

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Sára Michková

Antimikrobiální peptidy inhibující syntézu DNA
Antimicrobial peptides inhibiting DNA synthesis

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Libor Krásný, PhD.

Praha, 2024

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Liborovi Krásnému, PhD. a Mgr. Jiřímu Pospíšilovi, PhD. za vedení práce, odborné rady, pomoc, konzultace a milý přístup. Dále děkuji všem ostatním členům Laboratoře mikrobiální genetiky a genové exprese za trpělivost, ochotu pomoci a vytváření příjemného prostředí.

Prohlášení

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

V Praze, dne 23.4.2024

Podpis:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Krásný', written in a cursive style.

Abstrakt

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou krátké aminokyselinové sekvence, které jsou syntetizovány různými organismy jako obrana proti bakteriím. AMP lze rozdělit na dvě skupiny na základě jejich antibakteriálního mechanismu – AMP rozrušující bakteriální membránu a AMP s intracelulárním cílem. Také samotné bakterie mohou produkovat AMP, které využívají v konkurenčním boji proti ostatním bakteriím ve stejné ekologické nise.

Jedním z takových peptidů je sublancin, který je sekretován půdní bakterií *Bacillus subtilis*. Sublancin působí baktericidně proti Gram-pozitivním bakteriím, nicméně mechanismus jeho účinku není dosud znám. Z dostupné literatury je zřejmé, že sublancin má intracelulární cíl a spekuluje se o jeho možném negativním působení na replikaci DNA.

Tato bakalářská práce na úvod stručně popisuje replikaci DNA a poté shrnuje současné znalosti o AMP cílících na membránu i AMP s intracelulárním cílem. Větší pozornost je potom věnována AMP, které narušují syntézu nukleové kyseliny, což je cíl působení navržený pro sublancin. Závěrečná část práce se věnuje sublancinu ve větším detailu a popisuje jeho expresi, strukturu a možný mechanismus působení.

Klíčová slova: antimikrobiální peptid, mezidruhová kompetice, sublancin, *Bacillus subtilis*, replikace DNA

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are short amino acid sequences synthesized by a spectrum of organisms as a defence mechanism against bacteria. AMPs are divided into two groups based on their mechanisms of action – membrane disruptive AMPs and AMPs with an intracellular target. Bacteria themselves can also produce these toxins that help them compete with other strains within the same ecological niche.

One such a peptide is sublancin – an AMP secreted by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. Sublancin is bactericidal against Gram-positive bacteria. Although the exact mechanism of action of sublancin against bacteria is not yet well understood, it is known to target intracellular processes. It was proposed that sublancin could have a negative impact on DNA replication.

This bachelor thesis first provides a brief description of DNA replication and then summarizes current knowledge about AMPs that target membrane and AMPs with intracellular targets. Detailed attention is then focused on AMPs that affect nucleic acid synthesis, a mechanism also proposed for sublancin. The final part of this work describes sublancin – its expression, structure, and possible mechanism(s) of action.

Key words: antimicrobial peptide, interspecies competition, sublancin, *Bacillus subtilis*, DNA replication

Obsah

1. Úvod	1
2. Bakteriální replikace	2
2.1 Iniclace	2
2.2 Elongace	3
2.3 Terminace	5
3. Antimikrobiální peptidy	7
3.1 Struktura antimikrobiálních peptidů	7
3.2 Mechanismus funkce antibakteriálních peptidů	7
3.3 Interakce s bakteriální membránou.....	8
3.4 Antimikrobiální peptidy rozrušující bakteriální membránu	9
3.5 Antimikrobiální peptidy s intracelulárním cílem nerozrušující membránu	11
3.5.1 AMP interferující se syntézou DNA	11
3.5.2 AMP interferující se syntézou RNA	15
3.5.3 AMP interferující se syntézou proteinů.....	16
3.5.4 AMP interferující s metabolickými dráhami.....	19
3.5.5 AMP interferující se syntézou buněčné stěny	20
4. Sublancin	20
4.1 Zařazení sublancinu.....	20
4.2 Sublancinový operon	21
4.3 Struktura sublancinu	24
4.4 Interakce sublancinu s cílovou buňkou.....	25
4.5 Mechanismus funkce sublancinu	27
5. Závěr	29
Seznam použité literatury	31

Seznam zkratek

aa-tRNA	aminoacyl-transfer RNA	aminoacylová transferová RNA
AMP	antimicrobial peptide	antimikrobiální peptid
Api137	apidaecin 137	apidaecin 137
ATP	adenosin triphosphate	adenosin trifosfát
Bac5	bactenecin 5	baktenecin 5
Bac7	bactenecin 7	baktenecin 7
<i>B. halodurans</i>		<i>Bacillus halodurans</i>
bp	base pair	pár bází
<i>B. subtilis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
CFU	colony forming units	jednotky tvořící kolonie
CLC	clamp loader complex	komplex svorkových pomocných proteinů
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DNA Pol	DNA polymerase	DNA polymeráza
DUE	DNA unwinding element	element uvolňující DNA
ECM faktor sigma	extracytoplasmatic function sigma factor	faktor sigma s extracytoplazmatickou funkcí
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>
EF-Tu	elongation factor thermo-unstable	elongační faktor Tu
EM	electron microscopy	elektronová mikroskopie
GlcNAc	N-Acetylglucosamine	N-acetylglukosamin
LPS	lipopolysacharide	lipopolysacharid
MccB17	microcin B17	mikrocin B17
MccJ25	microcin J25	mikrocin J25
MIC	minimum inhibitory concentration	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MscL	mechanosensitive channel large	velký mechanosenzitivní kanál
MurNAc	N-Acetylmuramic acid	N-acetylmuramová kyselina
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid adenin dinukleotid
NTP	nukleosid triphosphate	nukleosid trifosfát
OD	optical density	optická denzita
oriC	origin of replication	počátek replikace
pBGC	phage-encoded biosynthetic gene cluster	biosyntetický genový klastr kódovaný fágem
PEP	phosphoenolpyruvate	fosfoenolpyruvát
PrAMP	proline rich AMP	AMP bohaté na prolin
PTC	peptidyl transferase center	peptidyl-transferázové centrum
PTS	phosphotransferase system	fosfotransferázový systém
RiPP	ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide	ribozomálně syntetizovaný a post-translačně modifikovaný peptid
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RTP	replication termination protein	replikační terminační protein
<i>S. aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
SSB	single strand binding protein	protein vázající jednořetězcovou DNA
Tus	terminus utilization substance	substance využívající terminus
UDP	uridine diphosphate	uridin difosfát
WT	wild-type	divoký kmen (typ)

1. Úvod

Bakterie jsou pro život na Zemi zásadně důležité. Bakteriální společenstva jsou tvořena různými druhy, které interagují jak navzájem, tak i s jinými mikro – či makroorganismy. Vzájemné vztahy pokrývají řadu interakcí – od mutualismu po antagonismus. Z těchto důvodů si bakterie i vyšší organismy vyvinuly celou škálu strategií a mechanismů, kterými se vymezují proti bakteriálním konkurentům. Jedním takovým mechanismem je produkce a sekrece antimikrobiálních peptidů (AMP). AMP jsou krátké aminokyselinové sekvence (přibližně 8 až 50 aminokyselin) s bakteriostatickým (inhibují růst nepřítele) či baktericidním (usmrcují nepřítele) účinkem. Toho dosahují různými způsoby – od narušení cytoplazmatické membrány bakterií až po ovlivnění syntézy makromolekul (DNA, RNA, proteiny, buněčná stěna).

Jedním z baktericidních AMP je sublancin, peptid dlouhý 37 aminokyselin, produkovaný půdní sporulující Gram-pozitivní bakterií *Bacillus subtilis*. Sublancin působí proti Gram-pozitivním bakteriím a cílí na mechanismy uvnitř buňky – syntézu DNA, RNA a proteinů (Oman *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 1998; C. Wu *et al.*, 2019), přičemž nejvýrazněji ovlivňuje replikaci DNA. Přesný mechanismus působení sublancinu a jeho cíl v buňce nejsou dosud známy.

Experimentálně jsem začala pracovat na rozluštění mechanismu působení sublancinu (horizont budoucí diplomové práce) a tato bakalářská práce poskytuje nezbytný teoretický základ. Mapuje literaturu a shrnuje základní informace o AMP a o mechanismech jejich působení. Krátce jsou zmíněny druhy interakcí lytických AMP s bakteriální membránou. Dále text popisuje několik konkrétních případů AMP s intracelulárním cílem, především AMP inhibující jednotlivé fáze centrálního dogmatu. Speciální pozornost je věnována AMP ovlivňujícím syntézu nukleových kyselin. Z toho důvodu je také na počátku této práce popsána replikace DNA u bakterií, aby byly uvedeny pojmy, které budou dále používány v souvislosti s konkrétními AMP. Poslední kapitola této bakalářské práce se věnuje podrobně sublancinu: shrnuje aktuální informace o jeho expresi, struktuře, modifikacích a možných mechanismech působení na cílovou bakteriální buňku.

Stylistická poznámka: v textu je používána zkratka AMP. V některých případech, kde by nemělo dojít k omylu a z textu by mělo být zřejmé, jaká molekula je popisována, je užíváno jako synonymum slovo peptid.

2. Bakteriální replikace

Replikace DNA je fundamentální proces pro zachování a přenos genetické informace ve všech živých organismech. Je to zásadní krok v rámci buněčného života a rozhodující faktor předcházející dělení buňky.

V bakteriální buňce je replikace DNA pevně spjatá s buněčným cyklem. Bakteriální genetická informace musí být za tento cyklus replikována pouze jednou. V případě, že jsou doba replikace (C) a doba růstu (D) dohromady delší než čas zdvojení u bakterie (τ), musí replikace započít ještě před dokončením dělení. Fáze C a D se překrývají a iniciace replikace probíhá v předchozí generaci. V případě rychlého růstu existují tedy v bakteriální buňce více než dvě replikační vidličky (Cooper & Helmstetter, 1968). Proces replikace je pečlivě regulován, a to především při iniciaci replikace.

2.1 Iniciace

Bakteriální replikace, na rozdíl od replikace eukaryotické, je iniciována pouze na jednom místě v bakteriálním chromozomu, a to ze speciální sekvence – *oriC* (*origin of replication*). Replikace je iniciována vazbou proteinu DnaA do několika DnaA boxů – 9 párů bází (*base pair*, bp) dlouhých sekvencí v místě *oriC*, které jsou tímto proteinem rozpoznávány (Fuller *et al.*, 1984; Fuller & Kornberg, 1983). Jako příklad lze uvést konsensus sekvence DnaA boxů u *Escherichia coli* - 5'TTATCCAC3'. Tato sekvence je navíc konzervovaná mezi Gram-negativními i Gram-pozitivními bakteriemi (**Obr. 1A**). Také DnaA proteiny jsou konzervovány napříč bakteriemi a vykazují pouze mírné strukturální odlišnosti mezi jednotlivými druhy (Fujita *et al.*, 1989, 1990; Fuller *et al.*, 1984; Ogasawara, Moriya, & Yoshikawa, 1985; Ogasawara, Moriya, von Meyenburg, *et al.*, 1985; Schaefer & Messer, 1991; shrnuto v Wolański *et al.*, 2015).

Snímek vazby proteinu DnaA do místa *oriC* pořízený Funnell *et al.*, 1987 je jednou z prvních vizualizací replikace DNA pod elektronovým mikroskopem (EM) (**Obr. 1B**).

DnaA je iniciační faktor, jehož koncentrace rozhoduje, zda k replikaci dojde. K vazbě DnaA a vůbec zahájení replikace je dále třeba negativních nadobrátek tvořených enzymem gyrázou v DNA (Fuller & Kornberg, 1983; Funnell *et al.*, 1986; van der Ende *et al.*, 1985).

V blízkosti DnaA boxů se nachází oblast bohatá na adenosin a thymin, složená z třikrát se opakujících 13 bp sekvencí (*A-T rich DNA-unwinding element*, DUE). Po vazbě DnaA-ATP do DnaA boxů se v oblastech DUE rozplétá dvoušroubovice. Tím se vytvoří jednořetězcová vlákna DNA a vzniká otevřený komplex (Bramhill & Kornberg, 1988; Sekimizu *et al.*, 1987; Yung & Kornberg, 1989).

Na uvolnění jednořetězcová vlákna se vážou proteiny SSB (*single-strand binding*), které vlákna stabilizují. Rozvolněná DNA je rozpoznána proteinem DnaC (*helicase loader*), který je přítomen v

komplexu s DnaB (*helicase*). Hexamer DnaB nasedá na jednořetězcová vlákna za pomoci DnaC a spotřeby ATP – vzniká preprimovací komplex (*prepriming complex*).

