podawano w jednostkach logarytmicznych; wg Plotka et al., 2020.



## 1.7. Peptydy antybakteryjne

Peptydy antybakteryjne (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs) wywołują coraz większe zainteresowanie w świecie ze względu na występowanie w każdym z sześciu królestw życia (bakterie, archeony, protisty, grzyby, rośliny i zwierzęta), jak również jako potencjalne środki lecznicze w walce z nieuleczalnymi infekcjami spowodowanymi przez mikroorganizmy (Mahlapuu et al., 2016; Mahlapuu et al., 2020). Pierwszym AMP odkrytym w 1939 roku była gramicydyna pochodząca z drobnoustrojów glebowych *Bacillus brevis*, która miała szerokie spectrum działania antybakteryjnego wobec bakterii Gram-dodatnich w testach *in vitro* i *in vivo* (Dubos, 1939). Bardzo istotną zaletą odróżniającą peptydy od większości antybiotyków jest ich ukierunkowanie na degradację bakteryjnych błon komórkowych. Zarówno drobnoustroje Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne mają błony komórkowe bogate w fosfolipidy zawierające ujemnie naładowane grupy, powodując silne oddziaływania z kationowymi AMPs. Dodatkowo kwasy teichojowe (WTA) występujące w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz lipopolisacharyd (LPS), który jest składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, zapewnia dodatkowy ładunek ujemny, który nasila oddziaływanie z AMPs (Ebenhan et al., 2014). Kolejną pozytywnym aspektem użycia AMPs jest fakt, że AMPs można modyfikować z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej co przyczyniło się do produkcji związków o zwiększonej aktywności bakteriobójczej oraz niskiej cytotoksyczności wobec komórek ludzkich (Henriques et al., 2017). Przeprowadzone badania pozwoliły na odkrycie i scharakteryzowanie ponad 3569 peptydów antybakteryjnych, których sekwencje zostały zdeponowane w bazie danych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (APD3) (<http://aps.unmc.edu/AP>) oraz kolekcji peptydów przeciwdrobnoustrojowych (CAMP) (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>). Istnieje kilka baz danych, takich jak APD3 (Wang et al., 2016), CAMP (Thomas et al., 2010), DrAMP 2.0 (Kang et al., 2019) katalogujące poznane do tej pory AMPs. Oprócz pełnienia funkcji baz danych, APD3 oraz CAMP posiadają algorytmy dostępne on-line pozwalające na określenie fizykochemicznych właściwości określonych peptydów, takich jak współczynnik hydrofobowości, ładunek, czy potencjał do oddziaływania z białkami ([http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction\\_main.php](http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php); <http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>).

### 1.7.1. Właściwości strukturalne i fizykochemiczne AMPs

Większość peptydów antybakteryjnych zbudowana jest z od 5 do 100 reszt aminokwasowych (Chen & Lu, 2020). Peptydy antybakteryjne często wykazują charakter amfipatyczny ze względu na to, że posiadają zarówno region hydrofilowy oddziałujący z głowami fosfolipidów, jak i hydrofobowy, gdzie aminokwasy hydrofobowe oddziałują z końcami węglowodorowymi dwuwarstwy lipidowej (Kumar et al., 2018). Bardzo ważna dla działania litycznego jest długość sekwencji AMP z uwagi na preferencje do tworzenia struktur drugorzędowych tj.  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -kartki. Tak więc długość peptydów jest kluczem do aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Deslouches et al., 2005), która bardzo często maleje wraz ze zmniejszaniem się długości danego peptydu (Ringstad et al., 2006).

### 1.7.2. Podział peptydów antybakteryjnych

W związku z dużą ilością peptydów antybakteryjnych bardzo ważna jest ich klasyfikacja na podstawie budowy aminokwasowej i struktur drugorzędowych. Wyróżnia się trzy klasy takich peptydów:  $\alpha$ -helikalne, peptydy o strukturze  $\beta$ -kartki zawierające cysteinę i elastyczne peptydy, które są bogate w wybrane aminokwasy, tj. prolina, tryptofan, histydyna, arginina i glicyna (Tabela 1) (Takahashi et al., 2010).

Tabela 1. Reprezentatywne peptydy przeciwdrobnoustrojowe o różnej klasyfikacji; zmodyfikowano na podstawie (D. Takahashi et al., 2010).

<b>Klasa</b>	<b>Przedstawiciel (peptyd)</b>	<b>Gospodarz</b>
$\alpha$ -helisa	LL-37	Ssak: człowiek
	Cekropiny	Owad: ćma
	Melityna	Owad: pszczoła miodna
	Magaininy	Płaz: żaba
$\beta$ -kartka	Tachyplesyny	Stawonogi: krab podkowiasty
	Protegryny	Ssak: świnia
	$\alpha$ -defensyna	Ssak: człowiek
	$\beta$ -defensyna	Ssak: człowiek
Elastyczne (ang. <i>flexible</i> )	Indolicydyna	Ssak: krowa
	Trytryptycyna	Ssak: świnia
	Histatyny	Ssak: człowiek
	PR-39	Ssak: świnia

Aktualnie około 30 do 50% wszystkich odkrytych i zbadanych peptydów antybakteryjnych składa się z dominujących struktur  $\alpha$ -helikalnych. Przepuszcza się, że wynika to ze względu na łatwość z jaką są syntetyzowane chemicznie w laboratorium, co ułatwia ich charakterystykę. Peptydy te zazwyczaj są zbudowane z 12-40 reszt aminokwasowych oraz zawierają bardzo dużo reszt stabilizujących helisę, tj. alanina, leucyna i lizyna, ale w ogóle nie zawierają cysteiny. Ważną cechą tej klasy peptydów jest fakt, że w roztworach wodnych bardzo często są nieuporządkowane przestrzennie (nieustrukturyzowane). Dopiero, gdy są związane z błoną komórkową albo w środowisku, które naśladuje błonę przyjmują konformację  $\alpha$ -helikalną (Zelezetsky & Tossi, 2006).

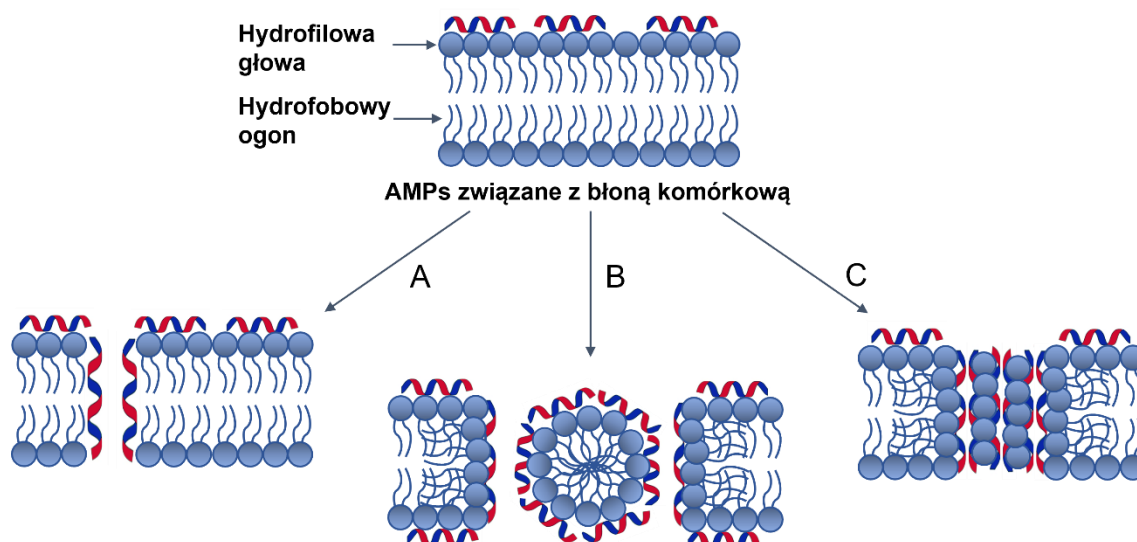
Drugą grupę peptydów antybakteryjnych charakteryzuje to, że w swojej budowie zawierają od 2-10 reszt cysteiny, które tworzą od jednego do pięciu międzylańcuchowych wiązań dwusiarczkowych. Taka zależność wiązania daje peptydom możliwość przyjęcia konformacji  $\beta$ -karkki. W większości przypadków peptydy antybakteryjne typu  $\beta$  należą do rodziny defensyn i są konserwowane ewolucyjnie u grzybów, roślin, owadów, mięczaków oraz kręgowców. Defensyny zbudowane są z dwóch do trzech antyrównoległych  $\beta$ -karktek, które stabilizowane są trzema lub czterema wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami dwusiarczkowymi. Zdarza się czasami, że na N- lub C-końcu znajduje się segment  $\alpha$ -helikalny lub nieustrukturyzowany. W porównaniu do  $\alpha$ -helikalnych peptydów, które nie posiadają struktury w roztworach wodnych, defensyny pozostają w takich warunkach w zwartej, kulistej strukturze (Takahashi et al., 2010).

Zdecydowanie mniejsza grupa peptydów antybakteryjnych zawiera dużą ilość poszczególnych aminokwasów, tj. prolina, tryptofan, histydyna, arginina i glicyna. Przedstawiciele tej klasy to: bogata w tryptofan bydłęca indolicydyna i świńska tritryptycyna, bogata w histydynę ludzka histatyna oraz bogata w argininę i prolinę świńska PR-39. Ze względu na swój nietypowy skład aminokwasowy peptydy te posiadają zmienne struktury drugorzędowe (Takahashi et al., 2010).

### 1.7.3. Mechanizmy działania AMPs

W pierwszej kolejności dochodzi do oddziaływań elektrostatycznych, gdzie na początku peptydy wiążą się z powierzchnią błony bakteryjnej (Wu et al., 1999). Uwzględniając fakt, że powierzchnia błon naładowana jest ujemnie (Silhavy et al., 2010),

a znaczna część AMP to dodatnio naładowane peptydy kationowe, dzięki obecności takich aminokwasów jak: argininy, lizyny i histydyny (Kumar et al., 2018). Następnie hydrofobowe końce przedostają się przez dwuwarstwę lipidową prowadząc do dezorganizacji błony poprzez proponowane 3 modele: klepek beczki, pory toroidalne albo zjawiska dywanu (Ryc. 8) (Bahar & Ren, 2013). Pierwszy mechanizm beczkowo-klepkowy cechuje się pionowym gromadzeniem się helis w błonie cytoplazmatycznej. Peptydy tworzą w centrum membrany pasmo z kanałem w środku, które przypomina beczkę, a utworzone w błonie pory prowadzą do wypływu składników cytoplazmy oraz spadku potencjału błonowego (Yang et al., 2001). W taki sposób działają peptydy takie jak pardaksyna (Shai, 1999), ceratotoksyna (Shenkarev et al., 2013) czy też bakteriocyny klasy II (Campagna et al., 2007). W modelu dywanowym peptydy pokrywają całą powierzchnię błony jak dywan, nie przenikając przez nią. W dalszej kolejności niepolarne łańcuchy boczne peptydów wiążą hydrofobowy rdzeń błony, podczas gdy reszty polarne z fosforanami lipidów tworzą micelle z rozdrobnioną błoną. W obecności dużego stężenia peptydów dochodzi do destabilizacji i rozerwania błony, spadku potencjału błonowego i wycieku składników cytoplazmy (Brogden, 2005). Do takich peptydów zaliczamy cekropiny (Subbalakshmi & Sitaram, 1998), indolicydyny (Fernandez et al., 2012). W trzecim mechanizmie porów toroidalnych peptydy oddziałują z głównymi grupami lipidów, indukują krzywiznę dwuwarstwy i wstawiają się prostopadle do dwuwarstwy błony (Lohner & Prossnigg, 2009). Dzięki temu peptydy tworzą polimery peptydowo-lipidowe i ostatecznie przedostają się do komórki bakteryjnej powodując jej śmierć (Sharma et al., 2016). Przykładem takich peptydów są tritryptycyna i pleurocydyna pleurocidin działające według tego modelu. Z kolei ujemnie naładowane AMPs takie jak ludzki peptyd DCD-1L tworzą oligomery stabilizowane przez jony  $Zn^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , co pozwala na wytworzenie kanałów jonowych w obrębie dwuwarstwy lipidowej (Paulmann et al., 2012).



Ryc. 8. Schematyczne przedstawienie oddziaływań peptydów antybakteryjnych z błoną bakteryjną. Regiony AMP przedstawione są odpowiednio kolorem niebieskim grupy hydrofobowe, a kolorem czerwonym hydrofilowe. Wszystkie mechanizmy zaczynają od adsorpcji peptydów na błonie komórki bakteryjnej. (A) Model klepkowo-beczkowy (B) Model dywanowy (C) Model porów toroidalnych; zmodyfikowano na podstawie Bahar & Ren, 2013.

### 1.8. Peptydy antybakteryjne ukryte w większych białkach

Do tej pory zjawisko „ukrytych peptydów antybakteryjnych” w pierwszorzędowych strukturach białek powiązane było głównie z eukariotycznymi organizmami wielokomórkowymi, a nie z białkami bakterii, czy bakteriofagów. Przykładem białka, w którego sekwencji pierwszorzędowej ukryty był peptyd antybakteryjny jest ludzka apolipoproteina E, naturalnie biorąca udział w transporcie cholesterolu i innych lipidów we krwi i centralnym układzie nerwowym. Sekwencja peptydu antybakteryjnego odpowiada sekwencji białka 133-150, a syntetyczny peptyd ApoE (133-150) posiada szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego przy znikomym efekcie cytotoksycznym wobec szeregu ludzkich linii komórkowych (Pane et al., 2016). Co ciekawe nie tylko peptyd ApoE wykazuje działanie antybakteryjne. Okazuje się, że szereg peptydów syntetyzowanych na podstawie sekwencji  $\alpha$ -helikalnego rejonu wiążącego receptor białka ApoE wykazuje aktywności podobne do aktywności całego białka, a peptydy takie jak ApoEdp i ApoE23 wykazują zarówno działanie przeciwbakteryjne, jak i przeciwzapalne (Pane et al., 2016). Kolejnym peptydem o podobnych właściwościach antybakteryjnych jest 20-aminokwasowy peptyd

GKY20 wywodzący się z C-terminalnego regionu łańcucha ciężkiego ludzkiej trombiny (Kasetty et al., 2011). Innym przykładem jest szereg peptydów syntetyzowanych na podstawie sekwencji kolagenu VI: GVR28, FLY25, FFL25, VTT30, SFV33 i DVN32 (Abdillahi et al., 2018). Wykazują one istotne właściwości przeciwbakteryjne przeciwko *S.aureus*, *E. coli* oraz *P. aeruginosa*, a mechanizm ich działania opiera się na destabilizacji bakteryjnej błony komórkowej (Abdillahi et al., 2018).

Wiążąca żelazo laktoferyna o właściwościach antybakteryjnych również zawiera ukryte w jej sekwencji peptydy tj. LF1-11, laktoferrampinę, czy laktoferycynę. Uwalniane są one w wyniku cięcia laktoferyny przez proteazy znajdujące się w ludzkim przewodzie pokarmowym, czy w miejscach infekcji bakteryjnej, co wzmacnia naturalną funkcję białka w organizmie. Peptyd LF1-11 (o sekwencji odpowiadającej pierwszemu jedenastu resztom aminokwasowym laktoferyny) jest wysoce skuteczny wobec *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* oraz różnych gatunków *Candida*. Laktoferrampina składająca się z reszt 268-284 ma szerokie działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko kilku bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, w szczególności *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Ostatni peptyd wywodzący się z sekwencji tego białka laktoferycyna (aa 17-41) wykazuje szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego oraz jest wysoce aktywna przeciwko *Candida albicans*. Oprócz tego peptyd ten ma działanie przeciwwirusowe (Sinha et al., 2013).

Jak już wspomniałam o peptydach wywodzących się z większych białek bakteryjnych lub pochodzenia bakteriofagowego wiadomo niewiele. Często naturalne działanie białek litycznych (tj. endolizyny) wobec komórek bakterii Gram-ujemnych tłumaczono obecnością struktur amfipatycznych położonych zazwyczaj w rejonach C-terminalnych, które miały powodować destabilizację błony zewnętrznej tych bakterii (Xu et al., 2021) Przykładem takiego białka jest endolizyna LysAB2 wywodząca się z litycznego bakteriofaga  $\Phi$ AB2 infekującego komórki *A. baumannii*. Endolizyna LysAB2 lizuje *in vitro* zarówno bakterie Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie (Lai et al., 2011). Zbudowana jest z N-terminalnej domeny katalitycznej o aktywności N-acetylmuramidazy oraz regionu C-terminalnego o silnym ładunku dodatnim. Peptydy syntetyzowane na podstawie sekwencji C-terminalnej białka wykazywały silne właściwości antybakteryjne, a peptyd o nazwie P3 spowodował 13-krotne zmniejszenie liczby bakterii *A. baumannii* w jamie otrzewnej i 27-krotne we krwi w mysim modelu infekcji *A. baumannii* (Peng et al., 2017).

Istnieją algorytmy tj. AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa>), które pozwalają na skanowanie sekwencji większych białek w poszukiwaniu regionów o potencjalnej funkcji antybakteryjnej (wykazujących cechy AMPs).

Co ciekawe w 2022 roku amerykańska firma ContraFect Corporation zgłosiła patent na zastosowanie przeciw bakteriom Gram-ujemnym takim jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, czy *Franciscella tularensis* peptydów syntetyzowanych na podstawie sekwencji pięciu potencjalnych lizyn: GN37, GN2, GN4, GN14, GN43 produkowanych przez bakteriofagi. Sekwencje peptydów wytypowano w wyniku analizy bioinformatycznej, jednak w patencie nie wymieniono algorytmów jakimi się posługiwano. Badania wykazały, że w obecności antybiotyku Polimyksyny B łączna pula peptydów o nazwach: PGN4, FGN4-1, FGN4-2, FGN4-3 oraz FGN4-4 (każdy w stężeniu 25 µg/ml) powodowała obniżenie liczby bakterii *P. aeruginosa* PAO1 w surowicy ludzkiej o co najmniej 2 log CFU/ml większe niż sam antybiotyk (<https://www.freepatentsonline.com/y2023/0050560.html>). Badania są więc obiecujące pod kątem antybakteryjnego wykorzystania peptydów syntetyzowanych na podstawie sekwencji większych białek litycznych.

Nie należy zapomnieć o odkrytej w naszym laboratorium Intestinalinie wywodzącej się z białka litycznego LysC (Plotka i in., 2020). Jest to pierwszy peptyd wywodzący się z większego białka kodowanego przez bakterię, a nie przez bakteriofaga, czy organizm eukariotyczny. Nasuwają się więc pytania, czy regiony podobne do sekwencji Intestinaliny znajdują się w innych białkach litycznych wykazujących podobieństwo do LysC?

## 2. CEL PRACY

Celem mojej pracy była analiza aktywności i funkcji peptydów antybakteryjnych stanowiących regiony większych białek litycznych ze szczególnym uwzględnieniem peptydu antybakteryjnego Intestianliny.

Wyznaczono następujące cele cząstkowe:

1. Jaka jest specyficzność substratowa peptydu Intestinaliny?
2. Czy peptyd działa na biofilm bakteryjny?
3. Jaki jest mechanizm jego aktywności?
4. Czy sekwencje podobnych peptydów o właściwościach antybakteryjnych zawarte są w sekwencjach innych białek litycznych?



### 3. MATERIAŁY

#### 3.1. Szczepy bakteryjne

Wykorzystane w tej pracy szczepy bakteryjne opisano w Tabeli 2.

Tabela 2. Szczepy bakteryjne.

Szczepy bakteryjne	Charakterystyka	Źródło
<i>Acinetobacter baumannii</i> CRAB KPD 205	Szczep kliniczny oporny na karbapenemy (PIP, TZP, CAZ, FEP, IMP, MEM, CIP, LVX,SXT)	UCK/ KPD, Polska
<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR KPD 581	Wielolekooporny szczep kliniczny (AMP, AMC, TZP, CEP, CXM, FOX, CTX, CAZ, FEP, ETP, MEM, CIP, SXT, TOB)	UCK/ KPD, Polska
<i>Acinetobacter baumannii</i> KPD 735	Szczep kliniczny (wrażliwy na wszystkie badane antybiotyki)	UCK/ KPD, Polska
<i>Acinetobacter baumannii</i> RUH134	Szczep referencyjny europejskiego klonu II (PIP, TE, GM, STX)	KM UG, Polska
<i>Citrobacter braaki</i> KPD 218	Szczep kliniczny (AMP, AMC, TZP, CEP, CXM, FOX, CTX, CAZ, FEP, CSL, ETP, SXT)	UCK/ KPD, Polska
<i>Deinococcus radiodurans</i> ATCC 13939		ATCC, USA
<i>Enterobacter cloacae</i> KPD 297	Szczep kliniczny (AMP, AMC, TZP, CEP, CXM, FOX, CTX, CAZ, FEP, CSL, ETP, CIP, SXT)	UCK/ KPD, Polska
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)[pRARE]		KM UG, Polska
<i>Escherichia coli</i> KPD 217	Szczep kliniczny (AMP, AMC, TZP, CEP, CXM, FOX, CTX, CAZ, FEP, CSL, SXT)	UCK/ KPD, Polska
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPD 298	Szczep kliniczny (AMP, AMC, TZP, CEP, CXM, FOX, CTX, CAZ, FEP, ETP, IMP, MEM, AKN, CIP, SXT, TOB)	UCK/ KPD, Polska
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 430	Szczep kliniczny (PIP, TZP, CAZ, FEP, CIP, LVX, TCC, TOB)	KPD, Polska

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 431	Szczep kliniczny (GM, PIP, TZP, CAZ, FEP, TCC, MEM)	KPD, Polska
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	(AMP, PIP, TZP)	KM UG, Polska
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (szczep referencyjny)	Szczep kliniczny (oporność pośrednia na CAZ i AMO)	ATCC, USA
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA KPD 740	Szczep kliniczny (E, CC, TE)	KPD, Polska
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA KPD 425	Szczep kliniczny (CIP, LVX, E, CC, TE, FOX)	KPD, Polska
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KPD 440	Szczep kliniczny (GM, CIP, LVX, E, CC)	KPD, Polska
<i>Staphylococcus hominis</i> KPD 910	Szczep kliniczny (TE, VA)	KPD, Polska
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> KPD 741	Szczep kliniczny (CIP, LVX, E, CC)	KPD, Polska
<i>Thermus flavus</i> MAT 1087		MATIS, Islandia
<i>Thermus parvatiensis</i> DSM 21745		DSMZ GmbH, Niemcy
<i>Thermus thermophilus</i> HB8 DSM 579		DSMZ GmbH, Niemcy
<i>Thermus thermophilus</i> HB27 DSM 7039		DSMZ GmbH, Niemcy
<i>Thermus scotoductus</i> MAT2119		MATIS, Islandia

Szczepy kliniczne oznaczone UCK/KPD otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) w Gdańsku dzięki uprzejmości kierownika Zakładu dr. Marka Bronka. Testy wrażliwości na antybiotyki wykonano w UCK zgodnie z zaleceniami EUCAST (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Wszystkie otrzymane szczepy zostały zdeponowane w Kolekcji Plazmidów i Mikroorganizmów (KPD), Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego. Szczepy, których źródło oznaczono jako KPD zostały pozyskane bezpośrednio z Kolekcji Plazmidów i Mikroorganizmów (KPD), Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego dzięki uprzejmości Kurator Kolekcji dr n. med. Anny-Kariny Kaczorowskiej; ATCC – American Type Culture Collection; DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH; KM – Katedra Mikrobiologii; MATIS – firma R&D, Reykjavík, Iceland.

### Stosowane antybiotyki to:

AMC – amoksycylina-kwas klawulanowy, AKN – amikacyna, AMO – amoksycylina, AMP – ampicylina, CAZ – ceftazydim, CC – klindamycyna, CEP – cefalotyna, CIP– cyprofloksacyna, CSL – cefoperazon-sulbaktam, CTX – cefotaksym, CXM – sól sodowa cefuroksymu, E – erytromycyna, ETP – ertapenem, FEP – cefepim, FOX – cefoksytyna, GM – gentamycyna, IMP – imipenem, LVX – lewofloksacyna, MEM – meropenem, PIP – piperacylina, SXT – trimetoprim-sulfametoksazol, TCC – tikarcylina-kwas klawulanowy, TE – tetracyklina, TOB – tobramycyna, TZP – piperacylina-tazobaktam, VA – wankomycyna.

### 3.2. Plazmidy bakteryjne

Wykorzystane w tej pracy plazmidy opisano w Tabeli 3.

Tabela 3. Plazmidy bakteryjne.

Nazwy plazmidu	Charakterystyka	Źródło
pET15b	Plazmid zawiera znacznik histydynowy 6x His oraz niesie gen oporności na ampicylinę.	Novagen
pET15b_GasC	Plazmid zawierający gen kodujący białko GasC, wklonowano w miejsce NdeI i BamHI do wektora pET15b. Zawiera znacznik histydynowy 6x His oraz niesie gen oporności na ampicylinę.	KM UG
Pet15b_CT4	Plazmid zawierający gen kodujący białko GasC, wklonowano w miejsce NdeI i BamHI do wektora pET15b. Zawiera znacznik histydynowy 6x His oraz niesie gen oporności na ampicylinę.	KM UG
pET15b_LysC	Plazmid zawierający gen kodujący białko LysC, wklonowano w miejsce NdeI i BamHI do wektora pET15b. Zawiera znacznik histydynowy 6x His oraz niesie gen oporności na ampicylinę.	KM UG
pET15b_PhiKo	Plazmid zawierający gen kodujący białko PhiKo, wklonowano w miejsce NdeI i BamHI do wektora pET15b. Zawiera znacznik histydynowy 6x His oraz niesie gen oporności na ampicylinę.	KM UG

### 3.3. Sekwencje aminokwasowe białek

Wykorzystane w tej pracy białka opisano w Tabeli 4.

Tabela 4. Sekwencje rekombinowanych białek.

Nazwa białka, ilość aminokwasów	Sekwencja aminokwasowa	Masa cząsteczkowa
CT4 (+ N-terminalny His-tag 194 aa, bez 173 aa)	N' - MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM KNIFRRALRRVFKARQVQPKIVEVNY KWAQPLQFTMKPQMIVYHHTVEIGKT PEEIHQLHVNRGWAGIGYHFYIRKDG TIYRGRPENAVGSHAPGVNNIALGIA FEGNFMVEKPTEQQLNSAIIILSKYLV NKYGIKELRRHKDVKPTTECPGINFP FDYIKSKVLGTTTNKTA - C'	22,2 kDa
GasC (+ N-terminalny His-tag 187 aa, bez 167 aa)	N' - MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM KSVVRKLLKKRMRQSPPPMPKIVEVD YKVASPLSYTLKPTMIVYHHTAEDNL TPQRIDELHKARGWSGIGYHFYIRKD GTIYRGRPENAI GAHAPS VNSKALGI ALEGNFNEEFVTKEQEDSLIALSKYL VNKYNIKDIKRHKDVTNTECPGKNFP FKEIKAELKL - C'	21,4 kDa
LysC (+ N-terminalny His-tag 192, bez 172 aa)	N' - MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM KNLLRRIRRKLRNKFSRSDVIKTPKI VEVNYTWATPLSYNFNPNMIVYHHTV DNNMTPQKIDEIHKQRGWSGIGYHFY IRKDGTIYRGRPENAVGSHAPGVNAR AFGIASEGNFNEEYVTPQQMTSLIAL SRYLMNKYNI TDLKRHKDVRQTECPG NNFPFEEIKAKLNVK - C'	22,3 kDa
PhiKo (+ N-terminalny His-tag 190, bez 170 aa)	N' - MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM NWIEFWRSKPTWRHRPVDPAYIVLH HTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHG YHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGE YNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERA PGWKS LAWLVREL RKHDSGLRLRLVR HKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQ EQVETLKVAGVIA - C'	21,6 kDa

Kolorem zielonym zaznaczono sekwencje pochodzące z wektora pET15b. Wszystkie konstrukty otrzymane zostały z firmy BioCat, Heidelberg Niemcy po uprzednim wysłaniu sekwencji nukleotydowych.

#### 3.4. Sekwencje aminokwasowe peptydów antybakteryjnych

Wykorzystane w tej pracy peptydy opisano w Tabeli 5. Wszystkie peptydy syntetyzowane były we współpracy z dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG z Katedry Chemii Biomedycznej, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego.

**APLP** – peptyd służący jako kontrola negatywna (nie ma działania przeciwbakteryjnego i jest częścią ludzkiego białka podobnego do amyloidu 2 zaangażowanego w patogenezę choroby Alzheimera)

**LL-37** – peptyd służący jako kontrola pozytywna (posiada silne i dobrze udokumentowane właściwości antybakteryjne)

**VVR-20** – peptyd pochodzący z N-terminalnego końca białka GasC (aa 4-23), o długości 20 aa i zaczynający się od aminokwasów: walina, walina, arginina (VVR)

**IFR-20** – peptyd pochodzący z N-terminalnego końca białka CT4 (aa 4-23), o długości 20 aa i zaczynający się od aminokwasów: izoleucyna, fenyloalanina, arginina (IFR)

**Intestinalina (P30)** – peptyd pochodzący z N-terminalnego końca białka LysC (aa 2-31), o długości 30 aa

**RAP-29** – peptyd pochodzący z C-terminalnego końca białka PhiKo (aa 105-133), o długości 29 aa i zaczynający się od aminokwasów: arginina, alanina, prolina (RAP)

Tabela 5. Sekwencje peptydów.

Nazwa peptydu	Sekwencja aminokwasowa peptydu	Masa cząsteczkowa
APLP (17 aa)	RVGGLEEEERESVGPLRE	1,95 kDa
LL-37 (37 aa)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPTES	4,49 kDa
VVR-20 (20 aa)	VVRKLLKKRMRRQSPPMPKI	2,45 kDa
IFR-20 (20 aa)	IFRRALRRVFKARQVQPKIV	2,48 kDa
Intestinalina (30 aa)	KNLLRRIIRKLRNKFSDVIKTPKIVEVN	3,68 kDa
RAP-29 (29 aa)	RAPGWKSLAWLVRELKRDHSGLRRLVRH	3,51 kDa

### 3.5. Płytki do hodowli komórkowych oraz przeprowadzanych doświadczeń

**96-dolkowe płytki firmy Corning** (Assay plate, Flat bottom, non-Binding Surface, Polystyrene, nr kat. 3641)

**96-dolkowe płytki firmy Eppendorf** (Cell Culture Plate, 96-Well, Non-treated, sterile, with lid, flat bottom, nr kat. 0030730011)

**96-dolkowe płytki Nunclon™ Delta Surface** (VWR® Tissue Culture Plate, Non-treated, 96 Wells-U, sterilized, nr kat. 734-2782)

**96-dolkowe płytki OptiPlate-96 F HB** (Black 96-well, Microplate OptiPlate, PerkinElmer).

### 3.6. Wzorce masowe

**Wzorzec masowy białek w zakresie 10-180 kDa** – PageRuler Prestained Protein Ladder  
(Thermo Scientific, nr kat. 26617)

### 3.7. Antybiotyki

**Ampicylina (Amp)** – 100 mg/ml w wodzie destylowanej, stężenie końcowe 100 µg/ml

**Chloramfenikol (Cm)** – 34 mg/ml w etanolu, stężenie końcowe 34 µg/ml

### 3.8. Detergenty

**DDM** – β-D-maltozyd n-dodecyłu – stężenie końcowe 20 mM

**DPC** – n-dodecylofosfocholina – stężenie końcowe 20 mM

**LDAO** – N-tlenek N,N-dimetylododecyloaminy – stężenie końcowe 20 mM

**SDS** – laurylosiarczan sodu – stężenie końcowe 20 mM

### 3.9. Podłoża wzrostowe

#### **Pożywka płynna LB (Luria Broth), pH 7,2**

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
Woda destylowana	do 1000 ml

#### **Pożywka stała LA (Luria Agar), pH 7,2**

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
Agar bakteryjny	15 g
Woda destylowana	do 1000 ml

#### **Pożywka płynna MH (Mueller-Hinton)**

Sole Castenholz'a	2 g
Hydrolizat kazeiny	17,5 g
Skrobia	1,5 g
Woda destylowana	do 1000 ml

**Pożywka płynna TM**

Ekstrakt drożdżowy	2 g
Polipepton	4 g
NaCl	1 g
Sole Castenholz'a	10 ml
Woda destylowana	do 1000 ml

**Pożywka płynna TSB (Tryptic Soy Broth)**

Hydrolizat kazeinowy	17 g
Chlorek sodu	5 g
Hydrolizat sojowy	3 g
Fosforan dipotasu	2,5 g
Glukoza	2,5 g
Woda destylowana	do 1000 ml

**Sole Castenholz'a, pH 7,2**

Kwas nitrylotrioctowy	1 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1 g
CaSO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,6 g
NaCl	0,8 g
KNO <sub>3</sub>	1,03 g
NaNO <sub>3</sub>	6,89 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,11 g
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O roztwór 0,03%	10 ml
Sole Nitsch'a	10 ml
Woda destylowana do	1000 ml

**Sole Nitsch'a, pH 8,2**

MnSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	2,2 g
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 g
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,016 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,025 g
CoCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,046 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 ml

Woda destylowana do 1000 ml

### 3.10. Odczynniki do elektroforezy poliakrylamidowej

#### **Bufor SDS-PAGE, pH 8,3**

Roztwór 10 × stężony		Roztwór 1 × stężony	
SDS	10 g	Bufor 10 × SDS-PAGE	100 ml
Tris	30 g	Woda destylowana	900 ml
Glicyna	144 g		
Woda destylowana	do 1000 ml		

#### **Bufor Tris-HCl, pH 8,8 (dolny)**

Tris 181,6 g (1,5 M)  
SDS 4 g  
Woda destylowana do 1000 ml

#### **Bufor Tris-HCl, pH 6,8 (górny)**

Tris 60,6 g (0,5 M)  
SDS 4 g  
Woda destylowana do 1000 ml

#### **Roztwór 30% akrylamidów**

Akrylamid 29 g  
N,N-metyleno-bis-akrylamid 1 g  
Woda destylowana do 1000 ml

#### **Żel poliakrylamidowy rozdzielający (dolny) 12,5%**

Bufor Tris-HCl, pH 8,8 5,6 ml  
Roztwór 30% akrylamidów 9,7 ml  
Woda destylowana 7,1 ml  
TEMED 90 µl  
10% nadsiarazan amonu 180 µl



**Żel poliakrylamidowy zagęszczający (górny) 4%**

Bufor Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Roztwór 30% akrylamidów	1,4 ml
Woda destylowana	5,7 ml
TEMED	40 µl
10% nadsiarczan amonu	80 µl

**Barwnik Laemmli 4 × stężony**

Tris-HCl, pH 6,8	0,25 M
SDS	8%
β-merkaptoetanol	8%
Glicerol (100%)	40%
Bromofenol blue	0,02%
Woda destylowana	do 10 ml

**Barwnik Coomassie Brilliant Blue (CBB)**

Roztwór 10 × stężony		Roztwór 1 × stężony	
Coomassie Brilliant Blue	2,5 g	Barwnik 10 × CBB	500 ml
Kwas octowy	100 ml	Kwas octowy	200 ml
Metanol	450 ml	Woda destylowana	do 1000 ml
Woda destylowana	do 1000 ml		

**Odbarwiacz 1 : 2 : 8**

Kwas octowy	100 ml
Metanol	200 ml
Woda destylowana	800 ml

**3.11. Odczynniki stosowane do oczyszczania białek****Złoże TALON** (TaKaRa, nr kat. 635503)**Worek dializacyjny** (SERVA, nr kat. 44110.02)

**Bufor 2 × NPi, pH 8,0**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 M
NaCl	0,3 M
Imidazol	0,001 M
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor NPi-10**

Bufor 2 × NPi pH 8,0	500 ml
Triton X-100	0,1%
Glicerol	10%
Imidazol	0,001 M
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor NPi-20**

Bufor 2 × NPi pH 8,0	500 ml
Triton X-100	0,1%
Glicerol	10%
Imidazol	0,002 M
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor NPi-150**

Bufor 2 × NPi pH 8,0	500 ml
Triton X-100	0,1%
Glicerol	10%
Imidazol	0,15 mM
Woda destylowana	do 1000 ml

## 3.12. Bufory wykorzystane do analizy białek

**20 mM HEPES, pH 7,4** (Sigma-Aldrich, nr kat. H3375)**10 mM MES, pH 6,0** (Sigma-Aldrich, nr kat. M8250)**10 mM fosforan (KPi), pH 8,0****PBS, pH 7,3** (Sigma-Aldrich, nr kat. P4417-50TAB)

**Bufor X do dializy**

KCl	50 mM
Fosforan potasu, pH 8,0	25 mM
Glicerol	50%
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor Y do analitycznego wirowania**

NaCl	100 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
Fosforan sodu, pH 6,8	5 mM
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor Z do oczyszczania substratu**

Tris-HCl, pH 7,7	20 mM
Chloroform	500 ml
Woda destylowana	do 1000 ml

## 3.13. Bufory używane do określenia optimum aktywności

<b>Bufor</b>	<b>pH</b>	<b>Bufor</b>	<b>pH</b>
20 mM octan sodu	5,0	20 mM Tris-HCl	5,5
20 mM octan sodu	5,5	20 mM Tris-HCl	6,0
20 mM octan sodu	6,0	20 mM Tris-HCl	6,5
		20 mM Tris-HCl	7,0
		20 mM Tris-HCl	7,5
		20 mM Tris-HCl	8,0
		20 mM Tris-HCl	8,8

## 3.14. Odczynniki do pomiaru stężenia białka metodą Bradford

**Odczynnik Bradford** (Sigma-Aldrich, nr kat. B6916)**BSA:** roztwory wzorcowe o stężeniu 0,25 – 1,4 mg/ml (EURx, nr kat. E4020-01)

## 3.15. Odczynniki wykorzystane do analizy biofilmu

**Fiolet krystaliczny 0,1%** (QCA, nr kat. 998710)**Kwas octowy 33%** (Poch, nr kat. 64-19-7)

### 3.16. Odczynniki stosowane do mikroskopii fluorescencyjnej

**Zestaw do oznaczania żywotności bakterii LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit** (Thermo Fisher, nr kat. L7012)

**Szkiełka mikroskopowe** (Bionovo, nr kat. S-1395)

**Szkiełka nakrywkowe 35 x 64 mm** (MICRO SHOP, nr kat. AGL463564-1)

#### **Bufor TBE (TRIS/Boran/EDTA)**

Roztwór 10 × stężony		Roztwór 1 × stężony	
Tris	108 g (890 mM)	Bufor 10 × TBE	100 ml
Kwas borowy	55 g (889 mM)	Woda destylowana	900 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	40 ml (0,02 mM)		
Woda destylowana	do 1000 ml		

Podkładka agarozowa 1% do unieruchamiania komórek bakteryjnych na szkiełkach podstawowych

#### **Agaroz niskotopliwa** (EURx, nr kat. E0303)

Low Melting Agarose 1 g

Bufor TBE 1 × 100 ml

## 4. METODY

### 4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych

W celu uzyskania komórek kompetentnych wybraną kolonię bakteryjną zaszczepiono w 10 ml pożywki płynnej LB (Materiały 3.9). Hodowlę inkubowano przez noc w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodzono w 25 ml nowej porcji pożywki LB przez zaszczepienie w proporcji 1:50 i umieszczono ponownie w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C do uzyskania  $OD_{600} = 0,4$ . Po tym czasie schłodzono hodowlę w lodzie przez 15 min i przelano do jałowego falkonu, a następnie odwirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C, 2000 × g, 10 min). Supernatant odrzucono, a osad bakteryjny zawieszono w 10 ml zimnego 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubowano przez 30 min w lodzie. Zawiesinę bakterii odwirowano, zachowując te same warunki co poprzednio, a następnie osad bakteryjny zawieszono w 3,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i 1,5 ml 50% glicerolu. Ostatecznie komórki kompetentne porpcjowano po 500 µl i przechowywano w temperaturze -80°C.