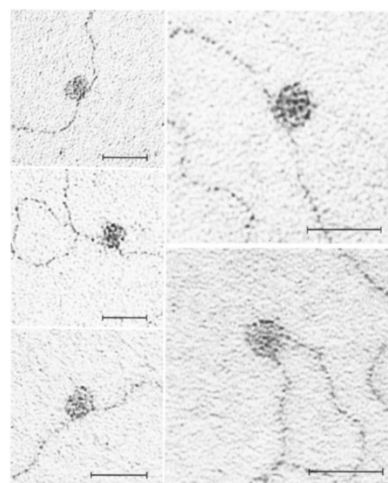
Následně helikáza (DnaB) vytvoří replikační vidličku a rozplete dvouřetězcové vlákno. Tím je zpřístupněn samostatný řetězec DNA pro DNA polymerázu (Funnell *et al.*, 1987; Kobori & Kornberg, 1982; LeBowitz & McMacken, 1986). Dále se ke komplexu pojí DnaG (*primase*), což způsobí disociaci DnaC a vznik primovacího komplexu (*priming complex*). Primáza tvoří na jednořetězcových vláknech krátké RNA primery, které dále využívá DNA polymeráza k elongaci vlákna (Bramhill & Kornberg, 1988; Makowska-Grzyska & Kaguni, 2010; van der Ende *et al.*, 1985).

Iniciace replikace je kromě pozitivní regulace přítomností DnaA proteinu také negativně regulována proteinem SeqA. V bakteriálním chromozomu jsou místa GATC methylována Dam methylázou. Při syntéze nového vlákna DNA, dle vlákna starého, tedy vzniká hemi-methylovaná dvoušroubovice DNA s methylovaným parentálním a nemethylovaným dceřiným vláknem. Tyto místa se nachází hojně v oblasti *oriC* a má k nim vysokou afinitu protein SeqA. Protein SeqA blokuje vazbu DnaA-ATP do *oriC* a tím opětovnou iniciaci replikace, zároveň se váže i do míst promotoru genu *dnaA*, ležícího blízko *oriC*. Tím blokuje i nadprodukcii proteinu DnaA (Campbell & Kleckner, 1990; shrnuto v Løbner-Olesen *et al.*, 2005; Lu, 1994; Russell & Zinder, 1987).

A

Organismus	Sekvence DnaA boxu
<i>Escherichia coli</i>	TTATCCACA
<i>Bacillus subtilis</i>	TTATCCACA
<i>Vibrio cholerae</i>	TTATCCACA
<i>Pseudomonas putida</i>	TTATCCACA
<i>Caulobacter crescentus</i>	TGATCCACA
<i>Helicobacter pylori</i>	TCATTCACA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	TTGTCCACA
<i>Streptomyces coelicolor</i>	TTGTCCACA
<i>Micrococcus luteus</i>	TTGTCCACA

B



Obrázek 1: Vazba proteinu DnaA do DnaA boxů na *oriC*

(A) Sekvence vysokoafinitních DnaA boxů u vybraných bakterií (Fujita *et al.*, 1990; upraveno z Wolański *et al.*, 2015). (B) Snímek proteinu DnaA vázající se na iniciační sekvenci *oriC* z EM. K negativnímu barvení preparátů na sítkách pro EM byly použity 4 kapky 1% uranyl acetátu ve vodě. Měřítka je 50 nm (Funnell *et al.*, 1987)

2.2 Elongace

Replikace nukleové kyseliny probíhá současně na obou rozvolněných vláknech a oběma směry od *oriC* – vznikají dvě replikační vidličky (Bird *et al.*, 1972). Replikace je tedy semi-konzervativní – dle

parentálního vlákna je přepisováno vlákno nové, komplementární, a tyto dvě vlákna jsou poté spojeny do dvoušroubovice (Meselson & Stahl, 1958).

Enzym schopný elongace nově vznikajícího DNA vlákna se nazývá DNA polymeráza (DNA pol). Hlavní replikační polymeráza zodpovědná za syntézu obou vláken je u bakterií DNA polymeráza III. Holoenzym DNA pol III se skládá z několika podjednotek: α , ϵ , θ , β , τ , γ , δ , δ' , χ a ψ (**Obr. 2**) (Maki *et al.*, 1988; McHenry & Kornberg, 1977). DNA pol III je schopna syntetizovat nové vlákno DNA pouze ve směru od 5' konce DNA ke 3' konci DNA. Tímto způsobem probíhá kontinuální syntéza vedoucího řetězce (*leading strand*, 5' \rightarrow 3') a diskontinuální syntéza opožděného řetězce (*lagging strand*, 3' \rightarrow 5'). Na opožděném řetězci vzniká nové vlákno pomocí DNA pol III nejprve v krátkých tzv. Okazakiho fragmentech, které vznikají prodloužením RNA primerů (Okazaki *et al.*, 1968).

Replikativní α -podjednotka polymerázy III (Pol III α) zajišťuje připojování nukleotidů do nově vznikajícího vlákna. Vyskytuje se ve více formách, dvě nejčastější jsou PolC a DnaE. U *B. subtilis* jsou k replikaci potřebné obě tyto polymerázy. PolC zajišťuje primárně syntézu vedoucího vlákna, k syntéze opožděného vlákna je třeba DnaE, PolC a primáza (DnaG). DnaE využívá RNA primerů, ke kterým přidává krátký řetězec DNA. Dále pak syntézu opožďujícího se řetězce provádí PolC. Tomu nasvědčují dva faktory – DnaE se od PolC liší tím, že sama nevykazuje 3' \rightarrow 5' exonukleázovou aktivitu – opravná aktivita polymerázy, díky které může zpětně odbourávat špatně zařazené nukleotidy z 3' konce. Syntéza touto polymerázou tedy vede k zvýšené chybovosti. Dále je DnaE velmi pomalou polymerázou, je schopna *in vitro* přidávat 75 bází/s, přičemž rychlost holoenzymu DNA Pol III je přibližně 500 bází/s (Dervyn *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 1991; Low *et al.*, 1976; Maki *et al.*, 1985; O'Donnell & Kornberg, 1985; Sanders *et al.*, 2010).

Další podjednotkou DNA Pol III je podjednotka ϵ s 3' \rightarrow 5' exonukleázovou aktivitou. Společně s podjednotkou θ , která stabilizuje ϵ , tvoří podjednotky $\alpha\epsilon\theta$ jádro (*core*) Pol III (Maki *et al.*, 1988; Scheuermann *et al.*, 1983; Taft-Benz & Schaaper, 2004).

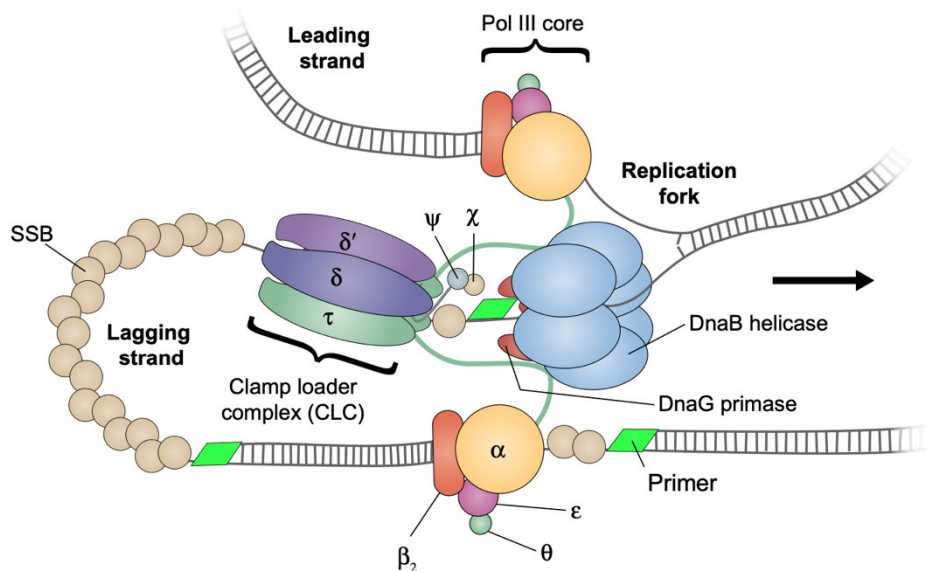
Třetí důležitou podjednotkou DNA Pol III je β -svorka (β -*clamp*), která je po dokončení syntézy primerů vázána na rozhraní primeru a templátu DNA prostřednictvím pomocných proteinů (*clamp loader complex*, CLC). Pol III α a ϵ podjednotky vážou β -svorku a tvoří elongační komplex. Svorkové proteiny zajišťují vysokou procesivitu DNA pol a zabraňují disociaci polymerázy z templátu (Jergic *et al.*, 2013; Stukenberg *et al.*, 1991; shrnuto v Xu & Dixon, 2018). β -podjednotka dále stimuluje hydrolýzu ATP v komplexu s DnaA, inaktivuje DnaA a tím jasně odděluje iniciaci replikace od elongace (Katayama *et al.*, 1998).

CLC je komplex složený z několika podjednotek: τ , δ , δ' , χ , a ψ , které slouží především k nasazení podjednotky β na templát za spotřeby ATP a celkové stabilizaci komplexu. Podjednotka γ je zkrácenou verzí podjednotky τ . Oba proteiny jsou kódovány genem *dnaX*. Podjednotka γ ale postrádá C-terminální

doménu, díky které podjednotka τ funkčně zajišťuje propojení holoenzymu Pol III a helikázy DnaB. Toto propojení je dalším faktorem zajišťujícím vysokou procesivitu polymerázy (Kim *et al.*, 1996; shrnuto v Xu & Dixon, 2018).

Bakteriálních DNA polymeráz je ale popsáno několik o řadě rozlišných funkcí. První objevenou polymerázou byla DNA polymeráza I, která napomáhá maturaci Okazakiho fragmentů. DNA pol I má kromě 5'→3' polymerázové a 3'→5' opravné aktivity také 5'→3' exonukleázovou aktivitu, díky které může odstraňovat RNA primer a zároveň na jeho místo syntetizovat chybějící vlákno DNA (Lehman *et al.*, 1958; shrnuto v J. S. Lewis *et al.*, 2016). DNA ligáza následně spojí jednotlivé Okazakiho fragmenty do kontinuálního vlákna (shrnutí v J. S. Lewis *et al.*, 2016).

Další popsanou DNA polymerázou je DNA polymeráza II. Tento enzym je součástí odpovědi SOS bakterií a účastní se opravných procesů DNA – například po poškození UV zářením nebo oxidací (Bonner *et al.*, 1990; Escarceller *et al.*, 1994; Masker *et al.*, 1973). Součástí odpovědi SOS jsou dále také DNA polymerázy IV a V. Tyto polymerázy jsou speciálními translézními polymerázami, které nahrazují hlavní replikační polymerázu zastavenou v místě poškození DNA. Taková syntéza DNA je nepřesná a často vede k chybám (Tang *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999).



Obrázek 2: Replizom *E. coli*

Grafické znázornění probíhající replikace u *E. coli*. Znázornění podjednotek holoenzymu DNA polymerázy III, SSB proteinů, helikázy DnaB a primázy DnaG. Syntéza DNA probíhá dle parentálního vlákna kontinuálně na vedoucím vlákně a diskontinuálně na vlákně opožděném pomocí RNA primerů (převzato z Xu & Dixon, 2018).

2.3 Terminace

Vzhledem k tomu, že replikace probíhá z jednoho místa na cirkulárním chromozomu oběma směry, lze předpokládat, že by se oba replizomy měly setkat zhruba na opačné straně chromozomu od *oriC* (Bird

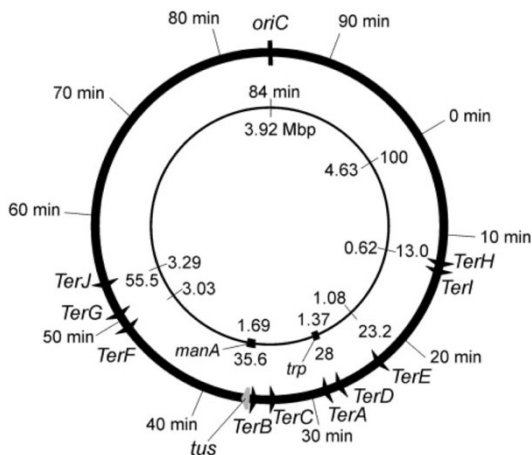
et al., 1972). Tomuto setkání předchází speciální terminační sekvence (*Ter*), které zastavují replikační vidličky a ukončují tak replikaci. *Ter* místa jsou 23 bp dlouhé polární sekvence, které brzdí replizomy pouze z jednoho, nebo druhého směru (de Massy *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Louarn *et al.*, 1977).

U *E. coli* je takových míst 10 – *TerA*, *TerB*, *TerC*, *TerD*, *TerE*, *TerF*, *TerG*, *TerH*, *TerI*, *TerJ* (**Obr. 3**), přičemž sekvence *TerA-TerC* je pro zastavení replikace nejvíce používána. Množství terminálních sekvencí zmenšuje pravděpodobnost, že by se replikace neukončila, nebo že by se protichůdné replikační vidličky srazily (Coskun-Ari & Hill, 1997).

Na sekvence *Ter* se váže DNA-vazebný protein, který je zodpovědný za zastavení replizomu. Pro *E. coli* se tento protein nazývá Tus (*termination utilization substance*). U *B. subtilis* se do sekvencí *Ter* váže protein RTP (*replication termination protein*). RTP a Tus jsou strukturně i sekvencně velmi odlišné proteiny; každý váže své sekvence *Ter* odlišným způsobem. RTP je dimer, vázající se do sekvence *Ter* složené ze dvou invertovaných repetit. Oproti tomu protein Tus se váže jako monomer (Lewis *et al.*, 1990; shrnuto v Neylon *et al.*, 2005).

Gen pro Tus se nachází poblíž sekvence *TerB* (Hill *et al.*, 1988, 1989). Při vazbě Tus do *TerB* nemůže být zahájena transkripce genu *tus* a protein Tus tak autoreguluje svojí expresi (Roeklein & Kuempel, 1992).

Po interakci helikázy DnaB s komplexem Tus-*Ter* dochází k disociaci DnaB. DNA pol III dokončí syntézu vedoucího vlákna a posledního Okazakiho fragmentu na opožděném vlákně. Následuje disociace DNA pol III a replikace je ukončena (shrnutu v Neylon *et al.*, 2005).



Obrázek 3: Pozice sekvencí *Ter* a genu *tus* na chromozomu *E. coli*

Pro oba směry, kterými se pohybují replikační vidličky, je u *E. coli* přítomno pět terminačních sekvencí. *Ter* sekvence zabezpečují správné ukončení replikace DNA. Gen pro protein Tus (označen šedě), vázající *Ter* sekvence, se nachází v blízkosti sekvence *TerB* (převzato z Neylon *et al.*, 2005).

3. Antimikrobiální peptidy

AMP jsou krátké polypeptidy produkované jako obrana proti mikrobiální invazi množstvím organismů – od savců, přes rostliny a houby až po samotné bakterie. Mohou sloužit jako prostředky konkurenčního boje.

Existuje mnoho typů AMP s odlišnou aminokyselinovou sekvencí a rozdílným mechanismem účinku. Jejich základní strukturální charakteristiky jsou ale většinou velmi podobné (shrnutí v R. E. Hancock, 2001). Kromě antimikrobiálního účinku mohou mít AMP také účinek antivirální či antirakovinový. Dále mohou zamezovat tvorbě biofilmu (shrnutí v Haney *et al.*, 2017) či vykazovat imunomodulační efekt. Z lidských buněk je produkují například mastocyty, makrofágy nebo neutrofilny (Di Nardo *et al.*, 2003; shrnutí v Le *et al.*, 2017).

3.1 Struktura antimikrobiálních peptidů

AMP jsou polypeptidové sekvence o malé molekulární hmotnosti složené z 8 až 50 aminokyselin. Většinou jsou syntetizované jako neaktivní pro-peptid, který se mění na aktivní AMP pomocí proteolytického štěpení (shrnutí v Haney *et al.*, 2017 a Le *et al.*, 2017). Většina AMP je pozitivně nabitých, nesou polární aminokyselinové zbytky jako arginin či lysin. Dalším faktorem, formujícím sekundární strukturu těchto peptidů, je také vysoký obsah hydrofobních aminokyselin, potažmo tedy jejich amfipatický charakter. Polární pozitivně nabitě aminokyseliny se nachází na jedné straně molekuly, hydrofobní skupiny na straně druhé. Tyto charakteristiky AMP umožňují elektrostatické interakce s bakteriální membránou bez přítomnosti receptoru na membráně, založené pouze na pozitivním náboji peptidu a negativním náboji na povrchu bakterie (shrnutí v Haney *et al.*, 2017; Le *et al.*, 2017 a Lee *et al.*, 2015).

Sekundární struktura AMP závisí na jejich aminokyselinové sekvenci. Dle sekundární struktury jsou rozeznávány čtyři hlavní skupiny: (i) AMP s α -helikální strukturou (tuto strukturu zaujímají především po kontaktu s membránou); (ii) AMP se strukturou β -skládaného listu (tyto struktury jsou často stabilizované disulfidickými můstky); (iii) AMP se smyčkovou (*loop*) strukturou; (iv) AMP s prodlouženou (*extended*) strukturou (nezaujímají obvyklé sekundární struktury pomocí interakcí mezi postranními řetězci vlastních aminokyselin) (shrnutí v Boman, 1995; R. E. Hancock, 2001; Haney *et al.*, 2017; T.-H. Lee *et al.*, 2015 a Powers & Hancock, 2003).

3.2 Mechanismus funkce antibakteriálních peptidů

Studium mechanismu AMP a jejich baktericidních schopností bylo dříve zaměřeno převážně na interakce AMP s membránou. Mnoho AMP dokáže v bakteriální membráně tvořit póry, nebo způsobit její dezintegraci, vedoucí k narušení membránového potenciálu, vytékání buněčného obsahu a tím ke smrti buňky. Bylo ale zjištěno, že rozrušení bakteriální membrány není jediným mechanismem působení AMP.

Dle Wu *et al.*, 1999 není u různých AMP absolutní spojitost mezi schopností permeabilizovat cytoplazmatickou membránu bakterie a jejich antimikrobiální aktivitou. Některé peptidy způsobují alespoň částečné narušení membrány i v daleko nižších koncentracích než jsou jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) – jedná se například o gramicidin S. Některé peptidy naopak nejsou schopny depolarizovat membránu v jejich MIC, například bakteneccin.

Z těchto zjištění je zřejmé, že dezintegrace a depolarizace bakteriální membrány nejsou výlučnými mechanismy působení AMP. Některé AMP tedy musí vstupovat do buňky mechanismy nenarušujícími membránu. Jejich cíl se pak nachází v cytoplazmě.

3.3 Interakce s bakteriální membránou

Nehledě na to, jaký je mechanismus funkce AMP a jaký je v bakteriální buňce jeho cíl, musí se peptid dostat přes bakteriální membrány.

V případě Gram-negativních bakterií musí AMP překonat vnitřní i vnější membránu. Pro překonávání těchto buněčných bariér slouží peptidu především jeho amfipatický charakter. Pomocí elektrostatických interakcí je polární pozitivně nabitá část peptidu přitahována k fosfátovým skupinám lipopolysacharidům (LPS) ukotveným ve vnější membráně. Protože je afinita peptidu větší než afinita běžně přítomných kationtů jako jsou Mg^{2+} nebo Ca^{2+} , AMP nahrazují tyto ionty. To vnější membránu naruší, což umožní průchod AMP touto membránou až k membráně cytoplazmatické (shrnuto v R. E. W. Hancock & Chapple, 1999).

U Gram-pozitivních bakterií se vyskytuje silná buněčná stěna. Primární komponentou této stěny je peptidoglykan, který zodpovídá za její pevnost. Peptidoglykan je komplexní polymer, skládající se ze zesíťovaných monomerů disacharidů N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a N-acetylmuramové kyseliny (MurNAc), na kterou je připojený pentapeptid. Jednotky peptidoglykanu jsou propojeny podélně pomocí β -1,4-glykosidické vazby mezi cukry a příčně pomocí vazby mezi terminálním D-alaninem a třetí aminokyselinou na druhém monomeru. K peptidoglykanu jsou kovalentně vázány stěnové teichoové kyseliny, dále jsou také přítomny lipoteichoové kyseliny, ty jsou vázány do cytoplazmatické membrány (shrnuto v Rohde, 2019). Buněčné stěna Gram-pozitivních bakterií je rovněž místo, kde probíhají různé metabolické děje. Obsahuje proto řadu enzymů, které k peptidoglykanu váží enzymy sortázy (shrnuto v Bhat *et al.*, 2021).

AMP jsou pak přitahovány záporným nábojem teichoových kyselin. Vazba AMP na lipoteichoovou kyselinu nesouvisí se schopností peptidu bakterii zabít. Toto zjištění podporuje tvrzení, že se jedná pouze o mechanismus, který napomáhá AMP se dostat k cytoplazmatické membráně (Scott *et al.*, 1999).

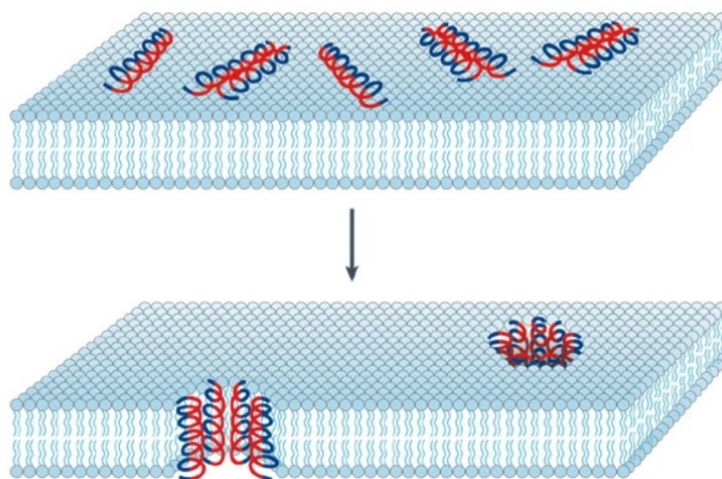
Dalším faktorem je interakce AMP s cytoplazmatickou membránou. Dle této interakce lze rozdělit mechanismus funkce AMP do dvou skupin. Pokud peptid touto interakcí cytoplazmatickou membránu

naruší, patří do tzv. AMP rozrušujících membránu (*membrane disruptive AMP*). Pokud se peptid pouze dostává přes membránu do cytoplazmy, cíl jeho zásahu je jiný než samotná membrána a jedná se o tzv. AMP membránu nerozrušující (*membrane non-disruptive AMP*) (shrnutí v Powers & Hancock, 2003).

3.4 Antimikrobiální peptidy rozrušující bakteriální membránu

Při malém poměru AMP vůči lipidům cytoplazmatické membrány jsou peptidy na membráně umístěny paralelně k ní (**Obr. 4-6**). Až při zvyšujícím se množství peptidů se peptidy mohou orientovat k membráně kolmo, vnikat do ní a tvořit póry. Pro změnu orientace peptidu a následné narušení membrány musí tedy být překročen určitý koncentrační práh peptidů, který se liší pro jednotlivé AMP i lipidy membrány a je závislý na teplotě a hydrataci prostředí (Yang *et al.*, 2001). Jsou popisovány tři rozlišné mechanismy AMP pro tvorbu pórů v membráně.

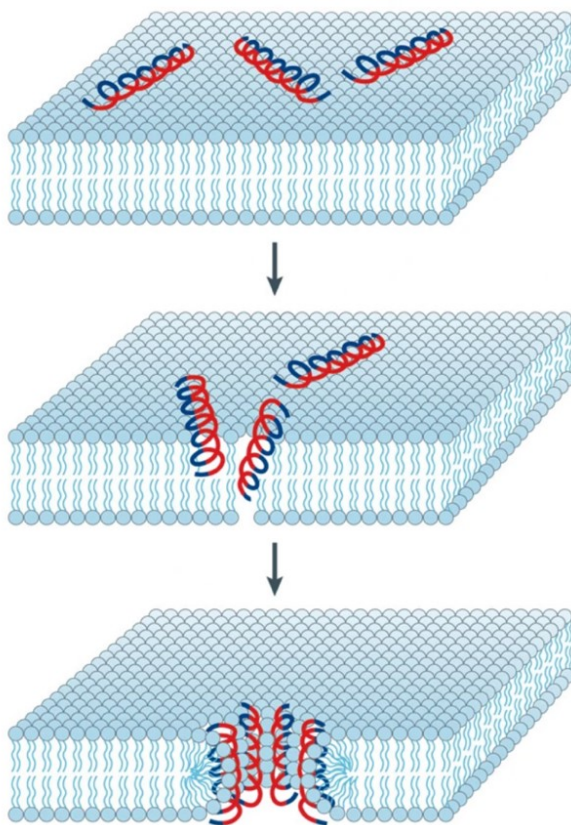
První mechanismus tvorby pórů v membráně popisuje tzv. *barrel-stave* model. AMP se dostávají do membrány, jejich hydrofobní oblasti interagují s hydrofobním centrem (*core*) lipidické dvojvrstvy a jejich hydrofilní oblasti tvoří lumen póru. Uspořádání peptidů vůči lipidům je paralelní (**Obr. 4**). Jedním z AMP tvořících póry dle *barrel-stave* modelu je alamethicin – cyklický peptid produkovaný plísní *Trichoderma viridae* (Baumann & Mueller, 1974; shrnutí v Hale & Hancock, 2007; He *et al.*, 1996; Meyer & Reusser, 1967).