### 4.2. Transformacja plazmidowa komórek kompetentnych

Do schłodzonej probówki typu Eppendorf zawierającej 100 µl wybranej porcji szczepu komórek kompetentnych (Metoda 4.1) dodano 1 µl (20-50 ng) wybranego plazmidu. Mieszaninę inkubowano w lodzie przez 30 min, a następnie poddano szokowi termicznemu w termobloku przez 3 min w temperaturze 42°C. Po tym czasie probówkę umieszczono na 2 min w lodzie, a następnie do komórek dodano 500 µl pożywki płynnej LB (Materiały 3.9). Probówki z mieszaniną reakcyjną umieszczono w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C przez 45 min. Po tym czasie na płytki ze stałym podłożem LA i odpowiednim antybiotykiem (Materiały 3.7) za pomocą głaszczki wysiano 50-200 µl komórek bakteryjnych. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

### 4.3. Nadprodukcja białka w systemie bakteriofaga T7

Wybraną kolonię spośród otrzymanych transformantów (Metoda 4.2) zaszczepiono w 10 ml pożywki płynnej LB (Materiały 3.9) z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (Materiały 3.8) i 0,4% glukozy i wytrząsano przez noc w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C. Następnego dnia hodowlę nocną odmłodzono w 1000 ml pożywki

LB przez zaszczepienie w proporcji 1:50 i umieszczono ponownie w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C do uzyskania  $OD_{600} = 0,4$ . Po uzyskaniu pożądanego gęstości, hodowlę zaindukowano 1 mM IPTG i ponownie prowadzono inkubację przez 4 h. Po tym czasie hodowlę bakteryjną zwirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C, 10000 × g, 20 min). Supernatant odrzucono, a osad bakteryjny zawieszono w buforze NPi-10 (Materiały 3.11) i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

#### 4.4. Oczyszczanie białka

##### 4.4.1. Liza komórek bakteryjnych

Lizę komórek bakteryjnych przeprowadzono za pomocą sonikacji przy użyciu urządzenia Sonicator Ultrasonic Processor XL2020 (Misonix). Osad bakteryjny rozmrożono i zawieszono w buforze NPi-10 (Materiały 3.11). Sonikację prowadzono w lodzie przez 6 min, puls 10 sek., przerwa 1 min. Uzyskany roztwór wirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C, 11000 × g, 20 min), a uzyskany supernatant poddano dalszym analizom.

##### 4.4.2. Chromatografia powinowactwa na złożu TALON

W celu zrównoważenia złoża TALON (Materiały 3.11) przemyto je 10 objętościami jałowej wody, a następnie buforu NPi-10 (Materiały 3.12). Uzyskany lizat komórkowy dodano do probówki typu falkon zawierającego 1,5 ml złoża TALON i delikatnie zawieszono, mieszając od czasu do czasu na lodzie (4°C, 20 min). Po tym czasie całość naniesiono na kolumnkę 15 ml i zebrano przesącz. Następnie przemyto złożo 10 objętościami buforu NPi-10 oraz NPi-20 (Materiały 3.11), a elucję białka prowadzono przy 10 ml buforu NPi-150 (Materiały 3.11), gdzie frakcje zbierano po 1 ml.

##### 4.4.3. Dializa

Po przeprowadzonej analizie frakcji na żelu poliakrylamidowym (Metody 4.6.1) wybrano próbki, w których znajdowało się oczyszczane białko. Dializę nastawiono w worku dializacyjnym (Materiały 3.11) na noc w buforze X do dializy (Materiały 3.12) w temperaturze 4°C na mieszadle magnetycznym. Otrzymane białko porcjowano do probówek typu Eppendorf po 500 μl i przechowywano w 4°C do bieżących eksperymentów oraz w -80°C w celu przechowywania na dłuższy okres czasu.

#### 4.4.4. Sączenie molekularne (SEC)

Dla potwierdzenia czystości badanego białka wykonano sączenie molekularne za pomocą urządzenia ÄKTA Pure 25 system (GE Healthcare) z użyciem kolumny Superdex75 10/300 GL (Cytiva). Kolumnę zrównoważono buforem Y (Materiały 3.12), a następnie naniesiono próbkę białka o objętości 500  $\mu$ l o stężeniu 1 mg/ml. Szybkość przepływu kolumny ustawiono na 0,5 ml/min i wszystkie przebiegi przeprowadzono w temperaturze 8°C. Czas retencji białka monitorowano przy długości fali 280 nm. Kolumnę kalibrowano białkami o znanych masach cząsteczkowych: aprotynina 10 kDa, rybonukleaza A 13,7 kDa, anhydraza węglanowa 29 kDa, albumina jaja kurzego 44 kDa i konalbumina 75 kDa (GE Healthcare, nr kat. 28-4038-41).

#### 4.5. Pomiar stężenia białka

Ilość otrzymanego białka określono poprzez zastosowanie metody Bradford. W 96-dołkowej płytce Eppendorf (Materiały 3.5) umieszczono 125  $\mu$ l odczynnika Bradford Reagent (Materiały 3.14) do którego dodano 2,5  $\mu$ l białka w trzech powtórzeniach lub jego rozcieńczenie. Dokładnie wymieszano składniki i mierzono absorbancję próbki przy długości fali 595 nm za pomocą czytnika płytek Sunrise (TECAN). Dla kontroli użyto buforu, wobec którego dializowano białko. Stężenie białka określono w oparciu o krzywą wzorcową na podstawie zależności absorbancji od stężenia białka wzorcowego BSA w stężeniach: 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,4 mg/ml (Materiały 3.14).

#### 4.6. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

##### 4.6.1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

W pierwszej kolejności przygotowano 12,5% roztwór dolnego żelu poliakrylamidowego (Materiały 3.10) i wylano go między płyty aparatu do elektroforezy. Następnie górną warstwę pokryto niewielką ilością wody destylowanej, w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza oraz zapewnienia odpowiednich warunków do polimeryzacji żelu. Po spolimeryzowaniu żelu dolnego usunięto wodę i dodano przygotowany wcześniej 4% roztwór górnego żelu poliakrylamidowego (Materiały 3.10), w którym umieszczono przed jego polimeryzacją grzebień.

#### 4.6.2. Wykonanie prób do elektroforezy białkowej

Aby przygotować próbki z nadprodukcji białka pobrano 0,5 ml hodowli bakteryjnej przed indukcją oraz 1 ml po indukcji IPTG. Bakterie zwirowano ( $18000 \times g$ , 3 min), a uzyskany osad zawieszono w 20  $\mu$ l buforu Laemmli (Materiały 3.10). Tak przygotowane próbki gotowano w łaźni wodnej ( $100^{\circ}\text{C}$ , 5 min) i wirowano ( $18000 \times g$ ; 30 s).

#### 4.6.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Gotowe próbki nanoszono do studzienek przygotowanego wcześniej żelu poliakrylamidowego (Metoda 4.6.1) 10  $\mu$ l przed indukcją oraz 5  $\mu$ l po indukcji IPTG. W celu określenia wielkości białka na żelu, naniesiono 2  $\mu$ l markera białkowego (Materiały 3.6). Rozdział prowadzono w roztworze  $1 \times$  SDS-PAGE (Materiały 3.11) przy natężeniu prądu 180 mA, aż do wyjścia barwnika. Po rozdziale elektroforetycznym barwiono żel w barwniku Coomassie Brilliant Blue (Materiały 3.10), po czym umieszczono go w odbarwiaczu (Materiały 3.10), aż do momentu odbarwienia się tła.

#### 4.7. Analiza bioinformatyczna

Sekwencje białek porównano w programie CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> dostęp: 29.01.2023 r.). Oprogramowanie internetowe AMPA zastosowano w celu poszukiwania regionów białek litycznych o potencjale antybakteryjnym. Właściwości antybakteryjne i właściwości fizykochemicznych peptydów w tym: skład aminokwasowy, masa cząsteczkowa, stosunek hydrofobowy, ładunek netto i potencjał wiązania białek określano za pomocą kalkulatora (APD3). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa syntetycznych peptydów została przewidziana przez algorytm i Kolekcję Peptydów Przeciwdrobnoustrojowych (CAMP). To narzędzie opiera się na czterech różnych algorytmach: Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) i Discriminant Analysis (DA). Model ANN przewiduje peptydy, które mają być przeciwdrobnoustrojowe lub nie przeciwdrobnoustrojowe (AMP lub NAMP).



#### 4.8. Test antybakteryjne

Testy antybakteryjne przeprowadzono wobec szczepów bakteryjnych (Materiały 3.1). Nocną hodowlę bakteryjną odmłodzono w 20 ml nowej porcji pożywki TSB (Materiały 3.9) przez zaszczepienie w proporcji 1:100 i wstawiono do wytrząsarki rotacyjnej w temperaturze 37°C, aż do uzyskania  $OD_{600} = 0,5$ . Następnie 1 ml hodowli zwirowano w wirówce z chłodzeniem (4°C, 4000 × g, 15 min), supernatant zlano, a osad przepłukano w 1 ml buforu 20 mM HEPES pH 7,4 (Materiały 3.12) i ponownie zwirowano w tych samych warunkach. Supernatant ponownie zlano, a osadzone komórki zawieszono w 0,5 ml tego samego buforu. Następnie zawiesinę bakteryjną rozcieńczono 100-krotnie w 20 mM buforu HEPES pH 7,4. Przygotowano mieszaninę o objętości 450 µl, w której skład wchodziła taka ilość białka, aby stężenie końcowe wynosiło 500 µg/ml (21,4 µM) (lub peptydu, aby stężenie wynosiło 5/3 µM) oraz odpowiednią ilość 100-krotnie rozcieńczonej zawiesiny bakteryjnej (w przybliżeniu  $1 \times 10^6$  komórek bakteryjnych). Równocześnie przygotowano kontrole negatywną, czyli bakterie zawieszono w buforze reakcyjnym. Mieszaninę inkubowano (37°C, 90 min). Po upływie tego czasu przeprowadzono seryjne rozcieńczenia w tym samym buforze odpowiednio dla każdej z prób, wysiewając po 100 µl na płytki z podłożem stałym LA (Materiały 3.9). Płytki inkubowano całą noc w temperaturze 37°C, po czym zliczono kolonie. Wyniki przedstawiono w skali logarytmicznej wyliczone według wzoru:

$$\text{Spadek logarytmiczny} = \log_{10} \frac{N_0}{N_i}$$

gdzie:

- $N_0$  – liczba komórek bakteryjnych w kontroli (kontrola negatywna)
- $N_i$  – liczba komórek bakteryjnych w próbie po traktowaniu białkiem lub peptydem

#### 4.9. Minimalne stężenie hamujące

Minimalne stężenie hamujące (MIC, ang. *Minimal Inhibitory Concentration*). Bakterie hodowano przez noc w 37°C w pożywce Mueller-Hinton (Materiały 3.9). Następnego dnia liczbę komórek bakteryjnych w fazie średniej logarytmicznej ( $OD_{600} = 0,5$ ) dostosowano do  $10^6$  CFU/ml w tej samej pożywce i komórki przeniesiono do 96-dółkowych płytek (Materiały 3.5) do mikromiareczkowania (90 µl/dółek). Trzykrotne seryjne rozcieńczenia peptydu przygotowano w probówkach testowych i dodano do płytki w objętości 10 µl na studzienkę w trzech powtórzeniach, aby uzyskać

końcowe stężenia peptydu w różnym zakresie. Następnie bakterie pozostawiono do wzrostu w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

#### 4.10. Testy formowania biofilmu

W przypadku tworzenia biofilmu hodowle nocne bakterii Gram-dodatnich rozcieńczono w świeżym TSB (Materiały 3.9) z dodatkiem 0,25% glukozy do  $10^6$  CFU/ml, natomiast hodowle nocne bakterii Gram-ujemnych rozcieńczono w płynnym LB (Materiały 3.9). Tak przygotowane komórki umieszczono po 200  $\mu$ l w 96-dołkowej płytce testowej (Materiały 3.5) oraz po 200  $\mu$ l komórek bakteryjnych z dodatkiem peptydu w końcowym stężeniu 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, a następnie inkubowano (37°C, 24 h). Po tym czasie ze studzienek usunięto zawiesinę bakteryjną poprzez energiczne strzepnięcie i przemyto dwukrotnie PBS (Materiały 3.12). Biofilm, który przywarł do powierzchni studzienki obserwowano przez barwienie 0,1% fioletem krystalicznym (Materiały 3.15) przez 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie delikatnie przepłukano wodą i rozpuszczono poprzez dodanie 33% kwasu octowego (Materiały 3.15). Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm.

#### 4.11. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM, ang. *Transmission Electron Microscopy*) przeprowadzono we współpracy z Pracownią Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego. Chcąc wykonać zdjęcia przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała białko w końcowym stężeniu 500  $\mu$ g/ml oraz zawiesinę komórek bakteryjnych  $10^8$  w objętości 500  $\mu$ l 20 mM HEPES, pH 7,4 (Materiały 3.12). W reakcji kontrolnej do zawiesiny komórek zamiast enzymu dodano równoważną objętość 20 mM HEPES, pH 7,4. Próbki inkubowano przez 1,5 godziny w 37°C, przemyto w soli fizjologicznej buforu PBS (Materiały 3.12) i utrwalano przez noc w 4°C w 2,5% aldehydzie glutarowym zawieszonym w PBS. W dalszym etapie przekazano próbki do Pracowni Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

#### 4.12. Mikroskopia fluorescencyjna

W celu zobrazowania integralności błon komórek owych bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 po traktowaniu białkiem lub peptydem antybakteryjnym wykorzystano zestaw do oznaczania żywotności bakterii LIVE/DEAD™ BacLight™ (Thermo Fisher, nr kat. L7012). Zestaw ten zawiera dwa barwniki: SYTO®9 (Invitrogen, USA) o małej masie cząsteczkowej, który przenika do wnętrza komórki przez spójne błony cytoplazmatyczne oraz PI (ang. *propidium iodide*) o dużej masie cząsteczkowej, który przenika tylko do tych z uszkodzeniami w błonach. Zastosowanie zestawu umożliwia zróżnicowanie populacji bakterii na komórki żywe i komórki martwe pod względem różnic w ciągłości błon cytoplazmatycznych. Hodowle nocną odmłodzono w 25 ml nowej porcji pożywki TSB (Materiały 3.9) przez zaszczepienie w proporcji 1:20 i umieszczono ponownie w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 37°C do uzyskania OD<sub>600</sub> = 0,5. Następnie hodowlę odwirowano 2 ml w wirówce z chłodzeniem (4°C, 5000 × g, 10 min), supernatant odrzucono, a osad bakteryjny przepłukano buforem 20 mM HEPES, pH 7,4 (Materiały 3.12). Przygotowano mieszaninę reakcyjną, która zawierała białko w końcowym stężeniu 200 µg/ml, 500 µg/ml lub peptyd 1,5 µM, 3 µM oraz zawiesinę komórek bakteryjnych 10<sup>8</sup> w objętości 500 µl 20 mM HEPES, pH 7,4. W reakcji kontrolnej do zawiesiny komórek zamiast enzymu dodano równoważną objętość 20 mM HEPES, pH 7,4. Próbkę inkubowano (37°C, 90 min) po tym czasie zmieszano równe ilości (1,5 ml) odczynnika SYTO®9 oraz PI, a następnie inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej 15 min. Zabarwione bakterie (3 µl) unieruchomiono na 1% podkładce agarozowej (Materiały 3.16), umieszczono na szkiełku mikroskopowym i zbadano za pomocą Nikon Eclipse E800 (mikroskop epifluorescencyjny połączony z kontrastem interferencyjnym różnicowym, DIC). Obrazy zostały zebrane i przetworzone za pomocą oprogramowania Lucia Laboratory Imaging Software (Laboratory Imaging, s.r.o., Praga, Czechy).

#### 4.13. Spektroskopia dichroizmu kołowego

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *Circular Dichroism*) przeprowadzono we współpracy z dr Danutą Augustin-Nowacką z Pracowni Pomiarów Fizyko-Chemicznych, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pomiar CD wykonano przy pomocy spektropolarymetru J-815 (Jasco) z celą o długości ścieżki 1 mm został użyty do rejestracji widm. Strukturę drugorzędową peptydu badano przy stężeniu

0,15 mg/ml (4  $\mu$ M) , gdzie stężenie końcowe wynosiło 20  $\mu$ M w 25°C od 185 do 260 nm w odstępach 0,1 nm. Próbkę rozpuszczono w wodzie lub 20 mM micelach laurylo- $\beta$ -d-maltozydu (DDM), dodecylofosfocholiny (DPC), N-tlenku N,N-dimetylododecyloaminy (LDAO) i dodecylosiarczanu sodu (SDS) (Materiały 3.8). Każde widmo reprezentuje średnią z sześciu skanów. Dane CD są pokazane jako średnia eliptyczność reszt ( $\theta$ ) w stopniach  $\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ .

#### 4.14. Analityczne ultrawierowanie

Analityczne ultrawierowanie (AUC ang. *Analytical Ultracentrifugation*) przeprowadzono we współpracy z Międzynarodowym Instytutem Biologii Molekularnej i Komórkowej, Medycznego Uniwersytetu Warszawskiego. Pomiarzy szybkości sedimentacji przeprowadzono w ultrawirówce analitycznej Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I (Indianapolis, USA) wyposażonej w 8-otworowy rotor analityczny An-50 i dwusektorowe komórki Epon z węglem drzewnym o długości ścieżki 12 mm. Próbkę peptydów odwirowano w buforze Y (Materiały 3.12), przy braku lub w obecności 20 mM detergentu DPC (Materiały 3.8). Komórki zawierały 400  $\mu$ l próbki i 410  $\mu$ l buforu odwirowano przy 50 000 obr./min i monitorowano absorbancją UV przy 230 nm w 20°C, stosując tryb skanowania ciągłego i odstęp promieniowy 0,003 cm. Dane analizowano przy użyciu modelu „Ciągły rozkład c(s)” programu SEDFIT (Schuck, 2000) z poziomem ufności (współczynnik F) określonym na 0,68. Gęstości rozpuszczalników (1,00416  $\text{g}/\text{cm}^3$  bez DPC i 1,00475  $\text{g}/\text{cm}^3$  z DPC) oraz lepkości (1,006  $\text{mPa} \cdot \text{s}$  bez DPC i 1,034  $\text{mPa} \cdot \text{s}$  z DPC) zmierzono w 20°C przy użyciu densytometru Anton Paar (Graz, Austria) DMA 5000 i Lovis 2000 M, odpowiednio wiskozymetr. Częściową objętość właściwą i współczynniki ekstynkcji dla białek obliczono za pomocą oprogramowania SEDNTERP (Philo, 2011). Wyniki wykreślono za pomocą programu graficznego GUSI (Brautigam, 2015).

#### 4.15. Przygotowanie substratów bakteryjnych

Przygotowano substraty: *T. flavus* MAT1087, *T. parvatiensis* DSM 21745, *T. thermophilus* HB8 DSM 579, *T. scotoductus* MAT2119 (Materiały 3.1).

W celu przygotowania bakterii z rodzaju *Thermus* nocną hodowlę bakteryjną odmłodzono w 500 ml nowej porcji pożywki TM (Materiały 3.9) przez zaszczepienie w stosunku 1:200 i wytrząsano przez noc w wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze 60°C.

Po nocy hodowlę zwirowano (4°C, 5000 × g, 15 min), supernatant zlano, a osad zawieszono w 80 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,7/chloroform (Materiały 3.12), pobierając zarówno górną i dolną warstwę w stosunku 1:1. W kolejnym kroku komórki inkubowano przez 45 min. w temperaturze pokojowej z delikatnym wytrząsaniem. Następnie zawiesinę ponownie wirowano (4°C, 5000 × g, 15 min), delikatnie zebrano i odrzucono warstwę Tris-HCl/chloroform. Osad przemyto 80 ml 10 mM buforem fosforanowym (KPi) pH 8,0 (Materiały 3.12) i poddano wirowaniu (4°C, 5000 × g, 15 min). Supernatant zlano, a osad zawieszono w 20 ml 10 mM KPi pH 8,0. Poporcjowano po 0,5 ml do próbek typu Eppendorf i zamrożono w temperaturze -80°C.

#### 4.16. Test redukcji zmętnienia

Przygotowany wcześniej substrat odmrożono i doprowadzono w buforze 20 mM HEPES pH 7,4 (Materiał 3.12) do uzyskania OD<sub>600</sub> = 0,6. Przygotowano rozcieńczenia białka: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml i 1,56 µg/ml. Następnie w 96 dołkowej płaskodennej płytce (Materiały 3.5) nanoszono po 10 µl białka w odpowiednim stężeniu w trzech powtórzeniach i dodawano 190 µl substratu. Pomiar OD<sub>600</sub> wykonywano co 2 min. przez 14 min w 60°C na czytniku Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

Wyniki otrzymane podczas doświadczenia przeanalizowano w programie Microsoft Excel, gdzie wykonano obliczenia. Spadek absorbancji obliczano odejmując od wartości pierwszego pomiaru, wartość pomiaru wykonanego po 14 min (po przemieszaniu ręcznym prób). Odjęto od wyniku również tło (czyli wartość spadku gęstości optycznej samego substratu, bez białka). Wzór jednostki aktywności zaproponowanej przez Bries i współpracowników (Briers, 2019).

$$\text{Aktywność (jednostka/mg)} = \frac{\Delta OD_{600 \text{ nm}} / (\text{min mg})}{0,001} \times \frac{\text{objętość reakcji (}\mu\text{l)}}{1000 \mu\text{l}}$$

#### 4.17. Określenie wpływu pH buforu na aktywność lityczną białka

W celu sprawdzenia optimum pH wykorzystano 9 buforów w zakresie pH 5,0-8,8 (Materiały 3.13). Substrat *T. thermophilus* HB8 (Materiały 3.1) zawieszono w 0,85% NaCl do uzyskania OD<sub>600</sub> = 0,6. Zawiesinę bakteryjną rozporcjowano po 600 µl do próbek typu Eppendorf, a następnie zwirowano (5000 × g; 3 min). Supernatant zlano,

osad zawieszono w 600  $\mu$ l buforu z odpowiednim pH (Materiały 3.13). Na płytkę 96-cio dołkową (Materiały 3.5) nanoszono w trzech powtórzeniach po 10  $\mu$ l białka w optymalnym stężeniu (50  $\mu$ g/ml) i 190  $\mu$ l buforu o odpowiednim pH. Dla każdej próby wykonano kontrolę nanosząc w trzech powtórzeniach po 200  $\mu$ l buforu o odpowiednim pH bez białka. Pomiar OD<sub>600</sub> wykonywano co 30 s przez 14 min w 60°C używając EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

#### 4.18. Specyficzność substratowa

Analizę specyficzności substratowej białka prowadzono używając bakterii: *T. flavus* MAT1087T, *T. parvatiensis* DSM 21745, *T. thermophilus* HB8 DSM 579, *T. scotoductus* MAT2119 (Metody 4.17). Po rozmrożeniu bakterie zawieszono w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0 (Materiały 3.12) do uzyskania OD<sub>600</sub> = 0,6. Komórki rozporcjowano po 600  $\mu$ l do probówek 1,5 ml typu Eppendorf, dodano białka do stężenia ostatecznego 6,25 mg/ml i nakładano po 200  $\mu$ l w trzech powtórzeniach na płytkę 96-cio dołkową (Materiały 3.5). Pomiar OD<sub>600</sub> prowadzono w temperaturze (60°C, 14 min) na czytniku płytek EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

#### 4.19. Analiza potencjału błonowego

Komórki *S. aureus* ATCC 25923 hodowano w temperaturze 37°C w pożywce TSB (Materiały 3.9) do osiągnięcia fazy logarytmicznej wzrostu (OD<sub>600</sub> = 0,5). Komórki wirowano (4000  $\times$  g; 15 min; 20°C) i przemyto 10 mM PBS, pH 7,3 (Materiały 3.12) i 10-krotnie rozcieńczono w tym samym buforze uzupełnionym 1% DMSO, uzyskując  $\sim 10^6$  komórek. Zawiesinę komórek zmieszano z 1  $\mu$ M DiSC<sub>3</sub>(5) (SIGMA-Aldrich) rozpuszczonym w DMSO i 200  $\mu$ l dodano do studzienek czarnej 96-cio polistyrenowej płytki (Materiały 3.5) do miareczkowania (OptiPlate, PerkinElmer). Płytkę wstępnie inkubowano w 37°C przez 25 minut w ciemności. Następnie monitorowano fluorescencję (wzbudzenie przy 652 nm, emisja przy 672 nm) w odstępach 1 minuty przy użyciu czytnika płytek (EnSpire™ 2300, PerkinElmer). Gdy odczyty ustabilizowały się, płytkę wyjęto z urządzenia i dodano peptyd Intestinalinę (P30) w trzech powtórzeniach do końcowego stężenia między 0,5  $\mu$ M do 10  $\mu$ M. Fluorescencję mierzono ponownie przez 15 minut w odstępach 1 minuty. A 10  $\mu$ M peptyd LL-37 i 10  $\mu$ M peptydu APLP służyły odpowiednio jako kontrola dodatnia i ujemna. Peptyd APLP nie ma działania

przeciwbakteryjnego i jest częścią ludzkiego białka podobnego do amyloidu 2 zaangażowanego w patogenezę choroby Alzheimera (sekwencja: RVGGLEEEERESVGPLRE). Peptydy zostały zsyntetyzowane przez Katedrę Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku.

## 5. WYNIKI

Na podstawie sekwencji aminokwasowej białka LysC i analizy wyników *in silico* uzyskanych z użyciem oprogramowania APD3 i CAMP (Metoda 4.7), wytypowano do dalszych badań, a następnie zsyntetyzowano 30-aminokwasowy peptyd pochodzący z N-końcowego regionu białka LysC w celu przebadania jego potencjału antybakteryjnego w porównaniu do białka typu dzikiego (WT) (Plotka et al., 2020).

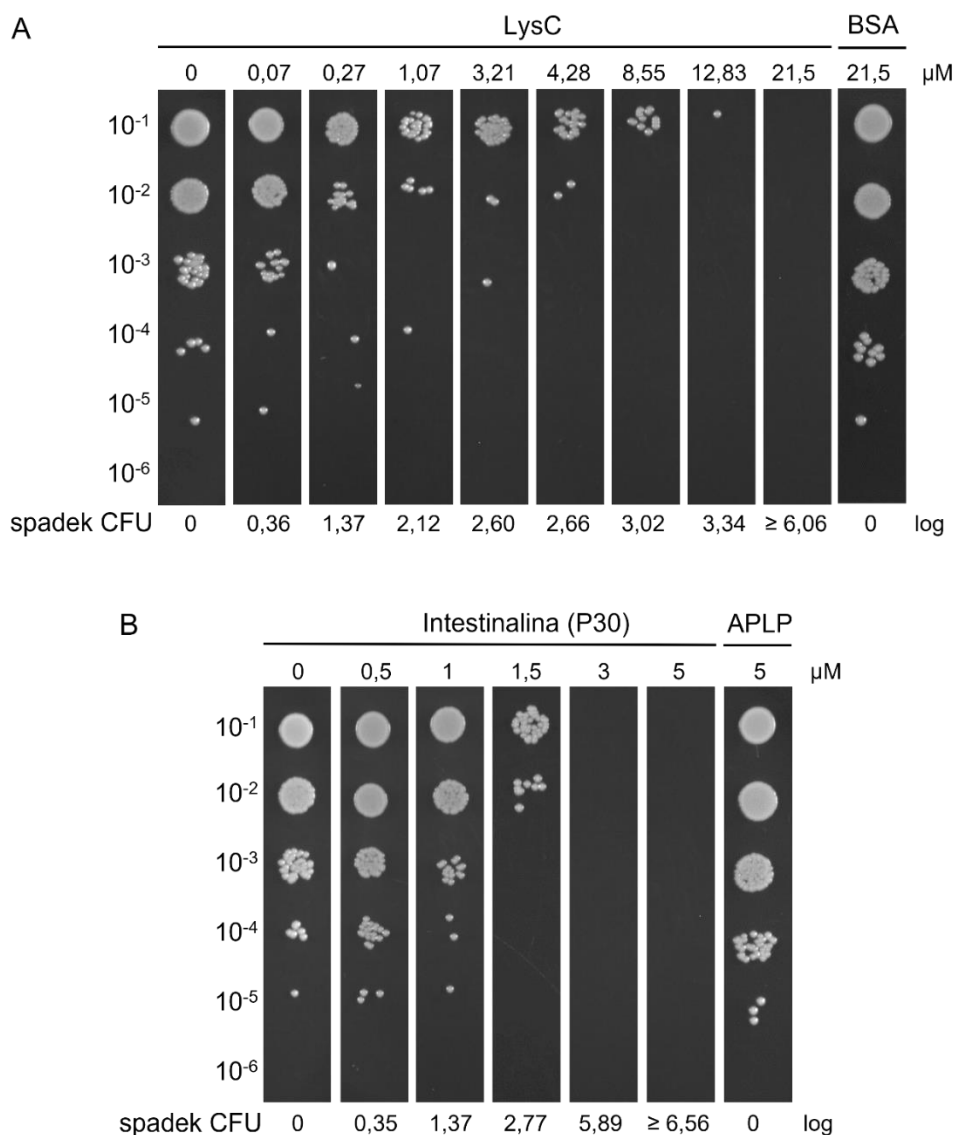
### 5.1. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej białka LysC i peptydu Intestinaliny

#### 5.1.1. Wartości IC<sub>50</sub>

Prowadzone wcześniej badania nad autolizyną LysC *Clostridium intestinale* URNW (GenBank ERK30183.1) i peptydem Intestinaliną (P30) pochodzącą z N-końcowego regionu białka LysC przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wykazały, że zarówno białko jak i peptyd mają wysoki potencjał antybakteryjny powodując całkowitą eliminację  $\sim 10^6$  komórek bakteryjnych w przeciągu 1,5 h inkubacji w 37°C (Plotka et al., 2020). Początkowo białko LysC w testach antybakteryjnych użyto w stężeniu 500 µg/ml (21,5 µM). Wartość tę wytypowano wg publikacji (Lai et al., 2011), w której testy antybakteryjne endolizyny LysAB2 przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, bez dodania związków osłabiających zewnętrzną błonę bakteryjną, wykonano właśnie przy takim stężeniu (Lai et al., 2011). W trakcie badań okazało się jednak, że już stężenie 20 µg/ml (5 µM) peptydu Intestinaliny wykazuje działanie podobne do białka pełnej długości. W celu standaryzacji wykonywanych testów pojawiło się zatem pierwsze pytanie, jakie stężenia białka LysC i peptydu Intestinaliny powodują zabicie 50% komórek użytych w testach, innymi słowy jakie są dawki IC<sub>50</sub> tych związków?

Chcąc udzielić odpowiedzi na zadane pytanie przeprowadziłam testy antybakteryjne (Metoda 4.8) *in vitro* przeciwko *S. aureus* ATCC 25923 używając różnych stężeń białka: odpowiednio 0 – 21,5 µM i peptydu: 0 – 5 µM (Rys. 9).





Ryc. 9. Testy antybakteryjne wykazujące zależną od dawki aktywność enzymu litycznego LysC i peptydu Intestinaliny (P30) wobec *S. aureus* ATCC 25923. W testach antybakteryjnych użyto (A) białka LysC w zakresie stężeń 0 – 21,5  $\mu\text{M}$  i (B) Intestinaliny w stężeniu 0 – 5  $\mu\text{M}$ . Krople 5  $\mu\text{l}$  zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w  $37^{\circ}\text{C}$  przez noc, a następnie sfotografowałam. Albumina surowicy bydlęcej (BSA) w stężeniu 21,5  $\mu\text{M}$  i peptyd APLP w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  służyły jako kontrole negatywne odpowiednio dla LysC i Intestinaliny (P30). Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.

Z otrzymanych wyników wykazałam, że stężenie 5  $\mu\text{M}$  (20  $\mu\text{g/ml}$ ) peptydu Intestinaliny powodowało całkowitą redukcję  $10^6$  komórek *S. aureus* ATCC 25923, podczas gdy podobny efekt można było zaobserwować dopiero przy stężeniu 21,5  $\mu\text{M}$  (500  $\mu\text{g/ml}$ ) białka LysC. Z przeprowadzonego doświadczenia wyznaczyłam wartość  $\text{IC}_{50}$  dla peptydu wynoszącą 1,5  $\mu\text{M}$  (6  $\mu\text{g/ml}$ ), natomiast dla białka LysC wartość  $\text{IC}_{50}$  wynosi 8,55  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 5.1.2. Spektrum przeciwbakteryjne enzymu LysC i peptydu Intestinaliny

W celu określenia potencjału przeciwbakteryjnego peptydu w porównaniu z białkiem wykorzystałam 5  $\mu\text{M}$  stężenie Intestinaliny (P30) i 21,5  $\mu\text{M}$  stężenie LysC przeprowadzając testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.8) wobec Gram-dodatnich gronkowców i szeregu Gram-ujemnych bakterii przedstawionych w Tabeli 4 (Materiały 3.4) i Tabeli 6 (Materiały 3.1).

Tabela 6. Działanie bakteriobójcze LysC i Intestinaliny (P30) na wybrane bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

Szczep bakteryjny	Średnie spadki ilości bakterii (log CFU/ml)	
	LysC	P30
<b>Gram-dodatnie bakterie</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5,12 $\pm$ 0,14	5,09 $\pm$ 0,04
<i>S. aureus</i> MSSA KPD 740	4,76 $\pm$ 0,27	6,77 $\pm$ 0,04
<i>S. aureus</i> MRSA KPD 425	6,83 $\pm$ 0,10	6,83 $\pm$ 0,10
<i>S. epidermidis</i> KPD 440	6,53 $\pm$ 0,08	6,53 $\pm$ 0,08
<i>S. hominis</i> KPD 910	5,42 $\pm$ 0,06	5,42 $\pm$ 0,06
<i>S. pettenkoferi</i> KPD 741	6,73 $\pm$ 0,06	6,73 $\pm$ 0,06
<b>Gram-ujemne bakterie</b>		
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	6,93 $\pm$ 0,08	6,93 $\pm$ 0,08
<i>A. baumannii</i> MDR 581	7,10 $\pm$ 0,05	7,10 $\pm$ 0,05
<i>A. baumannii</i> KPD 735	6,97 $\pm$ 0,07	6,97 $\pm$ 0,07
<i>A. baumannii</i> RUH134	6,70 $\pm$ 0,08	6,70 $\pm$ 0,08
<i>C. braaki</i> KPD 218	4,75 $\pm$ 0,04	6,83 $\pm$ 0,08
<i>E. cloacae</i> KPD 297	0,74 $\pm$ 0,05	7,31 $\pm$ 0,02

<i>E. coli</i> KPD 217	0,34 ± 0,15	7,06 ± 0,15
<i>K. pneumoniae</i> KPD 298	0,40 ± 0,04	5,28 ± 0,02
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	2,03 ± 0,07	3,04 ± 0,12
<i>P. aeruginosa</i> KPD 430	6,73 ± 0,10	6,73 ± 0,10
<i>P. aeruginosa</i> CRPA KPD 431	4,69 ± 0,04	6,62 ± 0,12

W teście tym jako kontrola pozytywna posłużyła reakcja z *S. aureus* ATCC 25923 (szczep referencyjny) gdzie zarówno enzym LysC jak i peptyd Intestinalina powodowały ponad 5-krotny logarytmiczny spadek ilości bakterii (Tabela 6). Enzym LysC był aktywny wobec wszystkich badanych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych *Citrobacter braakii* z rzędu *Enterobacterales* i Gram-ujemnych bakterii z rzędu *Pseudomonadales*: *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. Dla bakterii Gram-dodatnich, LysC wykazywał największą aktywność wobec klinicznego szczepu *S. aureus* KPD 425 (spadek o 6,83 ± 0,10 log), a najmniejszą przeciwko *S. aureus* KPD 740 (redukcja o 4,76 ± 0,27 log). Pomimo to ogólna aktywność przeciwbakteryjna LysC przekroczyła 4,5-krotny logarytmiczny spadek liczby bakterii. Wśród szczepów *A. baumannii* i *P. aeruginosa* największą aktywność wykazano przeciwko *A. baumannii* KPD 581 (spadek o 7,10 ± 0,05 log), a najmniejszą aktywność zaobserwowano dla *P. aeruginosa* PAO1 (2,03 ± 0,07 log). Enzym LysC był zdecydowanie mniej aktywny wobec enterobakterii (innych niż *Citrobacter braakii*; redukcja o 4,75 ± 0,04 log) i spowodował spadek zaledwie o 0,74 ± 0,05 log liczby bakterii *Enterobacter cloacae* KPD 297, 0,34 ± 0,15 log *Escherichia coli* KPD 217 oraz 0,40 ± 0,04 log komórek *Klebsiella pneumoniae* KPD 298. Natomiast Intestinalina (P30) była aktywna wobec wszystkich testowanych patogenów bakteryjnych, ze swoistą redukcją między 3,04 ± 0,12 log dla *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i 7,31 ± 0,02 log dla *Enterobacter cloacae* KPD 297 (Tabela 6). Intestinalina (P30) miała większe spektrum przeciwbakteryjne obejmujące *E. cloacae* KPD 297, *E. coli* KPD 217 i *K. pneumoniae* KPD 298, z aktywnością przekraczającą 5,28 log redukcji liczby bakterii, podczas gdy aktywność LysC wobec tych szczepów była w zakresie spadku od 0,34 do 0,74 log (Tabela 6). W związku z tym w dalszych badaniach postanowiłam skupić się na potencjale bakteriobójczym peptydu Intestinaliny (P30).

### 5.1.3. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC)

Wartości MIC określiłam dla Intestinaliny (P30) (Materiały 4.9) z wykorzystaniem panelu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wymienionych w Tabeli 7. MIC to najmniejsze stężenie badanej substancji, które powoduje całkowite zahamowanie wzrostu danej bakterii. Dla badanego peptydu Intestinaliny (P30) wartości MIC wynosiły od 7,8 do 124  $\mu\text{M}$ . Najwyższe wartości MIC (124  $\mu\text{M}$ ) zaobserwowałam dla *S. aureus* KPD 740, *S. aureus* KPD 425, *E. cloacae* KPD 297, *E. coli* KPD 217 i *K. pneumoniae* KPD 298. Najniższe wartości MIC (7,8  $\mu\text{M}$ ) dotyczyły trzech z czterech badanych szczepów *A. baumannii*, a także *S. hominis* KPD 910 i *S. pettenkoferi* KPD 741. Interesujący jest fakt że, Intestinalina (P30) wykazywała większą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii z rzędu *Pseudomonadales*, *A. baumannii* i *P. aeruginosa*, niż wobec *S. aureus* i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wyników tych nie zaobserwowano w przeprowadzonych testach przeciwbakteryjnych wykonanych w środowisku hipotonicznym (20 mM HEPES, pH 7,4), gdzie większość bakterii była podobnie podatna na działanie peptydu.

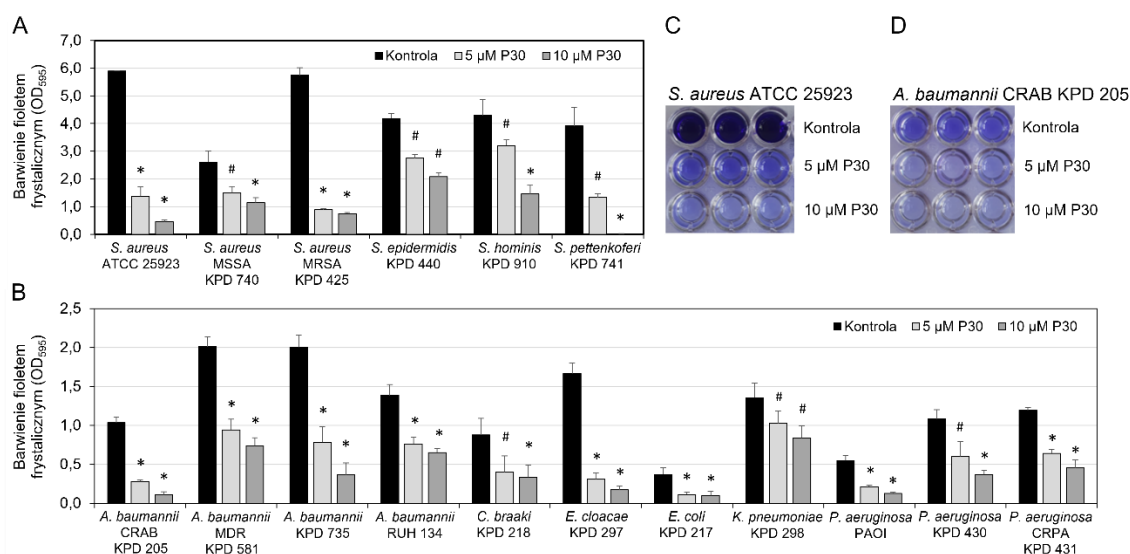
Tabela 7. MIC dla Intestinaliny (P30) w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Szczep bakteryjny	P30 MIC	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$
<b>Gram-dodatnie bakterie</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	455	124
<i>S. aureus</i> MSSA KPD 740	>455	>124
<i>S. aureus</i> MRSA KPD 425	>455	>124
<i>S. epidermidis</i> KPD 440	455	124
<i>S. hominis</i> KPD 910	28,5	7,8
<i>S. pettenkoferi</i> KPD 741	28,5	7,8
<b>Gram-ujemne bakterie</b>		
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	28,5	7,8
<i>A. baumannii</i> MDR 581	28,5	7,8
<i>A. baumannii</i> KPD 735	28,5	7,8
<i>A. baumannii</i> RUH134	114	31

<i>C. braaki</i> KPD 218	114	31
<i>E. cloacae</i> KPD 297	>455	>124
<i>E. coli</i> KPD 217	>455	>124
<i>K. pneumoniae</i> KPD 298	>455	>124
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	57	15,5
<i>P. aeruginosa</i> KPD 430	228	62
<i>P. aeruginosa</i> CRPA KPD 431	57	15,5

#### 5.1.4. Wpływ Intestinaliny (P30) na formowanie się biofilmu

Kolejnym krokiem było zbadanie działania peptydu Intestinaliny (P30) na zdolność do tworzenia biofilmu, który oceniałam za pomocą testu barwienia fioletem krystalicznym (Metody 4.10) z wykorzystaniem 6 Gram-dodatnich (Ryc. 10 A) i 11 Gram-ujemnych szczepów bakterii (Ryc. 10 B).



Ryc. 10. Hamowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego. Wpływ Intestinaliny (P30) na tworzenie biofilmu bakterii (A) Gram-dodatnich i (B) Gram-ujemnych inkubowanych bez (kontrola) lub z 5 μM i 10 μM peptydem przez 24 godziny w 37°C. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. \*,  $P = 0,0001$ ; #,  $P = 0,0002$  (test t-Studenta). Zdjęcie przedstawiające biofilm zabarwiony fioletem krystalicznym utworzony przez (C) *S. aureus* ATCC 25923 i (D) *A. baumannii* CRAB KPD 205 przy braku (kontrola) lub obecności peptydu w stężeniach 5 μM i 10 μM.

Dla wszystkich badanych szczepów odnotowano znaczące zahamowanie zdolności do tworzenia biofilmu (Ryc. 10 i Tabela 8).

Tabela 8. Hamowanie zdolności tworzenia biofilmu bakteryjnego (%) przez Intestinalinę (P30) w stosunku do kontroli negatywnych (biofilmu bakteryjnego tworzonego bez obecności peptydu).

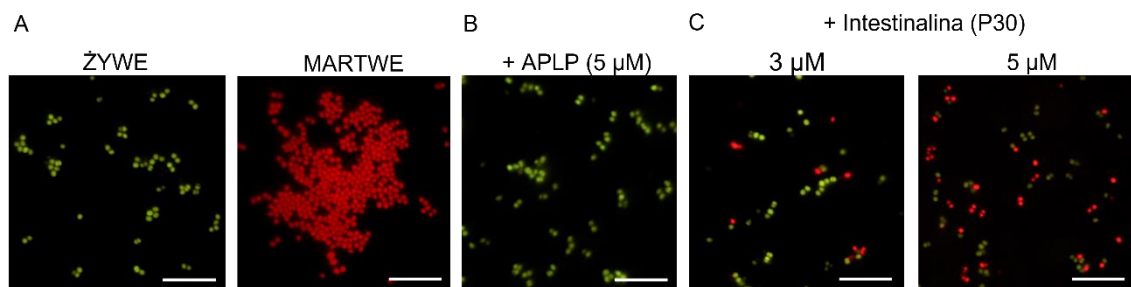
Szczep bakteryjny	% hamowania tworzenia biofilmu (średnia ± SD)	
	5 μM	10 μM
<b>Gram-dodatnie bakterie</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	76,8 ± 5,6	92,3 ± 1,2
<i>S. aureus</i> MSSA KPD 740	42,9 ± 9,2	56,2 ± 6,7
<i>S. aureus</i> MRSA KPD 425	84,7 ± 0,7	87,1 ± 0,7
<i>S. epidermidis</i> KPD 440	34,4 ± 3,3	50,3 ± 3,4
<i>S. hominis</i> KPD 910	25,4 ± 4,8	66,1 ± 7,3
<i>S. pettenkoferi</i> KPD 741	66,1 ± 3,8	99,7 ± 0,3
<b>Gram-ujemne bakterie</b>		
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	73,3 ± 2,5	89,7 ± 3,9
<i>A. baumannii</i> MDR 581	53,2 ± 6,8	63,3 ± 5,1
<i>A. baumannii</i> KPD 735	60,9 ± 10,0	82,0 ± 7,8
<i>A. baumannii</i> RUH134	45,1 ± 5,9	53,1 ± 8,1
<i>C. braaki</i> KPD 218	54,3 ± 23,6	62,0 ± 17,8
<i>E. cloacae</i> KPD 297	81,5 ± 4,8	89,7 ± 3,1
<i>E. coli</i> KPD 217	70,2 ± 8,5	73,6 ± 14,0
<i>K. pneumoniae</i> KPD 298	24,3 ± 11,5	38,1 ± 11,2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	60,9 ± 3,5	77,3 ± 3,6
<i>P. aeruginosa</i> KPD 430	44,5 ± 17,8	66,0 ± 5,3
<i>P. aeruginosa</i> CRPA KPD 431	46,3 ± 4,3	62,2 ± 8,7

W przypadku Intestinaliny w stężeniu 10 μM, tworzenie biofilmu zostało zmniejszone o 99,7% dla *S. pettenkoferi* KPD 741 w grupie bakterii Gram-dodatnich oraz o 89,7% dla dwóch bakterii Gram-ujemnych *A. baumannii* CRAB KPD 205 i *E. cloacae* KPD 297 ( $P = 0,0001$ ). Niższe hamowanie formowania biofilmu, ale nadal istotne statystycznie, zaobserwowano w przypadku 5 μM Intestinaliny. Najniższe zahamowanie

tworzenia biofilmu wyniosło 25,4% dla *S. hominis* KPD 910 (bakterie Gram-dodatnie) i 24,3% dla *K. pneumoniae* KPD 298 (bakterie Gram-ujemne) ( $P = 0,0002$ ).

#### 5.1.5. Mikroskopia fluorescencyjna

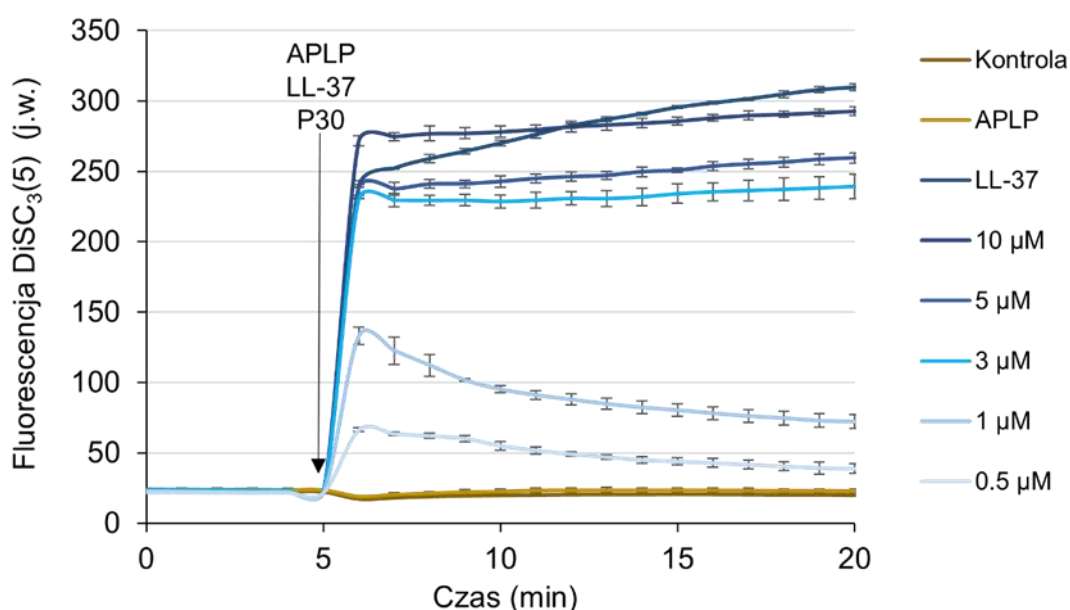
Następnie sprawdziłam żywotność bakterii z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej i zestawu LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Thermo Fisher) (Metody 5.12) w celu analizy potencjalnej przepuszczalności błony komórkowej bakterii spowodowanej przez peptyd Intestinalinę (P30) (Ryc. 11). W tym teście wykorzystałam dwa barwniki: SYTO 9 oraz jodek propidyny – PI (ang. *propidium iodide*). SYTO 9 o małej masie cząsteczkowej przenika do wnętrza komórki przez błony cytoplazmatyczne, a PI o dużej masie cząsteczkowej przenika tylko do tych z uszkodzeniami błon cytoplazmatycznych. Zastosowanie zestawu LIVE/DEAD® umożliwiło zróżnicowanie populacji bakterii na komórki żywe i martwe pod względem różnic w ciągłości struktury błon cytoplazmatycznych (Ryc. 11 A). Dodanie peptydu APLP (1,95 kDa) do  $10^8$  komórek *S. aureus* ATCC 25923 nie wykazało żadnego wpływu na ich żywotność (Ryc. 11 B). Inkubacja komórek w obecności Intestinaliny (P30) ( $3 \mu\text{M}$ ) spowodowała pojawienie się martwych komórek. Ich liczba wzrosła wraz z wyższym stężeniem peptydu ( $5 \mu\text{M}$ ) dodanym do próbki, co wskazuje, że integralność błony komórkowej została poważnie uszkodzona z powodu rozległego tworzenia się kanałów, które umożliwiły wejście barwnika PI do komórek (Rys. 11 C).



Ryc. 11. Mechanizm działania Intestinaliny (P30). (A do C) Wyniki testu żywotności bakterii wizualizowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. (A) Aktywne metabolicznie komórki *S. aureus* ATCC 25923 są zabarwione na zielono (żywe), a martwe komórki z uszkodzeniem błony są zabarwione na czerwono (martwe). (B) Komórki ( $10^8$ ) *S. aureus* po inkubacji w obecności  $5 \mu\text{M}$  APLP (kontrola negatywna). (C) Komórki po inkubacji z  $3 \mu\text{M}$  i  $5 \mu\text{M}$  peptydem Intestinaliną (P30). Skala odpowiada  $10 \mu\text{m}$ .

### 5.1.6. Spadek potencjału błonowego

Uszkodzenie błon komórkowych prowadzi do spadku potencjału błonowego. W celu analizy zmian potencjału błony komórkowej po dodaniu Intestinaliny (P30) do zawiesiny komórek *S. aureus* ATCC 25923 użyłam barwnika fluorescencyjnego DiSC<sub>3</sub>(5). Barwnik karbocyjaninowy DiSC<sub>3</sub>(5) gromadzi się w spolaryzowanej błonie komórkowej, powodując gaszenie fluorescencji. Po depolaryzacji błony komórkowej barwnik jest uwalniany, a fluorescencja wzrasta. Dodatek Intestinaliny (P30) wywołał znaczny wzrost fluorescencji DiSC<sub>3</sub>(5) w komórkach *S. aureus* (Ryc. 12). Wzrost był szybki przy stężeniach między 3 μM a 10 μM, podczas gdy peptyd w stężeniach 0,5 μM i 1 μM wykazywał mniejszy efekt. Dodatek 10 μM peptydu LL-37 zastosowano jako kontrolę pozytywną, a 10 μM peptyd APLP bez aktywności przeciwbakteryjnej służył jako kontrola negatywna.

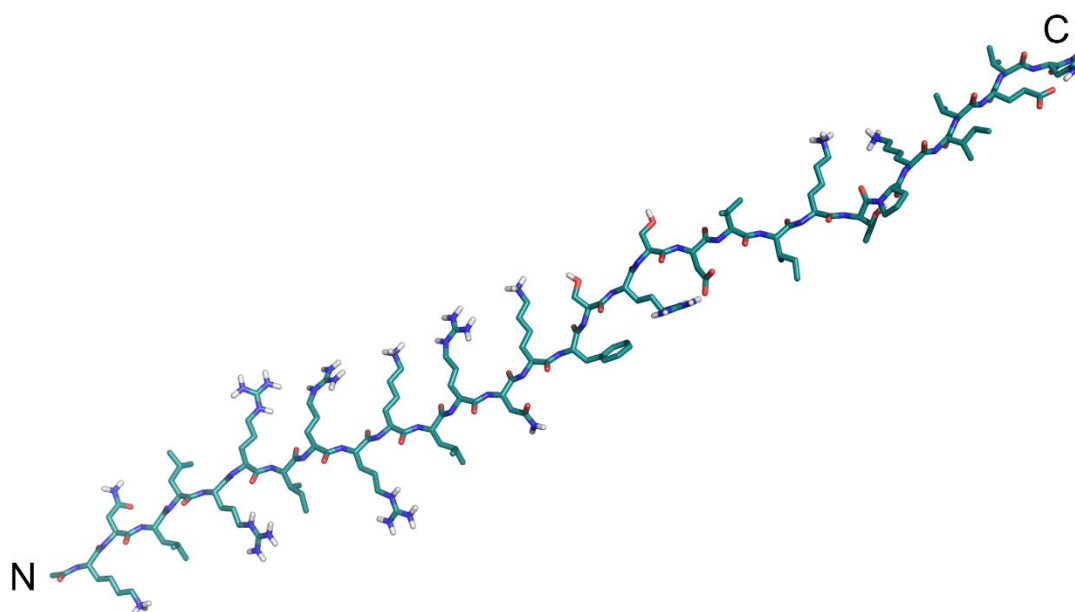


Ryc. 12. Mechanizm aktywności Intestinaliny (P30). Barwnik DiSC<sub>3</sub>(5) wrażliwy na potencjał błonowy inkubowano z bakteriami do czasu utworzenia stabilnej linii bazowej. Punkt czasowy dodania APLP, LL-37 oraz P30 jest zaznaczony strzałką. Wzrost fluorescencji po dodaniu peptydu mierzono przy długości fali wzbudzenia 652 nm i długości fali emisji 672 nm w funkcji czasu. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



### 5.1.7. Struktura przestrzenna peptydu Intestinaliny

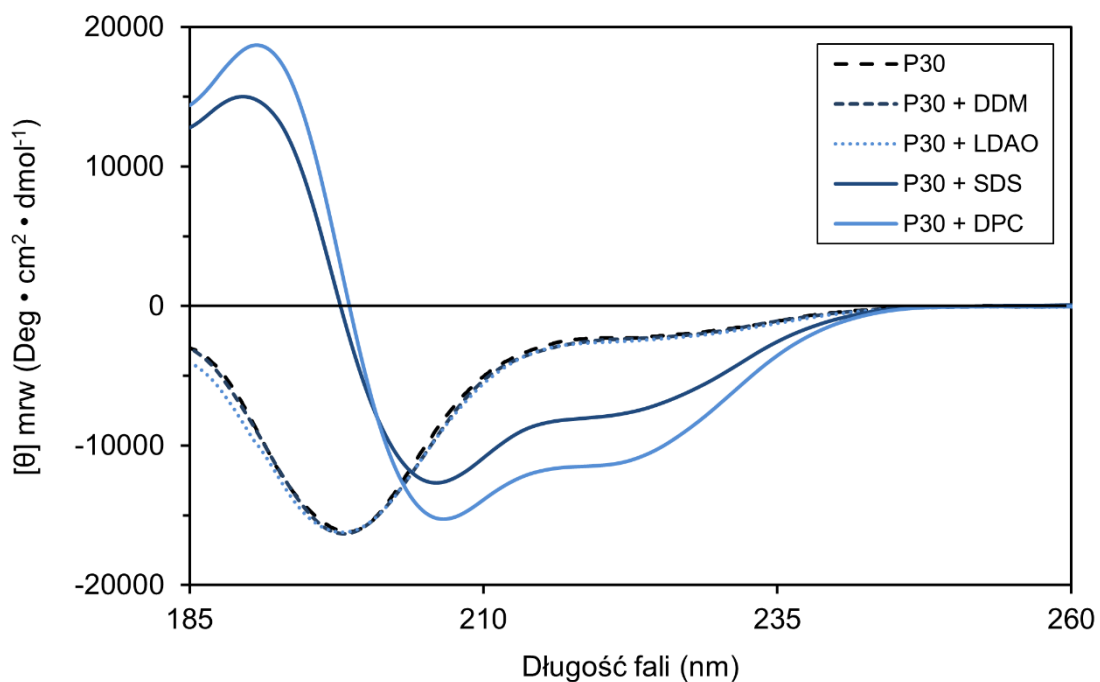
Właściwości fizykochemiczne peptydu określiłam za pomocą programu PepDraw (<https://pepdraw.com/>). Punkt izoelektryczny Intestinaliny (P30) wynosi 12,5, a hydrofobowość: +33,69 Kcal \* mol<sup>-1</sup>.



Ryc. 13. Model sekwencji peptydu Intestinaliny (30 aa). Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, a niebieskim azot.

### 5.1.8. Analiza struktury oligomerycznej peptydu P30

Wiele peptydów antybakteryjnych, zwłaszcza kationowych, ma nieuporządkowaną strukturę w roztworze, natomiast w obecności błon komórkowych przybierają amfipatyczne struktury helikalne (Mahlapuu et al., 2016). W celu określenia struktury drugorzędowej peptydu P30 przeprowadziłam we współpracy z dr Danutą Augustin-Nowacką spektroskopię dichroizmu kołowego (Metoda 4.13), w którym rejestrowano widma peptydu bez lub w obecności detergentów (Materiały 3.8), które są analogami błon bakteryjnych (Rys. 14).

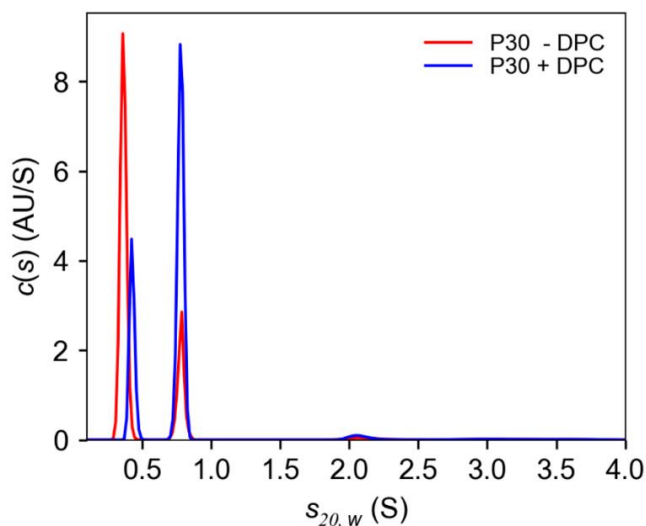


Ryc. 14. Widma dichroizmu kołowego peptydu wykazują konformację  $\alpha$ -helikalną Intestinaliny (P30) w obecności 20 mM detergentów SDS i DPC (linie ciągłe). Bez dodatku detergentów lub w obecności DDM lub LDAO (linie przerywane) peptyd ma strukturę nieuporządkowaną.

Otrzymane wyniki pokazują, że peptyd P30, sam lub w obecności laurylo- $\beta$ -D-maltozydu (DDM) i N-tlenku laurylodimetyloaminy (LDAO) nie posiada struktury uporządkowanej w roztworze. Jednak w obecności dodecylsulfanu sodu (SDS) i dodecylfosfocholiny (DPC) przyjmuje konformację  $\alpha$ -helikalną.

#### 5.1.9. Analityczne ultrawierowanie peptydu Intestinaliny (P30)

Następnie zastosowałam ultrawierowanie analityczne (AUC) w celu weryfikacji stopnia oligomeryzacji Intestinaliny w obecności lub nieobecności detergentu n-dodecylfosfocholiny (DPC), który podobnie jak SDS jest analogiem błon komórkowych bakterii (Rys. 15).



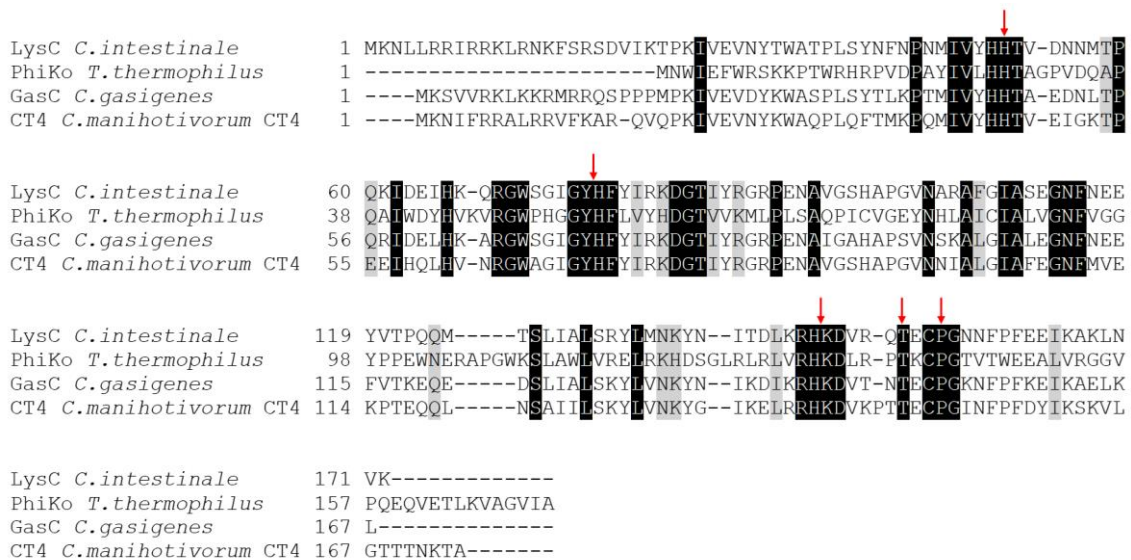
Ryc. 15. Ultrawirowanie analityczne peptydu Intestinaliny. Profile rozkładu współczynnika sedymentacji AUC dla Intestinaliny (P30) przy braku (linia czerwona) i w obecności (linia niebieska) detergentu DPC.

W obu sytuacjach zanotowano dwa główne pik, które stanowiły  $\sim 94\%$  sygnału. W przypadku peptydu P30 bez DPC zauważalna była dominacja pierwszego pik odpowiadającego monomerowi (współczynnik sedymentacji  $0,36 s_{20,w}$ ) i  $72\%$  sygnału. Dodanie detergentu zmieniło intensywność obu pików. Pierwszy ( $0,42 s_{20,w}$ ) odpowiadał tylko za  $27\%$  sygnału, a dominującą rolę przejął drugi pik ( $0,78 s_{20,w}$ ), odpowiadający oligomerowi, który stanowił ponad  $66\%$  sygnału. Prowadzona analiza oparta na modelu z bimodalnym współczynnikiem tarcia  $f/f_0$  pozwoliła na niezależne obliczenie współczynników tarcia dla każdej populacji (Zhao et al., 2013). Wyniki wskazują, że pierwszy pik odpowiadał monomerowi (stosunek tarcia  $1,46$ ), a drugi pik najprawdopodobniej reprezentował trimer o wydłużonym lub nieregularnym kształcie (stosunek tarcia  $2,80$ ).

Podsumowując, peptyd Intestinalina (P30) ukryty w sekwencji białka LysC wykazuje dużą aktywność przeciwbakteryjną i hamuje formowanie biofilmu bakteryjnego. W roztworze wodnym ma strukturę niezorganizowaną, ale pod wpływem detergentów przyjmuje konformację  $\alpha$ -helikalną. W obecności detergentów tworzy oligomery, a jak pokazały doświadczenia z barwnikiem DISC<sub>3</sub>(5) oraz mikroskopia fluorescencyjna pod wpływem Intestinaliny (P30) następuje spadek potencjału błonowego i dezintegracja błony komórkowej bakterii. Dlatego powstało kolejne pytanie, czy w białkach podobnych do LysC również znajdują się regiony o potencjalnej aktywności bakteriobójczej?

## 5.2. Badania *in silico* w poszukiwaniu białek wykazujących podobieństwo do LysC

W kolejnym etapie badań w celu poszukiwania białek podobnych do białka litycznego LysC przeprowadziłam analizy porównawcze sekwencji dostępnych w bazach danych NCBI, które umożliwiły wyodrębnienie kilku potencjalnych białek litycznych o podobieństwie sekwencji pierwszorzędowej. Postawiona hipoteza badawcza zakłada, że w białkach podobnych do LysC również mogą znajdować się rejony, które mogą odpowiadać „ukrytym” peptydom antybakteryjnym. Dopasowanie sekwencji aminokwasowych LysC oraz białek z rodzaju *Clostridium* oraz *Thermus* pokazałam na (Ryc. 16). Czerwone strzałki reprezentują konserwowane reszty aminokwasowe tworzące potencjalne centra katalityczne enzymów według NCBI BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

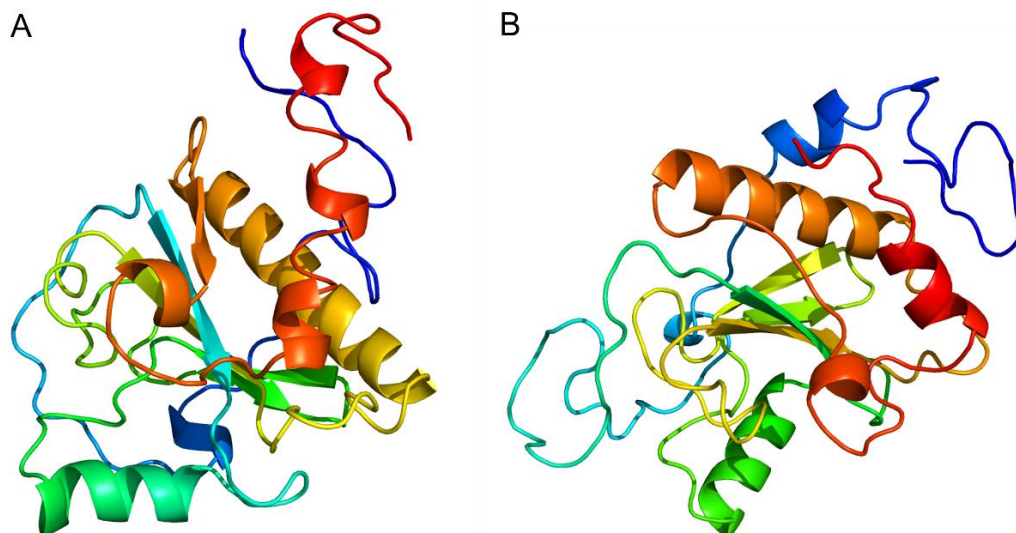


Rys. 16. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej białka LysC z sekwencjami białek pochodzącymi z *Clostridium* oraz *Thermus*. Zestawienie wykonano przy pomocy programu ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Czarny kolor wskazuje 100% identyczności reszt aminokwasowych, podczas gdy szary kolor pozycje konserwowane w 70% sekwencji. Czerwone strzałki wskazują konserwowane reszty aminokwasowe tworzące potencjalne centra katalityczne enzymów charakterystyczne dla amidaz N-acetylmuramylo-L-alaninowych typu 2. Numery dostępu sekwencji białek: [*Clostridium intestinale* URNW] LysC – ERK30183.1; [*Clostridium gasigenes*] GasC – SDO71926 lub WP\_089964948.1; [*Clostridium manihotivorum* CT4] CT4 – WP\_128212625.1; [*Thermus thermophilus* phage phiKo] PhiKo – AYJ74695.1.

Każde z analizowanych białek PhiKo, GasC oraz CT4 posiada regiony o 100% identyczności sekwencji z białkiem LysC (na Ryc. 16 oznaczone kolorem czarnym). Podobieństwo sekwencji, w tym regionów katalitycznych, niezbadanych dotąd białek powoduje, że białka te są atrakcyjnym modelem do dalszych szczegółowych analiz. W związku z tym następnym etapem było sprawdzenie na ile podobieństwo sekwencji aminokwasowej znajduje odzwierciedlenie w ich strukturze i właściwościach litycznych. Do dalszych badań w pierwszej kolejności zostało wybrane białko nazwane przeze mnie PhiKo (Materiały 3.4). Nazwa pochodzi od bakteriofaga phiKo z którego białko pochodzi.

### 5.2.1. Białko PhiKo

Poszukiwania nowych białek litycznych poprzez przeprowadzone analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowej enzymu LysC doprowadziły do wyodrębnienia strukturalnie podobnego białka jakim jest PhiKo (numer akcesyjny GenBank: AYJ74695.1) pochodzącego z bakteriofaga phiKo *Thermus thermophilus* HB27 (numer akcesyjny GenBank: MH673671.2; locus\_tag: phiKo\_20; gen 2728..3243). Jedno i drugie białko wykazuje globularną strukturę, a ich łańcuchy polipeptydowe układają się bardzo podobnie w przestrzeni (Ryc. 17). Na podstawie podobieństwa motywów katalitycznych oraz podobieństwa struktury przestrzennej można wysnuć hipotezę badawczą, że białko PhiKo ma aktywność lityczną analogiczną do białka LysC. Tak postawiona teza badawcza zakłada, że podobnie jak w przypadku scharakteryzowanej w naszym laboratorium autolizyny LysC, zewnętrzne dodanie białka PhiKo do komórek bakterii powinno skutkować lizą komórek bakteryjnych.

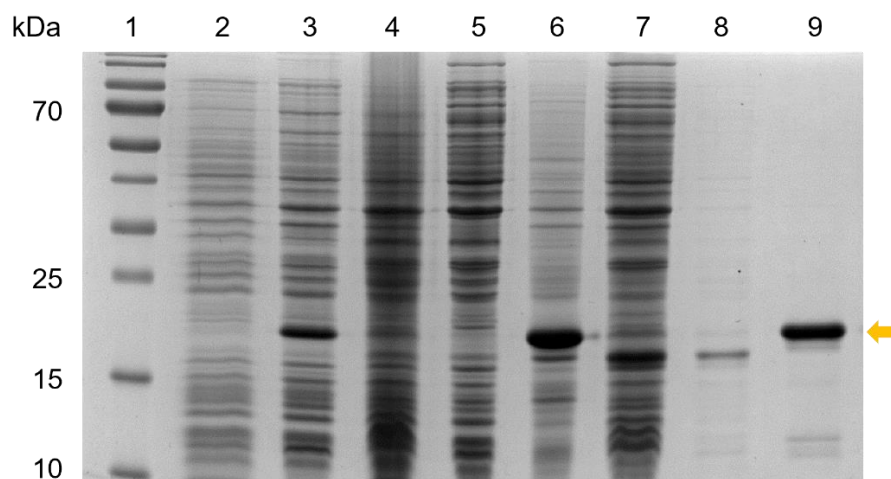


Ryc. 17. (A) Struktura przestrzenna białka PhiKo oraz (B) białka LysC. Struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko PhiKo jest złożone z 170 aminokwasów, natomiast LysC z 171 aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

### 5.2.2. Nadprodukcja i oczyszczanie białka PhiKo

Gen białka został syntetyzowany w firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Niemcy) i dostarczony w wektorze ekspresyjnym pET15b. W celu nadprodukcji potencjalnego białka litycznego użyłam szczepu *Escherichia coli* BL21(DE3). Transformację (Metoda 4.2) tego szczepu wykonałam z użyciem plazmidu pET15b\_PhiKo. Dla sprawdzenia efektywności nadprodukcji przygotowałam próbki przed indukcją oraz cztery godziny po indukcji 1 mM IPTG. Następnie próbki poddałam elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (Metoda 4.6.3), aby określić poziom nadprodukcji białka (Ryc. 18).

Analizując rozdział preparatów w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 18) można zauważyć, że białko PhiKo ulega wydajnej nadprodukcji (ścieżka nr 3) w szczepie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3). Następnie przeprowadziłam oczyszczanie białka za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu TALON (Metoda 4.4). Oczyszczane białko tylko w nieznaczej ilości przechodzi do osadu (ścieżka nr 5) oraz uległo w całości związaniu ze złożem (ścieżka nr 4). Nanoszenie buforu NPi-10 oraz NPi-20 na kolumnę nie doprowadziło do wypłukania białka z kolumny (ścieżka nr 7 i 8). W żelu poliakrylamidowym obserwowałam obecność tylko niewielu dodatkowych prążków w próbie białka po dializie, co świadczy o jego wysokiej czystości (ścieżka 9).

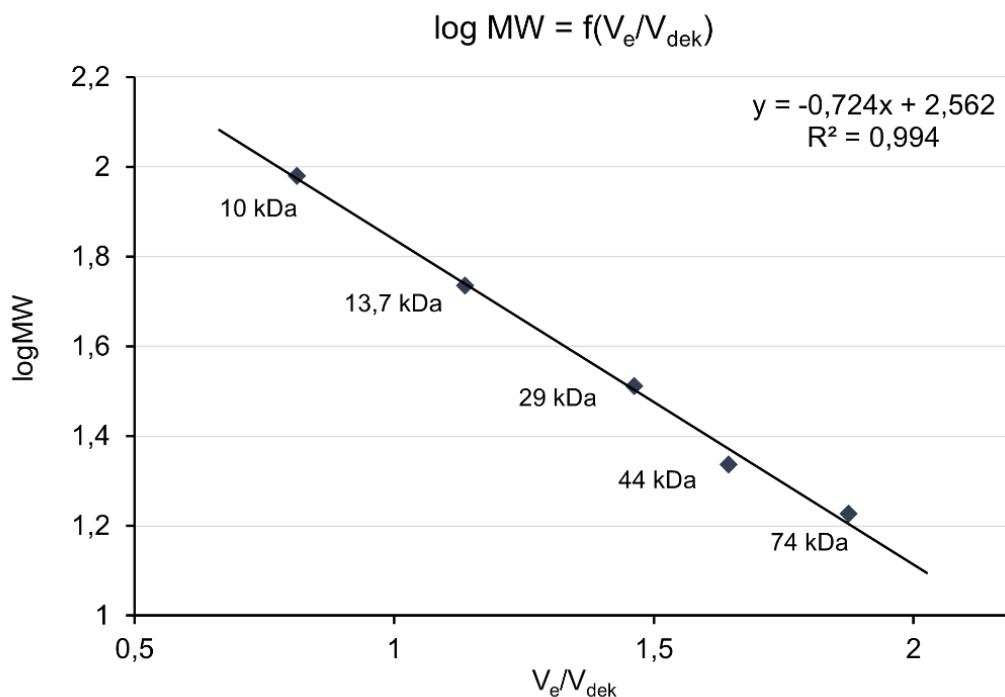


Ryc. 18. Elektroforeza SDS-PAGE 12,5% z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka oraz z kolejnych etapów oczyszczania. 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę). 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałką przedstawia pozycję naprodukowanego białka (21,6 kDa).

### 5.2.3. Analiza czystości i oligomeryczności białka PhiKo

Chcąc określić strukturę oligomeryczną enzymu PhiKo i potwierdzić czystość preparatu przeprowadziłam analizę próbki białka z wykorzystaniem sączenia molekularnego na kolumnie Superdex-75 10/300 GL (Materiały 4.4.4). W celu wykonania tego doświadczenia niezbędne było wyznaczenie krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem zestawu do kalibracji Low Molecular Weight (Cytivia). Dla enzymu PhiKo wyznaczono objętość elucji ( $V_e$ ) i obliczono  $V_e/V_{dek}$ , gdzie  $V_{dek}$  jest objętością martwą kolumny (Ryc. 19).

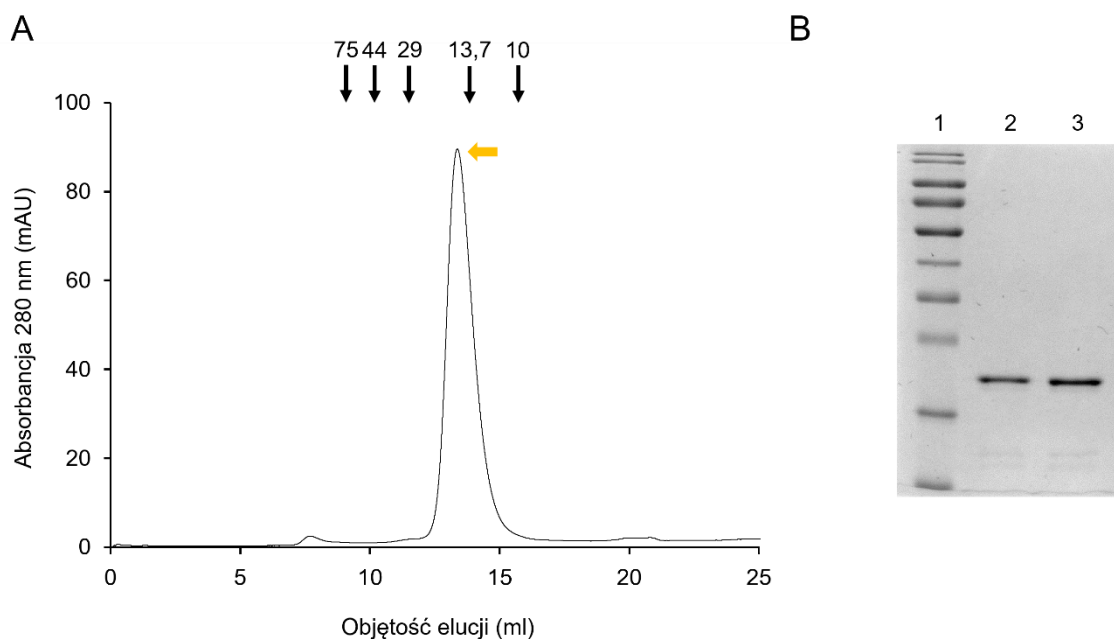




Ryc. 19. Krzywa kalibracyjna  $\log MW = f(V_e/V_{dek})$  wyznaczona poprzez rozdział białek wzorcowych na kolumnie Superdex-75 10/300 GL (Citiva). Użyłam następujących białek: aptotynina (10 kDa), rybonukleaza A (13,7 kDa), anhydraza węglanowa (29 kDa), albumina jaja kurzego (44 kDa) i konalbumina (74 kDa).

W wyniku rozdziału próbki białka PhiKo na kolumnie Superdex G-75 10/300 GL uzyskałam pojedynczy pik o objętości elucyjnej wynoszącej 13,12 ml (Ryc. 20). Biorąc pod uwagę sekwencję aminokwasową masa cząsteczkowa rekombinowanego białka PhiKo wyznaczona teoretycznie z pomocą programu Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) wynosi 21,6 kDa. Masa cząsteczkowa obliczona dla tego białka na podstawie krzywej kalibracyjnej wyniosła 22,9 kDa. Otrzymany wynik pokazuje, że białko PhiKo przyjmuje w roztworze formę monomeru. Dodatkowo otrzymany wynik potwierdza, że oczyszczone białko jest preparatem jednorodnym.



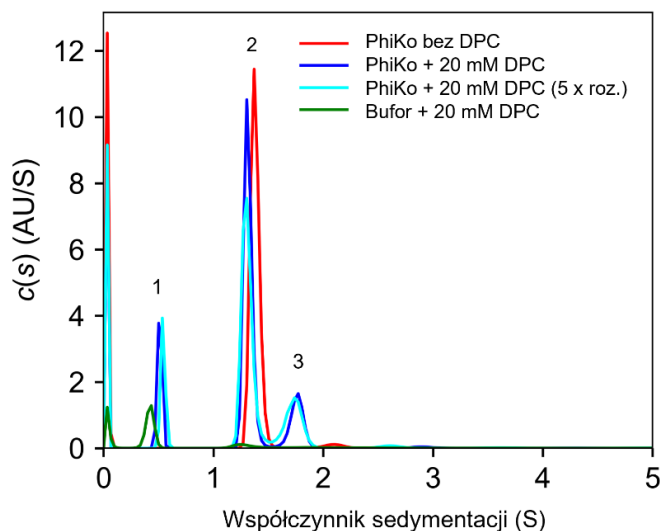


Rys. 20. Sączenie molekularne białka PhiKo na kolumnie Superdex G-75 10.300 GL. (A) Strzałką żółtą zaznaczono pik endolizyny, a położenie wzorców masy cząsteczkowej pokazano strzałkami czarnymi. (B) Rozdział próbek w 12,5% żelu poliakrylamidowym 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę), 2 – białko po sączeniu molekularnym, 3 – białko po dializie.

Kolejną metodą użytą do określenia struktury oligomerycznej białka PhiKo było analityczne ultrawiórowanie (Metoda 4.14). Celem eksperymentu było też zbadanie wpływu detergentu n-dodecylofosfocholiny (DPC) będącego analogiem błon komórek bakteryjnych na stopień oligomeryzacji białka PhiKo (Ryc. 21). Próbkę wolnego białka i próbki z DPC odwirowano w 4°C podczas tego samego doświadczenia. W kontroli negatywnej (bufor z DPC, zielona linia na wykresie; Ryc. 21) widoczny był jeden pik około 0,70  $S_{(20,w)}$ , który odpowiadał sedymentacji miceli DPC. W próbkach z endolizyną PhiKo (linia czerwona) występowały dwa piki, z których pierwszy odpowiadał za 97,7% sygnału i przedstawiał monomer o kulistym kształcie (współczynnik tarcia 1,25), a drugi (2,3% sygnału) wskazywał na nieznaczną dimeryzację białka.