Obrázek 4: *Barrel-stave* model

Hydrofilní části peptidu jsou ukázány červeně, tvoří lumen póru. Hydrofobní části peptidu, znázorněny modře, interagují s hydrofobní částí lipidické dvojvrstvy (převzato z Brogden, 2005).

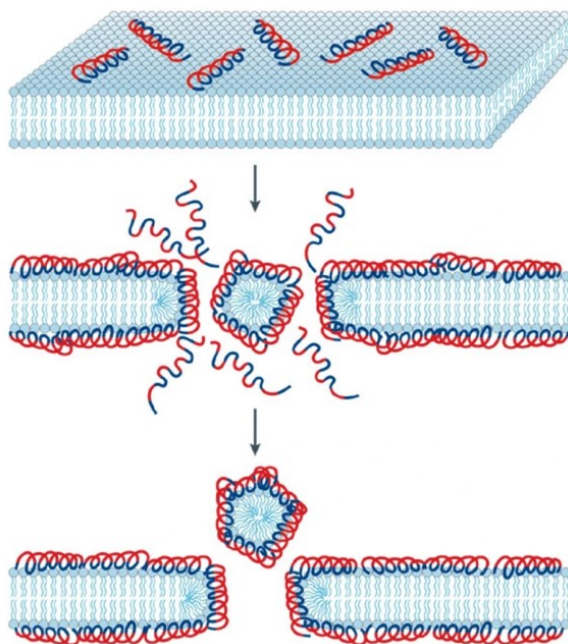
Oproti tomu druhý mechanismus, tzv. *toroidal pore model*, popisuje situaci, kdy se lipidy v přítomnosti AMP tvořících pór ohýbají tak, že polární hlavy lipidů interagují s polárními oblastmi peptidu. Ve vnitřním vodním prostředí póru se tedy nachází jak peptidy, tak polární hlavy lipidů. Hydrofobní části peptidů jsou orientovány směrem do membrány (**Obr. 5**). AMP, tvořící póry tohoto druhu, je magainin. Jedná se o 23 aminokyselin dlouhý peptid izolovaný z kůže drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (Ludtke *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2002; Zasloff, 1987).



Obrázek 5: Toroidal pore model

Součástí lumen póru jsou polární hlavy lipidů a hydrofilní části peptidů (znázorněny červeně). Hydrofilní části peptidu (znázorněny modře) interagují s hydrofilní částí lipidické dvojvrstvy (převzato z Brogden, 2005).

Podle třetího mechanismu, tzv. *carpet model*, nejsou peptidy orientovány kolmo k membráně a nevstupují do ní, naopak jsou elektrostatickými interakcemi přitahovány k jejímu povrchu paralelně. Při kritickém množství AMP na membráně je rozrušen membránový potenciál a tím dochází ke kolapsu membrány a tvorbě micel (**Obr. 6**) (shrnutí v Shai, 1999). Zástupcem takových AMP může být například cecropin P1, 31 aminokyselin dlouhý peptid izolovaný z prasečích střev, aktivní proti Gram-negativním bakteriím (Gazit *et al.*, 1995; J. Y. Lee *et al.*, 1989).



Obrázek 6: Carpet model

Peptidy agregují na povrchu membrány, následně membránu narušují a dochází k tvorbě micel. Hydrofilní části peptidu znázorněny červeně, hydrofobní modře (převzato z Brogden, 2005).

3.5 Antimikrobiální peptidy s intracelulárním cílem nerozrušující membránu

Existuje mnoho AMP, které se přes bakteriální membránu dostávají do buňky, aniž by ji narušily. V buňce pak interagují se svou cílovou molekulou/cílovým procesem. Takových cílů, které mohou AMP inhibovat, je mnoho; od biosyntézy buněčné stěny nebo buněčného dělení, přes různé metabolismy, biosyntézu a skládání proteinů, až po samotnou syntézu nukleových kyselin.

Konkrétní AMP navíc nemusí mít cíl pouze jeden a může interagovat s celou řadou buněčných procesů. Pokud je tedy působení AMP vnitrobuněčné, jejich translokace přes membránu sama o sobě nevyvolává buněčnou smrt. Vstupují do buňky různě, mohou využít bakteriálních membránových kanálů či transportních systémů. Následují vybrané příklady těchto AMP.

3.5.1 AMP interferující se syntézou DNA

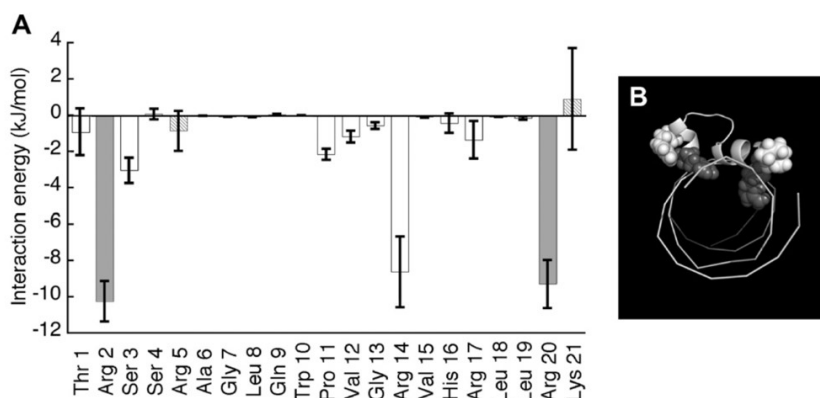
Buforin I je AMP dlouhý 39 aminokyselin, izolován z ropuchy čínské (*Bufo bufo gargarizans*). Z 39 aminokyselin tohoto peptidu 37 odpovídá N-koncové části H2A histonu *Xenopus*. Buforin I je tedy tzv. AMP odvozeným z histonu (*histone-derived antimicrobial peptide*).

Přirozené AMP je možné modifikovat. Příkladem je právě buforin I, na jehož půdorysu byl uměle připraven 21 aminokyselin dlouhý buforin II, který má silnější antimikrobiální aktivitu. Buforiny jsou aktivní proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (Park *et al.*, 1996).

V hydrofobním prostředí buforin zaujímá amfipatickou helikální strukturu. Jeho C- i N-konce tvoří helixy, mezi nimi se nachází a propojuje je aminokyselina Pro11. C-terminální stabilní helix je důležitý pro antimikrobiální aktivitu peptidu. Stejně tak je důležitý Pro11, který zprostředkovává vstup do buňky. Při záměně aminokyselin v těchto oblastech dochází k dramatickému snížení antimikrobiální aktivity peptidu (Park *et al.*, 1998, 2000; Yi *et al.*, 1996).

Buforin II nelyzuje bakterie ani ve velmi vysokých koncentracích (násobky jeho MIC), ale penetruje bakteriální membránu nejspíše podobným mechanismem jako některé lytické peptidy a dochází k jeho akumulaci v cytoplasmě (Kobayashi *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1998).

Buforin II váže DNA a RNA, interakce s DNA lze předpokládat i na základě homologie s H2A histonem (Park *et al.*, 1996). Vazba je nescifická a je založena především na elektrostatických interakcích mezi peptidem a fosfátovou kostrou nukleové kyseliny (Obr. 7) (Park *et al.*, 1998; Sim *et al.*, 2017; Uytterhoeven *et al.*, 2008).



Obrázek 7: Interakční energie jednotlivých aminokyselin buforinu II s DNA

(A) Interakční energie postranních řetězců jednotlivých aminokyselin peptidu buforin II s DNA. Vypracováno pomocí výpočetní metody MM-GBSA. Silné interakce jsou označeny šedě, slabé interakce šrafováním. Chyby jsou vyjádřeny jako standardní odchylky. (B) Simulace interakce fosfátové kostry DNA s buforinem II. Silně interagující aminokyseliny Arg2 a Arg20 jsou označeny šedě, slabě interagující Arg5 a Lys21 bíle (převzato z Uytterhoeven *et al.*, 2008)

Antimikrobiální aktivita buforinu je závislá na dvou faktorech: na schopnosti peptidu se efektivně translokovat přes membránu a na jeho schopnosti efektivně vázat DNA. Změna v těchto faktorech vede i ke změně v antimikrobiální aktivitě. Permeabilita membrány má vliv na aktivitu daleko nižší – mutovaný buforin II, který se translokuje přes membránu hůře než přirozený buforin II, má horší antimikrobiální aktivitu i přes to, že prokazuje větší permeabilitu membrány (Uytterhoeven *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2011).

Dle Rubio-Olaya *et al.*, 2022 by interakce buforinu II s DNA mohla vést k nefyziologickému nadšroubovicovému vinutí DNA a tím k tvorbě supramolekulárních nanokomplexů, ve kterých by byl AMP díky jeho hydrofobnímu povrchu obklopen nadšroubovicovou DNA. Taková změna v topologii DNA by

mohla mít negativní vliv na iniciaci replikace, pro kterou jsou potřeba negativní nadobrátky. Přesný mechanismus působení buforinu ale není znám.

Tachyplesin I, izolován z hemocytů ostrorepa východoasijského (*Tachypleus tridentatus*), je 17 aminokyselin dlouhý AMP s C-koncovým α -amidem, inhibující růst Gram-negativních i Gram-pozitivních bakterií. Peptid je stabilní při nízkém pH a při vysoké teplotě, což je dáno jeho rigidní strukturou – β -vláseň obsahující dva disulfidické můstky (Kawano *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1988).

AMP tvoří amfipatickou strukturu – na jedné straně antiparalelního β -listu jsou hydrofobické postranní řetězce aminokyselin, na straně druhé aminokyseliny nabitě (Kawano *et al.*, 1990).

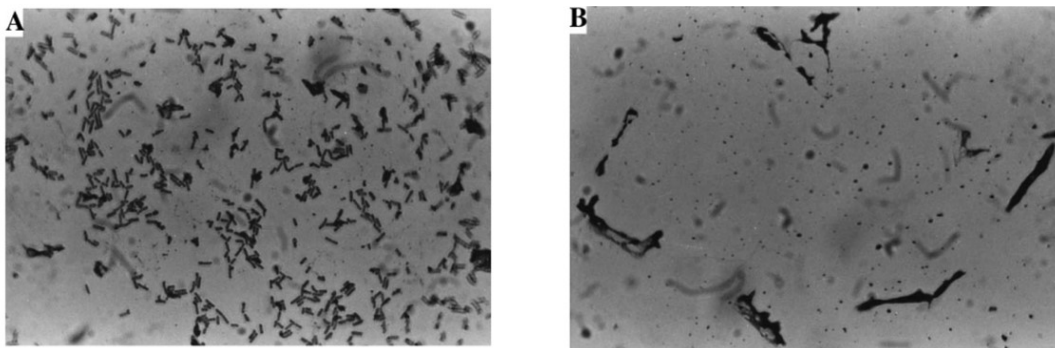
Byl izolován i tachyplesin II, isopeptid tachyplesinu I, který má drobnou záměnu ve dvou aminokyselinách (Miyata *et al.*, 1989).

Tachyplesin I váže LPS a fosfolipidy, což by mohlo přispívat k jeho antimikrobiální aktivitě (Miyata *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1988). Dále se ale také peptid váže do malého žlábků DNA. To je dáno především jeho strukturou β -listu – jeden z typických motivů pro proteiny vázající DNA (Yonezawa *et al.*, 1992).

Dle Kwun & Lee, 2021 tachyplesin I způsobuje v bakteriálních buňkách oxidativní stres, nerovnováhu iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} , a potažmo fragmentaci DNA. Výsledkem je pak smrt buňky podobná apoptóze. Poškození DNA po působení tachyplesinu I také odpovídá filamentace buněk. Buňky, které nemohou účinně replikovat svou genetickou informaci rostou, ale nerozdělí se. Následně tedy dochází k jejich filamentaci. Nicméně, mechanismus antimikrobiální aktivity tachyplesinu I není zatím plně znám.

Indolicidin, izolovaný z hovězích neutrofilů, je 13 aminokyselin dlouhý AMP bohatý na tryptofan (Selsted *et al.*, 1992). Na rozdíl od jiných amfipatických AMP, které v membránách mohou tvořit póry, je indolicidin lineární (patří do AMP s prodlouženou strukturou) a nezaujímá složitější sekundární strukturu (α -helix či β -struktura) ani v přítomnosti membrány. Indolicidin se může vázat na abazická místa na dvouvláknové i jednovláknové DNA a tvořit tzv. *crosslinky* – kovalentní vazby mezi dvěma bázemi. Tím inhibuje řadu procesů spojených s enzymy vázajícími DNA. Vlákna RNA váže s daleko menší afinitou (Marchand *et al.*, 2006).