Na podstawie dopasowań nieliniowych określiłam średnią masę cząsteczkową endolizyny PhiKo na 21 500, co dobrze odpowiada masie cząsteczkowej 21 600 obliczonej na podstawie sekwencji rekombinowanego białka. W próbkach białek z DPC (niebieskie linie), poza pikiem miceli DPC, podobnie jak w przypadku samej endolizyny PhiKo, obecne były dwa piki, ale drugi około 2,91  $S_{(20,w)}$  odpowiadający dimerowi był bardziej widoczny (15% sygnał całkowity). Podwyższony współczynnik tarcia o 1,51

najprawdopodobniej tłumaczy nieco wolniejszą sedymentację tej populacji. Wyniki te wskazują na tendencję białka PhiKo do tworzenia dimeru w kontakcie z błonami komórkowymi bakterii.



Ryc. 21. Analityczne ultrawierowanie białka PhiKo. Profile rozkładu współczynnika sedymentacji AUC dla białka PhiKo przy braku (linia czerwona) i w obecności (linie niebieskie) detergentu DPC. Kontrolę negatywną stanowił bufor z dodatkiem DPC (linia zielona). Szczyt numer 1 odpowiada sedymentacji miceli DPC, szczyt numer 2 odpowiada monomerowi PhiKo, natomiast szczyt numer 3 dimerowi białka PhiKo.

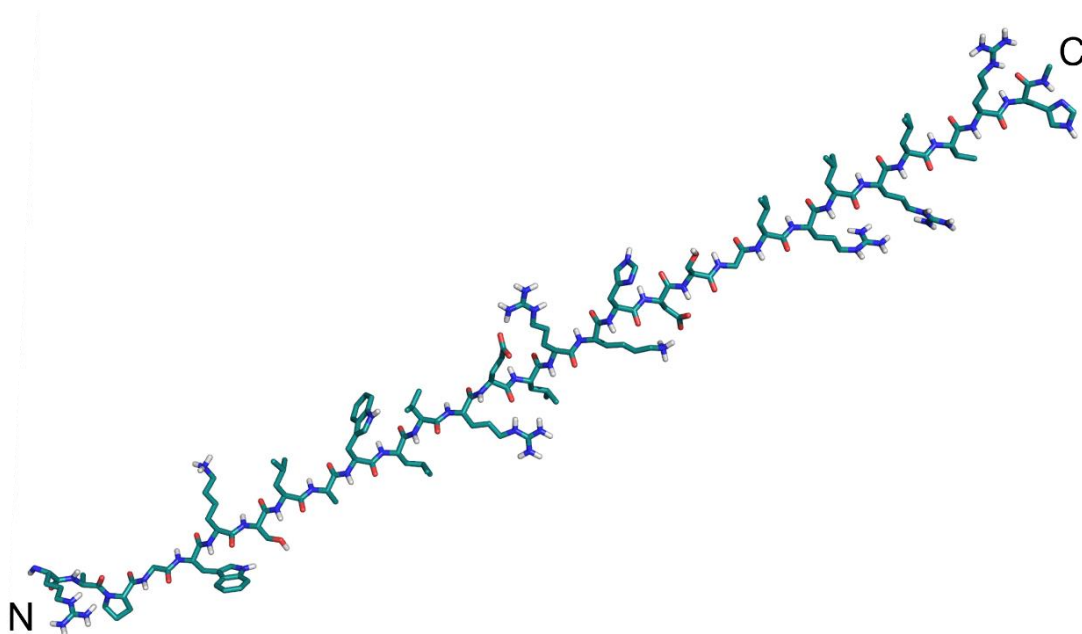
#### 5.2.4. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka PhiKo

Z uwagi na wyniki AUC, które wskazują na możliwość oddziaływania białka PhiKo z błonami bakteryjnymi postanowiłam poszukać regionów o potencjale antybakteryjnym ukrytych w sekwencji aminokwasowej białka, których potencjalnym mechanizmem działania byłyby destabilizacja błon bakteryjnych. W tym celu przeprowadziłam analizę bioinformatyczną z użyciem programu CAMP (Metoda 4.7). Program przy pomocy czterech algorytmów: Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) oraz Discriminant Analysis wytypował kilka regionów o potencjalnych właściwościach antybakteryjnych (Tabela S1). Do dalszej analizy wybrałam miejsce o najwyższym prawdopodobieństwie bycia regionem antybakteryjnym według wszystkich czterech algorytmów (Tabela 9). Odcinek ten odpowiadał resztom aminokwasowym 105-133 C- końcowej części białka.

Tabela 9. Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu odpowiadającego resztom aminokwasowym 105-133 białka PhiKo.

Sekwencja peptydu:	RAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRH	
Algorytm	Kategoria	Prawdopodobieństwo AMP
Support Vector Machine (SVM)	AMP	0,933
Random Forest (RF)	AMP	0,714
Artificial Neural Network (ANN)	AMP	
Discriminant Analysis (DA)	AMP	0,817

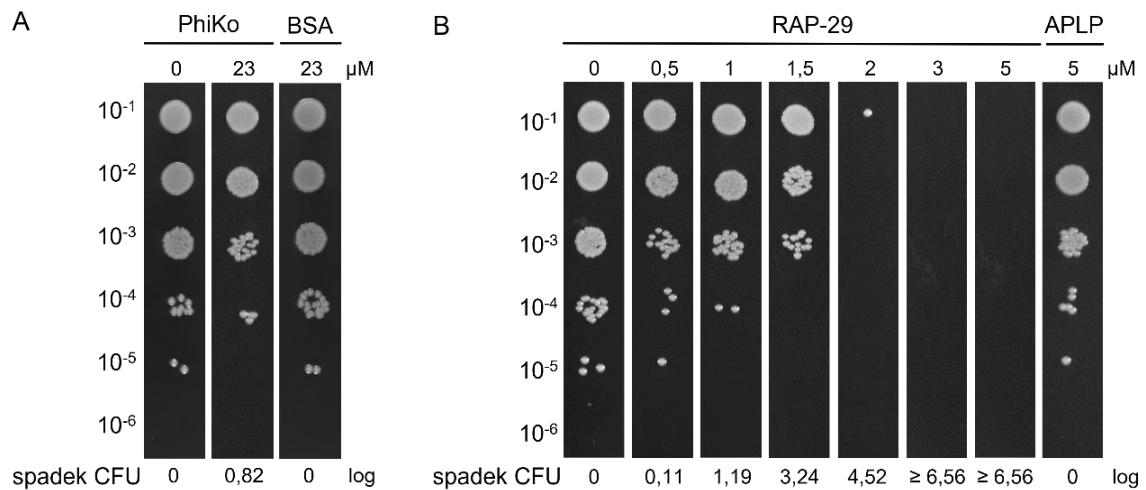
Wszystkie cztery algorytmy wykazały, że sekwencja aminokwasowa regionu C-terminalnego białka PhiKo może posiadać właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Na podstawie dostępnej sekwencji postanowiłam zsyntetyzować peptyd, który od nazwy trzech pierwszych aminokwasów oraz całkowitej długości nazwy został RAP-29 (Ryc. 22). Peptyd zsyntetyzowany został we współpracy z Panią dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG z Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.



Ryc. 22. Model sekwencji peptydu RAP-29. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, a niebieskim azot.

### 5.3.5. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej białka PhiKo i peptydu RAP-29

Charakterystyka uprzednio odkrytego peptydu Intestinaliny (P30) zsyntetyzowanego na podstawie N-końcowej sekwencji białka LysC *Clostridium intestinale* URNW wykazała jego aktywność lityczną wobec Gram-dodatniej bakterii *S. aureus*. W związku z tym analogicznie przeprowadziłam testy antybakteryjne *in vitro* (Metoda 4.8) przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 używając białka PhiKo w stężeniach 0 – 23  $\mu\text{M}$  i peptydu RAP-29 w stężeniach 0 – 5  $\mu\text{M}$  (Ryc. 23). Na podstawie otrzymanych wyników wykazałam, że już 3  $\mu\text{M}$  peptydu RAP-29 powodowało całkowitą redukcję  $10^6$  komórek *S. aureus* ATCC 25923, podczas gdy nie zaobserwowałam znaczącej aktywności białka PhiKo nawet przy stężeniu 23  $\mu\text{M}$  (dla uproszczenia na Ryc. 23 pokazałam tylko seryjne rozcieńczenia reakcji kontrolnej oraz próby z użyciem 23  $\mu\text{M}$  stężenia białka PhiKo).



Ryc. 23. Testy rozcieńczeń seryjnych określające zależną od dawki aktywność białka PhiKo i peptydu RAP-29 wobec *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne oceniały aktywność (A) PhiKo w stężeniach 0 oraz 23  $\mu\text{M}$  i (B) RAP-29 w zakresie stężeń 0 – 5  $\mu\text{M}$ . Krople 5  $\mu\text{l}$  zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w  $37^\circ\text{C}$  przez noc, a następnie sfotografowałam. Albumina surowicy bydlęcej (BSA) w stężeniu 23  $\mu\text{M}$  i peptyd APLP w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  służyły jako kontrole negatywne odpowiednio dla PhiKo i RAP-29. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.

Niska aktywność białka PhiKo wobec *S. aureus* ATCC 25923 nie wyklucza aktywności litycznej białka wobec innych szczepów bakterii. W kolejnym etapie badań przeprowadziłam więc testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.8) wobec gronkowców Gram-dodatnich i wybranych bakterii Gram-ujemnych (Materiały 3.1) z użyciem białka PhiKo w stężeniu 23  $\mu$ M i peptydu RAP-29 w stężeniu 3  $\mu$ M. Wyniki przedstawione zostały w Tabeli 10.

Tabela 10. Działanie bakteriobójcze białka PhiKo i peptydu RAP-29 na wybrane bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

Szczep bakteryjny	Średnie spadki ilości bakterii (log CFU/ml)	
	PhiKo	RAP-29
<b>Gram-dodatnie bakterie</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,82 $\pm$ 0,05	5,74 $\pm$ 0,06
<i>S. aureus</i> MSSA KPD 740	0,02 $\pm$ 0,03	6,89 $\pm$ 0,03
<i>S. aureus</i> MRSA KPD 425	0,75 $\pm$ 0,05	6,69 $\pm$ 0,09
<i>S. epidermidis</i> KPD 440	0,06 $\pm$ 0,05	6,93 $\pm$ 0,06
<i>S. hominis</i> KPD 910	0,06 $\pm$ 0,08	5,21 $\pm$ 0,06
<i>S. pettenkoferi</i> KPD 741	0,08 $\pm$ 0,06	4,40 $\pm$ 0,06
<b>Gram-ujemne bakterie</b>		
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	2,57 $\pm$ 0,07	6,93 $\pm$ 0,06
<i>A. baumannii</i> MDR 581	0,44 $\pm$ 0,10	7,10 $\pm$ 0,07
<i>A. baumannii</i> KPD 735	0,02 $\pm$ 0,02	6,95 $\pm$ 0,05
<i>E. cloacae</i> KPD 297	0,30 $\pm$ 0,02	3,78 $\pm$ 0,05
<i>E. coli</i> KPD 217	0,15 $\pm$ 0,09	6,23 $\pm$ 0,08
<i>K. pneumoniae</i> KPD 298	0,04 $\pm$ 0,06	4,41 $\pm$ 0,03
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,61 $\pm$ 0,05	3,67 $\pm$ 0,10
<i>P. aeruginosa</i> KPD 430	0,58 $\pm$ 0,10	6,65 $\pm$ 0,04
<i>P. aeruginosa</i> CRPA KPD 431	0,62 $\pm$ 0,08	5,72 $\pm$ 0,12

Enzym PhiKo był nieaktywny wobec większości badanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wykazując znaczącą aktywność tylko wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 (spadek ilości bakterii o 2,57  $\pm$  0,07 log). Natomiast peptyd RAP-29 był aktywny wobec wszystkich testowanych patogenów bakteryjnych

przy najniższym spadku liczby bakterii *P. aeruginosa* PAO1 ( $3,67 \pm 0,10$  log), a najwyższym dla *A. baumannii* KPD 735 (spadek o  $6,95 \pm 0,05$  log).

#### 5.2.6. Określenie minimalnego stężenia hamującego dla RAP-29

Wartości MIC określiłam dla peptydu RAP-29 (Materiały 4.9) w stosunku do panelu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wymienionych w Tabeli 11. Dla badanego peptydu RAP-29 wartości MIC wynosiły od 2,0 do 15,5  $\mu\text{M}$ . Najwyższe wartości MIC (31  $\mu\text{M}$ ) zaobserwowano dla *S. aureus* KPD 740 oraz *S. aureus* KPD 425. Najniższą wartości MIC (2  $\mu\text{M}$ ) otrzymałam tylko dla szczepu *S. hominis* KPD 910. Nieco wyższe wartości (3,9  $\mu\text{M}$ ) dla *S. pettenkoferi* KPD 741, *A. baumannii* CRAB KPD 205, *A. baumannii* MDR 258 oraz *A. baumannii* KPD 735. Interesujący jest fakt, że peptyd RAP-29 wykazywał większą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii z rzędu *Pseudomonadales*: *A. baumannii* i *P. aeruginosa*, niż wobec *S. aureus* MSSA i MRSA. Wyników tych nie zaobserwowałam w przeprowadzonych testach przeciwbakteryjnych wykonanych w środowisku hipotonicznym (20 mM HEPES, pH 7,4), gdzie większość bakterii była podobnie podatna na działanie peptydu.

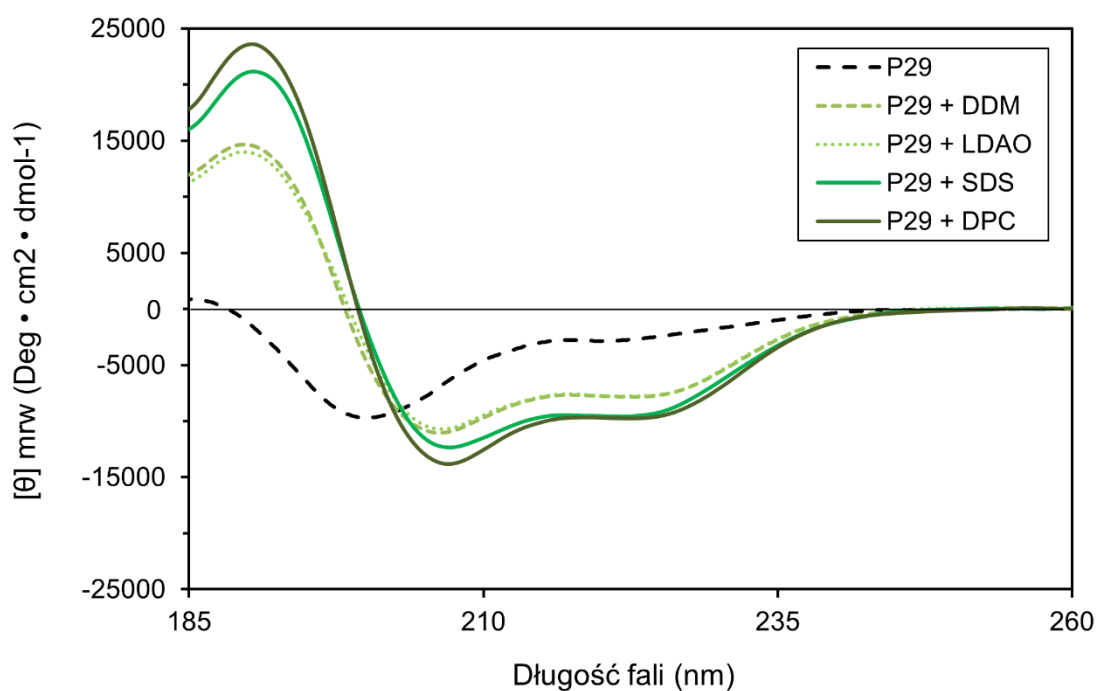
Tabela 11. MIC dla peptydu RAP-29 w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Szczep bakteryjny	RAP-29 MIC	
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$
<b>Gram-dodatnie bakterie</b>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	54,4	15,5
<i>S. aureus</i> MSSA KPD 740	108,8	31
<i>S. aureus</i> MRSA KPD 425	108,8	31
<i>S. epidermidis</i> KPD 440	54,4	15,5
<i>S. hominis</i> KPD 910	6,8	2
<i>S. pettenkoferi</i> KPD 741	13,6	3,9
<b>Gram-ujemne bakterie</b>		
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	13,6	3,9
<i>A. baumannii</i> MDR 581	13,6	3,9
<i>A. baumannii</i> KPD 735	13,6	3,9

<i>A. baumannii</i> RUH134	27,2	7,8
<i>C. braaki</i> KPD 218	54,4	15,5
<i>E. cloacae</i> KPD 297	54,4	15,5
<i>E. coli</i> KPD 217	27,2	7,8
<i>K. pneumoniae</i> KPD 298	54,4	15,5
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	54,4	15,5
<i>P. aeruginosa</i> KPD 430	54,4	15,5
<i>P. aeruginosa</i> CRPA KPD 431	54,4	15,5

### 5.2.7. Analiza struktury oligomerycznej peptydu RAP-29

Chcąc określić strukturę drugorzędową peptydu RAP-29 wykonałam spektroskopię dichroizmu kołowego (Metoda 4.13), w którym zapisywane zostały widma bez lub w obecności detergentów (Materiały 3.8), które są analogami błon bakteryjnych (Rys. 24).

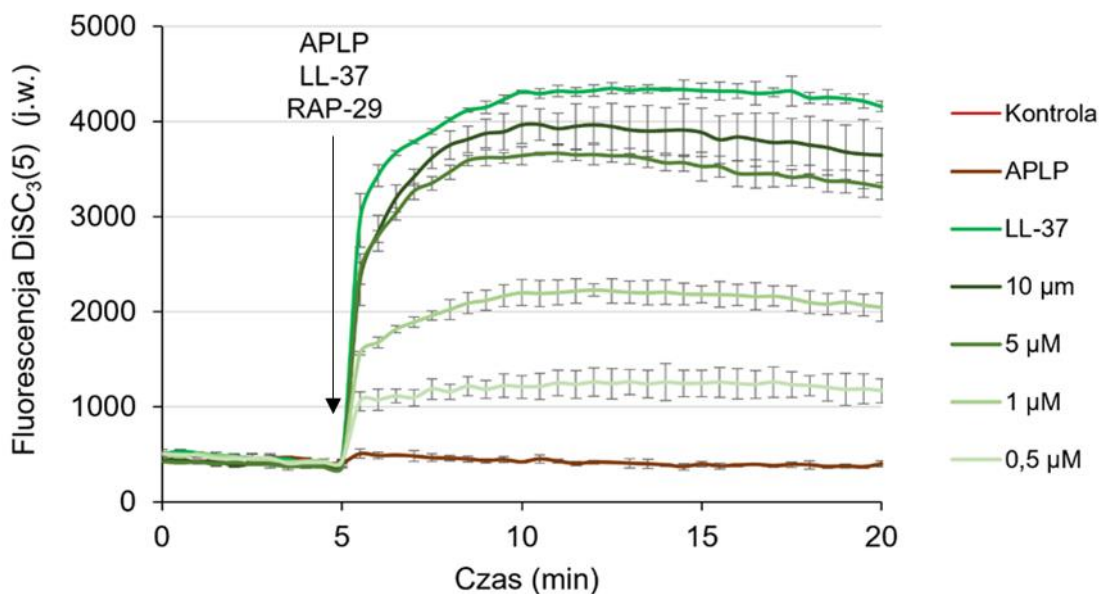


Rys. 24. Widma dichroizmu kołowego peptydu wykazują konformację  $\alpha$ -helikalną RAP-29 w obecności detergentów DDM, LDAO, SDS i DPC. Bez dodatku detergentu peptyd ma strukturę nieuporządkowaną.

Otrzymane wyniki pokazują, że peptyd RAP-29 sam nie posiada określonej struktury w roztworze. Jednak w obecności laurylo- $\beta$ -D-maltozydu (DDM), N-tlenku laurylodimetyloaminy (LDAO), dodecylosiarczanu sodu (SDS) i dodecylofosfocholiny (DPC) przyjmuje konformację  $\alpha$ -helikalną.

#### 5.2.8. Analiza mechanizmu działania peptydu RAP

W celu analizy zmian potencjału błony komórkowej po dodaniu peptydu RAP-29 do zawiesiny komórek *S. aureus* ATCC 25923 użyłam barwnika fluorescencyjnego DiSC<sub>3</sub>(5). Dodatek peptydu RAP-29 wywołał znaczny wzrost fluorescencji DiSC<sub>3</sub>(5) w badanych komórkach bakteryjnych (Ryc. 25). Wzrost był szybki przy stężeniach 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M. Peptyd w stężeniach 0,5  $\mu$ M i 1  $\mu$ M wykazywał mniejszy efekt. Dodatek 10  $\mu$ M peptydu LL-37 zastosowano jako kontrolę pozytywną (znaczny wzrost fluorescencji barwnika DiSC<sub>3</sub>(5)).

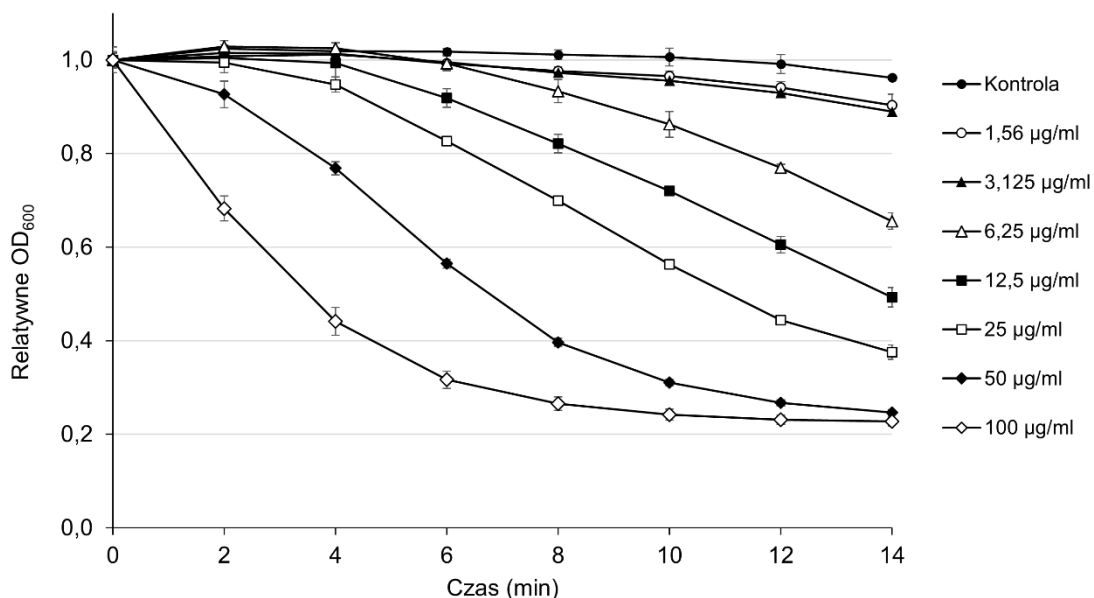


Ryc. 25. Mechanizm aktywności peptydu RAP-29. Barwnik DiSC<sub>3</sub>(5) wrażliwy na zmiany potencjału błonowego inkubowano z bakteriami do czasu utworzenia stabilnej linii bazowej. Punkt czasowy dodania APLP, LL-37 oraz peptydu RAP-29 jest zaznaczony strzałką. Wzrost fluorescencji po dodaniu peptydu mierzono przy długości fali wzbudzenia 652 nm i długości fali emisji 672 nm w funkcji czasu. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



### 5.2.9. Aktywność białka PhiKo w zależności od stężenia

W przeciwieństwie do peptydu RAP-29 (aktywnego wobec szeregu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych) białko PhiKo było aktywne w testach antybakteryjnych tylko wobec szczepu *A. baumannii* CRAB KPD 205 (Tabela 12). Bakteriofag phiKo z którego białko pochodzi został wyizolowany z gorących źródeł (konkretne miejsce izolacji nie zostało podane; numer dostępu NCBI GenBank MH673671.2), postawiłam więc pytanie, czy białko PhiKo jest aktywne wobec bakterii termofilnych? Do dalszych analiz wybrałam szczep *Thermus thermophilus* HB8 będący jednym z najlepiej poznanych termofilnych szczepów bakterii (Cava i in., 2009). Przygotowany substrat (Metody 4.18) zawiesiłam w 20 mM buforze HEPES, pH 7,4 (Materiały 3.12). Białko PhiKo w stężeniach: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml i 1,25 µg/ml dodawałam do zawiesiny bakterii (Metody 4.16). Kontrolę negatywną stanowił bufor wykorzystany do dializy białka (Materiały 3.12). Pomiar spadku absorbancji mieszaniny bakterii pod wpływem wzrastającego stężenia białka w porównaniu do reakcji kontrolnej przeprowadzałam w temperaturze 60°C z użyciem czytnika Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) (Ryc. 26).

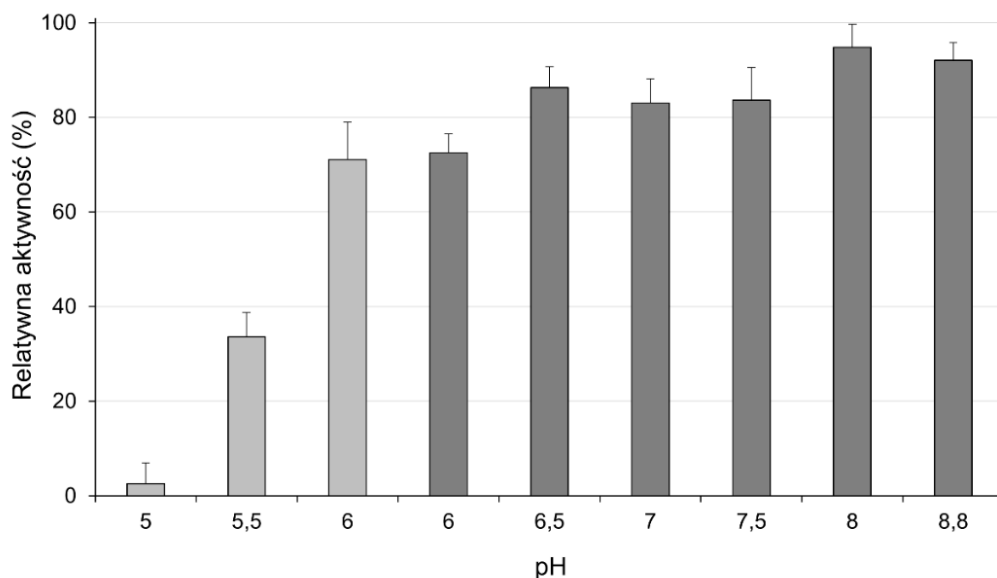


Ryc. 26. Aktywność lityczna białka PhiKo wobec bakterii *T. thermophilus* HB8 przeprowadzona w czasie w zależności od stężenia białka w 20 mM buforze HEPES, pH 7,4, w temperaturze 60°C. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach biologicznych; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

Na powyższej rycinie wykazano aktywność badanego białka z *T. thermophilus* HB8 w zależności od stężenia. Najlepszą wydajność PhiKo osiąga przy stężeniu 50 µg/ml i regularnie, wraz ze zmniejszaniem stężenia białka, jego aktywność jest mniejsza i wymaga dłuższego czasu inkubacji. Dlatego też stężenie 50 µg/ml zostało wykorzystane do przeprowadzenia kolejnego doświadczenia.

#### 5.2.10. Określenie wpływu pH na aktywność białka PhiKo

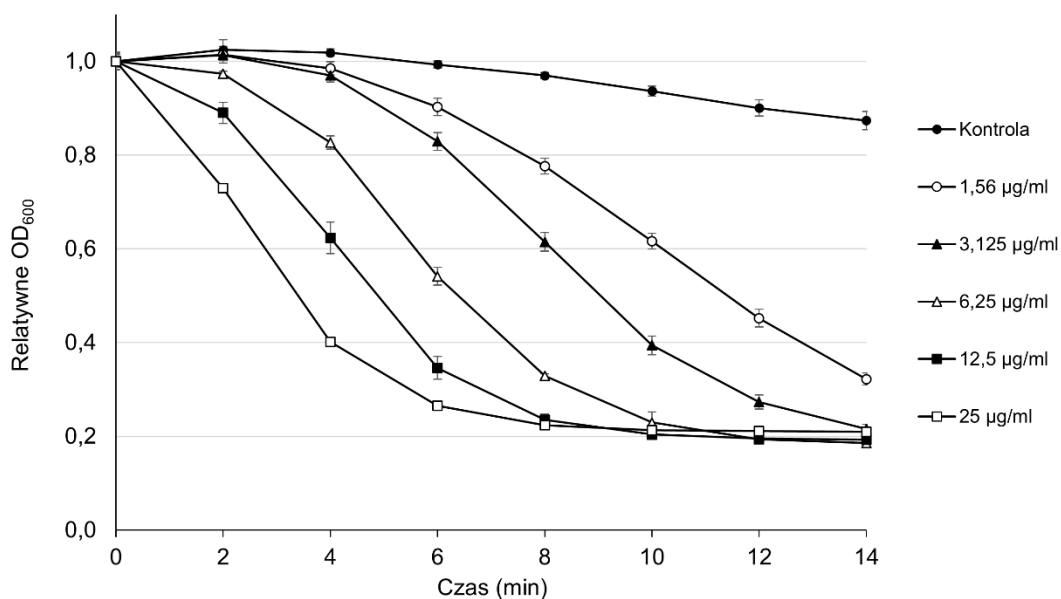
W celu ustalenia optymalnego buforu umożliwiającego prześledzenie aktywności białka PhiKo wykorzystałam zestaw buforów: pH 5,0-6,0 octan sodu oraz pH 6,0-8,8 20 mM Tris-HCl (Materiały 3.13). Analizę prowadziłam z wykorzystaniem testu redukcji zmętnienia (Metody 4.16) z wykorzystaniem protokołu: [bio-protocol.org/e1233](http://bio-protocol.org/e1233). Doświadczenie wykonałam dla substratu *T. thermophilus* HB8 (Materiały 3.1). Zaobserwowałam, że białko PhiKo wykazuje najwyższą aktywność w zakresie pH 6,5-8,8 (Ryc. 27). Spośród sprawdzonych dziewięciu buforów najlepszą aktywność mierzoną białko PhiKo wykazało w buforze Tris-HCl pH 8,0 ( $94,8\% \pm 4,86$ ), dlatego do dalszych doświadczeń został wykorzystywany właśnie ten bufor. Dla pozostałych doświadczeń wykazało następujące wartości: octan sodu, pH 5,0 (2,5%); octan sodu, pH 5,5 (33,6%); octan sodu, pH 6,0 (71,1%); Tris-HCl, pH 6,0 (72,5%); Tris-HCl, pH 6,5 (86,3%); Tris-HCl, pH 7,0 (83%); Tris-HCl, pH 7,5 (83,6%); Tris-HCl, pH 8,8 (92%). (Ryc. 27).



Ryc. 27. Wpływ pH (5-8,8) na aktywność lityczną białka PhiKo. Jako substrat w teście redukcji zmętnienia użyłam *T. thremophilus* HB8 (Materiały 3.1). Pomiaru aktywności dokonałam po 14 min w 60°C, a końcowe stężenie białka wynosiło 50 µg/ml. Aktywność względną obliczono przyjmując najwyższą aktywność PhiKo jako 100%. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach biologicznych; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

#### 5.2.11. Aktywność białka PhiKo w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0

Po wybraniu optymalnego buforu dla aktywności litycznej białka PhiKo, powtórzyłam doświadczenie z określeniem aktywności białka w zależności od stężenia. Wykorzystane stężenia białka to od 1,56 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml do 25 µg/ml. Największą aktywność PhiKo wykazuje w stężeniu 25 µg/ml, a spadek gęstości optycznej OD<sub>600</sub> z 1 do 0,2 następuje w ciągu 8 minut (Ryc. 28).

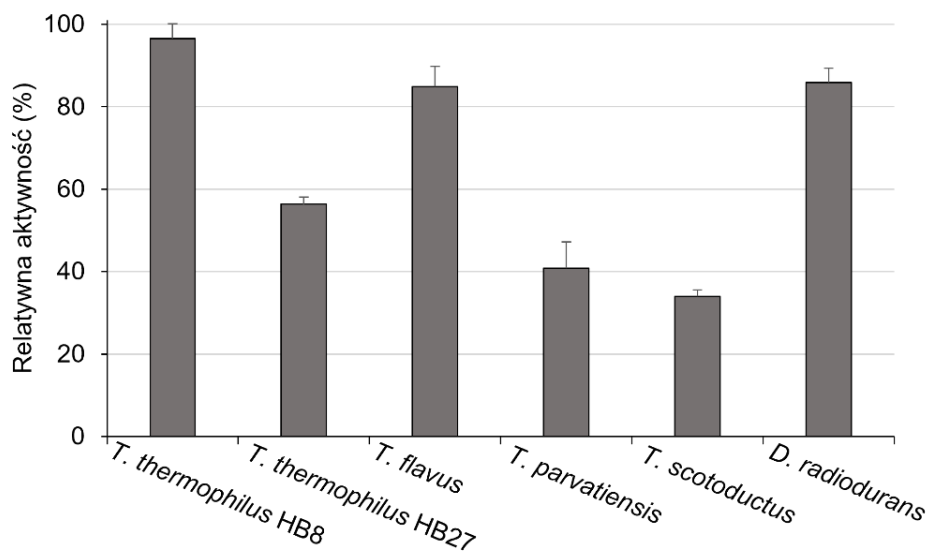


Ryc. 28. Aktywność lityczna białka PhiKo wobec bakterii *T. thermophilus* HB8 przeprowadzona w czasie w zależności od stężenia białka w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0 w temperaturze 60°C. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach biologicznych; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

#### 5.2.12. Specyficzność substratowa

Wyniki pokazały, że białko PhiKo jest aktywne w stosunku do termofilnej bakterii *Thermus thermophilus* HB8. Powstało jednak pytanie, czy białko PhiKo jest aktywne wobec bakterii będącej gospodarzem dla bakteriofaga phiKo – *Thermus thermophilus* HB27 DSM 7039 oraz innych szczepów bakterii ekstremofilnych: *Thermus flavus* MAT1087, *Thermus parvatiensis* DSM 21745, *Thermus scotoductus* MAT2119 oraz *Deinococcus radiodurans* ATCC 13939. W tym celu substraty z badanych szczepów (Metody 4.15) zawieszałam w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0 (Materiały 3.13). Kontrolę negatywną stanowił bufor wykorzystany do dializy białka (Materiały 3.12). Reakcję przeprowadziłam w temperaturze 60°C z użyciem czytnika Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) (Ryc. 29).

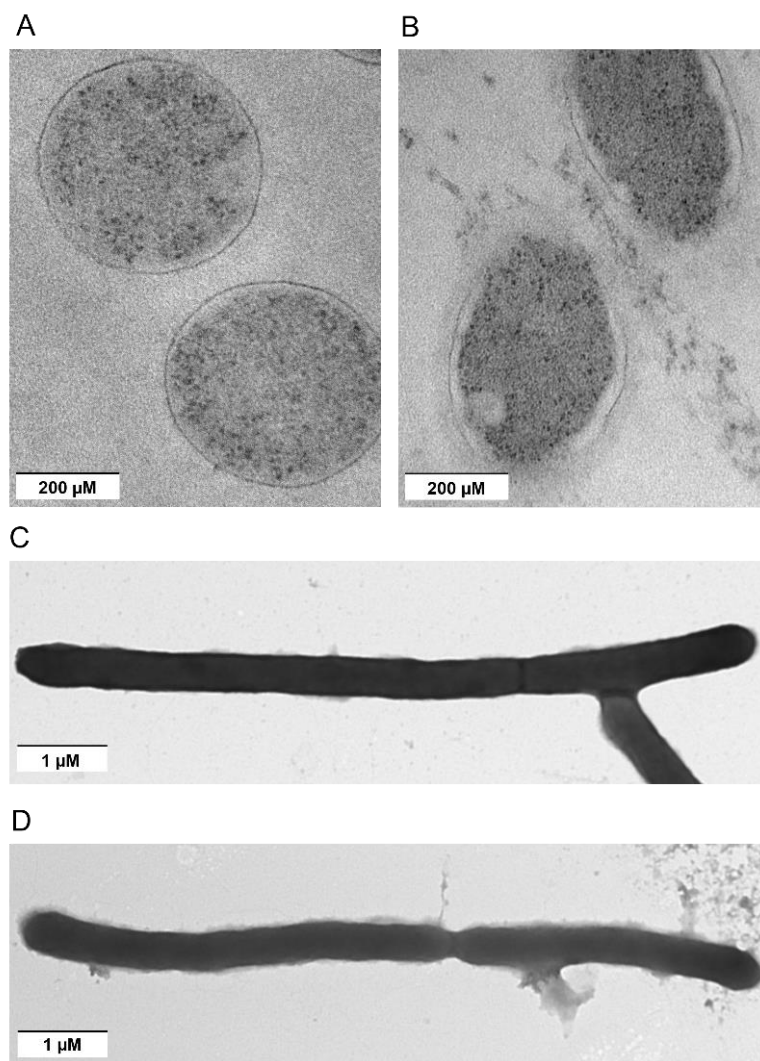
Największą aktywność białko PhiKo wykazuje w stosunku do bakterii *Thermus thermophilus* HB8 równą  $96,49\% \pm 3,6$  i *Thermus flavus*  $84,81\% \pm 5,0$ . W stosunku do *Thermus termophilus* HB27  $56,33 \pm 1,7$ , *Thermus parvatiensis*  $40,85\% \pm 6,31$ , a najniższą względem *Thermus scotoductus*  $34,01\% \pm 1,5$  (Ryc. 29). Testy przeprowadziłam również z wykorzystaniem ekstremofilnej bakterii *Deinococcus radiodurans* ATCC 13939 wobec której białko wykazywało  $85,89\% \pm 3,5$  aktywności litycznej.



Ryc. 29. Aktywności lityczna białka PhiKo wobec pięciu szczepów bakterii z rodziny *Thermus* oraz ekstremofilnej bakterii *Deinococcus radiodurans* w 20 mM buforze Tris-HCl pH 8,0. Pomiaru aktywności dokonałam po 14 min w temperaturze 60°C, a końcowe stężenie białka wynosiło 6,25 µg/ml. Aktywność względną obliczyłam przyjmując najwyższą aktywność PhiKo jako 100%. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

#### 5.2.13. Ocena aktywności PhiKo za pomocą mikroskopii elektronowej

Kolejnym krokiem było zbadanie zmian w morfologii komórek bakteryjnych *Thermus thermophilus* HB8 traktowanych białkiem PhiKo przy wykorzystaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Metoda 4.11). W kontroli nie obserwowano żadnych zmian w budowie morfologicznej komórki przy braku białka PhiKo (Ryc. 30 A), natomiast traktowanie bakterii białkiem PhiKo w stężeniu 1,56 µg/ml przez 14 min powodowało zmiany w wyglądzie komórek bakteryjnych w tym uszkodzenia ściany komórkowej oraz wypływ składników cytoplazmy na zewnątrz komórki (Ryc. 30 B). Taki sam obraz uzyskany został dla zdjęć negatywnych (Ryc. 30 C, D). Tak niskie stężenie białka (1,56 µg/ml) zostało wybrane, aby zaobserwować ewentualne zmiany z strukturze komórek, ale nie spowodować całkowitej ich lizy.



Ryc. 30. Transmisyjna mikroskopia elektronowa komórek *T. thermophilus* HB8 poddanych działaniu białka PhiKo. (A) Komórki *T. thermophilus* HB8 nie traktowane białkiem PhiKo (kontrola). (B) Komórki *T. thermophilus* HB8 traktowane białkiem PhiKo (1,56  $\mu\text{g/ml}$ , 14 min, 60°C). (C, D) Komórki wybarwione 1,5% octanem uranylu. (C) Komórki *T. thermophilus* HB8 nie traktowane białkiem PhiKo (kontrola). (D) Komórki *T. thermophilus* HB8 traktowane białkiem PhiKo (1,56  $\mu\text{g/ml}$ , 14 min, 60°C).

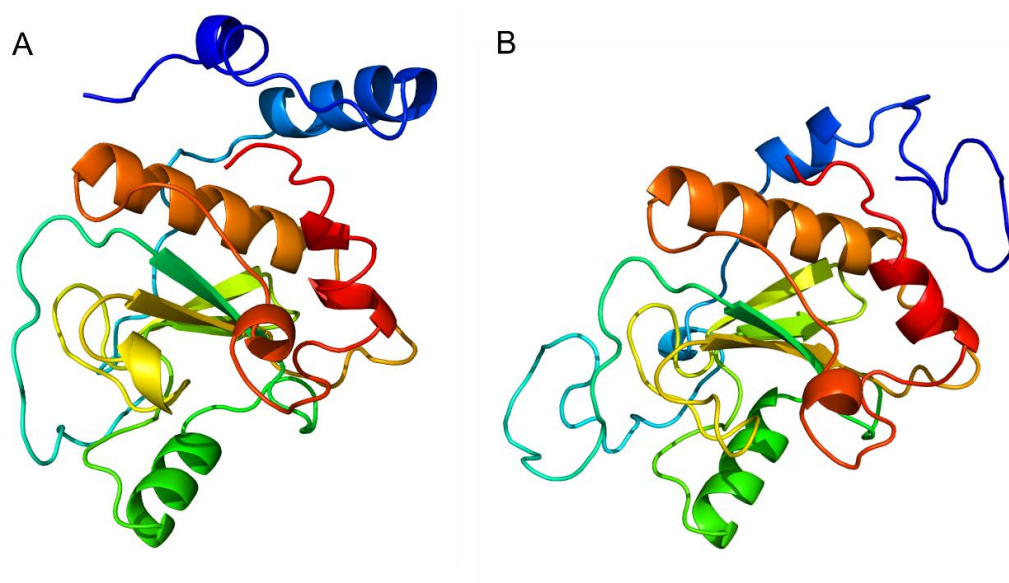
Podsumowując, według BLASTP (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) białko PhiKo wykazuje 37% identyczności sekwencji pierwszorzędowej z analizowanym uprzednio białkiem LysC oraz posiada identyczny motyw katalityczny charakterystyczny dla amidaz N-acetylmuramylo-L-alaninowych typu 2 (Ryc. 15). Region N-terminalny białka PhiKo nie wykazuje jednak podobieństwa do N-terminalnego regionu białka LysC na podstawie którego został zsyntetyzowany peptyd Intestinalina (P30) scharakteryzowany w trakcie niniejszych badań. Wykazałam jednak zwiększoną

dimeryzację białka PhiKo w obecności detergentu będącego analogiem bakteryjnych błon komórkowych co wskazywałoby na możliwość oddziaływania białka z dwuwarstwami lipidowymi. Według algorytmu CAMP w sekwencji białka PhiKo występują regiony o potencjalnej funkcji antybakteryjnej, a peptyd nazwany RAP-29, zsyntetyzowany na podstawie C-terminalnej sekwencji białka PhiKo (aa 105-133) wykazywał silne właściwości antybakteryjne. Obrazują to zarówno spadki ilości bakterii wykorzystanych w testach antybakteryjnych (spadki pomiędzy  $3,67 \pm 0,10$ , a  $6,93 \pm 0,06$  log) oraz wartości MIC pomiędzy 2, a  $31 \mu\text{M}$ . Kolejnym nasuwającym się pytaniem jest, czy inne białka lityczne podobne do LysC posiadają regiony o funkcji AMP i w jakich częściach tych białek (N-terminalnych, środkowych, czy C-terminalnych) regiony te są zlokalizowane?

### 5.3. Aktywność przeciwbakteryjna GasC

#### 5.3.1. Podobieństwo białka GasC do autolizny LysC

Poszukiwania nowych białek litycznych poprzez przeprowadzone analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowej enzymu LysC doprowadziły do wyodrębnienia strukturalnie podobnego białka jakim jest potencjalna amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa nazwana przeze mnie GasC pochodząca z Gram-dodatniej bakterii *Clostridium gasigenes* (numer akcesyjny GenBank: SDO71926). W bazie danych NCBI GenBank białko to znajduje się pod jeszcze jednym numerem akcesyjnym: WP\_089964948 jako „peptidoglycan recognition family protein”. Zarówno LysC jak i GasC wykazują globularną strukturę, a ich łańcuchy polipeptydowe układają się bardzo podobnie w przestrzeni (Ryc. 31). Według programu BLASTP białka wykazują 67,25% identyczności sekwencji aminokwasowej (wartość  $E=3e-94$ ). Na podstawie podobieństwa motywów katalitycznych (Ryc. 15) oraz podobieństwa struktury przestrzennej można wysnuć hipotezę badawczą, że białko GasC ma aktywność lityczną analogiczną do białka LysC. Tak postawiona teza badawcza zakłada, że podobnie jak w przypadku scharakteryzowanej w naszym laboratorium autolizyny LysC, zewnętrznemu dodaniu białka GasC do komórek bakterii powinno skutkować lizą komórek bakteryjnych.



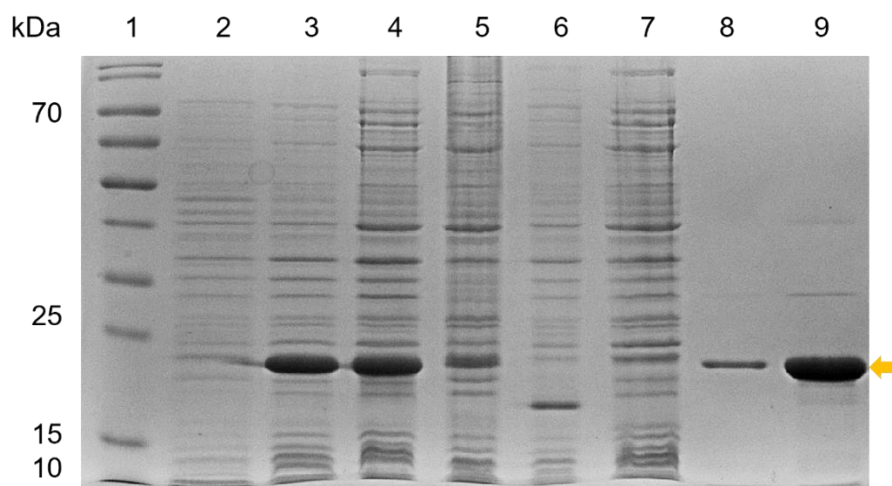
Ryc. 31. Struktury przestrzenne (A) białka GasC oraz (B) białka LysC. Każda struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko GasC jest złożone z 167 aminokwasów, natomiast LysC z 172 aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

### 5.3.2. Nadprodukcja i oczyszczanie białka GasC

Gen białka został syntetyzowany w firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Niemcy) i dostarczony w wektorze ekspresyjnym pET15b. W celu nadprodukcji potencjalnego białka litycznego użyłam szczepu *Escherichia coli* BL21(DE3). Transformację (Metoda 4.2) tego szczepu wykonałam z użyciem plazmidu pET15b z genem kodującym białko docelowe. Dla sprawdzenia efektywności nadprodukcji przygotowałam próbki przed indukcją oraz cztery godziny po indukcji 1 mM IPTG. Następnie próbki poddałam elektroforezie (Metoda 4.6.3), w żelu poliakrylamidowym (Metoda 4.6.1), aby określić poziom nadprodukcji białka (Ryc. 32).

Nadprodukowane białko zostało poddane oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa (Metody 4.4.2) na kolumnie TALON (Materiały 3.12), która przy wykorzystaniu jonów kobaltowych umożliwia wiązanie N-terminalnych ogonów histydynowych białek. Z każdego etapu oczyszczania pobierano próbki, które następnie rozdzielono w żelu poliakrylamidowym (Metody 4.6.1) w celu sprawdzenia obecności białka (Ryc. 32).



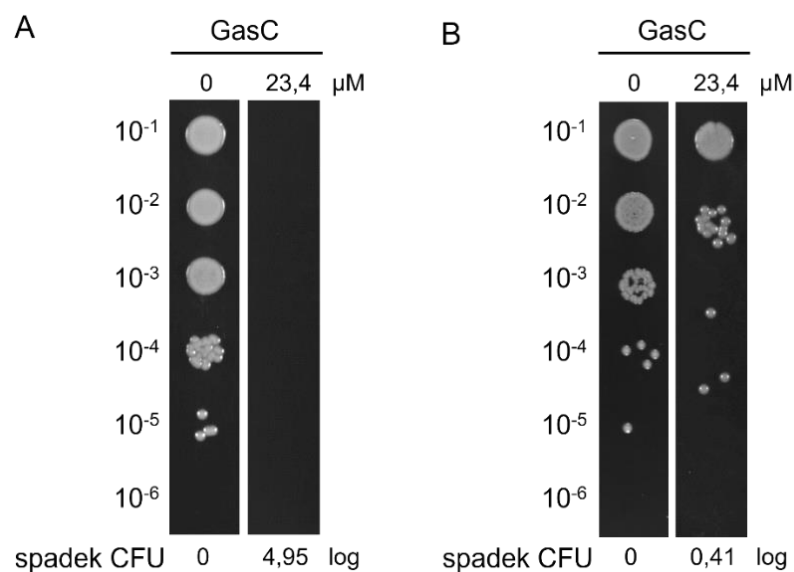


Ryc. 32. Elektroforeza SDS-PAGE 12,5% z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka GasC oraz z kolejnych etapów oczyszczania. 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę), 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałka przedstawia pozycję naprodukowanego białka (21,4 kDa).

Analizując rozdział preparatów w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 32) można zauważyć, że białko GasC ulega wydajnej nadprodukcji (ścieżka nr 3) w szczepie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3). Oczyszczane białko tylko w nieznacznej ilości przechodzi do osadu (ścieżka nr 5) oraz uległo praktycznie w całości związaniu ze złożem (ścieżka nr 4). Nanoszenie buforu NPi-10 oraz NPi-20 na kolumnę nie doprowadziło do wypłukania białka z kolumny (ścieżka nr 7 i 8). W żelu poliakrylamidowym zaobserwowano obecność tylko niewielu dodatkowych prążków w preparacie białka po dializie, co świadczy o jego wysokiej czystości (ścieżka 9).

### 5.3.3. Aktywność przeciwbakteryjna białka GasC

W celu zbadania potencjału przeciwbakteryjnego białka GasC przeprowadziłam testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.8). Wybrałam po jednym szczepie bakterii Gram-ujemnej (*A. baumannii* CRAB KPD 205) i Gram-dodatniej (*S. aureus* ATCC 25923), a wyniki przedstawiłam na rycinie poniżej (Ryc. 33).



Ryc. 33. Testy antybakteryjne białka GasC wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 i (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności białka GasC w stężeniu 500 μg/ml (23,4 μM). Krople 5 μl zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.

W teście antybakteryjnym wykazałam, że białko GasC było aktywne wobec bakterii Gram-ujemnej (spowodowało całkowite zahamowanie wzrostu *A. baumannii* CRAB KPD 205), natomiast jest nieaktywne wobec *S. aureus* ATCC 25923. Dlatego w kolejnym kroku postanowiłam przeprowadzić analizę *in silico* i poszukać w sekwencji białka regionów o potencjalnej aktywności antybakteryjnej.

#### 5.3.4. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka GasC

W celu poszukiwania potencjalnego peptydu antybakteryjnego „ukrytego” w sekwencji aminokwasowej białka GasC wykorzystano analizę bioinformatyczną z użyciem programu CAMP (Metoda 4.7). Program wytypował kilka regionów o potencjalnych właściwościach antybakteryjnych (Tabela S2). Jeden z nich zwrócił moją szczególną uwagę ze względu na umiejscowienie w N-terminalnym regionie białka GasC (Ryc. 34). Wyniki przewidywania aktywności antybakteryjnej regionu N-terminalnego białka GasC o sekwencji VVRKLLKRMRRQSPPPMPKI zamieściłam w Tabeli 12.

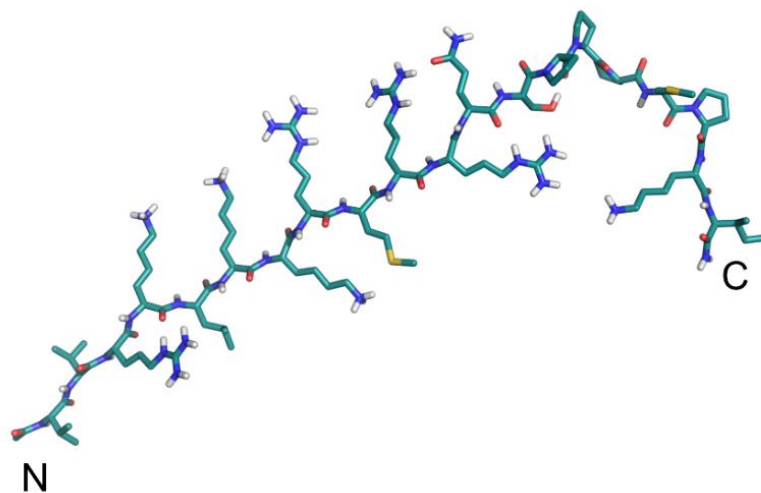
GasC <i>C.gasigenes</i>	MKS <b>VVRKLLKRRMRQSPPPMPKI</b> VEVDYKWASPLSYTLKPTMIVYHHTAEDNLTPQRIDE	60
GasC <i>C.gasigenes</i>	LHKARGWSGIGYHFYIRKDGTYRGRPENAI GAHAPSVNSKALGIALEGNFNEEFVTKEQ	120
GasC <i>C.gasigenes</i>	EDSLIALSKYLVNKYNIKDIKRHKDVTNTECPGKNFPFKEIKAEKLL	167

Ryc. 34. Amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa GasC. Czerwoną ramką zaznaczono potencjalny peptyd antybakteryjny.

Tabela 12. Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu N-końcowego białka GasC.

<b>Sekwencja peptydu:</b>	<b>VVRKLLKRRMRQSPPPMPKI</b>	
	Kategoria	Prawdopodobieństwo AMP
Support Vector Machine (SVM)	AMP	0,608
Random Forest Classifier	NAMP	0,347
Artificial Neural Network (ANN)	AMP	
Discriminant Analysis classifier (DA)	AMP	0,908

Wartości powyżej 0,5 potwierdzają, że dana sekwencja ma potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Trzy z czterech algorytmów wykazały, że sekwencja aminokwasowa N-terminalnego regionu białka GasC może posiadać właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Na podstawie dostępnej sekwencji postanowiłam zsyntetyzować peptyd, który od nazwy trzech pierwszych aminokwasów oraz całkowitej długości nazwany został VVR-20 (Ryc. 35). Peptyd zsyntetyzowany został we współpracy z Panią dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG z Katedry Chemii Biomedycznej.

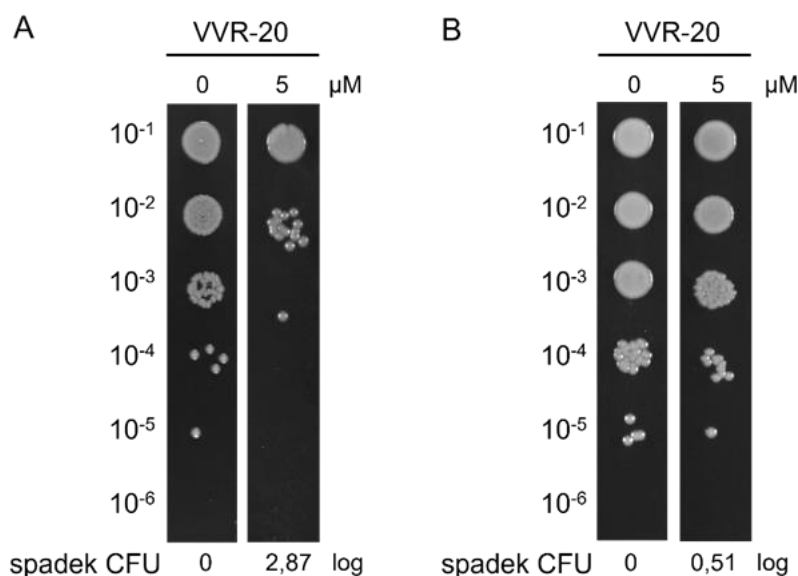


Ryc. 35. Model peptydu VVR-20. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, niebieskim azot, a żółty to siarka.

### 5.3.5. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej peptydu VVR-20

#### 5.3.5.1. Aktywność lityczna peptydu VVR-20

W celu zbadania potencjału przeciwbakteryjnego peptydu VVR-20 przeprowadziłam testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.8) wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923 (Materiały 3.1), a wyniki przedstawiłam na rycinie poniżej (Ryc. 36).



Ryc. 36. Testy antybakteryjne peptydu VVR-20 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności peptydu VVR-20 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Krople 5  $\mu\text{l}$  zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.

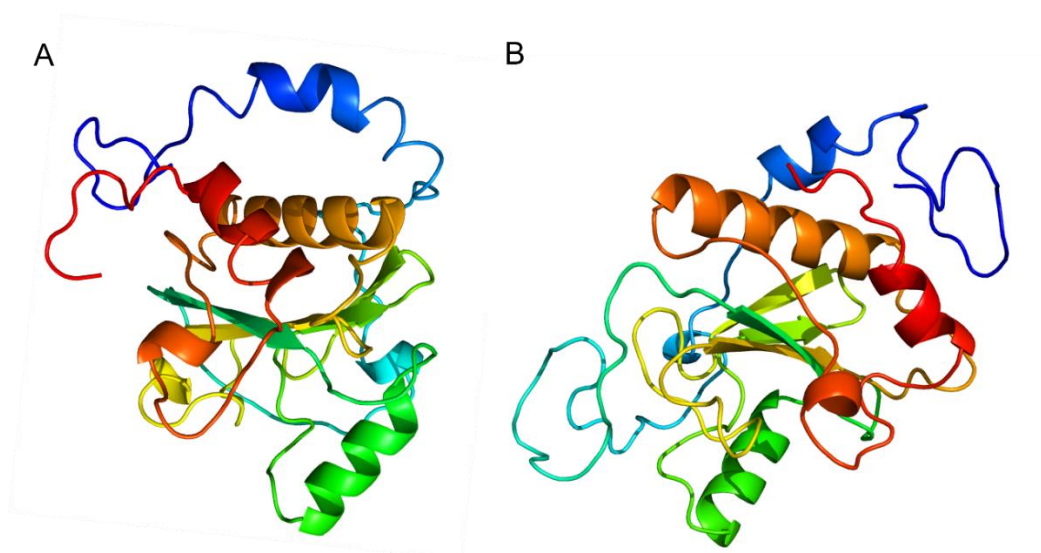
Na podstawie otrzymanych wyników wykazałam, że peptyd VVR-20 w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  spowodował spadek liczby bakterii *A. baumannii* CRAB KPD 205 o  $2,87 \pm 0,06$  log, natomiast w przypadku *S. aureus* ATCC 25923 badany peptyd wykazywał tylko niewielką aktywność (spadek o  $0,51 \pm 0,06$  log). Otrzymane wyniki dla peptydu pokrywają się z danymi otrzymanymi dla białka.

#### 5.3.5.2. Określenie minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego dla VVR-20

Wartości MIC określiłam dla peptydu VVR-20 (Materiały 4.9) w stosunku do bakterii *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923. Wartość MIC wynosiły dla *A. baumannii* CRAB KPD 205 – 261  $\mu\text{M}$  i tyle samo wynosił MBC (minimalne stężenie bakteriobójcze), natomiast dla *S. aureus* ATCC 25923 był to wynik powyżej 261  $\mu\text{M}$ . Wartości MIC są zatem dużo wyższe ( $\geq 261$   $\mu\text{M}$ ), niż stężenie peptydu używane w testach antybakteryjnych (5  $\mu\text{M}$ ).

#### 5.4. Potencjalne białko lityczne CT4

Kolejne białko wybrane w celu jego charakterystyki to CT4, którego sekwencję aminokwasową przedstawiłam w Tabeli 3 (Materiały 3.4), a podobieństwo sekwencji aminokwasowej do enzymu LysC na Ryc. 15. Oba białka CT4 (numer akcesyjny GenBank: WP\_072987482.1) i LysC przedstawiają globularną strukturę (Ryc. 37). Biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji aminokwasowej oraz występowanie identycznego miejsca katalitycznego można wnioskować, że białko CT4 to białko lityczne. Tak postawiona hipoteza badawcza zakłada, że tak samo jak w przypadku scharakteryzowanej autolizyny LysC, zewnątrznie dodanie białka CT4 do komórek bakterii może skutkować lizą komórek bakteryjnych.



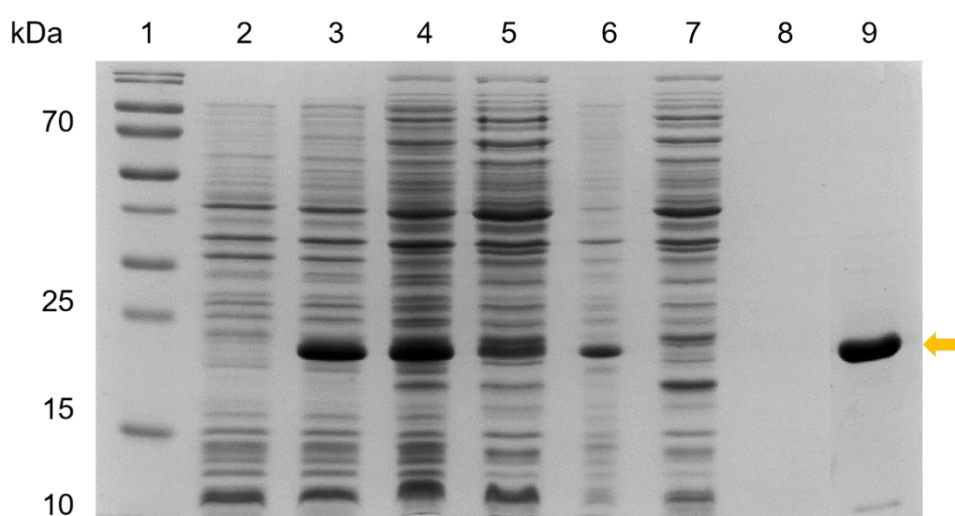
Rys. 37. (A) Struktura przestrzenna białka CT4 oraz (B) białka LysC. Struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko CT4 jest złożone z 169 aminokwasów, natomiast LysC z 171 aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

##### 5.4.1. Nadprodukcja i oczyszczanie białka CT4

Gen białka CT4 został syntetyzowany w firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Niemcy) i dostarczony w wektorze ekspresyjnym pET15b. W celu nadprodukcji potencjalnego białka litycznego użyto szczepu ekspresyjnego *Escherichia coli* BL21(DE3). Transformację (Metoda 4.2) tego szczepu wykonano plazmidem pET15b z

genem kodującym białko docelowe. Dla sprawdzenia efektywności nadprodukcji przygotowano próbki przed indukcją oraz cztery godziny po indukcji 1 mM IPTG. Następnie próbki poddano elektroforezie (Metoda 4.6.3) w żelu poliakrylamidowym (Metoda 4.6.1), aby określić poziom nadprodukcji białka (Ryc. 38).

Nadprodukowane białko zostało poddane oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa (Metody 4.4.2) na kolumnie TALON (Materiały 3.12), która przy wykorzystaniu jonów kobaltu umożliwia wiązanie ogonków histydynowych białek. Z każdego etapu oczyszczania pobierałam próbki, które w dalszej kolejności rozdzielałam w żelu poliakrylamidowym w celu sprawdzenia obecności białka (Ryc. 37).



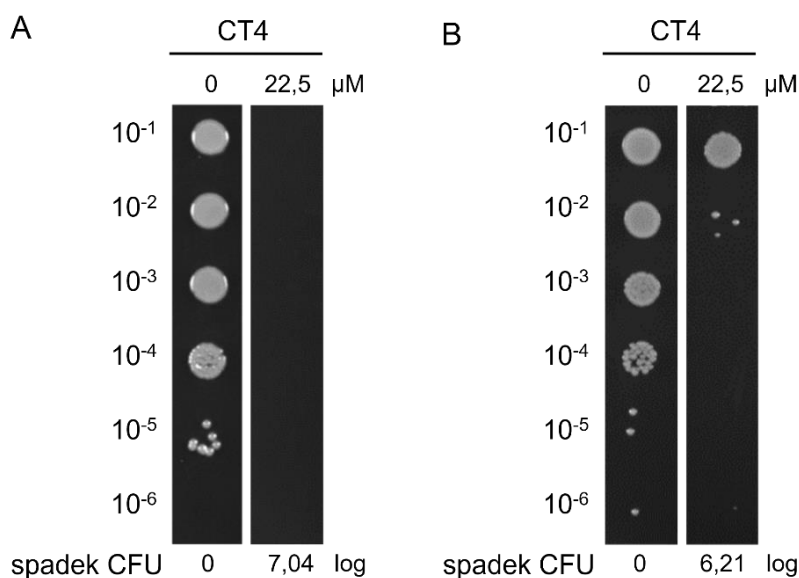
Rys. 38. Elektroforeza SDS-PAGE 12,5% z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka CT4 oraz z kolejnych etapów oczyszczania, 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę), 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałka przedstawia pozycję naprodukowanego białka (22,2 kDa).

Analizując rozdział próbek w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 38) można zaobserwować, że białko CT4 ulega wydajnej nadprodukcji (ścieżka nr 3) w szczepie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3). Oczyszczane białko w niewielkim stopniu przechodzi do osadu (ścieżka nr 5) oraz uległo w praktycznie w całości związaniu ze złożem (ścieżka nr 4). Nanoszenie buforu NPi-10 oraz NPi-20 na kolumnę nie doprowadziło do wypłukania białka z kolumny (ścieżka nr 7 i 8). W żelu poliakrylamidowym nie

zaobserwowałam obecności dodatkowych prążków w preparacie białka po dializie, co świadczy o jego wysokiej czystości (ścieżka nr 9).

#### 5.4.2. Aktywność przeciwbakteryjna białka CT4

W celu zbadania potencjału przeciwbakteryjnego białka CT4 przeprowadziłam testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.8) wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923 (Materiały 3.1). Wyniki testów przedstawiłam poniżej (Ryc. 39).



Ryc. 39. Testy antybakteryjne białka CT4 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne oceniały aktywność białka CT4 w stężeniu 500  $\mu$ g/ml (22,5  $\mu$ M). Krople 5  $\mu$ l zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiono w skali logarytmicznej.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że białko CT4 było wysoce aktywne wobec obu badanych bakterii. Całkowite zahamowanie wzrostu obserwowałam w przypadku *A. baumannii* CRAB KPD 205. Dlatego w kolejnym kroku postanowiłam przeprowadzić analizę *in silico* i poszukać w sekwencji białka CT4 regionów o potencjalnej aktywności antybakteryjnej.



### 5.4.3. Poszukiwanie regionów o charakterze antybakteryjnym w sekwencji białka CT4

W celu poszukiwania potencjalnego peptydu antybakteryjnego „ukrytego” w sekwencji aminokwasowej białka CT4 wykorzystano analizę bioinformatyczną z użyciem programu CAMP (Metoda 4.7). Program wytypował kilka regionów o potencjalnych właściwościach antybakteryjnych (Tabela S3). Jeden z nich zwrócił moją szczególną uwagę ze względu na umiejscowienie w N-terminalnym regionie białka CT4 (Ryc. 40). Wyniki przewidywania aktywności antybakteryjnej regionu N-terminalnego białka CT4 o sekwencji IFRRALRRVFKARQVQPKIV zamieściłam w Tabeli 13.

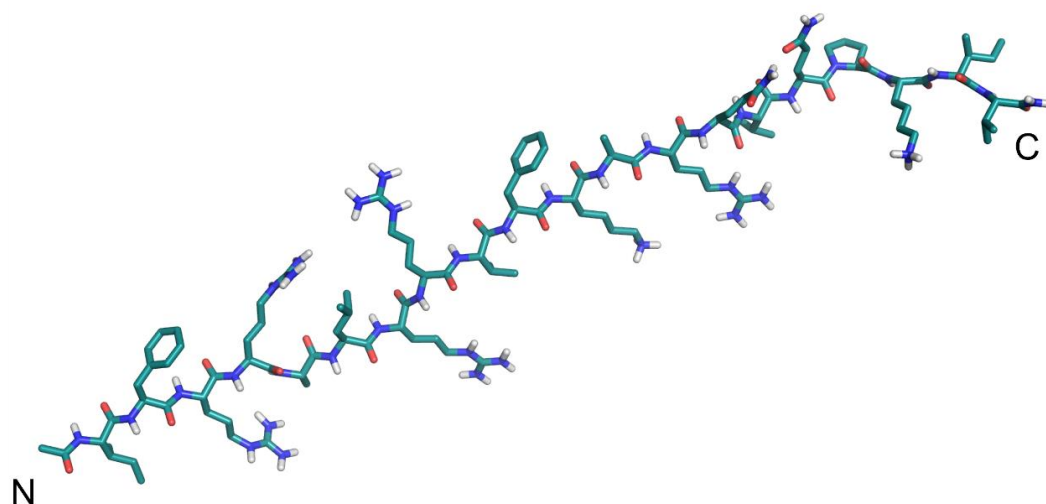
```
CT4 C.manihotivorum CT4 MKNIFRRALRRVFKARQVQPKIVENVYKWAQPLQFTMKPQMIVYHHTVEIGKTPEEIHQL 60
CT4 C.manihotivorum CT4 HVNRGWAGIGYHFYIRKDGTTIYRGRPENAUGSHAPGVNNIALGIAFEGNFMVEKPTEQQQL 120
CT4 C.manihotivorum CT4 NSAIILSKYLVNKYGIKELRRHKDVKPTTECPGINFPFDYIKSKVLGTTNKTA 174
```

Ryc. 40. Sekwencja białka CT4. Czerwoną ramką zaznaczono potencjalny peptyd antybakteryjny.

Tabela 13. Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu N-końcowego białka CT4.

Sekwencja peptydu:	IFRRALRRVFKARQVQPKIV	
	Kategoria	Prawdopodobieństwo AMP
SupportV Vector Machine (SVM)	AMP	0,992
Random Forest Classifier	AMP	0,969
Artificial Neural Network (ANN)	AMP	
Discriminant Analysis classifier (DA)	AMP	1,000

Wartości powyżej 0,5 potwierdzają, że dana sekwencja ma potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Wszystkie algorytmy wykazały, że sekwencja aminokwasowa sekwencji N-terminalnej białka CT4 może posiadać właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Na podstawie dostępnej sekwencji postanowiłam zsyntetyzować peptyd, który od nazwy trzech pierwszych aminokwasów oraz całkowitej długości nazwany został IFR-20 (Ryc. 41). Peptyd zsyntetyzowany został we współpracy z Panią dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG z Katedry Chemii Biomedycznej.

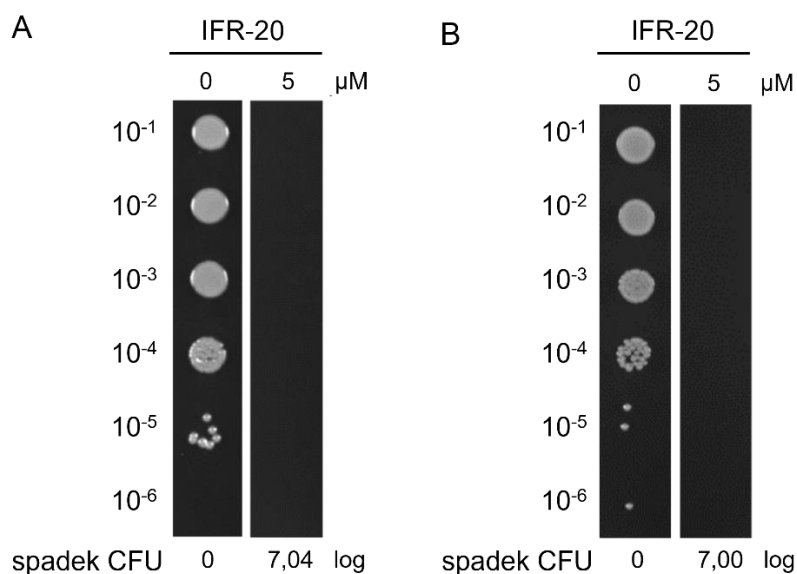


Ryc. 41. Model peptydu IFR-20. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, niebieskim azot.

#### 5.4.4. Charakterystyka aktywności przeciwbakteryjnej peptydu IFR-20

##### 5.4.4.1. Aktywność lityczna peptydu IFR-20

W celu zbadania potencjału przeciwbakteryjnego peptydu IFR-20 przeprowadziłam testy antybakteryjne *in vitro* (Metody 4.9) wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923 (Materiały 3.1). Wyniki przedstawiłam poniżej (Ryc. 42).



Ryc. 42. Testy antybakteryjne aktywności peptydu IFR-20 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 i (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności peptydu w stężeniu 5 μM. Krople 5 μl zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.

Analizy wykazały, że peptyd IFR-20 w stężeniu 5 μM w testach antybakteryjnych powodował całkowitą eliminację komórek zarówno *A. baumannii* CRAB KPD 205, jak i *S. aureus* ATCC 25923.

#### 5.4.4.2. Określenie minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bakteriobójczego dla IFR-20

Wartości MIC określiłam dla peptydu IFR-20 (Materiały 4.8) w stosunku do bakterii *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923. Wartość MIC wynosiły dla *A. baumannii* CRAB KPD 205 8,3 μM i tyle samo wynosił MBC (minimalne stężenie bakteriobójcze), natomiast dla *S. aureus* ATCC 25923 był to wynik powyżej 265 μM. Ta zależność nie pokrywa się z przeprowadzonymi testami przeciwbakteryjnymi.

## 6. PODSUMOWANIE

W testach antybakteryjnych badane białka: LysC, PhiKo, GasC oraz CT4 skutecznie obniżają ilość bakterii *A. baumannii* CRAB KPD 205 powodując spadek o  $2,57 \pm 0,07$  log w przypadku użycia białka PhiKo do całkowitej eliminacji bakterii w przypadku białek LysC, GasC i CT4 (Tabela 14). Większa rozbieżność jest w przypadku Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* ATCC 25923 wobec której białko PhiKo wykazuje aktywność tylko na poziomie spadku ilości bakterii o 0,82 log CFU/ml. Wszystkie badane peptydy, P30, RAP-29, VVR-20 oraz IFR-20 są aktywne wobec wybranej bakterii Gram-ujemnej, jednak ich działanie przeciw *S. aureus* jest zróżnicowane (np. peptyd VVR-20 wykazuje tylko niewielką aktywność lityczną wobec *S. aureus* ATCC 25923 wynoszącą 0,51 log). Również wartości MIC peptydów wobec *S. aureus* ATCC 25923 są wyższe niż wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 (Tabela 15). Stężenie peptydów użytych w testach było jednak dużo niższe niż preparatów białkowych, stąd ich wyższy potencjał aplikacyjny. Niniejsza praca pokazuje również, że zastosowane algorytmy można z powodzeniem wykorzystać do wyszukiwania regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencjach większych białek litycznych. Syntetyczne peptydy będące odpowiednikami tych regionów mogą być wykorzystywane jako efektywne środki antybakteryjne jednak ich aktywność powinna być bezwzględnie zweryfikowana eksperymentalnie.

Tabela 14. Podsumowanie działania bakteriobójczego wybranych białek i wywodzących się z ich sekwencji peptydów w testach antybakteryjnych wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923.

Szczep bakteryjny	Średnie spadki ilości bakterii (log)							
	Białka				Peptydy			
	LysC	PhiKo	GasC	CT4	P30	RAP-29	VVR-20	IFR-20
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	≥ 6,93	2,57	≥ 4,95	≥ 7,00	≥ 6,93	≥ 6,93	2,87	≥ 7,04
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 5,12	0,82	0,41	6,21	≥ 5,09	≥ 5,74	0,51	≥ 7,00

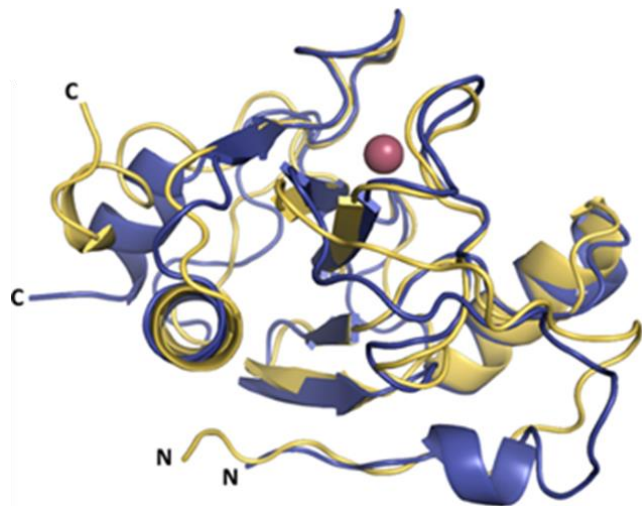
Tabela 15. MIC analizowanych peptydów wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz *S. aureus* ATCC 25923.

<b>Szczep bakteryjny</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
	<b>P30</b>	<b>RAP-29</b>	<b>VVR-20</b>	<b>IFR-20</b>
<i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205	7,8	3,9	261	8,3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	124	15,5	>261	>265

## 7. DYSKUSJA

Pierwsze praktyczne wykorzystanie endolizyny przeciwko paciorkowcom zostało przedstawione w 1958 roku (Krause, 1958). Z biegiem lat coraz więcej białek z grupy endolizyn znalazło zastosowanie przeciwbakteryjne jako zamiennik standardowych antybiotyków (Roach & Donovan, 2015). Jednakże ich zastosowanie praktyczne nie byłoby możliwe bez scharakteryzowania ich właściwości biochemicznych, biofizycznych i przeciwbakteryjnych (Kaur et al., 2020).

Analizy przedstawione w niniejszej pracy rozpoczęłam od badania aktywności przeciwbakteryjnej białka LysC i peptydu Intestinaliny (P30). Gen białka LysC znajduje się na chromosomie bakterii *Clostridium intestinale* URNW. Białko to jest więc najprawdopodobniej autolizyną, ale wykazuje wysokie podobieństwo struktury przestrzennej do endolizyny Ph2119 pochodzącej z bakteriofaga MAT2119 infekującego komórki termofilnej bakterii *Thermus scotoductus* (Ryc. 43).



Ryc. 43. Podobieństwo strukturalne białek LysC (numer akcesyjny PDB: 6SSC) i Ph2119 (numer akcesyjny PDB: 6SU5). Nałożenie struktur LysC (kolor beżowy) i endolizyny Ph2119 (kolor niebieski). Oprócz regionów N- i C- terminalnych wszystkie motywy strukturalne, włączając miejsce wiązania jonów  $Zn^{2+}$  (różowa sfera) są konserwowane.

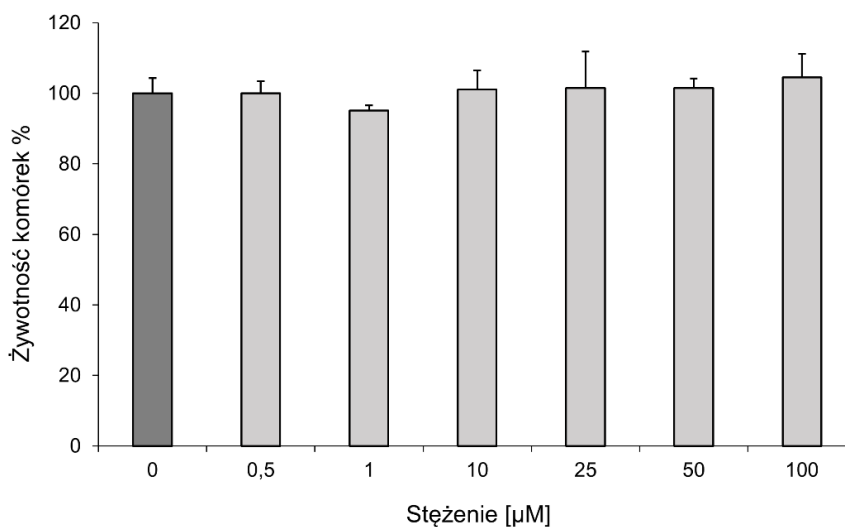
Białko LysC wykazywało aktywność bakteriobójczą wobec bakterii *S. aureus*, ale stężenie wykorzystane w testach antybakteryjnych było wysokie i dopiero 21,5  $\mu\text{M}$  (500  $\mu\text{g/ml}$ ) powodowało całkowitą eliminację komórek. Z kolei już stężenie 5  $\mu\text{M}$  (20  $\mu\text{g/ml}$ ) peptydu Intestinaliny (P30) powodowało całkowitą redukcję  $\sim 10^6$  komórek

*S. aureus* ATCC 25923. Z powyższych testów można wysnuć wniosek, że peptyd Intestinalina (P30) jest bardziej aktywny wobec Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* niż białko LysC.