Vazbou indolicidinu na dvouřetězcovou DNA vzniká velmi stabilní struktura, kdy DNA nelze jednoduše rozplést. To pak znemožňuje její replikaci a transkripci (Ghosh *et al.*, 2014). Podobně jako u zmíněného tachyplesinu je primární inhibicí syntézy DNA blokováno buněčné dělení a dochází k filamentaci buněk (**Obr. 8**) (Subbalakshmi & Sitaram, 1998).



Obrázek 8: Filamentace kultury *E. coli* po přidání indolicidinu

Kultura *E. coli* rostla do dosažení optické denzity 0,04 při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) a následně byla inkubovaná s indolicidinem. Byly připraveny nátěry z této kultury a kultury kontrolní, obarveny Gramovým barvením. Morfologické změny kultur byly pozorovány pod světelným mikroskopem. Následně byly preparáty vyfotografovány při 100x zvětšení. (A) Kontrolní kultura. (B) Kultura s přidáním indolicidinu o koncentraci 30 μg indolicidinu na 1 ml kultury (převzato z Subbalakshmi & Sitaram, 1998)

Mikrociny jsou AMP s malou molekulární hmotností syntetizované enterobakteriemi – jedná se tedy o toxin syntetizovaný bakterií účinný proti jiné bakterii. Takové AMP se nazývají bakteriociny. Mikrociny jsou aktivní proti Gram-negativním enterobakteriím; například *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter*. Rozdělují se do několika skupin (A, B, C, D, E, H, J). Geny pro jejich syntézu se většinou nacházejí na plasmidech. Jejich syntéza je v mnoha případech zvýšena při nedostatku živin v okolním prostředí jako třeba během stacionární fáze bakteriálního růstu (shrnutí v Baquero & Moreno, 1984).

Jedním z takových AMP je mikrocin B17 (MccB17) produkovaný *E. coli*. Na syntéze MccB17 se podílí 7 genů – *mcbA*, *mcbB*, *mcbC*, *mcbD*, *mcbE*, *mcbF* a *mcbG* (shrnutí v Baquero & Moreno, 1984). Gen *mcbA* kóduje prekurzor MccB17 o 69 aminokyselinách, produkty genů *mcbB*, *mcbC* a *mcbD* tvoří Mcc syntetázu, která posttranslačně modifikuje prekurzor MccB17 za vzniku finálního MccB17 – AMP tvořeného 43 aminokyselinami obsahujícího čtyři thiazolové a čtyři oxazolové kruhy. Geny *mcbE*, *mcbF* a *mcbG* jsou zodpovědné za imunitu proti MccB17 (Garrido *et al.*, 1988; Parks *et al.*, 2007).

MccB17 účinně inhibuje syntézu DNA, čímž vyvolává odpověď SOS, degradaci DNA a následně smrt buňky (Herrero & Moreno, 1986). Replikaci genetické informace inhibuje způsobem, který je podobný některým antibiotikům – fluorochinolonům (shrnutí v Hooper, 2001). MccB17 interaguje s podjednotkou esenciálního bakteriálního enzymu – gyrázy neboli topoisomerázy II. Jedná se o enzym se schopností vytvářet na bakteriálním chromozomu negativní nadšroubovici (*superhelicitu*) pomocí dvouvláknových zlomů a za spotřeby ATP. Negativní superhelicita je pro bakterie zásadní, protože mimo jiné termodynamicky usnadňuje rozplétání dvoušroubovice při iniciaci replikace a transkripce DNA. Gyráza je tetramer tvořený dimery GyrB a GyrA. Podjednotky GyrA jsou zodpovědné za vytvoření komplexu enzymu s DNA, podjednotky GyrB mají ATP-vazebnou doménu. Při vazbě ATP dochází ke konformační

změně a hydrolýza ATP způsobí uvolnění enzymu z DNA (shrnutí v Higgins, 2013). Důkazem toho, že MccB17 interaguje s gyrázou je skutečnost, že mutace v genu pro podjednotku GyrB vede k rezistenci vůči tomuto AMP. V případě nemutované podjednotky se gyráza váže dimerem GyrA k DNA, ale dimer GyrB blokuje navázaný peptid, nemůže tedy vázat a hydrolyzovat ATP. Gyráza tak zůstává kovalentně připojena k DNA a je inhibována replikace, může docházet i ke vznikům dvouvláknových zlomů v DNA (Vizán *et al.*, 1991).

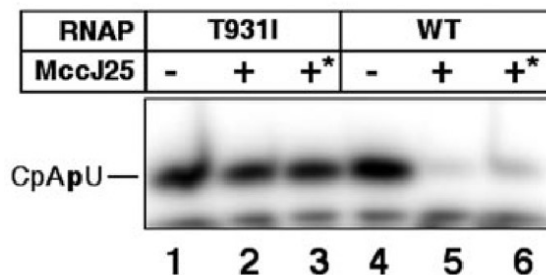
Vstup MccB17 do buňky je zprostředkován porinem OmpF a proteinem SbmA. SbmA je neesenciální transportér vnitřní membrány, jehož gen byl objeven v souvislosti s rezistencí k MccB17. Oproti mutantům v genech pro porin *ompF* nebo s ním související transkripční faktor *ompR* byly mutanti v genu *sbmA* vůči MccB17 kompletně rezistentní. Kromě MccB17 tento transportér zprostředkovává vstup do buněk i dalších AMP – např. mikrocinu J25, baktenečinu 7 nebo PR-39 (Lavina *et al.*, 1986; Mattiuzzo *et al.*, 2007; Pránting *et al.*, 2008; Salomón & Farías, 1995).

3.5.2 AMP interferující se syntézou RNA

Dalším příkladem ze skupiny mikrocinů je AMP mikrocin J25 (MccJ25), produkovaný *E. coli* AY25. Je to peptid o 21 aminokyselinách, zaujímající lasovitou strukturu (Bayro *et al.*, 2003; Salomón & Farías, 1992). Využívá pro vstup do buňky transportér FhuA vnější membrány, který rovněž slouží jako receptor pro ferrichrom nebo antibiotikum albomycin (Salomón & Farías, 1993). FhuA interaguje s proteinem TonB. Ten je vázán na systém ExbB/ExbD, který energizuje přenos MccJ25 přes vnější membránu (shrnutí v Noinaj *et al.*, 2010). Do cytoplazmy je MccJ25 transportován z periplazmatického prostoru pomocí proteinu SbmA (Salomón & Farías, 1995).

MccJ25 se váže na katalytickou podjednotku β' bakteriální RNA polymerázy (RNAP), tím blokuje vstup substrátových nukleosidtrifosfátů (NTP) do katalytického místa a inhibuje transkripci. Při záměně konzervované sekvence v genu *rpoC* kódující tuto podjednotku se mutanti stávají rezistentními proti MccJ25 (**Obr. 9**) (Yuzenkova *et al.*, 2002). MccJ25 inhibuje rozdělení buněk a tím navozuje buněčnou filamentaci. Dle Delgado *et al.*, 2001 by mikrocin mohl preferenčně inhibovat právě expresi genů důležitých pro rozdělení buňky.

MccJ25 působí proti některým patogenním kmenům *E. coli*, *Salmonella* a *Shigella* (Salomón & Farías, 1992). Některé druhy jsou ale k jeho působení citlivější než jiné. Příkladem je *Salmonella newport* kde MccJ25 depolarizuje cytoplazmatickou membránu, rozrušuje membránový potenciál a permeabilitu membrány, částečně inhibuje NADH a sukcinát dehydrogenázu. U *E. coli* takový efekt přítomen není (Rintoul *et al.*, 2001).



Obrázek 9: Inhibice transkripce mikrocinem J25

Byly izolovány holoenzymy RNAP z divokého kmene *E. coli* (WT) a mutantního kmene (T931I) rezistentního vůči MccJ25. Kmen T931I obsahoval aminokyselinovou substituci (Thr931 za Ile; T931I) v podjednotce β' enzymu RNAP. Následně byly RNAP přidány k fragmentu DNA obsahujícímu T7 A1 promotor (silný promotor pro RNAP), CpA primer a radioaktivně značené uridyltrifosfáty [α - 32 P]UTP. Reakce byly inkubované 15 min v 37 °C v přítomnosti (+/+*) nebo absenci (-) 10 μ M MccJ25. V reakcích (+) byl MccJ25 přidán před formováním komplexu na promotoru, v reakcích (+*) byl MccJ25 přidán až po formaci komplexu na promotoru. Výsledky byly stanoveny pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Na obrázku CpApU znázorňuje prodloužení primeru RNAP, tedy probíhající transkripci. MccJ25 inhibuje transkripci u WT, naopak transkripce u mutantu T931I není tímto AMP ovlivněna (převzato Yuzenkova *et al.*, 2002).

3.5.3 AMP interferující se syntézou proteinů

V rámci skupiny AMP bohaté na prolin (*proline-rich antimicrobial peptides*, PrAMP), existuje několik peptidů, které sdílí strukturální podobnosti. Interagují tudíž často se stejnými molekulami a mají velmi podobný mechanismus funkce. Tyto PrAMP mají vysoký obsah prolinu a argininu a navzájem jsou si strukturálně podobné opakujícím se motivem prolin-arginin-prolin (PRP motiv) (Cociancich *et al.*, 1994). PrAMP jsou aktivní pouze jako L-entatiomer a specificky vážou důležitý buněčný chaperone DnaK, který se podílí na několika procesech maturace proteinů. Napomáhá balení vznikajících polypeptidů do funkčních proteinů, opravě špatného sbalení proteinů a sekreci proteinů (shrnuto v Genest *et al.*, 2019; Otvos *et al.*, 2000). Tento chaperon ale není jejich hlavním cílem – mutanti v jeho genu nejsou vůči PrAMP rezistentní (Czihal *et al.*, 2012; Gagnon *et al.*, 2016; Krizsan *et al.*, 2014; Narayanan *et al.*, 2014; Scocchi *et al.*, 2009).

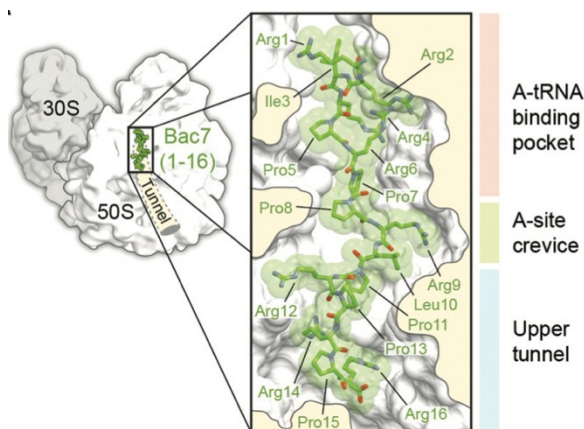
PrAMP výrazně inhibují syntézu proteinů. Vážou se do 70S ribozomálního výstupního (*exit*) kanálu pro vznikající polypeptid vycházející z peptidyl-transferázového centra (PTC), kde vzniká peptidická vazba mezi aminokyselinami (Gagnon *et al.*, 2016; shrnuto v Rodnina, 2018; Seefeldt *et al.*, 2016). Dále jsou ale dle jejich přesného mechanismu působení děleny do dvou skupin: PrAMP I. třídy – např. baktenečin 7 a pyrrolicorin – a PrAMP II. třídy – apidaeciny, drosocin (shrnuto v Graf & Wilson, 2019; Mangano *et al.*, 2023).

PrAMP I. třídy po vazbě do výstupního kanálu ribozomu inhibují elongaci. Jejich N-konec zasahuje do místa PTC, na které se váže 3' konec aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) nesoucí aminokyselinu. Vazba PrAMP znamená zamezení vazby aa-tRNA přinášené elongačním faktorem Tu (*elongation factor thermo unstable*, EF-Tu) do místa A. Translace je zastavena hned na jejím počátku po sestavení pre-translačního

komplexu, mRNA je v ribozomu zadržena v start kodonu AUG. Na podobném principu funguje například antibiotikum chloramfenikol (Gagnon *et al.*, 2016; shrnuto v Graf & Wilson, 2019 a Rodnina, 2018).