Nowo odkryty peptyd Intestinalina (P30), zsyntetyzowany na podstawie N-terminalnej sekwencji białka LysC wykazał również silne działanie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, powodując spadek żywotności badanych szczepów w testach antybakteryjnych o co najmniej 3-log dla *P. aeruginosa* PAO1 oraz dając średnio 7-log spadek liczby komórek *A. baumannii*. Peptydy zidentyfikowane w sekwencjach innych białek litycznych są nieliczne. Przykładem jest endolizyna PlyF307 pochodząca z bakteriofaga infekującego komórki *A. baumannii* (Thandar et al., 2016). Syntetyczny peptyd P307 odpowiadający aminokwasom 108 – 138 C- terminalnej części białka PlyF307 wykazywał aktywność przeciwdrobnoustrojową powodując spadek liczby bakterii *A. baumannii* o więcej niż 3 log (Thandar et al., 2016). Badany przeze mnie peptyd Intestinalina (P30) był więc bardziej aktywny wobec komórek *A. baumannii* w porównaniu do P307 (Szadkowska i in., 2022). Peptyd Intestinalina (P30) był również dużo bardziej efektywny wobec *Staphylococcus aureus* w przeprowadzonych testach antybakteryjnych, podczas gdy bakterie *S. aureus* były umiarkowanie wrażliwe na peptyd P307, a średni spadek liczby bakterii wynosił 1,3 log (Thandar et al., 2016). Innym przykładem peptydu będącego częścią większego białka litycznego jest P87, który pochodzi z endolizyny Pae87 z faga *Pseudomonas aeruginosa* JG004. Również peptyd P87 wykazywał niską aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (Vazquez et al., 2022). Intestinalina ma zatem dużo szerszy zakres działania antybakteryjnego niż peptydy P307 i P87, a co jest dużo bardziej istotne, przy zastosowaniu niższej dawki peptydu (Peng et al., 2017).

W dalszej części pracy sprawdziłam czy Intestinalina (P30) skutecznie zakłóca formowanie się biofilmu bakteryjnego. Peptyd powodował redukcję biomasy biofilmu w zakresie od 24,3% w przypadku *K. pneumoniae* do 99,7% w przypadku *S. pettenkoferi*. Fakt ten jest niezwykle istotny, ponieważ około 80% infekcji u ludzi spowodowanych jest przez tworzenie się bakteryjnego biofilmu na powierzchniach biotycznych lub abiotycznych (Yasir et al., 2018). Proces hamowania tworzenia biofilmu bakteryjnego opisano już wcześniej dla takich peptydów jak Esculentin-1a (Luca et al., 2013), Nisin A, lacticin Q, Nukacin ISK-1 (Okuda et al., 2013), jak również RN3(5-17P22-36) (Pulido et al., 2016), których mechanizm działania opiera się na zakłócaniu potencjału błonowego komórek osadzonych w biofilmie.

Istotną i kluczową cechą opisanego peptydu jest brak toksyczności dla komórek eukariotycznych, co może ułatwić dalsze badania peptydu pod kątem zastosowania praktycznego (Kumar et al., 2018). Przeprowadzone testy ukazują, że Intestinalina wobec linii ludzkich keranocytów (HaCaT) nie była toksyczna, nawet przy wysokim 100  $\mu\text{M}$  stężeniu (Ryc. 44).

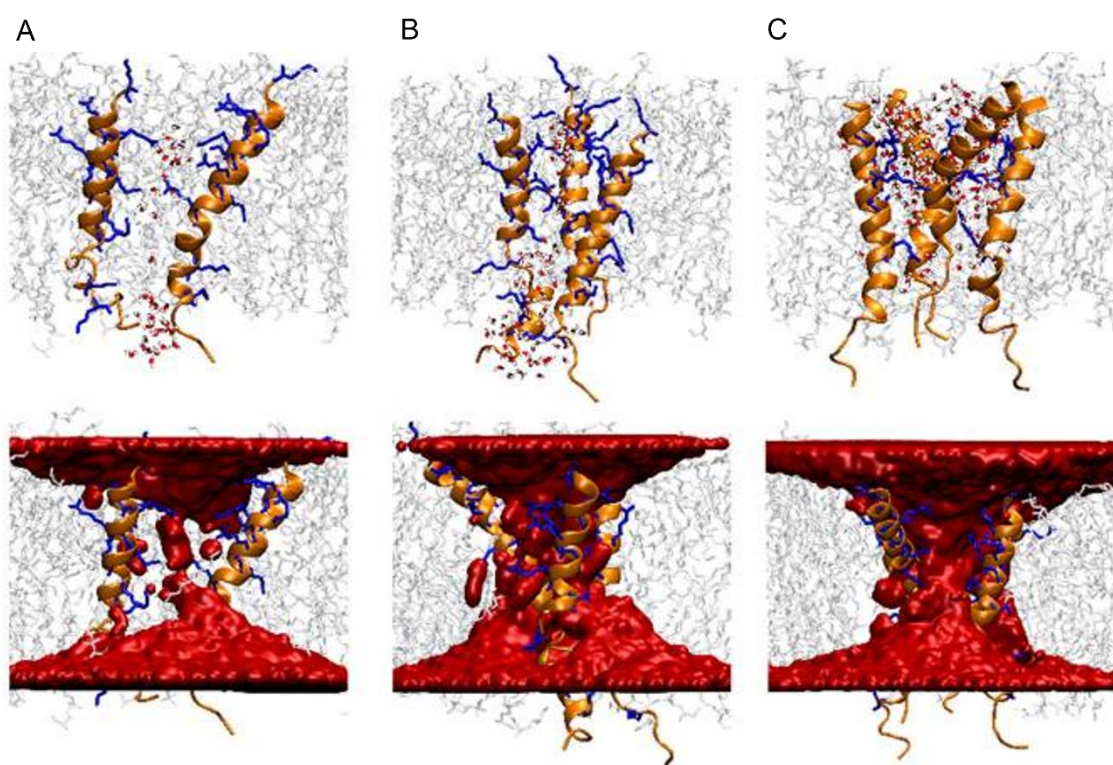


Ryc. 44. Żywotność linii ludzkich komórek keratynocytów (HaCaT). Żywotność komórek oceniono za pomocą testu MTT wykonanego w obecności rosnących stężeń peptydu i porównano z komórkami kontrolnymi hodowanymi w pożywce wolnej od Intestinaliny (P30). Próbkę inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 37°C. W teście MTT badana jest aktywność enzymu mitochondrialnego dehydrogenazy bursztynianowej, a substratem reakcji jest bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu przekształcany przez enzym do formazanu. Formazan był rozpuszczany w dimetylosulfotlenku (DMSO), a wynik odczytywano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm. Wartości reprezentują średnie z co najmniej dwóch niezależnych eksperymentów; wg Szadkowska et al., 2022.

W dalszej kolejności określiłam strukturę oligomeryczną peptydu i wykazałam, że w obecności detergentów, które naśladują błony bakteryjne, Intestinalina przyjmuje strukturę  $\alpha$ -helikalną. Struktura ta jest charakterystyczna dla polikationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (Mahlapu et al., 2016). Interesujący jest fakt, że peptyd pozostaje nieuporządkowany w roztworze wodnym co potwierdzają wyniki spektroskopii dichroizmu kołowego przedstawione na Ryc. 14 niniejszej pracy i w pracy Płotka et al., 2020.



W toku badań powstało kluczowe pytanie jaki jest mechanizm działania Intestinaliny w stosunku do komórek bakteryjnych. Przeprowadzone doświadczenia z użyciem barwników fluorescencyjnych SYTO 9 i PI pokazały, że peptyd powoduje permeabilizację i zwiększa przepuszczalność błony poprzez tworzenie kanałów w błonie komórkowej. Otrzymane wyniki potwierdzone zostały poprzez symulacje dynamiki molekularnej (MD, ang. *molecular dynamics*) przeprowadzone przez zespół z Politechniki Gdańskiej, które pokazują, że peptyd oligomeryzuje i tworzy kanały w błonie komórkowej bakterii (Ryc. 45).



Ryc. 45. Reprezentacja molekularna porów wodnych, w których tworzeniu pośredniczy Intestinalina (P30) (panel górny) i gęstość wody w błonie komórkowej (panel dolny). (A) dimer peptydu P30 (B) trimer P30 (C) tetramer P30; wg Szadkowska et al., 2022.

Analizy MD wykazały, że cząsteczki wody oddziałują z polarnymi resztami segmentów transbłonowych oligomerów peptydu P30. Jak pokazano na Ryc. 45, można zaobserwować ciągłą gęstość wody (kolor czerwony) przez przekrój błony wykazując, że oligomery peptydu tworzą kanały, które umożliwiają swobodne przenikanie wody przez błonę komórkową. Mechanizm działania peptydów, które tworzą pory w błonie komórkowej dzieli się na dwie kategorie: porów toroidalnych i klepek beczki (Kumar et al., 2018). Ponieważ P30 tworzy pory transbłonowe, które bezpośrednio

angażują ujemnie naładowane fosfolipidy błony komórkowej bakterii, model porów toroidalnych najlepiej opisuje działanie przeciwbakteryjne peptydu. Depolaryzacja błony komórkowej, a zatem zaburzenia gradientu elektrochemicznego błony komórkowej bakterii wpływa negatywnie na wiele procesów komórkowych tj. syntezę ATP czy transport składników odżywczych. Dysfunkcje te są na tyle poważne, że prowadzą do śmierci komórki.

Do obecnej chwili wirusy termofilne są potencjalnym źródłem enzymów o realnych zastosowaniach w biotechnologii (Plotka et al., 2014), (Plotka et al., 2015). Rozpatrując przypuszczalny potencjał przeciwdrobnoustrojowy białka PhiKo (numer akcesyjny GenBank: AYJ74695.1), dokładnie scharakteryzowałam jego optimum działania. Aktywność białka oznaczyłam w zakresie pH 5,0-8,8, gdzie enzym wykazywał aktywność powyżej 80% w zakresie pH 6,5-8,8 z optimum przy pH 8,0. W warunkach bardziej kwaśnych aktywność enzymu PhiKo spadła do poziomu poniżej 5% przy pH 5,0 (Ryc. 27). Specyficzność substratową enzymu testowałam z wykorzystaniem zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Działanie przeciwbakteryjne endolizyny PhiKo ogranicza się tylko do bakterii z rodzaju *Thermus*, a uzyskane wyniki przedstawia Ryc. 29. Bakterie reprezentujące peptydoglikan typu Orn: *T. flavus*, *T. thermophilus* HB8 i *D. radiodurans*, zostały skutecznie hydrolizowane przez enzym, a liza przekroczyła 80%. Enzym ten ma zatem wąskie spektrum antybakteryjne podobnie do endolizyny pochodzącej z bakteriofaga  $\phi$ IN93 *Thermus aquaticus* TZ2 (Matsushita & Yanase, 2008), czy endolizyn PlyBa, Ply21 oraz Ply12, bakteriofagów *B. cereus*: Bastille, TP21 oraz 12826, które wykazywały tylko aktywność wobec bakterii z rodzaju *Bacillus* (Loessner et al., 1997).

W niniejszej pracy sprawdziłam działanie przeciwbakteryjne potencjalnych peptydów antybakteryjnych ukrytych w sekwencjach większych białek litycznych takich jak PhiKo. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa została przypisana za pomocą narzędzia bioinformatycznego CAMP (ang. *Collection of Anti-Microbial Peptides*). CAMP wykorzystuje cztery algorytmy: Support Vector Machine (SVM), Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) i Discriminant Analysis (DA) do przewidywania funkcji antybakteryjnej krótkich regionów białek litycznych. Jak widać w Tabelach 9, 12 i 13, wszystkie testowane peptydy zostały sklasyfikowane jako przeciwdrobnoustrojowe (AMP) z dużym prawdopodobieństwem. Największym zaskoczeniem okazał się peptyd RAP-29 pochodzący z C-terminalnego regionu białka PhiKo, który wykazał aktywność

antybakteryjną wobec wszystkich badanych bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych (Tabele 10 i 11).

Kolejny badany peptyd nazwany VVR-20 pochodzi z N-terminalnego regionu białka GasC *C. gasigenes*. Pomimo, że trzy z spośród wykorzystanych algorytmów określiło ten region białka GasC jako posiadający właściwości antybakteryjne (Tabela S2), syntetyczny peptyd nie wykazał znaczącej aktywności bakteriobójczej wobec badanych szczepów bakterii *S. aureus* ATCC 25923 oraz *A. baumannii* CRAB KPD 205 (Ryc. 36). Całe białko GasC było natomiast ukierunkowane na działanie wobec Gram-ujemnej bakterii *A. baumannii* CRAB KPD 205 powodując spadek liczby bakterii  $\geq 4,95$  log.

Ostatni peptyd IFR-20 zsyntetyzowany na podstawie N-terminalnego regionu białka CT4 *C. manihotivorum* wykazywał wysoką aktywność zarówno wobec *A. baumannii* CRAB KPD 205, jak i *S. aureus* ATCC 25923 (spadek liczby bakterii powyżej 7,00 log). Jednakże MIC tego peptydu wobec *S. aureus* ATCC 25923 był wyższy niż 265  $\mu$ M. Możliwe, że rozbieżności te wynikają z różnych warunków reakcji, gdzie testy antybakteryjne przeprowadzane są w 20 mM buforu HEPES pH 7,4, natomiast MIC w pożywce Mueller-Hinton.

Pomimo, iż wszystkie cztery wytypowane peptydy: Intestinalina (P30), RAP-29, VVR-20 i IFR-20 miały posiadać aktywność antybakteryjną, tylko dwa (Intestinalina (P30) i RAP-29) wykazują duży potencjał antybakteryjny potwierdzony zarówno w testach antybakteryjnych, jak i wartościach MIC. Nie można zatem jednoznacznie przełożyć przewidywań teoretycznych na rzeczywistą aktywność antybakteryjną wyznaczonych regionów wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Przewidywania teoretyczne muszą zatem ulec praktycznej weryfikacji. Możliwe, że do analiz należy użyć zróżnicowanych narzędzi bioinformatycznych i wykorzystać również inne algorytmy jak choćby model k-nearest neighbors (kNN). Vázquez et al., 2021 użyli tego modelu do określenia C-terminalnych regionów lizyn skierowanych przeciwko *Pseudomonas* w poszukiwaniu regionów o aktywności antybakteryjnej. Z sukcesem wytypowano dwie lizyny, Pae87 i Ppl65, które wykazywały naturalną aktywność bakteriobójczą (bez dodatku substancji powodujących osłabienie błony zewnętrznej) wobec *P. aeruginosa* i innych Gram-negatywnych bakterii.

## 8. LITERATURA

- Abdillahi, S. M., Maaß, T., Kasetty, G., Strömstedt, A. A., Baumgarten, M., Tati, R., Nordin, S. L., Walse, B., Wagener, R., Schmidtchen, A., & Mörgelin, M. (2018). *Collagen VI Contains Multiple Host Defense Peptides with Potent In Vivo Activity*. *The Journal of Immunology*, 201(3), 1007–1020. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1700602>
- Abhisingha, M., Dumnail, J., & Pitaksutheepong, C. (2023). *Effect of lysin EN4 in combination with sodium bicarbonate on reduction of Salmonella in chilled and thawed chicken meat*. *International Journal of Food Microbiology*, 387. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.110058>
- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). *An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin*. *Nature* 1940 146:3713, 146(3713), 837–837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). *Antimicrobial Peptides*. *Pharmaceuticals* 2013, Vol. 6, Pages 1543-1575, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/PH6121543>
- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G., & Coelho, M. L. V. (2010). *Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications*. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 3(4), 1139–1161. <https://doi.org/10.3390/PH3041139>
- Brautigam, C. A. (2015). *Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data*. *Methods in Enzymology*, 562, 109–133. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2015.05.001>
- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C.W., Hertveldt, K., Lavigne R., (2007). *Muralytic activity and modular structure of the endolysins of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages phiKZ and EL*. *Mol Microbiol*. 2007 Sep;65(5):1334-44. <https://doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05870.x>.
- Briers, Y. (2019). *Phage Lytic Enzymes*. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/V11020113>
- Brogan, A. P., & Rudner, D. Z. (2023). *Regulation of peptidoglycan hydrolases: localization, abundance, and activity*. *Current Opinion in Microbiology*, 72. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2023.102279>
- Brogden, K. A. (2005). *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1098>
- Campagna, S., Saint, N., Molle, G., & Aumelas, A. (2007). *Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin*. *Biochemistry*, 46(7), 1771–1778. <https://doi.org/10.1021/BI0620297>

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., ... Hopkins, S. (2019). *Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis*. *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(1), 56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

Cava, F., Hidalgo, A., Berenguer J. (2009). *Thermus thermophilus as biological model*. *Extremophiles*. 2009 Mar;13(2):213-31. <https://doi: 10.1007/s00792-009-0226-6>.

Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). *Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9010024>

Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J. W., & Studier, F. W. (1994). *The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 4034. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.9.4034>

Daw, M. A., & Falkiner, F. R. (1996). *Bacteriocins: Nature, function and structure*. *Micron*, 27(6), 467–479. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(96\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(96)00028-5)

Deslouches, B., Phadke, S. M., Lazarevic, V., Cascio, M., Islam, K., Montelaro, R. C., & Mietzner, T. A. (2005). *De Novo Generation of Cationic Antimicrobial Peptides: Influence of Length and Tryptophan Substitution on Antimicrobial Activity*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 316. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.316-322.2005>

Do, T., Page, J. E., & Walker, S. (2020). *Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(10), 3347. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV119.010155>

Dubos, R. J. (1939). *Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus : I. preparation of the agent. Its activity in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*, 70(1), 1–10. <https://doi.org/10.1084/JEM.70.1.1>

Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., & Sathekge, M. M. (2014). *Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging*. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/867381>

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7687. <https://doi.org/10.1073/PNAS.122108599>

Fernandez, D. I., le Brun, A. P., Whitwell, T. C., Sani, M. A., James, M., & Separovic, F. (2012). *The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism*. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 14(45), 15739–15751. <https://doi.org/10.1039/C2CP43099A>

Fischetti, V. A. (2018). *Development of Phage Lysins as Novel Therapeutics: A Historical Perspective*. *Viruses*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/V10060310>

Fleming A. (1980) *Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae by Alexander Fleming*, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* <https://doi.org/10.226-236>, 1929

Grabowski, Ł., Łeppek, K., Stasiłojć, M., Kosznik-Kwaśnicka, K., Zdrojewska, K., Maciąg-Dorszyńska, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). *Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents*. *Microbiological Research*, 248. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2021.126746>

Gutiérrez, D., & Briers, Y. (2020). *Lysins breaking down the walls of Gram-negative bacteria, no longer a no-go*. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2020.08.014>

Gwiazdowska, D., Trojanowska, K., Biochemii Mikrobiologii, K., Ekonomiczna, A., Biotechnologii Mikrobiologii Żywności, K., & Rolnicza im Augusta Cieszkowskiego, A. (n.d.). (2005). *Bakteriocyny-właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa*. *Bacteriocins-properties and antimicrobial activity*.

Hartman, B., & Tomasz, A. (1981). *Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(5), 726–735. <https://doi.org/10.1128/AAC.19.5.726>

Hashimoto, M., Ooiwa, S., Sekiguchi, J. (2012). *Synthetic lethality of the *lytE* *cwlo* genotype in Bacillus subtilis is caused by lack of D,L-endopeptidase activity at the lateral cell wall*. *J Bacteriol.* 2012 Feb;194(4):796-803. <https://doi: 10.1128/JB.05569-11>. Epub 2011 Dec 2.

Henriques, S. T., Lawrence, N., Chaousis, S., Ravipati, A. S., Cheneval, O., Benfield, A. H., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Cooper, M. A., Chan, L. Y., Huang, Y. H., & Craik, D. J. (2017). *Redesigned Spider Peptide with Improved Antimicrobial and Anticancer Properties*. *ACS Chemical Biology*, 12(9), 2324–2334. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMBIO.7B00459>

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., & Tenover, F. C. (1997). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin*

*susceptibility*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 40(1), 135–136. <https://doi.org/10.1093/JAC/40.1.135>

Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2017). *Oporność bakterii na antybiotyki - nowe strategie walki*. Wstęp. Kosmos, 66(1), 7–8. <https://kosmos.ptpk.org/index.php/Kosmos/article/view/1657>

Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., Dou, T., & Junjing Jia, C. (2021). *Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>

Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., Li, H., Xu, H., Lao, X., & Zheng, H. (2019). *DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides*. Scientific Data 2019 6:1, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0154-y>

Kasetty, G., Papareddy, P., Kalle, M., Rydengrd, V., Walse, B., Svensson, B., Mörgelin, M., Malmsten, M., & Schmidtchen, A. (2011). *The C-terminal sequence of several human serine proteases encodes host defense functions*. Journal of Innate Immunity, 3(5), 471–482. <https://doi.org/10.1159/000327016>

Kaur, J., Singh, P., Sharma, D., Harjai, K., & Chhibber, S. (2020). *A potent enzymiobiotic against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Virus Genes, 56(4), 480–497. <https://doi.org/10.1007/S11262-020-01762-4>

Keita, K., Darkoh, C., & Okafor, F. (2022). *Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens*. Sn Applied Sciences, 4(8), 209. <https://doi.org/10.1007/S42452-022-05084-Y>

Kocot, A. M., Briers, Y., & Plotka, M. (2023). *Phages and engineered lysins as an effective tool to combat Gram-negative foodborne pathogens*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 22(3). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13145>

Krause, R. M. (1958). *Studies on the bacteriophages of hemolytic streptococci. II. Antigens released from the streptococcal cell wall by a phage-associated lysin*. The Journal of Experimental Medicine, 108(6), 803–821. <https://doi.org/10.1084/JEM.108.6.803>

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). *Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo*. Biomolecules, 8(1). <https://doi.org/10.3390/BIOM8010004>

Lai, M. J., Lin, N. T., Hu, A., Soo, P. C., Chen, L. K., Chen, L. H., & Chang, K. C. (2011). *Antibacterial activity of Acinetobacter baumannii phage  $\phi$ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 90(2), 529–539. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3104-Y>

- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). *Antibiotic resistance in the environment*. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/S41579-021-00649-X>
- Loeffler, J. M., Nelson, D., & Fischetti, V. A. (2001). *Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2170–2172. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1066869>
- Loessner, M. J., Maier, S. K., Daubek-Puza, H., Wendlinger, G., & Scherer, S. (1997). *Three Bacillus cereus bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli*. *Journal of Bacteriology*, 179(9), 2845–2851. <https://doi.org/10.1128/JB.179.9.2845-2851.1997>
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S. (2002). *C-terminal domains of Listeria monocytogenes bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates*. *Mol Microbiol.* 2002 Apr;44(2):335-49. <https://doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>.
- Lohner, K., & Prossnigg, F. (2009). *Biological activity and structural aspects of PGLa interaction with membrane mimetic systems*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1656–1666. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2009.05.012>
- Lowy, F. D. (2003). *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
- Luca, V., Stringaro, A., Colone, M., Pini, A., & Mangoni, M. L. (2013). *Esculentin (1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(15), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1291-7>
- Lyon J. A. (1985). *Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic*. *Drug Intell Clin Pharm.* 1985 Dec;19(12):895-9. <https://doi.org/10.1177/106002808501901202>
- Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). *Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). *Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(DEC), 194. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2016.00194/BIBTEX>
- Matsushita, I., & Yanase, H. (2008). *A novel thermophilic lysozyme from bacteriophage phiIN93*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), 89–92. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.09.101>



McCarthy, M. W. (2020). *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Imipenem–Cilastatin/Relebactam Combination Therapy*. *Clinical Pharmacokinetics*, 59(5), 567–573. <https://doi.org/10.1007/S40262-020-00865-3/METRICS>

Mohr, K. I. (2016). *History of antibiotics research*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 237–272. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_499/COVER](https://doi.org/10.1007/82_2016_499/COVER)

Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1999). *Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation*. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 185–198. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_8)

Mondal, S. I., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2020). *Bacteriophage endolysins as a potential weapon to combat Clostridioides difficile infection*. *Gut Microbes*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1813533>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4107. <https://doi.org/10.1073/PNAS.061038398>

Nishie, M., Nagao, J. I., & Sonomoto, K. (2012). *Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications*. *Biocontrol Science*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.4265/BIO.17.1>

Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., & Ochi, K. (2007). *Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria*. *Molecular Microbiology*, 63(4), 1096–1106. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05585.X>

Okuda, K. I., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., & Mizunoe, Y. (2013). *Effects of bacteriocins on methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5572–5579. <https://doi.org/10.1128/AAC.00888-13>

O’Neill, J. (2016) *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust and HM Government. [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)

Pane, K., Sgambati, V., Zanfardino, A., Smaldone, G., Cafaro, V., Angrisano, T., Pedone, E., di Gaetano, S., Capasso, D., Haney, E. F., Izzo, V., Varcamonti, M., Notomista, E., Hancock, R. E. W., di Donato, A., & Pizzo, E. (2016). *A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells*. *The FEBS Journal*, 283(11), 2115–2131. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13725>

Paulmann, M., Arnold, T., Linke, D., Özdirekcan, S., Kopp, A., Gutschmann, T., Kalbacher, H., Wanke, I., Schuenemann, V. J., Habeck, M., Bürck, J., Ulrich, A. S., & Schitteck, B. (2012). *Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat*. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8434–8443. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.332270>

Peng, S. Y., You, R. I., Lai, M. J., Lin, N. T., Chen, L. K., & Chang, K. C. (2017). *Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the Acinetobacter baumannii phage endolysin LysAB2*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-11832-7>

Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2009). *A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant Staphylococcus aureus and Enterococcus species*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(3), 546–551. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKP221>

Plotka, M., Kaczorowska, A. K., Morzywolek, A., Makowska, J., Kozłowski, L. P., Thorisdóttir, A., Skírnisdóttir, S., Hjörleifsdóttir, S., Fridjonsson, O. H., Hreggvidsson, G. O., Kristjánsson, J. K., Dabrowski, S., Bujnicki, J. M., & Kaczorowski, T. (2015). *Biochemical Characterization and Validation of a Catalytic Site of a Highly Thermostable Ts2631 Endolysin from the Thermus scotoductus Phage vB\_Tsc2631*. *PloS One*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0137374>

Plotka, M., Kaczorowska, A. K., Stefanska, A., Morzywolek, A., Fridjonsson, O. H., Dunin-Horkawicz, S., Kozłowski, L., Hreggvidsson, G. O., Kristjánsson, J. K., Dabrowski, S., Bujnicki, J. M., & Kaczorowski, T. (2014). *Novel highly thermostable endolysin from Thermus scotoductus MAT2119 bacteriophage Ph2119 with amino acid sequence similarity to eukaryotic peptidoglycan recognition proteins*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 886–895. <https://doi.org/10.1128/AEM.03074-13>

Plotka, M., Szadkowska, M., Håkansson, M., Kovačič, R., Al-Karadaghi, S., Walse, B., Werbowy, O., Kaczorowska, A. K., & Kaczorowski, T. (2020). *Molecular Characterization of a Novel Lytic Enzyme LysC from Clostridium intestinale URNW and Its Antibacterial Activity Mediated by Positively Charged N-Terminal Extension*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144894>

Pulido, D., Prats-Ejarque, G., Villalba, C., Albacar, M., González-López, J. J., Torrent, M., Moussaoui, M., & Boix, E. (2016). *A Novel RNase 3/ECP Peptide for Pseudomonas aeruginosa Biofilm Eradication That Combines Antimicrobial, Lipopolysaccharide Binding, and Cell-Agglutinating Activities*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6313–6325. <https://doi.org/10.1128/AAC.00830-16>

Rammelkamp, C. H., & Maxon, T. (2016). *Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin.\**. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>, 51(3), 386–389. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>

Ringstad, L., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2006). *Effect of peptide length on the interaction between consensus peptides and DOPC/DOPA bilayers*. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22(11), 5042–5050. <https://doi.org/10.1021/LA060317Y>

Roach, D. R., & Donovan, D. M. (2015). *Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications*. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>

Rogers H. J., Perkins H. R., Ward Chapman J. B. & Hall (1980) *Microbial Cell Walls and Membranes*. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.214.4520.550.a>

Samaszko-Fiertek, J., Dmochowska, B., & Madaj, J. (2015). *Peptydoglikan: budowa, rola biologiczna oraz synteza*. *Wiadomości Chemiczne*, [Z] 69, 7-8, 7–8. <https://www.docsity.com/pl/peptydoglikan-budowa-rola-biologiczna-oraz-synteza/5756796/>

Saravolatz, L. D., Stein, G. E., & Johnson, L. B. (2011). *Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(9), 1156–1163. <https://doi.org/10.1093/CID/CIR147>

Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). *Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials*. *Future Microbiology*, 7(10), 1147. <https://doi.org/10.2217/FMB.12.97>

Schmelcher, M., Shabarova, T., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Tchang, V. S., Banz, M., & Loessner, M. J. (2010). *Rapid multiplex detection and differentiation of Listeria cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5745–5756. <https://doi.org/10.1128/AEM.00801-10>

Schuck, P. (2000). *Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling*. *Biophysical Journal*, 78(3), 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0)

Shai, Y. (1999). *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1–2), 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)

Sharma, S., Sahoo, N., & Bhunia, A. (2016). *Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes.* *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 46–53. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703115454>

Shenkarev, Z. O., Paramonov, A. S., Lyukmanova, E. N., Gizatullina, A. K., Zhuravleva, A. v., Tagaev, A. A., Yakimenko, Z. A., Telezhinskaya, I. N., Kirpichnikov, M. P., Ovchinnikova, T. v., & Arseniev, A. S. (2013). *Peptaibol antimioebin I: spatial structure, backbone dynamics, interaction with bicelles and lipid-protein nanodiscs, and pore formation in context of barrel-stave model.* *Chemistry & Biodiversity*, 10(5), 838–863. <https://doi.org/10.1002/CBDV.201200421>

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). *The Bacterial Cell Envelope.* *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A000414>

Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., & Singh, T. P. (2013). *Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein.* *International Journal of Peptides*, 2013, 12. <https://doi.org/10.1155/2013/390230>

Son, B., Yun, J., Lim, J. A., Shin, H., Heu, S., & Ryu, S. (2012). *Characterization of LysB4, an endolysin from the Bacillus cereus-infecting bacteriophage B4.* *BMC Microbiology*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-33/FIGURES/4>

Steed, M. E., & Rybak, M. J. (2010). *Ceftaroline: a new cephalosporin with activity against resistant gram-positive pathogens.* *Pharmacotherapy*, 30(4), 375–389. <https://doi.org/10.1592/PHCO.30.4.375>

Subbalakshmi, C., & Sitaram, N. (1998). *Mechanism of antimicrobial action of indolicidin.* *FEMS Microbiology Letters*, 160(1), 91–96. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1998.TB12896.X>

Swaminathan, R., Ravi, V. K., Kumar, S., Kumar, M. V. S., & Chandra, N. (2011). *Lysozyme: a model protein for amyloid research.* *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 84, 63–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3>

Szadkowska, M., Olewniczak, M., Kloska, A., Jankowska, E., Kapusta, M., Rybak, B., Wyrzykowski, D., Zmudzinska, W., Gieldon, A., Kocot, A., Kaczorowska, A.-K., Nierzwicki, L., Makowska, J., Kaczorowski, T., & Plotka, M. (2022). *A Novel Cryptic Clostridial Peptide That Kills Bacteria by a Cell Membrane Permeabilization Mechanism.* *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01657-22>

Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). *Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity*. *Biochimie*, 92(9), 1236–1241. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2010.02.023>

Takahashi, J., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Nishida, T., Labischinski, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Yamagishi, J. ichi, & Sugai, M. (2002). *Molecular characterization of an atl null mutant of Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology*, 46(9), 601–612. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2002.TB02741.X>

Thandar, M., Lood, R., Winer, B. Y., Deutsch, D. R., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2016). *Novel Engineered Peptides of a Phage Lysin as Effective Antimicrobials against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2971–2979. <https://doi.org/10.1128/AAC.02972-15>

Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., & Idicula-Thomas, S. (2010). *CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides*. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP1021>

Vázquez, R., Blanco-Gañán, S., Ruiz, S., & García, P. (2021). *Mining of Gram-Negative Surface-Active Enzybiotic Candidates by Sequence-Based Calculation of Physicochemical Properties*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 660403. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.660403/BIBTEX>

Vazquez, R., Seoane-Blanco, M., Rivero-Buceta, V., Ruiz, S., Van Raaij, M. J., & Garcia, P. (2022). *Monomodular Pseudomonas aeruginosa phage JG004 lysozyme (Pae87) contains a bacterial surface-active antimicrobial peptide-like region and a possible substrate-binding subdomain*. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, 78(Pt 4), 435–454. <https://doi.org/10.1107/S2059798322000936>

Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., & Desvaux, M. (2019). *Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan*. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00331>

Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). *Peptidoglycan structure and architecture*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2007.00094.X>

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). *APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education*. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1278>

Wu, M., Maier, E., Benz, R., & Hancock, R. E. W. (1999). *Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38(22), 7235–7242. <https://doi.org/10.1021/BI9826299>

- Xu, S., Campisi, E., Li, J., & Fischetti, V. A. (2021). *Decontamination of Escherichia coli O157:H7 on fresh Romaine lettuce using a novel bacteriophage lysin*. *International Journal of Food Microbiology*, 341. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109068>
- 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), 1475–1485. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75802-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75802-X)
- Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2018). *Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms*. *Materials* (Basel, Switzerland), 11(12). <https://doi.org/10.3390/MA11122468>
- Young, R. (2014). *Phage lysis: three steps, three choices, one outcome*. *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea), 52(3), 243–258. <https://doi.org/10.1007/S12275-014-4087-Z>
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). *Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1436–1449. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2006.03.021>
- Zhao, H., Brautigam, C. A., Ghirlando, R., & Schuck, P. (2013). *Current Methods in Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium Analytical Ultracentrifugation*. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, 0 20(SUPPL.71). <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS2012S71>

## 9. SUPPLEMENT

### Ryc. S1. Geny syntetyczne; zielonym kolorem oznaczono miejsce cięcia enzymów restrykcyjnych.

#### > LysC

5' **CATATG**AAAAATCTGCTGCGTCGTATTTCGTCGTAAACTGCGTAACAAATTTAGCCGCGAGTGATGTGAT  
TAAACCCCCGAAAATTGTGGAAGTGAATTATACCTGGGCAACACCGCTGAGCTATAACTTTAATCCGAAC  
ATGATCGTGTATCATCACACCGTGGATAATAACATGACACCGCAGAAAATCGATGAGATCCATAAACAGC  
GTGGTTGGAGCGGTATTGGTTATCATTTCTATATTCGTAAAGATGGCACCATCTATCGTGGTTCGTCCGGA  
AAATGCAGTTGGTAGCCATGCACCGGGTGTAAATGCACGTGCCTTTGGTATTGCAAGCGAAGGCAATTTT  
AACGAAGAATATGTTACCCCTCAGCAGATGACCAGCCTGATTGCACTGAGCCGTTATCTGATGAACAAAT  
ACAATATCACCGATCTGAAACGCCATAAAGATGTTTCGTGAGACCGAATGTCCGGGTAATAACTTTCCGTT  
TGAAGAGATTAAGCCAAACTGAACGTGAAATAA**GGATCC**-3'

#### > PhiKo

5' **CATATG**AACCTGGATTGAATTCTGGCGTAGCAAAAAACCGACCTGGCGTCATCGTCCGGTTGATCCGGC  
ATATATTGTTCTGCATCATACCGCAGGTCCGGTGGATCAGGCACCGCAGGCAATTTGGGATTATCATGTT  
AAAGTTCGTGGTTGGCCTCATGGTGGTTATCATTTTCTGGTTTATCATGATGGCACCCTGGTTAAAATGC  
TGCCGCTGAGCGCACAGCCGATTTGTGTTGGTGAATATAATCATCTGGCCATTTGTATTGCCCTGGTGGG  
TAATTTTGTGGTGGCTATCCGCCTGAATGGAATGAACGTGCACCTGGTTGGAAAAGCCTGGCATGGCTG  
GTTTCGTGAACCTGCGTAAACATGATAGCGGTCTGCGTCTGCGCCTGGTTCGTCATAAAGATCTGCGTCCGA  
CCAAATGTCCGGGTACAGTTACCTGGGAAGAGGCACTGGTGCCTGGTGGTGGTGGTTCGCAAGAACAGGTTGA  
AACCTGAAAGTTGCCGGTGTATTGCATAA**GGATCC**-3'

#### > GasC

5' **CATATG**AAAAGCGTTGTGCGCAAACCTGAAAAACGTATGCGTCGTGAGAGTCCGCCTCCGATGCCGAA  
AATTGTTGAAGTTGATTACAAATGGGCAAGTCCGCTGAGCTATAACCCTGAAACCGACCATGATTGTTTAT  
CATCATAACCGCAGAAGATAATCTGACACCGCAGCGTATTGATGAACTGCATAAAGCACGTGGTTGGAGCG  
GTATTGGTTATCATTTCTATATTCGTAAAGATGGCACCATCTATCGTGGTTCGTCCGGAAAATGCAATTGG  
TGCACATGCACCGAGCGTTAATAGCAAAGCACTGGGTATTGCACTGGAAGGCAATTTTAAACGAAGAATTC  
GTGACCAAGAACAAGAGGATAGCCTGATTGCACTGAGCAAATATCTGGTGAACAAGTACAACATCAAAG  
ACATCAAACGCCACAAAGATGTTACCAATACAGAATGTCCGGGTAAAACCTTTCCGTTTAAAGAAATCAA  
AGCCGAACCTGAAACTGTA**AGGATCC**-3'

#### > CT4

5' **CATATG**AAGAACATTTTTTCGTCGTGCACTGCGTCGTGTTTTTAAAGCACGTCAGGTTTCAGCCGAAAAT  
TGTGGAAGTTAACTATAAATGGGCACAGCCGCTGCAGTTTACCATGAAACCGCAGATGATTGTTTATCAT  
CATACCGTGGAAATTGGCAAAACACCGGAAGAAATTCATCAGCTGCATGTTAATCGTGGTTGGGCAGGTA  
TTGGTTATCATTTCTATATTCGTAAAGATGGCACCATCTATCGTGGTTCGTCCGGAAAATGCAAGTTGGTAG  
CCATGCACCGGGTGTAAATAACATTGCACTGGGTATTGCATTTGAGGGCAATTTTCATGGTTGAAAAACCG  
ACCGAACAGCAGCTGAATAGCGCAATTATTCTGAGCAAATACCTGGTGAACAAGTACGGCATTAAAGAAC  
TGCGTCGCCATAAAGATGTTAAACCGACCACCGAATGTCCGGGTATTAACCTTTCCGTTTCGATTACATCAA  
AAGCAAAGTTCTGGGCACCACCACCAATAAAACCGCATAA**AGGATCC**-3'

**Tabela S1. Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka PhiKo.**

Algorytm:			SVM		RF		ANN	DA	
Nr sekw.	Pozycja	Sekwencja	AMP/NAMP	<i>P</i>	AMP/NAMP	<i>P</i>	AMP/NAMP	AMP/NAMP	<i>P</i>
1.	1-29	MNWIEFWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHT	NAMP	0,010	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,001
2.	2-30	NWIEFWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTA	NAMP	0,080	NAMP	0,094	NAMP	NAMP	0,067
3.	3-31	WIEFWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAG	NAMP	0,087	NAMP	0,153	NAMP	NAMP	0,076
4.	4-32	IEFWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGP	NAMP	0,096	NAMP	0,124	NAMP	NAMP	0,047
5.	5-33	EFWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPV	NAMP	0,102	NAMP	0,149	NAMP	NAMP	0,044
6.	6-34	FWRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVD	NAMP	0,086	NAMP	0,160	NAMP	NAMP	0,037
7.	7-35	WRSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQ	NAMP	0,046	NAMP	0,075	NAMP	NAMP	0,024
8.	8-36	RSKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQA	NAMP	0,047	NAMP	0,069	NAMP	NAMP	0,015
9.	9-37	SKKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAP	NAMP	0,036	NAMP	0,032	NAMP	NAMP	0,006
10.	10-38	KKPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQ	NAMP	0,049	NAMP	0,028	NAMP	NAMP	0,016
11.	11-39	KPTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQA	NAMP	0,044	NAMP	0,001	NAMP	NAMP	0,007
12.	12-40	PTWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAI	NAMP	0,041	NAMP	0,005	NAMP	NAMP	0,019
13.	13-41	TWRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIW	NAMP	0,031	NAMP	0,002	NAMP	NAMP	0,028
14.	14-42	WRHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWD	NAMP	0,021	NAMP	0,007	NAMP	NAMP	0,011
15.	15-43	RHRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDY	NAMP	0,032	NAMP	0,002	NAMP	NAMP	0,012
16.	16-44	HRPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYH	NAMP	0,019	NAMP	0,004	NAMP	NAMP	0,007
17.	17-45	RPVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHV	NAMP	0,033	NAMP	0,016	NAMP	NAMP	0,025
18.	18-46	PVDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVK	NAMP	0,078	NAMP	0,039	NAMP	NAMP	0,114
19.	19-47	VDPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKV	NAMP	0,098	NAMP	0,091	NAMP	NAMP	0,165
20.	20-48	DPAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVR	NAMP	0,058	NAMP	0,007	NAMP	NAMP	0,052



21.	21-49	PAYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRG	NAMP	0,091	NAMP	0,021	NAMP	NAMP	0,081
22.	22-50	AYIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGW	NAMP	0,082	NAMP	0,072	NAMP	NAMP	0,037
23.	23-51	YIVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWP	NAMP	0,048	NAMP	0,021	NAMP	NAMP	0,031
24.	24-52	IVLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPH	NAMP	0,079	NAMP	0,034	NAMP	NAMP	0,091
25.	25-53	VLHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHG	NAMP	0,072	NAMP	0,030	NAMP	NAMP	0,045
26.	26-54	LHHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGG	NAMP	0,076	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,033
27.	27-55	HHTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGY	NAMP	0,050	NAMP	0,009	NAMP	NAMP	0,030
28.	28-56	HTAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYH	NAMP	0,058	NAMP	0,020	NAMP	NAMP	0,038
29.	29-57	TAGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHF	NAMP	0,211	NAMP	0,042	NAMP	NAMP	0,053
30.	30-58	AGPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFL	NAMP	0,247	NAMP	0,136	NAMP	NAMP	0,062
31.	31-59	GPVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLV	NAMP	0,221	NAMP	0,109	NAMP	NAMP	0,075
32.	32-60	PVDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVY	NAMP	0,086	NAMP	0,062	NAMP	NAMP	0,036
33.	33-61	VDQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYH	NAMP	0,085	NAMP	0,084	NAMP	NAMP	0,075
34.	34-62	DQAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHD	NAMP	0,032	NAMP	0,035	NAMP	NAMP	0,027
35.	35-63	QAPQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDG	NAMP	0,052	NAMP	0,034	NAMP	NAMP	0,024
36.	36-64	APQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGT	NAMP	0,049	NAMP	0,069	NAMP	NAMP	0,030
37.	37-65	PQAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTV	NAMP	0,027	NAMP	0,044	NAMP	NAMP	0,012
38.	38-66	QAIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVV	NAMP	0,039	NAMP	0,100	NAMP	NAMP	0,029
39.	39-67	AIWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVK	NAMP	0,053	NAMP	0,134	NAMP	NAMP	0,066
40.	40-68	IWDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKM	NAMP	0,027	NAMP	0,034	NAMP	NAMP	0,020
41.	41-69	WDYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKML	NAMP	0,016	NAMP	0,021	NAMP	NAMP	0,012
42.	42-70	DYHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLP	NAMP	0,030	NAMP	0,017	NAMP	NAMP	0,011
43.	43-71	YHVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPL	NAMP	0,027	NAMP	0,136	NAMP	NAMP	0,013
44.	44-72	HVKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLS	NAMP	0,041	NAMP	0,125	NAMP	NAMP	0,034

45.	45-73	VKVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSA	NAMP	0,146	NAMP	0,269	NAMP	NAMP	0,070
46.	46-74	KVRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQ	NAMP	0,126	NAMP	0,080	NAMP	NAMP	0,051
47.	47-75	VRGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQP	NAMP	0,078	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,044
48.	48-76	RGWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPI	NAMP	0,111	NAMP	0,043	NAMP	NAMP	0,064
49.	49-77	GWPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPIC	NAMP	0,177	NAMP	0,030	NAMP	NAMP	0,042
50.	50-78	WPHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICV	NAMP	0,087	NAMP	0,013	NAMP	NAMP	0,014
51.	51-79	PHGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVG	NAMP	0,198	NAMP	0,051	NAMP	NAMP	0,030
52.	52-80	HGGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGE	NAMP	0,087	NAMP	0,036	NAMP	NAMP	0,016
53.	53-81	GGYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEY	NAMP	0,171	NAMP	0,048	NAMP	NAMP	0,018
54.	54-82	GYHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYN	NAMP	0,080	NAMP	0,018	NAMP	NAMP	0,014
55.	55-83	YHFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNH	NAMP	0,023	NAMP	0,005	NAMP	NAMP	0,004
56.	56-84	HFLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHL	NAMP	0,029	NAMP	0,000	NAMP	NAMP	0,012
57.	57-85	FLVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLA	NAMP	0,081	NAMP	0,013	NAMP	NAMP	0,027
58.	58-86	LVYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAI	NAMP	0,109	NAMP	0,033	NAMP	NAMP	0,010
59.	59-87	VYHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAIC	NAMP	0,168	NAMP	0,016	NAMP	NAMP	0,038
60.	60-88	YHDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICI	NAMP	0,124	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,018
61.	61-89	HDGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIA	NAMP	0,211	NAMP	0,076	NAMP	NAMP	0,022
62.	62-90	DGTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIAL	AMP	0,605	NAMP	0,250	NAMP	NAMP	0,211
63.	63-91	GTVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIALV	AMP	0,730	AMP	0,535	AMP	NAMP	0,315
64.	64-92	TVVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIALVG	AMP	0,539	NAMP	0,349	NAMP	NAMP	0,220
65.	65-93	VVKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIALVGN	AMP	0,665	AMP	0,548	AMP	NAMP	0,480
66.	66-94	VKMLPLSAQPICVGEYNHLAICIALVGNF	AMP	0,553	NAMP	0,477	NAMP	NAMP	0,253
67.	67-95	KMLPLSAQPICVGEYNHLAICIALVGNFV	NAMP	0,409	NAMP	0,205	NAMP	NAMP	0,236
68.	68-96	MLPLSAQPICVGEYNHLAICIALVGNFVG	NAMP	0,352	NAMP	0,140	NAMP	NAMP	0,135

69.	69-97	LPLSAQPICVGEYNHLAICIALVGNFVGG	AMP	0,884	AMP	0,680	AMP	AMP	0,694
70.	70-98	PLSAQPICVGEYNHLAICIALVGNFVGGY	AMP	0,816	NAMP	0,454	AMP	AMP	0,709
<b>71.</b>	<b>71-99</b>	<b>LSAQPICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,840</b>	<b>AMP</b>	<b>0,624</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,615</b>
72.	72-100	SAQPICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPP	AMP	0,784	NAMP	0,476	AMP	AMP	0,560
73.	73-101	AQPICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPE	AMP	0,608	NAMP	0,358	NAMP	NAMP	0,476
74.	74-102	QPICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEW	NAMP	0,311	NAMP	0,239	NAMP	NAMP	0,124
75.	75-103	PICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWN	AMP	0,511	NAMP	0,255	NAMP	NAMP	0,232
76.	76-104	ICVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNE	NAMP	0,431	NAMP	0,338	NAMP	NAMP	0,499
77.	77-105	CVGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNER	NAMP	0,258	NAMP	0,242	NAMP	NAMP	0,325
78.	78-106	VGEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERA	NAMP	0,233	NAMP	0,209	NAMP	NAMP	0,196
79.	79-107	GEYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERAP	NAMP	0,224	NAMP	0,116	NAMP	NAMP	0,084
80.	80-108	EYNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERAPG	NAMP	0,124	NAMP	0,069	NAMP	NAMP	0,020
81.	81-109	YNHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGW	NAMP	0,114	NAMP	0,124	NAMP	NAMP	0,022
82.	82-110	NHLAICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWK	NAMP	0,155	NAMP	0,157	NAMP	NAMP	0,111
83.	83-111	HLAICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKS	NAMP	0,161	NAMP	0,133	NAMP	NAMP	0,076
84.	84-112	LAICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSL	AMP	0,516	AMP	0,523	AMP	NAMP	0,252
85.	85-113	AICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLA	AMP	0,534	AMP	0,534	AMP	NAMP	0,458
86.	86-114	ICIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAW	AMP	0,549	AMP	0,503	AMP	NAMP	0,299
87.	87-115	CIALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWL	NAMP	0,398	NAMP	0,469	AMP	NAMP	0,227
88.	88-116	IALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLV	NAMP	0,359	NAMP	0,432	NAMP	NAMP	0,378
89.	89-117	ALVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVR	NAMP	0,260	NAMP	0,299	NAMP	NAMP	0,359
90.	90-118	LVGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRE	NAMP	0,128	NAMP	0,203	NAMP	NAMP	0,069
91.	91-119	VGNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVREL	NAMP	0,241	NAMP	0,205	NAMP	NAMP	0,157
92.	92-120	GNFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELR	NAMP	0,263	NAMP	0,162	NAMP	NAMP	0,287

93.	93-121	NFVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRK	NAMP	0,300	NAMP	0,176	NAMP	NAMP	0,209
94.	94-122	FVGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKH	NAMP	0,262	NAMP	0,109	NAMP	NAMP	0,085
95.	95-123	VGGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHD	NAMP	0,186	NAMP	0,066	NAMP	NAMP	0,049
96.	96-124	GGYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDS	NAMP	0,238	NAMP	0,060	NAMP	NAMP	0,049
97.	97-125	GYPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSG	NAMP	0,209	NAMP	0,052	NAMP	NAMP	0,035
98.	98-126	YPPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGL	NAMP	0,123	NAMP	0,040	NAMP	NAMP	0,004
99.	99-127	PPEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLR	NAMP	0,185	NAMP	0,092	NAMP	NAMP	0,066
100.	100-128	PEWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRL	NAMP	0,323	NAMP	0,190	NAMP	NAMP	0,086
101.	101-129	EWNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLR	AMP	0,634	NAMP	0,468	NAMP	NAMP	0,352
<b>102.</b>	<b>102-130</b>	<b>WNERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRL</b>	<b>AMP</b>	<b>0,830</b>	<b>AMP</b>	<b>0,654</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,712</b>
<b>103.</b>	<b>103-131</b>	<b>NERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLV</b>	<b>AMP</b>	<b>0,799</b>	<b>AMP</b>	<b>0,635</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,756</b>
<b>104.</b>	<b>104-132</b>	<b>ERAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVR</b>	<b>AMP</b>	<b>0,906</b>	<b>AMP</b>	<b>0,700</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,797</b>
<b>105.</b>	<b>105-133</b>	<b>RAPGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRH</b>	<b>AMP</b>	<b>0,933</b>	<b>AMP</b>	<b>0,714</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,817</b>
<b>106.</b>	<b>106-134</b>	<b>APGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,867</b>	<b>AMP</b>	<b>0,654</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,779</b>
107.	107-135	PGWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKD	AMP	0,770	AMP	0,622	NAMP	AMP	0,601
<b>108.</b>	<b>108-136</b>	<b>GWKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDL</b>	<b>AMP</b>	<b>0,925</b>	<b>AMP</b>	<b>0,700</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,948</b>
109.	109-137	WKSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLR	AMP	0,907	AMP	0,689	NAMP	AMP	0,799
<b>110.</b>	<b>110-138</b>	<b>KSLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,840</b>	<b>AMP</b>	<b>0,671</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,583</b>
111.	111-139	SLAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPT	AMP	0,568	AMP	0,552	NAMP	NAMP	0,371
<b>112.</b>	<b>112-140</b>	<b>LAWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,892</b>	<b>AMP</b>	<b>0,698</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,794</b>
<b>113.</b>	<b>113-141</b>	<b>AWLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKC</b>	<b>AMP</b>	<b>0,899</b>	<b>AMP</b>	<b>0,704</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,550</b>
114.	114-142	WLVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCP	AMP	0,826	AMP	0,605	AMP	NAMP	0,415
115.	115-143	LVRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPG	AMP	0,673	AMP	0,579	AMP	NAMP	0,389
116.	116-144	VRELRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGT	NAMP	0,395	AMP	0,520	AMP	NAMP	0,288

117.	117-145	RELKHD SGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTV	NAMP	0,459	AMP	0,535	AMP	NAMP	0,273
118.	118-146	ELRKHD SGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVT	NAMP	0,242	NAMP	0,453	AMP	NAMP	0,123
119.	119-147	LRKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTW	NAMP	0,390	AMP	0,505	AMP	NAMP	0,087
120.	120-148	RKHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWE	NAMP	0,222	NAMP	0,403	NAMP	NAMP	0,035
121.	121-149	KHDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEE	NAMP	0,136	NAMP	0,227	NAMP	NAMP	0,007
122.	122-150	HDSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEA	NAMP	0,088	NAMP	0,110	NAMP	NAMP	0,003
123.	123-151	DSGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEAL	NAMP	0,138	NAMP	0,137	NAMP	NAMP	0,031
124.	124-152	SGLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALV	NAMP	0,245	NAMP	0,210	NAMP	NAMP	0,040
125.	125-153	GLRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVR	AMP	0,552	NAMP	0,473	AMP	NAMP	0,236
126.	126-154	LRLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRG	NAMP	0,486	NAMP	0,452	NAMP	NAMP	0,072
127.	127-155	RLRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGG	NAMP	0,406	NAMP	0,428	AMP	NAMP	0,111
128.	128-156	LRLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGV	NAMP	0,341	NAMP	0,267	NAMP	NAMP	0,066
129.	129-157	RLVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVP	NAMP	0,235	NAMP	0,181	NAMP	NAMP	0,079
130.	130-158	LVRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQ	NAMP	0,184	NAMP	0,141	NAMP	NAMP	0,022
131.	131-159	VRHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQE	NAMP	0,060	NAMP	0,063	NAMP	NAMP	0,005
132.	132-160	RHKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQ	NAMP	0,043	NAMP	0,031	NAMP	NAMP	0,001
133.	133-161	HKDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQV	NAMP	0,032	NAMP	0,022	NAMP	NAMP	0,001
134.	134-162	KDLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVE	NAMP	0,027	NAMP	0,018	NAMP	NAMP	0,004
135.	135-163	DLRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVET	NAMP	0,021	NAMP	0,018	NAMP	NAMP	0,002
136.	136-164	LRPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETL	NAMP	0,032	NAMP	0,021	NAMP	NAMP	0,003
137.	137-165	RPTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLK	NAMP	0,037	NAMP	0,030	NAMP	NAMP	0,001
138.	138-166	PTKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKV	NAMP	0,048	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,008
139.	139-167	TKCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKVA	NAMP	0,057	NAMP	0,028	NAMP	NAMP	0,005
140.	140-168	KCPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKVAG	NAMP	0,105	NAMP	0,096	NAMP	NAMP	0,017

141.	141-169	CPGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKVAGV	NAMP	0,134	NAMP	0,270	NAMP	NAMP	0,031
142.	142-170	PGTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKVAGVI	NAMP	0,186	NAMP	0,221	NAMP	NAMP	0,126
143.	143-171	GTVTWEEALVRGGVPQEQVETLKVAGVIA	NAMP	0,323	NAMP	0,308	NAMP	NAMP	0,457

Pogrubione regiony o prawdopodobnej aktywności antybakteryjnej.

Czerwony kolor oznacza wybrany do dalszych analiz peptyd antybakteryjny.

*P* - prawdopodobieństwo

**Tabela S2. Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka GasC.**

Algorytm:			SVM		RF		ANN	DA	
Nr sekw.	Pozycja	Sekwencja	AMP/ NAMP	<i>P</i>	AMP/ NAMP	<i>P</i>	AMP/ NAMP	AMP/ NAMP	<i>P</i>
1.	1-20	MKSVVRKLLKKRMRRQSPPPM	NAMP	0,004	NAMP	0,161	NAMP	NAMP	0,284
2.	2-21	KSVVRKLLKKRMRRQSPPMP	NAMP	0,079	NAMP	0,231	NAMP	AMP	0,652
3.	3-22	SVVRKLLKKRMRRQSPPMPK	NAMP	0,129	NAMP	0,201	NAMP	AMP	0,770
<b>4.</b>	<b>4-23</b>	<b>VVRKLLKKRMRRQSPPMPKI</b>	<b>AMP</b>	<b>0,608</b>	<b>NAMP</b>	<b>0,347</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,908</b>
5.	5-24	VRKLLKKRMRRQSPPMPKIV	NAMP	0,303	NAMP	0,329	NAMP	AMP	0,822
6.	6-25	RKLLKKRMRRQSPPMPKIVE	NAMP	0,109	NAMP	0,254	NAMP	NAMP	0,297
7.	7-26	KLKKRMRRQSPPMPKIVEV	NAMP	0,118	NAMP	0,241	NAMP	NAMP	0,139
8.	8-27	LKKRMRRQSPPMPKIVEVD	NAMP	0,035	NAMP	0,221	NAMP	NAMP	0,142
9.	9-28	KKRMRRQSPPMPKIVEVDY	NAMP	0,059	NAMP	0,236	NAMP	AMP	0,634
10.	10-29	KRMRRQSPPMPKIVEVDYK	NAMP	0,023	NAMP	0,188	NAMP	NAMP	0,495
11.	11-30	RMRRQSPPMPKIVEVDYKW	NAMP	0,019	NAMP	0,139	NAMP	NAMP	0,144
12.	12-31	MRRQSPPMPKIVEVDYKWA	NAMP	0,009	NAMP	0,045	NAMP	NAMP	0,018
13.	13-32	RRQSPPMPKIVEVDYKWA	NAMP	0,087	NAMP	0,127	NAMP	NAMP	0,021
14.	14-33	RQSPPMPKIVEVDYKWASP	NAMP	0,054	NAMP	0,056	NAMP	NAMP	0,024
15.	15-34	QSPPMPKIVEVDYKWASPL	NAMP	0,045	NAMP	0,108	NAMP	NAMP	0,018
16.	16-35	SPPMPKIVEVDYKWASPLS	NAMP	0,153	NAMP	0,098	NAMP	NAMP	0,013
17.	17-36	PPMPKIVEVDYKWASPLSY	NAMP	0,111	NAMP	0,107	NAMP	NAMP	0,006
18.	18-37	PPMPKIVEVDYKWASPLSYT	NAMP	0,059	NAMP	0,036	NAMP	NAMP	0,004
19.	19-38	PMPKIVEVDYKWASPLSYTL	NAMP	0,030	NAMP	0,021	NAMP	NAMP	0,003
20.	20-39	MPKIVEVDYKWASPLSYTLK	NAMP	0,033	NAMP	0,098	NAMP	NAMP	0,010

21.	21-40	PKIVEVDYKWASPLSYTLKP	NAMP	0,085	NAMP	0,107	NAMP	NAMP	0,074
22.	22-41	KIVEVDYKWASPLSYTLKPT	NAMP	0,279	NAMP	0,133	NAMP	NAMP	0,192
23.	23-42	IVEVDYKWASPLSYTLKPTM	NAMP	0,148	NAMP	0,075	NAMP	NAMP	0,041
24.	24-43	VEVDYKWASPLSYTLKPTMI	NAMP	0,104	NAMP	0,078	NAMP	NAMP	0,037
25.	25-44	EVDYKWASPLSYTLKPTMIV	NAMP	0,079	NAMP	0,054	NAMP	NAMP	0,020
26.	26-45	VDYKWASPLSYTLKPTMIVY	NAMP	0,073	NAMP	0,208	NAMP	NAMP	0,110
27.	27-46	DYKWASPLSYTLKPTMIVYH	NAMP	0,050	NAMP	0,128	NAMP	NAMP	0,031
28.	28-47	YKWASPLSYTLKPTMIVYHH	NAMP	0,034	NAMP	0,214	NAMP	NAMP	0,090
29.	29-48	KWASPLSYTLKPTMIVYHHT	NAMP	0,156	NAMP	0,294	NAMP	NAMP	0,214
30.	30-49	WASPLSYTLKPTMIVYHHTA	NAMP	0,066	NAMP	0,190	NAMP	NAMP	0,138
31.	31-50	ASPLSYTLKPTMIVYHHTAE	NAMP	0,046	NAMP	0,215	NAMP	NAMP	0,018
32.	32-51	SPLSYTLKPTMIVYHHTAED	NAMP	0,020	NAMP	0,050	NAMP	NAMP	0,020
33.	33-52	PLSYTLKPTMIVYHHTAEDN	NAMP	0,011	NAMP	0,016	NAMP	NAMP	0,030
34.	34-53	LSYTLKPTMIVYHHTAEDNL	NAMP	0,010	NAMP	0,016	NAMP	NAMP	0,032
35.	35-54	SYTLKPTMIVYHHTAEDNLT	NAMP	0,018	NAMP	0,036	NAMP	NAMP	0,013
36.	36-55	YTLKPTMIVYHHTAEDNLTP	NAMP	0,013	NAMP	0,013	NAMP	NAMP	0,026
37.	37-56	TLKPTMIVYHHTAEDNLTPQ	NAMP	0,010	NAMP	0,004	NAMP	NAMP	0,022
38.	38-57	LKPTMIVYHHTAEDNLTPQR	NAMP	0,009	NAMP	0,016	NAMP	NAMP	0,010
39.	39-58	KPTMIVYHHTAEDNLTPQRI	NAMP	0,016	NAMP	0,030	NAMP	NAMP	0,009
40.	40-59	PTMIVYHHTAEDNLTPQRID	NAMP	0,006	NAMP	0,030	NAMP	NAMP	0,005
41.	41-60	TMIVYHHTAEDNLTPQRIDE	NAMP	0,007	NAMP	0,015	NAMP	NAMP	0,003
42.	42-61	MIVYHHTAEDNLTPQRIDEL	NAMP	0,011	NAMP	0,002	NAMP	NAMP	0,003
43.	43-62	IVYHHTAEDNLTPQRIDELH	NAMP	0,043	NAMP	0,088	NAMP	NAMP	0,073
44.	44-63	VYHHTAEDNLTPQRIDELHK	NAMP	0,030	NAMP	0,066	NAMP	NAMP	0,020



45.	45-64	YHHTAEDNLTPQRIDELHKA	NAMP	0,087	NAMP	0,092	NAMP	NAMP	0,004
46.	46-65	HHTAEDNLTPQRIDELHKAR	NAMP	0,031	NAMP	0,082	NAMP	NAMP	0,001
47.	47-66	HTAEDNLTPQRIDELHKARG	NAMP	0,058	NAMP	0,076	NAMP	NAMP	0,001
48.	48-67	TAEDNLTPQRIDELHKARGW	NAMP	0,053	NAMP	0,070	NAMP	NAMP	0,006
49.	49-68	AEDNLTPQRIDELHKARGWS	NAMP	0,189	NAMP	0,086	NAMP	NAMP	0,008
50.	50-69	EDNLTPQRIDELHKARGWSG	NAMP	0,041	NAMP	0,075	NAMP	NAMP	0,003
51.	51-70	DNLTPQRIDELHKARGWSGI	NAMP	0,136	NAMP	0,066	NAMP	NAMP	0,052
52.	52-71	NLTPQRIDELHKARGWSGIG	NAMP	0,292	NAMP	0,350	NAMP	NAMP	0,294
53.	53-72	LTPQRIDELHKARGWSGIGY	NAMP	0,222	AMP	0,654	NAMP	NAMP	0,118
54.	54-73	TPQRIDELHKARGWSGIGYH	NAMP	0,101	NAMP	0,080	NAMP	NAMP	0,028
55.	55-74	PQRIDELHKARGWSGIGYHF	NAMP	0,119	NAMP	0,081	NAMP	NAMP	0,039
56.	56-75	QRIDELHKARGWSGIGYHIFY	NAMP	0,124	NAMP	0,317	NAMP	NAMP	0,052
57.	57-76	RIDELHKARGWSGIGYHFYI	NAMP	0,297	NAMP	0,421	AMP	NAMP	0,219
58.	58-77	IDELHKARGWSGIGYHFYIR	NAMP	0,255	AMP	0,608	AMP	NAMP	0,437
59.	59-78	DELHKARGWSGIGYHFYIRK	NAMP	0,278	AMP	0,734	AMP	NAMP	0,296
60.	60-79	ELHKARGWSGIGYHFYIRKD	NAMP	0,154	AMP	0,751	NAMP	NAMP	0,104
61.	61-80	LHKARGWSGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,292	AMP	0,899	NAMP	NAMP	0,293
62.	62-81	HKARGWSGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,107	AMP	0,545	NAMP	NAMP	0,089
63.	63-82	KARGWSGIGYHFYIRKDG	AMP	0,613	AMP	0,710	NAMP	NAMP	0,267
64.	64-83	ARGWSGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,414	AMP	0,654	NAMP	NAMP	0,130
65.	65-84	RGWSGIGYHFYIRKDG	AMP	0,547	AMP	0,695	NAMP	NAMP	0,321
66.	66-85	GWSGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,267	AMP	0,707	AMP	AMP	0,511
67.	67-86	WSGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,175	AMP	0,712	NAMP	NAMP	0,323
68.	68-87	SGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,083	AMP	0,561	NAMP	AMP	0,594

69.	69-88	GIGYHFYIRKDGTIYRGRPE	NAMP	0,119	AMP	0,598	NAMP	NAMP	0,357
<b>70.</b>	<b>70-89</b>	<b>IGYHFYIRKDGTIYRGRPEN</b>	<b>NAMP</b>	<b>0,064</b>	<b>AMP</b>	<b>0,501</b>	<b>NAMP</b>	<b>NAMP</b>	<b>0,328</b>
71.	71-90	GYHFYIRKDGTIYRGRPENAI	NAMP	0,100	NAMP	0,227	NAMP	NAMP	0,291
72.	72-91	YHFYIRKDGTIYRGRPENAI	NAMP	0,088	NAMP	0,209	NAMP	NAMP	0,073
73.	73-92	HFYIRKDGTIYRGRPENAIIG	NAMP	0,123	NAMP	0,248	NAMP	NAMP	0,074
74.	74-93	FYIRKDGTIYRGRPENAIIGA	NAMP	0,211	AMP	0,712	NAMP	AMP	0,537
75.	75-94	YIRKDGTIYRGRPENAIGAH	NAMP	0,206	AMP	0,516	NAMP	NAMP	0,219
76.	76-95	IRKDGTIYRGRPENAIGAHA	NAMP	0,408	AMP	0,547	NAMP	NAMP	0,338
77.	77-96	RKDGTIYRGRPENAIGAHAP	NAMP	0,278	NAMP	0,198	NAMP	NAMP	0,066
78.	78-97	KDGTIYRGRPENAIGAHAPS	NAMP	0,267	NAMP	0,084	NAMP	NAMP	0,045
79.	79-98	DGTIYRGRPENAIGAHAPSV	NAMP	0,107	NAMP	0,061	NAMP	NAMP	0,117
80.	80-99	GTIYRGRPENAIGAHAPSVN	NAMP	0,204	NAMP	0,415	NAMP	NAMP	0,256
81.	81-100	TIYRGRPENAIGAHAPSVNS	NAMP	0,130	NAMP	0,227	NAMP	NAMP	0,153
82.	82-101	IYRGRPENAIGAHAPSVNSK	NAMP	0,275	AMP	0,536	NAMP	NAMP	0,389
83.	83-102	YRGRPENAIGAHAPSVNSKA	NAMP	0,282	NAMP	0,295	NAMP	NAMP	0,094
84.	84-103	RGRPENAIGAHAPSVNSKAL	AMP	0,490	NAMP	0,437	AMP	NAMP	0,171
85.	85-104	GRPENAIGAHAPSVNSKALG	AMP	0,615	NAMP	0,380	AMP	NAMP	0,414
86.	86-105	RPENAIGAHAPSVNSKALGI	NAMP	0,359	NAMP	0,311	AMP	NAMP	0,250
87.	87-106	PENAIGAHAPSVNSKALGIA	NAMP	0,374	NAMP	0,344	AMP	AMP	0,513
88.	88-107	ENAIGAHAPSVNSKALGIAL	AMP	0,676	NAMP	0,420	AMP	AMP	0,925
89.	89-108	NAIGAHAPSVNSKALGIALE	NAMP	0,470	NAMP	0,484	NAMP	AMP	0,909
<b>90.</b>	<b>90-109</b>	<b>AIGAHAPSVNSKALGIALEG</b>	<b>AMP</b>	<b>0,706</b>	<b>AMP</b>	<b>0,806</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,886</b>
<b>91.</b>	<b>91-110</b>	<b>IGAHAPSVNSKALGIALEGN</b>	<b>AMP</b>	<b>0,715</b>	<b>AMP</b>	<b>0,793</b>	<b>NAMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,912</b>
<b>92.</b>	<b>92-111</b>	<b>GAHAPSVNSKALGIALEGNF</b>	<b>AMP</b>	<b>0,543</b>	<b>AMP</b>	<b>0,582</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,909</b>

93.	93-112	AHAPSVNSKALGIALEGNFN	AMP	0,546	AMP	0,516	NAMP	AMP	0,655
94.	94-113	HAPSVNSKALGIALEGNFNE	NAMP	0,170	NAMP	0,070	NAMP	NAMP	0,101
95.	95-114	APSVNSKALGIALEGNFNEE	NAMP	0,171	NAMP	0,199	NAMP	NAMP	0,108
96.	96-115	PSVNSKALGIALEGNFNEEF	NAMP	0,190	NAMP	0,102	NAMP	NAMP	0,090
97.	97-116	SVNSKALGIALEGNFNEEFV	NAMP	0,371	NAMP	0,235	NAMP	NAMP	0,310
98.	98-117	VNSKALGIALEGNFNEEFVT	NAMP	0,415	NAMP	0,280	NAMP	AMP	0,504
99.	99-118	NSKALGIALEGNFNEEFVTK	NAMP	0,257	NAMP	0,130	NAMP	NAMP	0,157
100.	100-119	SKALGIALEGNFNEEFVTKE	NAMP	0,108	NAMP	0,077	NAMP	NAMP	0,055
101.	101-120	KALGIALEGNFNEEFVTKEQ	AMP	0,553	NAMP	0,187	AMP	NAMP	0,397
102.	102-121	ALGIALEGNFNEEFVTKEQE	AMP	0,598	NAMP	0,286	NAMP	NAMP	0,460
103.	103-122	LGIALEGNFNEEFVTKEQED	AMP	0,763	NAMP	0,362	NAMP	AMP	0,904
104.	104-123	GIALEGNFNEEFVTKEQEDS	AMP	0,713	NAMP	0,301	NAMP	AMP	0,868
105.	105-124	IALEGNFNEEFVTKEQEDSL	AMP	0,842	NAMP	0,294	NAMP	AMP	0,877
106.	106-125	ALEGNFNEEFVTKEQEDSLI	AMP	0,838	NAMP	0,286	NAMP	AMP	0,823
107.	107-126	LEGNFNEEFVTKEQEDSLIA	AMP	0,867	NAMP	0,280	NAMP	AMP	0,803
108.	108-127	EGNFNEEFVTKEQEDSLIAL	AMP	0,757	NAMP	0,213	NAMP	AMP	0,789
109.	109-128	GNFNEEFVTKEQEDSLIALS	AMP	0,560	NAMP	0,166	NAMP	NAMP	0,301
110.	110-129	NFNEEFVTKEQEDSLIALSK	NAMP	0,485	NAMP	0,128	NAMP	NAMP	0,301
111.	111-130	FNEEFVTKEQEDSLIALSKY	NAMP	0,429	NAMP	0,051	NAMP	NAMP	0,139
112.	112-131	NEEFVTKEQEDSLIALSKYL	NAMP	0,375	NAMP	0,069	NAMP	NAMP	0,067
113.	113-132	EEFVTKEQEDSLIALSKYLV	NAMP	0,224	NAMP	0,137	NAMP	NAMP	0,048
114.	114-133	EFVTKEQEDSLIALSKYLVN	NAMP	0,350	NAMP	0,110	NAMP	NAMP	0,075
115.	115-134	FVTKEQEDSLIALSKYLVNK	NAMP	0,468	NAMP	0,222	NAMP	AMP	0,570
116.	116-135	VTKEQEDSLIALSKYLVNKY	NAMP	0,388	NAMP	0,365	NAMP	AMP	0,657

117.	117-136	TKEQEDSLIALSKYLVNKYN	NAMP	0,115	NAMP	0,259	NAMP	NAMP	0,134
118.	118-137	KEQEDSLIALSKYLVNKYNI	NAMP	0,305	NAMP	0,368	NAMP	AMP	0,638
119.	119-138	EQEDSLIALSKYLVNKYNIK	AMP	0,519	NAMP	0,383	AMP	AMP	0,640
120.	120-139	QEDSLIALSKYLVNKYNIKD	NAMP	0,211	NAMP	0,360	NAMP	NAMP	0,448
121.	121-140	EDSLIALSKYLVNKYNIKDI	NAMP	0,454	NAMP	0,485	NAMP	AMP	0,759
<b>122.</b>	<b>122-141</b>	<b>DSLIALSKYLVNKYNIKDIK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,647</b>	<b>AMP</b>	<b>0,645</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,953</b>
<b>123.</b>	<b>123-142</b>	<b>SLIALSKYLVNKYNIKDIKR</b>	<b>AMP</b>	<b>0,585</b>	<b>AMP</b>	<b>0,758</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,870</b>
<b>124.</b>	<b>124-143</b>	<b>LIALSKYLVNKYNIKDIKRH</b>	<b>AMP</b>	<b>0,796</b>	<b>AMP</b>	<b>0,849</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,965</b>
<b>125.</b>	<b>125-144</b>	<b>IALSKYLVNKYNIKDIKRHK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,668</b>	<b>AMP</b>	<b>0,766</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,985</b>
126.	126-145	ALSKYLVNKYNIKDIKRHKD	NAMP	0,366	AMP	0,690	NAMP	AMP	0,914
127.	127-146	LSKYLVNKYNIKDIKRHKDV	NAMP	0,328	AMP	0,668	AMP	AMP	0,866
128.	128-147	SKYLVNKYNIKDIKRHKDVT	NAMP	0,065	NAMP	0,465	NAMP	NAMP	0,370
129.	129-148	KYLVNKYNIKDIKRHKDVTN	NAMP	0,195	NAMP	0,455	NAMP	AMP	0,614
130.	130-149	YLVNKYNIKDIKRHKDVTNT	NAMP	0,116	NAMP	0,287	NAMP	NAMP	0,273
131.	131-150	LVNKYNIKDIKRHKDVTNTE	NAMP	0,340	NAMP	0,193	NAMP	NAMP	0,111
132.	132-151	VNKYNIKDIKRHKDVTNTEC	NAMP	0,257	NAMP	0,192	NAMP	NAMP	0,057
133.	133-152	NKYNIKDIKRHKDVTNTECP	NAMP	0,073	NAMP	0,163	NAMP	NAMP	0,007
134.	134-153	KYNIKDIKRHKDVTNTECPG	NAMP	0,128	NAMP	0,144	NAMP	NAMP	0,008
135.	135-154	YNIKDIKRHKDVTNTECPGK	NAMP	0,122	NAMP	0,149	NAMP	NAMP	0,008
136.	136-155	NIKDIKRHKDVTNTECPGKN	NAMP	0,369	NAMP	0,213	AMP	NAMP	0,014
137.	137-156	IKDIKRHKDVTNTECPGKNF	NAMP	0,286	NAMP	0,171	NAMP	NAMP	0,047
138.	138-157	KDIKRHKDVTNTECPGKNFP	NAMP	0,092	NAMP	0,173	NAMP	NAMP	0,041
139.	139-158	DIKRHKDVTNTECPGKNFPF	NAMP	0,085	NAMP	0,037	NAMP	NAMP	0,231
140.	140-159	IKRHKDVTNTECPGKNFPFK	NAMP	0,212	NAMP	0,393	NAMP	NAMP	0,343

141.	141-160	KRHKDVTNTECPGKNFPFKE	NAMP	0,043	NAMP	0,223	NAMP	NAMP	0,034
142.	142-161	RHKDVTNTECPGKNFPFKEI	NAMP	0,043	NAMP	0,045	NAMP	NAMP	0,035
143.	143-162	HKDVTNTECPGKNFPFKEIK	NAMP	0,026	NAMP	0,046	NAMP	NAMP	0,037
144.	144-163	KDVTNTECPGKNFPFKEIKA	NAMP	0,063	NAMP	0,047	NAMP	NAMP	0,112
145.	145-164	DVTNTECPGKNFPFKEIKAE	NAMP	0,013	NAMP	0,079	NAMP	NAMP	0,152
146.	146-165	VTNTECPGKNFPFKEIKAEL	NAMP	0,046	NAMP	0,066	NAMP	NAMP	0,066
147.	147-166	TNTECPGKNFPFKEIKAELK	NAMP	0,043	NAMP	0,057	NAMP	NAMP	0,015
148.	148-167	NTECPGKNFPFKEIKAELKL	NAMP	0,068	NAMP	0,095	NAMP	NAMP	0,046

Pogrubione regiony o prawdopodobnej aktywności antybakteryjnej.

Czerwony kolor oznacza wybrany do dalszych analiz peptyd antybakteryjny.

*P* - prawdopodobieństwo

Tabela S3. Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka CT4.