Prvním příkladem PrAMP I. třídy je baktenečin 7 (Bac7). Jak je pro tuto skupinu typické, má vysoký obsah pozitivně nabitých aminokyselin prolin a arginin, přičemž jeho ostatní aminokyseliny jsou hydrofobní (jedná se o leucin, isoleucin a fenylalanin). Kromě baktenečinu 7 existuje i jemu příbuzný baktenečin 5 (Bac5). Bac7 i Bac5 byly izolovány z bovinních neutrofilů a působí baktericidně proti Gram-negativním enterobakteriím (Gennaro *et al.*, 1989). Oba AMP jsou syntetizovány v kostní dřeni jako větší propeptidy, které jsou následně jednoduchými modifikacemi přeměněny na aktivní formy (Zanetti *et al.*, 1990). Bac7 je složen z 59 aminokyselin, Bac5 je o něco kratší, skládá se ze 42 aminokyselin (Frank *et al.*, 1990). Plně funkční N-koncový fragment Bac7 (1. – 35. aminokyselina) ve svých MIC koncentracích nerozrušuje membránu, jeho cíl je tedy primárně intracelulární. Při mnohokrát vyšších koncentracích než MIC však působí lytický i na membránu. Podobně jako jiné, dříve popsané AMP, je do bakteriální cytoplazmy přenášen transportérem SbmA. Pro vstup do buňky je důležitá N-terminální RRIR sekvence peptidu, bez které jeho internalizace neprobíhá (Mattiuzzo *et al.*, 2007; Podda *et al.*, 2006).

Bac7 (1-35) interaguje s ribozomální podjednotkou 70S a některými ribozomálními proteiny (**Obr. 10**); v živých buňkách inhibuje syntézu proteinů. Na replikaci či transkripci nemá Bac7 (1-35) podstatný vliv (Mardirossian *et al.*, 2014).



Obrázek 10: Vazba Bac7 (1-16) na ribozomu

Na obrázku je znázorněno vazebné místo pro fragment Bac7 (1-16) vázající se do ribozomálního *exit* kanálu. Bac7 (1-16) zasahuje do vazebného místa pro aa-tRNA a tím znemožňuje vznik polypeptidového řetězce. Detail obrázku ukazuje molekulární interakce postranních řetězců Bac7 (1-16) s částmi ribozomálního kanálu (převzato z Seefeldt *et al.*, 2016).

Druhým příkladem PrAMP I. třídy je drosocin. Drosocin je AMP dlouhý 19 aminokyselin, izolovaný z octomilky (*Drosophila*) a posttranslačně O-glykosylovaný na threoninu pomocí N-acetylgalaktosaminu a galaktózy. Peptid je bez této modifikace méně aktivní (aktivní je primárně proti

Gram-negativním bakteriím) a je prvním AMP, u kterého byla taková modifikace sledována (Bulet *et al.*, 1993).

PrAMP II. třídy také inhibují translaci vazbou do *exit* kanálu ribozomu, ale fungují na odlišném principu. Na rozdíl od první skupiny v jejich přítomnosti dochází ke vzniku polypeptidu, zamezeno je terminací translace (shrnutí v Graf & Wilson, 2019)

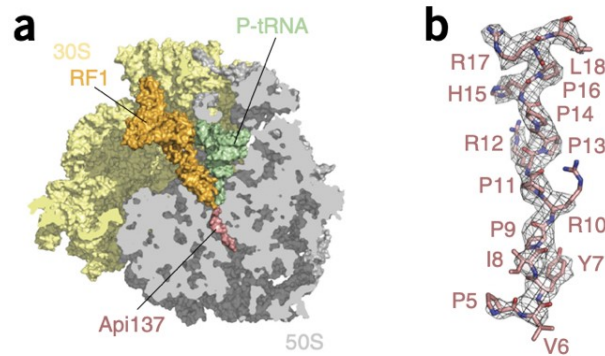
Apidaeciny, PrAMP II. třídy, jsou skupinou důležitou pro imunitu hmyzu. Původně byly z hemolymfy včely medonosné (*Apis mellifera*) izolovány tři téměř identické isoformy dlouhé 18 aminokyselin – apidaecin Ia, apidaecin Ib a apidaecin II. Jedná se o termostabilní AMP, aktivní proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím, neinteragující s fosfolipidovou dvojvrstvou – nejsou lytické pro buněčnou membránu (Casteels *et al.*, 1989).

Apidaecin zamezuje syntéze proteinů interakcí s uvolňovacím faktorem (*release factor*, RF1 nebo RF2). Tento faktor interaguje s ribozomem po dokončení syntézy proteinu a napomáhá tak terminaci translace. V momentě, kdy je syntéza proteinu dokončena a do ribozomálního místa A se dostane stop kodon v mRNA, pojí se RF s ribozomem, dochází k hydrolýze vazby peptidyl-tRNA. Výsledkem je uvolnění polypeptidu. V bakteriální buňce je mnohonásobně větší počet ribozomů než uvolňovacích faktorů, tyto faktory se tedy musí recyklovat a mezi ribozomy s dokončenými proteiny cirkulovat (shrnutí v Rodnina, 2018).

Apidaecin inhibuje disociaci RF z komplexu s ribozomem a tím znemožňuje buněčné kolování tohoto proteinu (**Obr. 11**). To vede k omezení syntézy proteinů na úrovni celé buňky. Dále také apidaecin přispívá k pročtení stop kodonu na ribozomech, které nemají dostupný RF – pokud je totiž v jejich blízkosti nabitá aa-tRNA, může dojít k připojení dalších aminokyselin k polypeptidu (Florin *et al.*, 2017).

Dalším PrAMP II. třídy je pyrrhocoricin, AMP vysoce podobný výše popsanému drosocinu. Původně byl izolovaný z hemolymfy ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). Tento peptid se skládá z 20 aminokyselin a stejně jako drosocin je O-glykosylovaný na jedenáctém threoninu, tentokrát ale nese pouze monosacharid N-acetylgalaktosamin. Další podobností pyrrhocoricinu k drosocinu je aktivita zejména proti Gram-negativním bakteriím (Cociancich *et al.*, 1994).

Pyrrhocoricin se chová podobně jako apidaecin. Také zastavuje translaci u stop kodonu, podporuje pročtení stop kodonu a jsou k němu rezistentní mutanti ve stejných genech jako k apidaecinu – mutanti v genech pro transportér SbmA, v genech kódujících RF1 a RF2 a v genu pro některé ribozomální proteiny, které jsou součástí *exit* kanálu vznikajícího polypeptidu (Florin *et al.*, 2017; Mangano *et al.*, 2023).



Obrázek 11: Vazba apidaecinu 137 (Api137) na ribozom

(a) Znárodnění vazby Api137 – 18 aminokyselin dlouhého derivátu z apidaecinu Ib – v ribozomálním kanálu společně s RF1. Api137 inhibuje disociaci RF1 z ribozomu a tím zamezuje jeho recyklaci v buňce. (b) Strukturní znázornění Api137 a jeho postranních řetězců (převzato z Florin *et al.*, 2017).

Zmíněné PrAMP tedy zamezují translaci mRNA, potažmo biosyntéze proteinů, dále ale také kromě samotné syntézy mohou interferovat se skládáním proteinů prostřednictvím zmíněného DnaK. Mohly by tedy mít vliv na více jednotlivých momentů v rámci výroby proteinů.

3.5.4 AMP interferující s metabolickými dráhami

AMP mohou také inhibovat různé metabolické dráhy. Příkladem je PR-39, izolovaný z prasečích střev. Jak název napovídá, jedná se o AMP s vysokým podílem prolinu a argininu o 39 aminokyselinách, devatenáctkrát je v peptidu přítomný prolin a devětkrát arginin. Peptid se tedy opět řadí do skupiny PrAMP, jeho působení je ale rozlišné od PrAMP výše zmíněných. PR-39 působí převážně proti Gram-negativním enterobakteriím. Do bakteriální buňky se PR-39 dostává již několikrát zmíněným proteinem SbmA (Pränting *et al.*, 2008). Po vstupu do buňky inhibuje některé proteiny významné v metabolismu folátu (například dihydrofolát reduktázu), který je důležitý pro syntézu některých aminokyselin, nebo proteiny pro syntézu LPS, zásadní komponenty vnější membrány bakterií. Dále také PR-39 inhibuje syntézu proteinů souvisejících s metabolismem RNA. Negativní vliv má i na syntézu DNA (Agerberth *et al.*, 1991; Boman *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 2016). Fenotypicky PR-39 zamezuje dělení buněk, způsobuje tedy jejich filamentaci (Shi *et al.*, 1996).

Zbývající aminokyseliny kromě prolinu a argininu, ze kterých je peptid složen, jsou převážně hydrofobní (Agerberth *et al.*, 1991). Analogický peptid peptidu PR-39 byl izolován také z prasečích neutrofilů, peptidy ovšem mezi sebou mají drobný rozdíl v 27. aminokyselině. U PR-39 z prasečích střev se na této pozici vyskytuje prolin, u PR-39 z prasečích neutrofilů isoleucin (Shi *et al.*, 1994). Na základě tohoto zjištění byl připraven syntetický AMP PR-26, který je zkrácenou verzí PR-39. Je dlouhý 26 aminokyselin, obsahuje tedy všechny aminokyseliny, které jsou shodné pro PR-39 ze střev a PR-39 z

neutrofilů. PR-26 vykazuje obdobnou baktericidní aktivitu jako PR-39, s nižšími MIC hodnotami než PR-39 (Shi *et al.*, 1996).

3.5.5 AMP interferující se syntézou buněčné stěny

Posledním příkladem z široké škály možných vnitrobuněčných působení AMP je inhibice syntézy buněčné stěny. AMP takto působícím je mersacidin – tetracyklický bakteriocin obsahující čtyři sulfidické můstky mezi alaninem (Ala) a α -aminobutyrylovou kyselinou (Abu). Jedná se o posttranslační modifikace aminokyselin, charakteristické pro skupinu bakteriocinů – lantibiotika. Mersacidin je produkován kmenem *Bacillus* (HIL Y-85,54728). Je aktivní proti Gram-pozitivním bakteriím, například *S. aureus* (Chatterjee *et al.*, 1992).

Mersacidin inhibuje syntézu buněčné stěny, což následně vede k lyzi bakterie. Konkrétní krok, který ve složité biosyntéze buněčné stěny inhibuje, je transglykosylace peptidoglykanu. Při syntéze peptidoglykanu a výstavbě buněčné stěny se nejprve prekurzor cukru UDP-MurNAc pojí s pěti aminokyselinami za vzniku lipidu I (UDP-MurNAc-pentapeptid), poté se k lipidu I pojí UDP-GlcNAc, vzniká lipid II (UDP-GlcNAc-MurNAc-pentapeptid). Následně je ke třetí aminokyselině v pentapeptidu připojeno pět glycinových zbytků, které později slouží k tvorbě pentaglycinového můstku mezi aminokyselinami dvou monomerů peptidoglykanu. Monomer se poté přesouvá z cytoplazmatického prostředí do periplazmatického prostoru, kde dochází ke transglykosylaci – připojení monomeru do existující sítě peptidoglykanu pomocí tvorby β -1,4-glykosidické vazby mezi cukry (shrnuto v Rohde, 2019). Právě na tuto reakci cílí mersacidin. AMP vyvazuje lipid II, substrát pro enzym transglykosylázu. Je tedy zamezeno esenciálnímu kroku při tvorbě buněčné stěny (Brötz *et al.*, 1995, 1997; Brötz *et al.*, 1998).

4. Sublancin

Sublancin je AMP produkováný půdní sporulující bakterií *B. subtilis* 168. Jedná se o vysoce stabilní peptid, jehož aktivitu neovlivní ani velmi nízké pH. Podobně jako další bakteriociny produkované Gram-pozitivními bakteriemi je sublancin baktericidní pouze proti Gram-pozitivním bakteriím, konkrétně například proti kmenům *B. subtilis* (6633), *Bacillus megaterium* (14581), *S. aureus* (12600). Silně, ale částečně reverzibilně, inhibuje i germinaci spor a vznik vegetativních buněk (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015; Paik *et al.*, 1998).

4.1 Zařazení sublancinu

Sublancin je bakteriocin – patří tedy do skupiny bakteriálních toxinů, které se dělí do tří následujících tříd.

Třída I. obsahuje peptidy syntetizované ribozomálně a post-translačně modifikované (*ribosomally-synthesised and post-translationally modified peptide*, RiPP). Do této třídy patří právě sublancin. Konkrétně

se řadí do podskupiny glykocinů – RiPP, které jsou glykosylované (často S-glykosylované – mají cukr připojený na atom síry v cysteinu) a obsahují disulfidické můstky. Do této podskupiny se dále řadí např. glycocin F, ASM1 nebo thurandacin. Dříve byl sublancin nesprávně zařazován do jiné podskupiny Třídy I., do lantibiotik, se kterými sdílí některé charakteristiky. Zástupcem lantibiotik je například nisin A nebo výše popsaný mersacidin. Dříve zmiňované mikrociny jsou zástupci další podskupiny Třídy I., lasovitých peptidů (shrnutí v Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016 a Norris & Patchett, 2016).

Třída II. pak sdružuje nemodifikované peptidy, které jsou menší než 10 kDa. Jedná se například o lactococcin Q, patřící do podskupiny dvoupeptidových bakteriocinů, které jsou aktivní pouze ve dvojici odlišných peptidů. Takové peptidy samy o sobě většinou nemají baktericidní schopnost.

Poslední skupinou bakteriocinů je Třída III., která zahrnuje nemodifikované toxiny větší než 10 kDa, dělí se do dvou podskupin: bakteriolytické peptidy a peptidy nelytické (shrnutí v Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016 a Cotter *et al.*, 2013).

4.2 Sublancinový operon

Sublancin je kódován genem *sunA*, patřícím do *sun* operonu. Tento operon je součástí profága SPβ (Paik *et al.*, 1998). Bakteriofág SPβ je velmi specifický pro *B. subtilis* (Seaman *et al.*, 1964). Předáním genů potřebných k syntéze sublancinu (*phage-encoded biosynthetic gene cluster*, pBGC) tak bakteriofág přináší svému hostiteli ekologickou výhodu (Dragoš *et al.*, 2021).

Operon *sun* obsahuje kromě genu *sunA* dále také geny *sunT*, *bdbA*, *sunS* a *bdbB*. *SunA* totiž kóduje 56 aminokyselin dlouhý pre-sublancin skládající se z N-terminálního vedoucího peptidu (*leader peptide*, 19 aminokyselin) a peptidu, který posléze tvoří maturovaný sublancin (*core peptide*, 37 aminokyselin). Ostatní geny operonu *sun* pak kódují proteiny, které se podílí na maturaci tohoto pre-peptidu (**Obr. 12**) (Dorenbos *et al.*, 2002; Oman *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 1998).

Gen následující v operonu *sunA* je *sunT* a kóduje ABC transportér, který má kromě domény transportérové i doménu proteázovou. Zabezpečuje tedy odstranění vedoucího peptidu od maturovaného sublancinu a transport sublancinu z buňky. SunT presublancin štěpí v místě tzv. dvojitého glycinu (*double glycine motif*) na vedoucím peptidu. Pro bakteriociny modifikované i nemodifikované je typická syntéza pre-peptidu, který obsahuje vedoucí peptid a je následně post-translačně štěpen a transportován z buňky jedním proteinem (ABC transportérem) (shrnutí v Havarstein *et al.*, 1995; Paik *et al.*, 1998).

Vedoucí peptid inhibuje aktivitu sublancinu, bez SunT je sublancin neaktivní (Dorenbos *et al.*, 2002; Oman *et al.*, 2011).

Kromě sestřížení pre-peptidu musí dále dojít ke dvěma důležitým modifikacím, bez kterých toxin ztrácí svou funkci (Oman *et al.*, 2011).

První modifikací je glykosylace na Cys22 pomocí proteinu SunS (*sublancin biosynthetic enzyme*, původní název YolJ). Protein rozeznává N-terminální helix A a k peptidu připojuje S- β -vazbou glukózu. Tato glykosyltransferáza je kódována genem *sunS*. Ten se stejně jako ostatní geny pro enzymy určené k maturaci sublancinu nachází v *sun* operonu. Ke glykosylaci není třeba disulfidických můstků, SunS má velkou specifitu k Cys22 a na jiný cystein hexózu nepřipojuje. Pokud dojde k náhradě Cys22 za jinou aminokyselinu, ke glykosylaci nedochází. Zároveň při přemístění cysteinu z 22. místa blíže k C- i N- konci ke glykosylaci na tomto cysteinu dojde. SunS má ale vysokou substrátovou promiskuitu, mimo glukózy dokáže k sublancinu připojit i jiné cukry, jako například GlcNAc, galaktázu, manózu či xylózu. Analogy vzniklé připojením rozdílných cukrů jsou aktivní, ale méně než sublancin glykosylovaný glukózou (Biswas *et al.*, 2017; Oman *et al.*, 2011; Wang & van der Donk, 2011).

Další modifikací nutnou k funkci sublancinu je tvorba dvou disulfidických můstků. Ty tvoří thiol-disulfid oxidoreduktázy, kódovány geny *bdbA* a *bdbB*. Protein BdbB je pro produkci sublancinu důležitý, ale není esenciální. Při mutaci v genu *bdbB* dochází k produkci sublancinu, BdbB je částečně nahrazen jinou thiol-disulfid oxidázou BdbC, ale produkce je nižší. Protein BdbA není pro tvorbu sublancinu nutný (Dorenbos *et al.*, 2002).

Posledním známým proteinem produkovaným ve spojitosti se sublancinem je imunitní protein SunI (původní název YolF). Tento protein je velmi důležitý, díky němu jsou producenti sublancinu proti svému vlastnímu toxinu rezistentní. SunI je kódovaný genem *sunI*, který je přepisován z jiného promotoru a nepatří do operonu *sun* (Obr. 12). Gen je ale také kódován profágem SP β . V případě mutanta, u kterého je vyvolána absence celého SP β profága (Δ SP β), navozuje SunI rezistenci vůči sublancinu i u bakterií, které tento toxin neprodukují.

SunI je malý bazický protein o 105 aminokyselinách asociovaný s membránou. Má jednu transmembránovou doménu, jeho N-konec je extracytoplazmatický, C-konec je v cytoplazmě. Imunitní proteiny jsou pro bakteriociny typické; imunitní protein s podobnou strukturou jako SunI ale nebyl do jeho objevení znám. Mechanismus imunity zprostředkované proteinem SunI zatím nebyl popsán. (Dubois *et al.*, 2009).

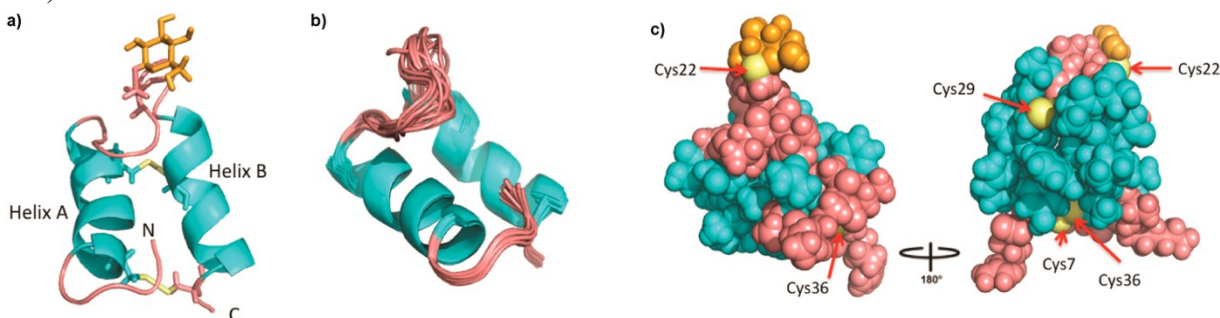
Total RNA amount/ probe	W168	$\Delta sigM$	$\Delta sigX$	$\Delta sigMX$	Δabh	$\Delta abrB$	$\Delta abh abrB$	$\Delta sunA$
10 μ g /sunA								
100ng/23SrRNA								

Obrázek 13: Kvantitativní analýza transkriptu *sunAT*

Měření produkce transkriptu *sunAT* pomocí RNA slot blotting za použití 32 P-označené DNA sondy *sunA*. Produkce *SunAT* mRNA je výrazně snížena u mutantů $\Delta sigX$, $\Delta sigMX$ a Δabh , méně u $\Delta sigM$. Mutanti $\Delta abrB$ a $\Delta abh abrB$ se produkcí sublancinu výrazně neliší od divokého kmene (*wild-type*) *B. subtilis* 168 (W168). Mutant $\Delta sunA$ je negativní kontrolou, transkript při absenci genu není produkován. 23SrRNA je kontrolou zatížení (*loading control*) (převzato z Luo & Helmann, 2009).

4.3 Struktura sublancinu

Sublancin se ve své maturované formě skládá z 37 aminokyselin. Je velký 3,8 kDa a tvořen dvěma α -helixy, které spojuje interhelikální smyčka. N-terminální helix A je tvořen aminokyselinami na pozicích 6–16, C-terminální helix B tvořen aminokyselinami 26–35. Interhelikální smyčka, tvořená aminokyselinami 17–25, je relativně flexibilní, ale má definovanou konformaci a udává kompaktní strukturu sublancinu. Velmi kompaktní struktura odpovídá velké chemické stabilitě sublancinu a dále je dána početnými hydrofobními interakcemi v rámci peptidu. Sublancin obsahuje ve své struktuře pětkrát aminokyselinu cystein. V interhelikální smyčce je k cysteinu na 22. pozici (Cys22) S- β -vazbou připojena glukóza. Dále také peptid obsahuje dva disulfidické můstky, a to mezi cysteiny na pozici 7 a 36 (Cys7-Cys36) a cysteiny na pozici 14 a 29 (Cys14-Cys29) (Obr. 14). Tyto dvě post-translační modifikace sublancinu jsou právě těmi charakteristikami, které sublancin oddělily od skupiny lantibiotik a na základě kterých vznikla nová skupina – glykociny (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2014; Oman *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 1998).



Obrázek 14: Struktura sublancinu

(a) Stuhlý diagram nejnižší energetické konformace molekuly sublancinu s helixy A a B zbarvenými modře, interhelikální smyčkou, N- a C-konci zbarvenými růžově, disulfidickými můstky zbarvenými žlutě a hexózou připojenou na Cys22 zbarvenou oranžově. (b) Soubor 15 konformací s nejnižší energií znázorňující atomy peptidické

kostry. (c) Kalotový model reprezentující konformaci s nejnižší energií molekuly, znázorněna oblast interhelikální smyčky a terminálních částí v růžové barvě, helixy v modré barvě, exponované atomy síry žlutě (převzato z Garcia De Gonzalo *et al.*, 2014).

4.4 Interakce sublancinu s cílovou buňkou

Pro vstup sublancinu do buňky byly navrženy dva transportní systémy. Prvním je velký mechanosenzitivní kanál (*mechanosensitive channel large*, MscL). Bylo pozorováno, že obsah NaCl v médiu ovlivňuje vstup sublancinu do cílových buněk. Vyšší obsah soli v médiu znamená uzavření mechanosenzitivních kanálů a zároveň snížený vstup sublancinu. Jedním z takových kanálů je právě MscL. Mutanti bez tohoto kanálu jsou zcela rezistentní k sublancinu bez ohledu na obsah soli v médiu. Toxin tedy s kanálem určitým způsobem interaguje, mohl by být vstupní bránou do bakteriální buňky (Kouwen *et al.*, 2009).

Druhým systémem je fosfoenolpyruvát:cukr fosfotransferázový systém (*phosphotransferase system*, PTS) (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015).

PTS je přenašečem cukrů do bakteriální buňky. S přenosem se pojí fosforylace substrátu. PTS tvoří soubor proteinů – PtsI (nebo EI), PtsH (nebo HPr) a PtsG (nebo EII). PtsI a PtsH jsou nespecifické proteiny, PtsG je specifický pro konkrétní cukry a skládá se z domén IIA, IIB a IIC. PtsI je fosforylován pomocí fosfoenolpyruvátu (PEP), a dále fosfátovou skupinu přenáší na PtsH. Ten předává fosfátovou skupinu na PtsG. Podjednotka IIA fosforyluje podjednotku IIB a IIB předává fosfát na příchozí cukr. Pokud je příchozím cukrem glukóza, po fosforylaci se stává glukóza-6-fosfátem a může být přímo zpracována glykolýzou (shrnuto v Deutscher *et al.*, 2006).