Algorytm:			SVM		RF		ANN	DA	
Nr sekw.	Pozycja	Sekwencja	AMP/ NAMP	<i>P</i>	AMP/ NAMP	<i>P</i>	AMP/ NAMP	AMP/ NAMP	<i>P</i>
1.	1-20	MKNI FRRALRRVFKARQVQP	NAMP	0,252	AMP	0,559	NAMP	AMP	0,836
2.	2-21	<b>KNIFRRALRRVFKARQVQPK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,972</b>	<b>AMP</b>	<b>0,873</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,998</b>
3.	3-22	<b>NI FRRALRRVFKARQVQPKI</b>	<b>AMP</b>	<b>0,980</b>	<b>AMP</b>	<b>0,868</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,999</b>
4.	4-23	<b>IFRRALRRVFKARQVQPKIV</b>	<b>AMP</b>	<b>0,992</b>	<b>AMP</b>	<b>0,969</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>1,000</b>
5.	5-24	<b>FRRALRRVFKARQVQPKIVE</b>	<b>AMP</b>	<b>0,945</b>	<b>AMP</b>	<b>0,793</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,987</b>
6.	6-25	<b>RRALRRVFKARQVQPKIVEV</b>	<b>AMP</b>	<b>0,944</b>	<b>AMP</b>	<b>0,850</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,980</b>
7.	7-26	<b>RALRRVFKARQVQPKIVEVN</b>	<b>AMP</b>	<b>0,912</b>	<b>AMP</b>	<b>0,816</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,966</b>
8.	8-27	<b>ALRRVFKARQVQPKIVEVNY</b>	<b>AMP</b>	<b>0,768</b>	<b>AMP</b>	<b>0,798</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,884</b>
9.	9-28	<b>LRRVFKARQVQPKIVEVNYK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,779</b>	<b>AMP</b>	<b>0,783</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,899</b>
10.	10-29	<b>RRVFKARQVQPKIVEVNYKW</b>	<b>AMP</b>	<b>0,808</b>	<b>AMP</b>	<b>0,759</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,745</b>
11.	11-30	<b>RVFKARQVQPKIVEVNYKWA</b>	<b>AMP</b>	<b>0,734</b>	<b>AMP</b>	<b>0,746</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,704</b>
12.	12-31	VF <del>KARQVQPKIVEVNYKWAQ</del>	AMP	0,759	AMP	0,746	NAMP	AMP	0,737
13.	13-32	F <del>KARQVQPKIVEVNYKWAQP</del>	AMP	0,494	AMP	0,650	NAMP	NAMP	0,298
14.	14-33	K <del>ARQVQPKIVEVNYKWAQPL</del>	AMP	0,583	AMP	0,600	NAMP	NAMP	0,478
15.	15-34	A <del>RQVQPKIVEVNYKWAQPLQ</del>	AMP	0,557	AMP	0,547	NAMP	NAMP	0,277
16.	16-35	R <del>QVQPKIVEVNYKWAQPLQF</del>	NAMP	0,307	AMP	0,515	NAMP	NAMP	0,176
17.	17-36	Q <del>VQPKIVEVNYKWAQPLQFT</del>	NAMP	0,261	NAMP	0,115	NAMP	NAMP	0,245
18.	18-37	V <del>QPKIVEVNYKWAQPLQFTM</del>	NAMP	0,171	NAMP	0,096	NAMP	NAMP	0,141
19.	19-38	Q <del>PKIVEVNYKWAQPLQFTMK</del>	NAMP	0,187	NAMP	0,255	NAMP	NAMP	0,075
20.	20-39	P <del>KIVEVNYKWAQPLQFTMKP</del>	NAMP	0,155	NAMP	0,116	NAMP	NAMP	0,051

21.	21-40	KIVEVNYKWAQPLQFTMKPQ	NAMP	0,310	NAMP	0,195	NAMP	NAMP	0,207
22.	22-41	IVEVNYKWAQPLQFTMKPQM	NAMP	0,267	NAMP	0,091	NAMP	NAMP	0,403
23.	23-42	VEVNYKWAQPLQFTMKPQMI	NAMP	0,183	NAMP	0,094	NAMP	NAMP	0,375
24.	24-43	EVNYKWAQPLQFTMKPQMIV	NAMP	0,148	NAMP	0,069	NAMP	NAMP	0,240
25.	25-44	VNYKWAQPLQFTMKPQMIVY	NAMP	0,087	NAMP	0,248	NAMP	AMP	0,754
26.	26-45	NYKWAQPLQFTMKPQMIVYH	NAMP	0,044	NAMP	0,127	NAMP	AMP	0,582
27.	27-46	YKWAQPLQFTMKPQMIVYHH	NAMP	0,016	NAMP	0,088	NAMP	NAMP	0,160
28.	28-47	KWAQPLQFTMKPQMIVYHHT	NAMP	0,072	NAMP	0,167	NAMP	NAMP	0,283
29.	29-48	WAQPLQFTMKPQMIVYHHTV	NAMP	0,036	NAMP	0,028	NAMP	NAMP	0,161
30.	30-49	AQPLQFTMKPQMIVYHHTVE	NAMP	0,062	NAMP	0,154	NAMP	NAMP	0,134
31.	31-50	QPLQFTMKPQMIVYHHTVEI	NAMP	0,019	NAMP	0,043	NAMP	NAMP	0,115
32.	32-51	PLQFTMKPQMIVYHHTVEIG	NAMP	0,035	NAMP	0,018	NAMP	NAMP	0,069
33.	33-52	LQFTMKPQMIVYHHTVEIGK	NAMP	0,057	NAMP	0,029	NAMP	NAMP	0,138
34.	34-53	QFTMKPQMIVYHHTVEIGKT	NAMP	0,054	NAMP	0,023	NAMP	NAMP	0,163
35.	35-54	FTMKPQMIVYHHTVEIGKTP	NAMP	0,082	NAMP	0,025	NAMP	NAMP	0,353
36.	36-55	TMKPQMIVYHHTVEIGKTPE	NAMP	0,025	NAMP	0,025	NAMP	NAMP	0,048
37.	37-56	MKPQMIVYHHTVEIGKTPEE	NAMP	0,009	NAMP	0,001	NAMP	NAMP	0,016
38.	38-57	KPQMIVYHHTVEIGKTPEEI	NAMP	0,032	NAMP	0,052	NAMP	NAMP	0,034
39.	39-58	PQMIVYHHTVEIGKTPEEIH	NAMP	0,029	NAMP	0,014	NAMP	NAMP	0,026
40.	40-59	QMIVYHHTVEIGKTPEEIHQ	NAMP	0,027	NAMP	0,011	NAMP	NAMP	0,033
41.	41-60	MIVYHHTVEIGKTPEEIHQL	NAMP	0,019	NAMP	0,002	NAMP	NAMP	0,021
42.	42-61	IVYHHTVEIGKTPEEIHQLH	NAMP	0,090	NAMP	0,098	NAMP	NAMP	0,435
43.	43-62	VYHHTVEIGKTPEEIHQLHV	NAMP	0,060	NAMP	0,060	NAMP	NAMP	0,266
44.	44-63	YHHTVEIGKTPEEIHQLHVN	NAMP	0,076	NAMP	0,024	NAMP	NAMP	0,049

45.	45-64	HHTVEIGKTPEEIHQLHVNR	NAMP	0,044	NAMP	0,045	NAMP	NAMP	0,011
46.	46-65	HTVEIGKTPEEIHQLHVNRG	NAMP	0,078	NAMP	0,026	NAMP	NAMP	0,008
47.	47-66	TVEIGKTPEEIHQLHVNRGW	NAMP	0,096	NAMP	0,043	NAMP	NAMP	0,010
48.	48-67	VEIGKTPEEIHQLHVNRGWA	NAMP	0,252	NAMP	0,102	NAMP	NAMP	0,059
49.	49-68	EIGKTPEEIHQLHVNRGWAG	NAMP	0,185	NAMP	0,067	NAMP	NAMP	0,026
50.	50-69	IGKTPEEIHQLHVNRGWAGI	NAMP	0,442	NAMP	0,204	AMP	NAMP	0,436
51.	51-70	GKTPEEIHQLHVNRGWAGIG	NAMP	0,446	NAMP	0,172	AMP	NAMP	0,168
52.	52-71	KTPEEIHQLHVNRGWAGIGY	NAMP	0,108	NAMP	0,053	NAMP	NAMP	0,014
53.	53-72	TPEEIHQLHVNRGWAGIGYH	NAMP	0,100	NAMP	0,042	NAMP	NAMP	0,026
54.	54-73	PEEIHQLHVNRGWAGIGYHF	NAMP	0,141	NAMP	0,073	NAMP	NAMP	0,039
55.	55-74	EEIHQLHVNRGWAGIGYHFY	NAMP	0,110	NAMP	0,108	NAMP	NAMP	0,117
56.	56-75	EIHQLHVNRGWAGIGYHFYI	NAMP	0,218	NAMP	0,258	NAMP	NAMP	0,435
57.	57-76	IHQLHVNRGWAGIGYHFYIR	NAMP	0,413	AMP	0,820	AMP	AMP	0,822
58.	58-77	HQLHVNRGWAGIGYHFYIRK	NAMP	0,335	AMP	0,618	AMP	NAMP	0,361
59.	59-78	QLHVNRGWAGIGYHFYIRKD	NAMP	0,259	AMP	0,715	NAMP	NAMP	0,223
60.	60-79	LHVNRGWAGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,346	AMP	0,823	NAMP	NAMP	0,236
61.	61-80	HVNRGWAGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,183	AMP	0,578	NAMP	NAMP	0,071
62.	62-81	VNRGWAGIGYHFYIRKDG	AMP	0,676	AMP	0,875	AMP	AMP	0,523
63.	63-82	NRGWAGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,363	AMP	0,592	NAMP	NAMP	0,113
64.	64-83	RGWAGIGYHFYIRKDG	AMP	0,729	AMP	0,701	AMP	NAMP	0,329
<b>65.</b>	<b>65-84</b>	<b>GWAGIGYHFYIRKDG</b>	<b>AMP</b>	<b>0,561</b>	<b>AMP</b>	<b>0,717</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,525</b>
66.	66-85	WAGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,439	AMP	0,742	NAMP	NAMP	0,407
67.	67-86	AGIGYHFYIRKDG	NAMP	0,323	AMP	0,755	AMP	AMP	0,733
68.	68-87	GIGYHFYIRKDG	NAMP	0,119	AMP	0,598	NAMP	NAMP	0,357



69.	69-88	IGYHFYIRKDGTIYRGRPEN	NAMP	0,064	AMP	0,501	NAMP	NAMP	0,328
70.	70-89	GYHFYIRKDGTIYRGRPEN	NAMP	0,100	NAMP	0,227	NAMP	NAMP	0,291
71.	71-90	YHFYIRKDGTIYRGRPENAV	NAMP	0,075	NAMP	0,161	NAMP	NAMP	0,049
72.	72-91	HFYIRKDGTIYRGRPENAVG	NAMP	0,105	NAMP	0,142	NAMP	NAMP	0,049
73.	73-92	FYIRKDGTIYRGRPENAVGS	NAMP	0,119	AMP	0,587	NAMP	NAMP	0,246
74.	74-93	YIRKDGTIYRGRPENAVGSH	NAMP	0,126	NAMP	0,408	NAMP	NAMP	0,156
75.	75-94	IRKDGTIYRGRPENAVGSHA	NAMP	0,273	NAMP	0,419	NAMP	NAMP	0,120
76.	76-95	RKDGTIYRGRPENAVGSHAP	NAMP	0,215	NAMP	0,158	NAMP	NAMP	0,046
77.	77-96	KDGTIYRGRPENAVGSHAPG	NAMP	0,248	NAMP	0,065	NAMP	NAMP	0,026
78.	78-97	DGTIYRGRPENAVGSHAPGV	NAMP	0,087	NAMP	0,059	NAMP	NAMP	0,076
79.	79-98	GTIYRGRPENAVGSHAPGVN	NAMP	0,171	NAMP	0,359	NAMP	NAMP	0,176
80.	80-99	TIYRGRPENAVGSHAPGVNN	NAMP	0,116	NAMP	0,084	NAMP	NAMP	0,054
81.	81-100	IYRGRPENAVGSHAPGVNNI	NAMP	0,318	NAMP	0,460	NAMP	NAMP	0,289
82.	82-101	YRGRPENAVGSHAPGVNNIA	NAMP	0,403	NAMP	0,237	NAMP	NAMP	0,043
83.	83-102	RGRPENAVGSHAPGVNNIAL	AMP	0,516	NAMP	0,321	NAMP	NAMP	0,298
84.	84-103	GRPENAVGSHAPGVNNIALG	AMP	0,613	NAMP	0,380	NAMP	NAMP	0,492
85.	85-104	RPENAVGSHAPGVNNIALGI	NAMP	0,404	NAMP	0,345	NAMP	NAMP	0,284
86.	86-105	PENAVGSHAPGVNNIALGIA	NAMP	0,314	NAMP	0,353	NAMP	AMP	0,563
87.	87-106	ENAVGSHAPGVNNIALGIAF	AMP	0,604	NAMP	0,418	AMP	AMP	0,902
88.	88-107	NAVGSHPGVNNIALGIAFE	NAMP	0,385	NAMP	0,453	NAMP	AMP	0,881
89.	89-108	AVGSHPGVNNIALGIAFEG	AMP	0,655	AMP	0,796	NAMP	AMP	0,891
90.	90-109	VGSHPGVNNIALGIAFEGN	AMP	0,644	AMP	0,745	NAMP	AMP	0,908
91.	91-110	GSHAPGVNNIALGIAFEGNF	AMP	0,563	AMP	0,605	NAMP	AMP	0,887
92.	92-111	SHAPGVNNIALGIAFEGNFM	NAMP	0,266	NAMP	0,184	NAMP	NAMP	0,152

93.	93-112	HAPGVNNIALGIAFEGNFMV	NAMP	0,326	NAMP	0,114	NAMP	NAMP	0,181
94.	94-113	APGVNNIALGIAFEGNFMVE	NAMP	0,363	NAMP	0,269	NAMP	NAMP	0,230
95.	95-114	PGVNNIALGIAFEGNFMVEK	AMP	0,576	NAMP	0,242	NAMP	NAMP	0,164
96.	96-115	GVNNIALGIAFEGNFMVEKP	NAMP	0,396	NAMP	0,363	AMP	AMP	0,625
97.	97-116	VNNIALGIAFEGNFMVEKPT	NAMP	0,336	NAMP	0,306	NAMP	NAMP	0,335
98.	98-117	NNIALGIAFEGNFMVEKPTE	NAMP	0,160	NAMP	0,138	NAMP	NAMP	0,088
99.	99-118	NIALGIAFEGNFMVEKPTEQ	NAMP	0,216	NAMP	0,097	NAMP	NAMP	0,114
100.	100-119	IALGIAFEGNFMVEKPTEQQ	NAMP	0,249	NAMP	0,116	NAMP	NAMP	0,112
101.	101-120	ALGIAFEGNFMVEKPTEQQQL	NAMP	0,235	NAMP	0,108	NAMP	NAMP	0,049
102.	102-121	LGIAFEGNFMVEKPTEQQQLN	NAMP	0,293	NAMP	0,100	NAMP	NAMP	0,071
103.	103-122	GIAFEGNFMVEKPTEQQQLNS	NAMP	0,373	NAMP	0,106	NAMP	NAMP	0,050
104.	104-123	IAFEGNFMVEKPTEQQQLNSA	NAMP	0,302	NAMP	0,080	NAMP	NAMP	0,032
105.	105-124	AFEGNFMVEKPTEQQQLNSAI	NAMP	0,311	NAMP	0,080	NAMP	NAMP	0,023
106.	106-125	FEGNFMVEKPTEQQQLNSAII	NAMP	0,332	NAMP	0,025	NAMP	NAMP	0,065
107.	107-126	EGNFMVEKPTEQQQLNSAIIL	NAMP	0,277	NAMP	0,062	NAMP	NAMP	0,029
108.	108-127	GNFMVEKPTEQQQLNSAIILS	NAMP	0,380	NAMP	0,149	NAMP	NAMP	0,057
109.	109-128	NFMVEKPTEQQQLNSAIILSK	NAMP	0,299	NAMP	0,063	NAMP	NAMP	0,106
110.	110-129	FMVEKPTEQQQLNSAIILSKY	NAMP	0,213	NAMP	0,080	NAMP	NAMP	0,176
111.	111-130	MVEKPTEQQQLNSAIILSKYL	NAMP	0,115	NAMP	0,083	NAMP	NAMP	0,064
112.	112-131	VEKPTEQQQLNSAIILSKYLV	AMP	0,550	NAMP	0,467	NAMP	AMP	0,700
113.	113-132	EKPTEQQQLNSAIILSKYLVN	NAMP	0,094	NAMP	0,177	NAMP	NAMP	0,208
114.	114-133	KPTEQQQLNSAIILSKYLVNK	NAMP	0,158	NAMP	0,260	NAMP	AMP	0,558
115.	115-134	PTEQQQLNSAIILSKYLVNKY	NAMP	0,183	NAMP	0,240	NAMP	NAMP	0,465
116.	116-135	TEQQQLNSAIILSKYLVNKYG	AMP	0,488	NAMP	0,298	NAMP	NAMP	0,435

117.	117-136	EQQLNSAIILSKYLVNKYGI	AMP	0,783	NAMP	0,472	AMP	AMP	0,913
<b>118.</b>	<b>118-137</b>	<b>QQLNSAIILSKYLVNKYGIK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,882</b>	<b>AMP</b>	<b>0,659</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,982</b>
<b>119.</b>	<b>119-138</b>	<b>QLNSAIILSKYLVNKYGIKE</b>	<b>AMP</b>	<b>0,765</b>	<b>AMP</b>	<b>0,709</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,957</b>
<b>120.</b>	<b>120-139</b>	<b>LNSAIILSKYLVNKYGIKEL</b>	<b>AMP</b>	<b>0,895</b>	<b>AMP</b>	<b>0,824</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,975</b>
<b>121.</b>	<b>121-140</b>	<b>NSAIILSKYLVNKYGIKELR</b>	<b>AMP</b>	<b>0,548</b>	<b>AMP</b>	<b>0,719</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,799</b>
<b>122.</b>	<b>122-141</b>	<b>SAIILSKYLVNKYGIKELRR</b>	<b>AMP</b>	<b>0,578</b>	<b>AMP</b>	<b>0,784</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,681</b>
<b>123.</b>	<b>123-142</b>	<b>AIILSKYLVNKYGIKELRRH</b>	<b>AMP</b>	<b>0,781</b>	<b>AMP</b>	<b>0,895</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,911</b>
<b>124.</b>	<b>124-143</b>	<b>IILSKYLVNKYGIKELRRHK</b>	<b>AMP</b>	<b>0,701</b>	<b>AMP</b>	<b>0,889</b>	<b>AMP</b>	<b>AMP</b>	<b>0,965</b>
125.	125-144	ILSKYLVNKYGIKELRRHKD	NAMP	0,359	AMP	0,756	AMP	AMP	0,915
126.	126-145	LSKYLVNKYGIKELRRHKDV	NAMP	0,271	AMP	0,708	NAMP	AMP	0,671
127.	127-146	SKYLVNKYGIKELRRHKDVK	NAMP	0,066	AMP	0,608	NAMP	AMP	0,525
128.	128-147	KYLVNKYGIKELRRHKDVKP	NAMP	0,212	AMP	0,550	NAMP	NAMP	0,469
129.	129-148	YLVNKYGIKELRRHKDVKPT	NAMP	0,084	NAMP	0,395	NAMP	NAMP	0,138
130.	130-149	LVNKYGIKELRRHKDVKPTT	NAMP	0,170	NAMP	0,455	NAMP	NAMP	0,088
131.	131-150	VNKYGIKELRRHKDVKPTTE	NAMP	0,084	NAMP	0,436	NAMP	NAMP	0,050
132.	132-151	NKYGIKELRRHKDVKPTTEC	NAMP	0,042	NAMP	0,428	NAMP	NAMP	0,006
133.	133-152	KYGIKELRRHKDVKPTTECP	NAMP	0,043	NAMP	0,389	NAMP	NAMP	0,005
134.	134-153	YGIKELRRHKDVKPTTECPG	NAMP	0,056	NAMP	0,112	NAMP	NAMP	0,002
135.	135-154	GIKELRRHKDVKPTTECPGI	NAMP	0,168	NAMP	0,157	NAMP	NAMP	0,006
136.	136-155	IKELRRHKDVKPTTECPGIN	NAMP	0,119	NAMP	0,137	NAMP	NAMP	0,004
137.	137-156	KELRRHKDVKPTTECPGINF	NAMP	0,050	NAMP	0,141	NAMP	NAMP	0,018
138.	138-157	ELRRHKDVKPTTECPGINFP	NAMP	0,037	NAMP	0,028	NAMP	NAMP	0,019
139.	139-158	LRRHKDVKPTTECPGINFPF	NAMP	0,086	NAMP	0,114	NAMP	NAMP	0,075
140.	140-159	RRHKDVKPTTECPGINFPFD	NAMP	0,019	NAMP	0,018	NAMP	NAMP	0,027

141.	141-160	RHKDVKPTTECPGINFPFDY	NAMP	0,029	NAMP	0,006	NAMP	NAMP	0,013
142.	142-161	HKDVKPTTECPGINFPFDYI	NAMP	0,024	NAMP	0,006	NAMP	NAMP	0,013
143.	143-162	KDVKPTTECPGINFPFDYIK	NAMP	0,051	NAMP	0,013	NAMP	NAMP	0,057
144.	144-163	DVKPTTECPGINFPFDYIKS	NAMP	0,078	NAMP	0,006	NAMP	NAMP	0,215
145.	145-164	VKPTTECPGINFPFDYIKSK	NAMP	0,126	NAMP	0,051	NAMP	NAMP	0,122
146.	146-165	KPTTECPGINFPFDYIKSKV	NAMP	0,080	NAMP	0,020	NAMP	NAMP	0,024
147.	147-166	PTTECPGINFPFDYIKSKVL	NAMP	0,156	NAMP	0,040	NAMP	NAMP	0,013
148.	148-167	TTECPGINFPFDYIKSKVLG	NAMP	0,207	NAMP	0,049	NAMP	NAMP	0,019
149.	149-168	TECPGINFPFDYIKSKVLGT	NAMP	0,210	NAMP	0,048	NAMP	NAMP	0,023
150.	150-169	ECPGINFPFDYIKSKVLGTT	NAMP	0,225	NAMP	0,036	NAMP	NAMP	0,038
151.	151-170	CPGINFPFDYIKSKVLGTTT	NAMP	0,128	NAMP	0,223	AMP	NAMP	0,149
152.	152-171	PGINFPFDYIKSKVLGTTTN	NAMP	0,079	NAMP	0,124	NAMP	NAMP	0,223
153.	153-172	GINFPFDYIKSKVLGTTTNK	NAMP	0,192	NAMP	0,219	AMP	AMP	0,721
154.	154-173	INFPFDYIKSKVLGTTTNKT	NAMP	0,146	NAMP	0,190	AMP	AMP	0,675
155.	155-174	NFPFDYIKSKVLGTTTNKTA	NAMP	0,168	NAMP	0,166	NAMP	AMP	0,633

Pogrubione regiony o prawdopodobnej aktywności antybakteryjnej.

Czerwony kolor oznacza wybrany do dalszych analiz peptyd antybakteryjny.

*P* - prawdopodobieństwo

## 10. SPIS TABEL I RYCIN

<b>Tabela 1.</b> Reprezentatywne peptydy przeciwdrobnoustrojowe o różnej klasyfikacji; zmodyfikowano na podstawie (D. Takahashi et al., 2010).....	<b>strona 26.</b>
<b>Tabela 2.</b> Tabela 2. Szczepy bakteryjne.....	<b>strona 33 i 34.</b>
<b>Tabela 3.</b> Plazmidy bakteryjne.....	<b>strona 35.</b>
<b>Tabela 4.</b> Sekwencje rekombinowanych białek.....	<b>strona 36.</b>
<b>Tabela 5.</b> Sekwencje peptydów. ....	<b>strona 37.</b>
<b>Tabela 6.</b> Działanie bakteriobójcze LysC i Intestinaliny (P30) na wybrane bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.....	<b>strona 58 i 59.</b>
<b>Tabela 7.</b> MIC dla Intestinaliny (P30) w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.....	<b>strona 60 i 61.</b>
<b>Tabela 8.</b> Hamowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego (%) przez Intestinalinę (P30) w stosunku do kontroli negatywnych (biofilmu bakteryjnego tworzonego bez obecności peptydu).....	<b>strona 62.</b>
<b>Tabela 9.</b> Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu odpowiadającego resztom aminokwasowym 105-133 białka PhiKo.....	<b>strona 75.</b>
<b>Tabela 10.</b> Działanie bakteriobójcze białka PhiKo i peptydu RAP-29 na wybrane bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.....	<b>strona 77.</b>
<b>Tabela 11.</b> MIC dla peptydu RAP-29 w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.....	<b>strona 78 i 79.</b>
<b>Tabela 12.</b> Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu N-końcowego białka GasC.....	<b>strona 91.</b>
<b>Tabela 13.</b> Przewidywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych regionu N-końcowego białka CT4.....	<b>strona 97.</b>

<b>Tabela 14.</b> Podsumowanie działania bakteriobójczego wybranych białek i wywodzących się z ich sekwencji peptydów wobec <i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205 oraz <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	<b>strona 100.</b>
<b>Tabela 15.</b> MIC analizowanych peptydów wobec <i>A. baumannii</i> CRAB KPD 205 oraz <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	<b>strona 101.</b>
<b>Tabela S1.</b> Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka PhiKo.....	<b>strona 120-126.</b>
<b>Tabela S2.</b> Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka GasC.....	<b>strona 127-133.</b>
<b>Tabela S3.</b> Przewidywanie obecności regionów o potencjale antybakteryjnym w sekwencji białka CT4.....	<b>strona 134-140.</b>
<b>Ryc. 1.</b> Schemat przedstawiający odkrycie antybiotyku i pierwszą zaobserwowaną oporność u bakterii; zmodyfikowano na podstawie Keita et al., 2022.....	<b>strona 14.</b>
<b>Ryc. 2.</b> Schemat budowy peptydoglikanu na przykładzie (A) <i>Staphylococcus aureus</i> oraz (B) <i>Escherichia coli</i> . Strzałkami oznaczono miejsca działania enzymów litycznych o różnej specyficzności; zmodyfikowano na podstawie Samaszko-Fiertek et al., 2015.....	<b>strona 16.</b>
<b>Ryc. 3.</b> Etapy cyklu litycznego bakteriofaga; zmodyfikowano na podstawie <a href="https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/lytic-cycle">https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/lytic-cycle</a> .....	<b>strona 18.</b>
<b>Ryc. 4.</b> Model działania endolizyny na ściany komórkowe bakterii Gram-dodatnich; zmodyfikowano na podstawie Mondal et al., 2020.....	<b>strona 19.</b>
<b>Ryc. 5.</b> Porównanie sekwencji aminokwasowej enzymu litycznego LysC z sekwencjami endolizyn: Ph2119 oraz Ts2631, a także amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowej z <i>Clostridium perfringens</i> oraz eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan. Porównanie sekwencji przeprowadzono przy pomocy programu Clustal Omega. Czarne tło wskazuje na konserwowane aminokwasy w sekwencjach porównywanych białek. Czerwone strzałki wskazują reszty His50, Tyr76, His147, Thr153 i Cys155 LysC	

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ERK30183.1>), które są istotne dla aktywności amidazy (Plotka et al., 2020).....**strona 22.**

**Ryc. 6.** Struktura przestrzenna białka LysC (numer akcesyjny PDB: 6SSC) (A) Białko LysC wykazuje konserwatywną architekturę domeny katalitycznej, w tym miejsce wiążące  $Zn^{2+}$  (kolor malinowy). (B) Miejsce katalityczne białka LysC złożone jest z trzech reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za koordynację  $Zn^{2+}$ : His<sup>50</sup>, His<sup>147</sup> i Cys<sup>155</sup> oraz kolejnych reszt aminokwasowych konserwowanych w sekwencji białka: Thr<sup>52</sup>, His<sup>51</sup>, Tyr<sup>76</sup> i Thr<sup>153</sup> (Plotka et al., 2020).....**strona 23.**

**Ryc. 7.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białek LysC i LysCΔ2–23 oraz peptydu Intestinaliny przeciwko *S. aureus* ATCC 25923. Bakterie w logarytmicznej fazie wzrostu ( $OD_{600} = 0.5$ ) łączono z białkami w stężeniu końcowym 500  $\mu\text{g/ml}$  lub peptydem (20  $\mu\text{g/ml}$ ) w objętości 300  $\mu\text{l}$  w 20 mM buforze HEPES, pH 7.4. Próbkę inkubowano 1.5 h w 37°C, a następnie 10-krotne rozcieńczenia seryjne (A) kontroli lub próbek z (B) LysC, (C) LysCΔ2–23 oraz (D) 30 aa peptydem Intestinaliną w objętości 5  $\mu\text{l}$  nanoszono na podłoże TSA, inkubowano w 37°C przez 18 h, a następnie fotografowano; (E) Seryjne 10-krotne rozcieńczenia próbki kontrolnej oraz reakcji z LysC, LysCΔ2-23 i peptydem Intestinaliną w objętości 100  $\mu\text{l}$  wysiewano w postaci murawy na płytce z podłożem TSA. Po nocnej inkubacji liczono CFU, a aktywność antybakteryjną podawano w jednostkach logarytmicznych; wg Plotka et al., 2020.....**strona 24.**

**Ryc. 8.** Schematyczne przedstawienie oddziaływań peptydów antybakteryjnych z błoną bakteryjną. Regiony AMP przedstawione są odpowiednio kolorem niebieskim grupy hydrofobowe, a kolorem czerwonym hydrofilowe. Wszystkie mechanizmy zaczynają od adsorpcji peptydów na błonie komórki bakteryjnej. (A) Model klepkowo-beczkowy (B) Model dywanowy (C) Model porów toroidalnych; zmodyfikowano na podstawie Bahar & Ren, 2013.....**strona 29.**

**Ryc. 9.** Testy antybakteryjne wykazujące zależną od dawki aktywność enzymu litycznego LysC i peptydu Intestinaliny (P30) wobec *S. aureus* ATCC 25923. W testach antybakteryjnych użyto (A) białka LysC w zakresie stężeń 0 – 21,5  $\mu\text{M}$  i (B) Intestinaliny w stężeniu 0 – 5  $\mu\text{M}$ . Krople 5  $\mu\text{l}$  zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Albumina surowicy

bydłej (BSA) w stężeniu 21,5  $\mu\text{M}$  i peptyd APLP w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  służyły jako kontrole negatywne odpowiednio dla LysC i Intestinaliny (P30). Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.....**strona 57.**

**Ryc. 10.** Hamowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego. Wpływ Intestinaliny (P30) na tworzenie biofilmu bakterii Gram-dodatnich (A) i Gram-ujemnych (B) inkubowanych bez (kontrola) lub z 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  peptydem przez 24 godziny w 37°C. Eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenia standardowe. \*,  $P = 0,0001$ ; #,  $P = 0,0002$  (test t-Studenta). Zdjęcie przedstawiające biofilm zabarwiony fioletem krystalicznym utworzony przez *S. aureus* ATCC 25923 (C) i *A. baumannii* CRAB KPD 205 (D) przy braku (kontrola) lub obecności peptydu w stężeniach 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ .....**strona 61.**

**Ryc. 11.** Mechanizm działania Intestinaliny (P30). (A do C) Wyniki testu żywotności bakterii wizualizowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. (A) Aktywne metabolicznie komórki *S. aureus* ATCC 25923 są zabarwione na zielono (żywe), a martwe komórki z uszkodzeniem błony są zabarwione na czerwono (martwe). (B) *S. aureus* komórki ( $10^8$ ) po inkubacji w obecności 5  $\mu\text{M}$  APLP (kontrola negatywna). (C) Komórki po inkubacji z 3  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  peptydem Intestinaliną (P30). Skala odpowiada 10  $\mu\text{m}$ .....**strona 63.**

**Ryc. 12.** Mechanizm aktywności Intestinaliny (P30). Barwnik DiSC<sub>3</sub>(5) wrażliwy na potencjał błonowy inkubowano z bakteriami do czasu utworzenia stabilnej linii bazowej. Punkt czasowy dodania APLP, LL-37 oraz P30 jest zaznaczony strzałką. Wzrost fluorescencji po dodaniu peptydu mierzono przy długości fali wzbudzenia 652 nm i długości fali emisji 672 nm w funkcji czasu. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.....**strona 64.**

**Ryc. 13.** Model sekwencji peptydu Intestinaliny (30 aa). Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, a niebieskim azot.....**strona 65.**

**Ryc. 14.** Widma dichroizmu kołowego peptydu wykazują konformację  $\alpha$ -helikalną Intestinaliny (P30) w obecności detergentów SDS i DPC (linie ciągłe). Bez dodatku detergentów lub w obecności DDM lub LDAO (linie przerywane) peptyd ma strukturę nieuporządkowaną.....**strona 66.**



**Ryc. 15.** Ultrawiórowanie analityczne peptydu Intestinaliny. Profile rozkładu współczynnika sedymentacji AUC dla Intestinaliny (P30) przy braku (linia czerwona) i w obecności (linia niebieska) detergentu DPC.....**strona 67.**

**Rys. 16.** Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej białka LysC z sekwencjami białek pochodzącymi z *Clostridium* oraz *Thermus*. Zestawienie wykonano przy pomocy programu ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Czarny kolor wskazuje 100% identyczności reszt aminokwasowych, podczas gdy szary kolor pozycje konserwowane w 70% sekwencji. Czerwone strzałki wskazują konserwowane reszty aminokwasowe tworzące potencjalne centra katalityczne enzymów charakterystyczne dla amidaz N-acetylmuramylo-L-alaninowych typu 2. Numery dostępu sekwencji białek: [*Clostridium intestinale* URNW] LysC – ERK30183.1; [*Clostridium gasigenes*] GasC – SDO71926 lub WP\_089964948.1 [*Clostridium manihotivorum* CT4] CT4 – WP\_128212625.1; [*Thermus thermophilus* phage PhiKo] PhiKo – AYJ74695.1.....**strona 68.**

**Ryc. 17.** (A) Struktura przestrzenna białka PhiKo oraz (B) białka LysC. Struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko PhiKo jest złożone z 170 aminokwasów, natomiast LysC z 171 aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).....**strona 70.**

**Ryc. 18.** Elektroforeza SDS-PAGE 12,5%. z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka oraz z kolejnych etapów oczyszczania. 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2 µl na ścieżkę). 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałką przedstawia pozycję nadprodukowanego białka (21,6 kDa).**strona 71.**

**Ryc. 19.** Krzywa kalibracji  $\log MW = f(V_e/V_{dek})$  wyznaczona poprzez rozdział białek wzorcowych na kolumnie Superdex-75 10/300 GL (Citiva). Użyto następujących białek: aprotynina (10 kDa), rybonukleaza A (13,7 kDa), anhydraza węglanowa (29 kDa), albumina jaja kurzego (44 kDa) i konalbumina (74 kDa).....**strona 72.**

**Rys. 20.** Sączenie molekularne białka PhiKo na kolumnie Superdex G-75 10.300 GL. (A) Strzałką żółtą zaznaczono pik endolizyny, a położenie wzorców masy cząsteczkowej

pokazano strzałkami czarnymi. (B) Rozdział próbek w 12,5% żelu poliakrylamidowym 1 – wzorec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę), 2 – białko po sączeniu molekularnym, 3 – białko po dializie.....**strona 73.**

**Ryc. 21.** Analityczne ultrawierowanie białka PhiKo. Profile rozkładu współczynnika sedymentacji AUC dla białka PhiKo przy braku (linia czerwona) i w obecności (linie niebieskie) detergentu DPC. Kontrolę negatywną stanowił bufor z dodatkiem DPC (linia zielona). Szczyt numer 1 odpowiada sedymentacji miceli DPC, szczyt numer 2 odpowiada monomerowi PhiKo, natomiast szczyt numer 3 dimerowi białka PhiKo.....**strona 74.**

**Ryc. 22.** Model sekwencji peptydu RAP-29. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, a niebieskim azot. ....**strona 75.**

**Ryc. 23.** Testy rozcieńczeń seryjnych określające zależną od dawki aktywność białka PhiKo i peptydu RAP-29 wobec *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne oceniały aktywność (A) PhiKo w stężeniach 0 oraz 23  $\mu$ M i (B) RAP-29 w zakresie stężeń 0 – 5  $\mu$ M. Krople 5  $\mu$ l zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Albumina surowicy bydlęcej (BSA) w stężeniu 23  $\mu$ M i peptyd APLP w stężeniu 5  $\mu$ M służyły jako kontrole negatywne odpowiednio dla PhiKo i RAP-29. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej....**strona 76.**

**Rys. 24.** Widma dichroizmu kołowego peptydu wykazują konformację  $\alpha$ -helikalną RAP-29 w obecności detergentów DDM, LDAO, SDS i DPC. Bez dodatku detergentu peptyd ma strukturę nieuporządkowaną.....**strona 79.**

**Ryc. 25.** Mechanizm aktywności peptydu RAP-29. Barwnik DiSC<sub>3</sub>(5) wrażliwy na zmiany potencjału błonowego inkubowano z bakteriami do czasu utworzenia stabilnej linii bazowej. Punkt czasowy dodania APLP, LL-37 oraz peptydu RAP-29 jest zaznaczony strzałką. Wzrost fluorescencji po dodaniu peptydu mierzono przy długości fali wzbudzenia 652 nm i długości fali emisji 672 nm w funkcji czasu. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe..... **strona 80.**

**Ryc. 26.** Aktywność lityczna białka PhiKo wobec bakterii *T. thermophilus* HB8 przeprowadzona w czasie w zależności od stężenia białka w 20 mM buforze HEPES, pH 7,4 w temperaturze 60°C. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.....**strona 81.**

**Ryc. 27.** Wpływ pH (5 – 8,8) na aktywność lityczną PhiKo. Jako substrat w teście redukcji zmętnienia użyłam *T. thermophilus* HB8 (Materiały 3.1). Pomiaru aktywności dokonałam po 14 min w 60°C, a końcowe stężenie białka wynosiło 50 µg/ml. Aktywność względną obliczono przyjmując najwyższą aktywność PhiKo jako 100%. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.....**strona 83.**

**Ryc. 28.** Aktywność lityczna białka PhiKo wobec bakterii *T. thermophilus* HB8 przeprowadzona w czasie w zależności od stężenia białka w 20 mM buforze Tris-HCl, pH 8,0 w temperaturze 60°C. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.....**strona 84.**

**Ryc. 29.** Aktywność lityczna białka PhiKo wobec pięciu szczepów bakterii z rodziny *Thermus* oraz ekstremofilnej bakterii *Deinococcus radiodurans* w 20 mM buforze Tris-HCl pH 8,0. Pomiaru aktywności dokonałam po 14 min w temperaturze 60°C, a końcowe stężenie białka wynosiło 6,25 µg/ml. Aktywność względną obliczyłam przyjmując najwyższą aktywność PhiKo jako 100%. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach; słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.....**strona 85.**

**Ryc. 30.** Transmisyjna mikroskopia elektronowa komórek *T. thermophilus* HB8 poddanych działaniu białka PhiKo. (A) Komórki *T. thermophilus* HB8 nie traktowane białkiem PhiKo (kontrola). (B) Komórki *T. thermophilus* HB8 traktowane białkiem PhiKo (1,56 µg/ml, 14 min, 60°C). (C, D) Komórki wybarwione 1,5% octanem uranylu. (C) Komórki *T. thermophilus* HB8 nie traktowane białkiem PhiKo (kontrola). (D) Komórki *T. thermophilus* HB8 traktowane białkiem PhiKo (1,56 µg/ml, 14 min, 60°C).....**strona 86.**

**Ryc. 31.** Struktury przestrzenne (A) białka GasC oraz (B) białka LysC. Każda struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko GasC jest złożone z 167 aminokwasów, natomiast LysC z 172

aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).....strona 88.

**Ryc. 32.** Elektroforeza SDS-PAGE 12,5 %. z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka GasC oraz z kolejnych etapów oczyszczania. 1 – wzorec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2 µl na ścieżkę), 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałka przedstawia pozycję naprodukowanego białka (21,4 kDa).....strona 89.

**Ryc. 33.** Testy antybakteryjne białka GasC wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 i (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności białka GasC w stężeniu 500 µg/ml (23,4 µM). Krople 5 µl zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.....strona 90.

**Ryc. 34.** Amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa GasC. Czerwoną ramką zaznaczono potencjalny peptyd antybakteryjny.....strona 91.

**Ryc. 35.** Model peptydu VVR-20. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, niebieskim azot, a żółty to siarka.....strona 92.

**Ryc. 36.** Testy antybakteryjne peptydu VVR-20 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności peptydu VVR-20 w stężeniu 5 µM. Krople 5 µl zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.....strona 93.

**Rys. 37.** (A) Struktura przestrzenna białka CT4 oraz (B) białka LysC. Struktura oznaczona jest kolorami od granatowego (koniec N-terminalny) do czerwonego (koniec C-terminalny). Białko CT4 jest złożone z 169 aminokwasów, natomiast LysC z 171

aminokwasów. Modele zostały wygenerowane przy użyciu programu Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).....**strona 94.**

**Rys. 38.** Elektroforeza SDS-PAGE 12,5%. z rozdziałem próbek otrzymanych z komórek ekspresyjnych po nadprodukcji białka CT4 oraz z kolejnych etapów oczyszczania, 1 – wzorzec masowy białek PageRuler Prestained Protein Ladder (2  $\mu$ l na ścieżkę), 2 – przed indukcją, 3 – cztery godz. po indukcji, 4 – supernatant po sonifikacji, 5 – osad po wirowaniu, 6 – przesącz, 7 – przemycie buforem NPi-10, 8 – przemycie buforem NPi-20, 9 – białko po dializie. Strzałka przedstawia pozycję naprodukowanego białka (22,2 kDa).....**strona 95.**

**Ryc. 39.** Testy antybakteryjne białka CT4 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 oraz (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne oceniały aktywność białka CT4 w stężeniu 500  $\mu$ g/ml (22,5  $\mu$ M). Krople 5  $\mu$ l zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych nanosiłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiono w skali logarytmicznej.....**strona 96.**

**Ryc. 40.** Sekwencja białka CT4. Czerwoną ramką zaznaczono potencjalny peptyd antybakteryjny.....**strona 97.**

**Ryc. 41.** Model peptydu IFR-20. Model został wygenerowany przy użyciu programu PyMOL (<https://pymol.org/2/>). Kolorem czerwonym oznaczono tlen, niebieskim azot.....**strona 98.**

**Ryc. 42.** Testy antybakteryjne aktywności peptydu IFR-20 wobec (A) *A. baumannii* CRAB KPD 205 i (B) *S. aureus* ATCC 25923. Testy antybakteryjne pozwoliły na ocenę aktywności peptydu w stężeniu 5  $\mu$ M. Krople 5  $\mu$ l zawierające seryjne, 10-krotne rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ ) mieszanin reakcyjnych naniosłam na stałą pożywkę TSB. Płytki inkubowałam w 37°C przez noc, a następnie sfotografowałam. Spadki CFU/ml przedstawiłam w skali logarytmicznej.....**strona 99.**

**Ryc. 43.** Podobieństwo strukturalne białek LysC (numer akcesyjny PDB: 6SSC) i Ph2119 (numer akcesyjny PDB: 6SU5). Nałożenie struktur LysC (kolor beżowy) i endolizyny Ph2119 (kolor niebieski). Oprócz regionów N- i C- terminalnych wszystkie motywy

strukturalne, włączając miejsce wiązania jonów  $Zn^{2+}$  (różowa sfera) są konserwowane.....**strona 102.**

**Ryc. 44.** Żywotność linii ludzkich komórek keratynocytów (HaCaT). Żywotność komórek oceniono za pomocą testu MTT wykonanego w obecności rosnących stężeń peptydu i porównano z komórkami kontrolnymi hodowanymi w pożywce wolnej od Intestinaliny (P30). Próbkę inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 37°C. W teście MTT badana jest aktywność enzymu mitochondrialnego dehydrogenazy bursztynianowej, a substratem reakcji jest bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu przekształcany przez enzym do formazanu. Formazan był rozpuszczany w dimetylosulfotlenku (DMSO), a wynik odczytywano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm. Wartości reprezentują średnie z co najmniej dwóch niezależnych eksperymentów; wg Szadkowska et al., 2022.....**strona 104.**

**Ryc. 45.** Reprezentacja molekularna porów wodnych, w których pośredniczy Intestinalina (P30) (panel górny) i gęstość wody w błonie komórkowej (panel dolny). (A) dimer peptydu P30 (B) trymer P30 (C) tetramer P30; wg Szadkowska et al., 2022.....**strona 105.**

**Ryc. S1.** Geny syntetyczne; zielonym kolorem oznaczono miejsce cięcia enzymów restrykcyjnych. ....**strona 119.**