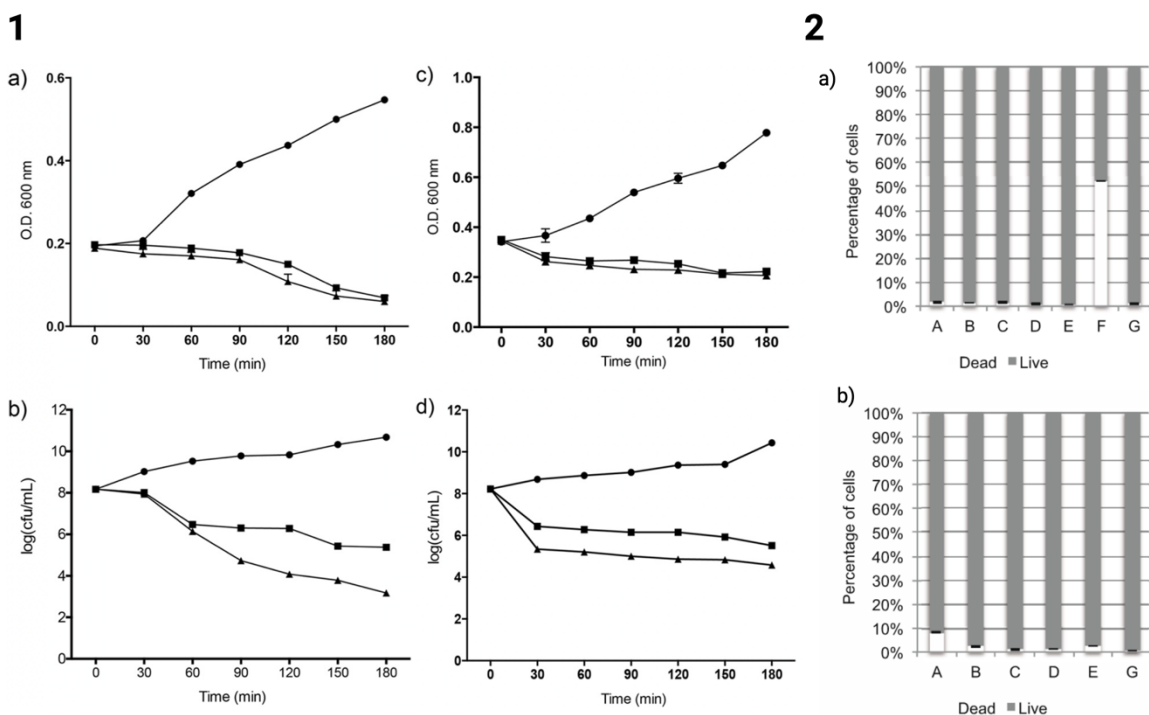
Pro identifikaci genů, které ovlivňují senzitivitu k sublancinu vytvořili Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015 sadu delečních mutantů, přičemž žádný z těchto mutantů neobsahoval genom profága SP β , tudíž ani nekódoval imunitní protein SunI. Díky tomu bylo zjištěno, že delece v genech pro operon *pts* vedou k rezistenci vůči sublancinu.

Pokud jsou do média k sublancinu a bakteriálním buňkám přidány cukry transportované PTS, snižuje se aktivita sublancinu. Zároveň bylo při radioaktivním značení PTS-cukrů sledováno, že přidané cukry jsou do bakteriálních makromolekul inkorporovány daleko méně při nižším obsahu glukózy v médiu - 0,01 %, než při vyšším obsahu glukózy v médiu - 0,1 %. To napovídá tomu, že by mohla mezi PTS-cukrem a sublancinem probíhat kompetice o vstup do cílové buňky (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015; C. Wu *et al.*, 2019).

Pokud je cukr do média přidán až později, po působení sublancinu na buňky, dochází k částečné ochraně buněk před sublancinem. PTS tedy sublancinem nemůže být nevratně inaktivovaný – není jeho hlavním cílem, ale pouze prostředkem, který využívá, aby se ke svému hlavnímu cíli dostal.

Pro zjištění konkrétní interakce sublancinu s PTS byl vytvořen mutant se změnou v patnácté aminokyselině HPr – histidinu (His15), která je běžně fosforylována pomocí PtsI. Taková mutace zvyšovala rezistenci k sublancinu. Je tedy možné, že sublancin musí být při vstupu do buňky fosforylován, aby se projevil jeho baktericidní vlastnosti. Glukóza, připojená k sublancinu, by mohla být PTS rozeznávána a umožnit tak transport sublancinu do buňky nebo interakci s hlavním cílem sublancinu (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015).

Sublancin bakterie zabíjí bez okamžité lyze, což dokazuje, že v membránách nevytváří póry (**Obr. 15**) (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015).



Obrázek 15: Inhibice růstu bakteriálních kultur *B. subtilis* ATCC 6633 a *Bacillus halodurans* C-125 pomocí sublancinu

(1) Kultury *B. subtilis* ATCC 6633 a *B. halodurans* C-125 byly kultivovány do exponenciální fáze, následně přeneseny na 48-jamkovou misku a vystaveny působení sublancinu při 1xMIC a 4xMIC. Periodicky byla měřena OD₆₀₀. Po 6 hodinách inkubace byl u obou kultur exponovaných sublancinu sledován pokles OD₆₀₀. Dále byl u kultur stanoven počet CFU (*colony-forming unit*). Pokles CFU byl významně vyšší než pokles OD. Data v grafech jsou průměrem vždy tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky udávají standardní odchylku.

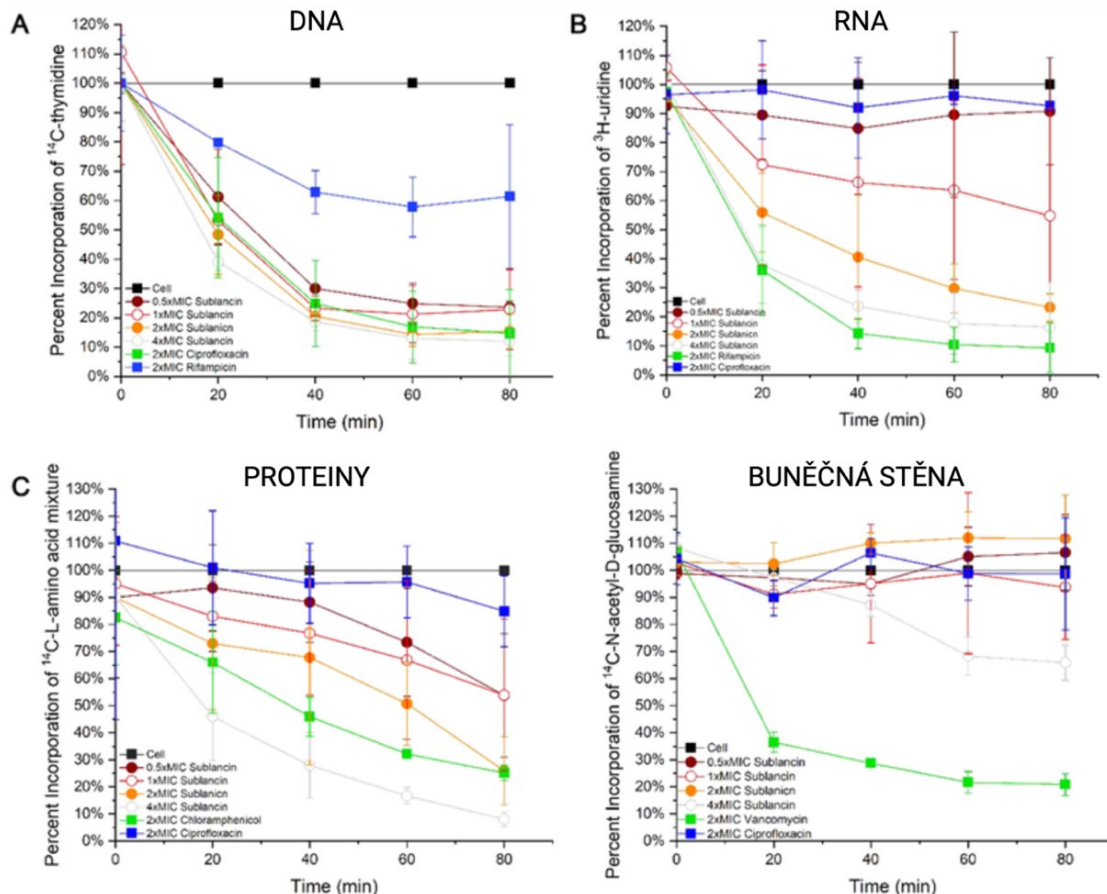
(a) Změna OD₆₀₀ v závislosti na čase u kultury kmenu *B. subtilis* ATCC 6633 v absenci sublancinu (kroužky) a přítomnosti sublancinu při 1xMIC (čtverce) a 4xMIC (trojuhelníky). (b) Analýza vzorků kultur z části (a) pro počet CFU. (c) Změna OD₆₀₀ v závislosti na čase u kultury kmenu *B. halodurans* C-125 v absenci sublancinu (kroužky) a přítomnosti sublancinu při 1xMIC (čtverce) a 4xMIC (trojuhelníky). (d) Analýza vzorků kultur z části (c) pro počet CFU.

(2) Určení životaschopnosti bakterií ΔSPβ na základě integrity membrány pomocí metody LIVE/DEAD® BacLight™ (a) 30 min a (b) 90 min po inkubaci se sublancinem. Šedé sloupce znázorňují bakterie s neporušenou membránou, bílé sloupce bakterie s membránou narušenou. A: 100nM sublancin, B: 200nM sublancin, C: 300nM sublancin, D: 400nM sublancin, E: 500nM sublancin, F: pozitivní kontrola s bakteriocinem nisin, který narušuje bakteriální membránu, G: negativní kontrola. Data jsou průměrem vždy tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky udávají standardní odchylku (převzato a upraveno z Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015).

Pro zjištění, které aminokyseliny jsou důležité k aktivitě sublancinu, byly v aminokyselinách, jejichž postranní řetězce jsou exponované na povrchu peptidu, vytvořeny mutace. Pokud se mutace týkala aminokyselin asparaginu na 31. pozici (Asn31) nebo argininu na 33. pozici (Arg33), došlo ke snížení aktivity sublancinu. Obě tyto aminokyseliny se nachází na helixu B a je pravděpodobné, že interagují s cílem sublancinu, tuto interakci zprostředkovávají, nebo jsou důležité pro vstup sublancinu do buňky (Biswas *et al.*, 2017).

4.5 Mechanismus funkce sublancinu

Pro sledování mechanismu působení sublancinu byly využity radioaktivně značené prekurzory biosyntézy buněčné stěny, DNA, RNA a proteinů. Efekt na buněčnou stěnu měl sublancin podobný jako negativní kontrola, kterou bylo antibiotikum ciprofloxacín. Oproti tomu syntéza DNA byla narušena velmi významně již při koncentraci sublancinu nedosahující hodnoty MIC. Zaznamenan byl i efekt na syntézu RNA a proteinů, tyto procesy ale nejspíše nejsou hlavním cílem sublancinu (Obr. 16). Kdyby tomu tak bylo, nedocházelo by k tak silné inhibici DNA. Dá se tedy předpokládat, že sublancin inhibuje transkripci a translaci nepřímo a jeho hlavním cílem působení je replikace DNA (C. Wu *et al.*, 2019). Cílový protein/proteiny a přesný mechanismus tohoto působení zatím nejsou známy.



Obrázek 16: Efekt sublancinu na syntézu DNA, RNA, proteinů a buněčné stěny měřený pomocí radioaktivních prekurzorů

(A) Procentuální inkorporace ^{14}C -thymidinů do DNA u *B. subtilis* $\Delta\text{SP}\beta$ byla měřena v závislosti na čase. Do bakteriální kultury bylo přidáno $0,8 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -thymidinu. Po 15 min byl přidán sublancin při $0,5\text{xMIC}$, 1xMIC , 2xMIC nebo 4xMIC . Jako pozitivní kontola sloužila kultura s ciprofloxacinem, bakteriální kultura bez přidaného sublancinu a kultura s rifampicinem jako kontrola negativní. Data pochází ze tří nezávislých experimentů.

(B) Procentuální inkorporace ^3H -uridinu do RNA u *B. subtilis* $\Delta\text{SP}\beta$ byla měřena v závislosti na čase. Do bakteriální kultury bylo přidáno $0,8 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -uridinu. Po 15 min byl přidán sublancin při $0,5\text{xMIC}$, 1xMIC , 2xMIC nebo 4xMIC . Jako pozitivní kontola sloužila kultura s rifampicinem, bakteriální kultura bez přidaného sublancinu a kultura s ciprofloxacinem jako kontrola negativní. Data pochází ze tří nezávislých experimentů.

(C) Procentuální inkorporace ^{14}C -značených aminokyselin do proteinů u *B. subtilis* $\Delta\text{SP}\beta$ byla měřena v závislosti na čase. Do bakteriální kultury bylo přidáno $0,8 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -značených aminokyselin. Po 15 min byl přidán sublancin při $0,5\text{xMIC}$, 1xMIC , 2xMIC nebo 4xMIC . Jako pozitivní kontola sloužila kultura s chloramfenikolem, bakteriální kultura bez přidaného sublancinu a kultura s ciprofloxacinem jako kontrola negativní. Data pochází ze tří nezávislých experimentů.

(D) Procentuální inkorporace ^{14}C -značeného N-acetyl-D-glukosaminu do buněčné stěny u *B. subtilis* $\Delta\text{SP}\beta$ byla měřena v závislosti na čase. Do bakteriální kultury bylo přidáno $0,8 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -značeného GlcNAc. Po 15 min byl přidán sublancin při $0,5\text{xMIC}$, 1xMIC , 2xMIC nebo 4xMIC . Jako pozitivní kontola sloužila kultura s vancomycinem, bakteriální kultura bez přidaného sublancinu a kultura s ciproflaxinem jako kontrola negativní. Data pochází ze tří nezávislých experimentů (převzato a upraveno z C. Wu *et al.*, 2019).

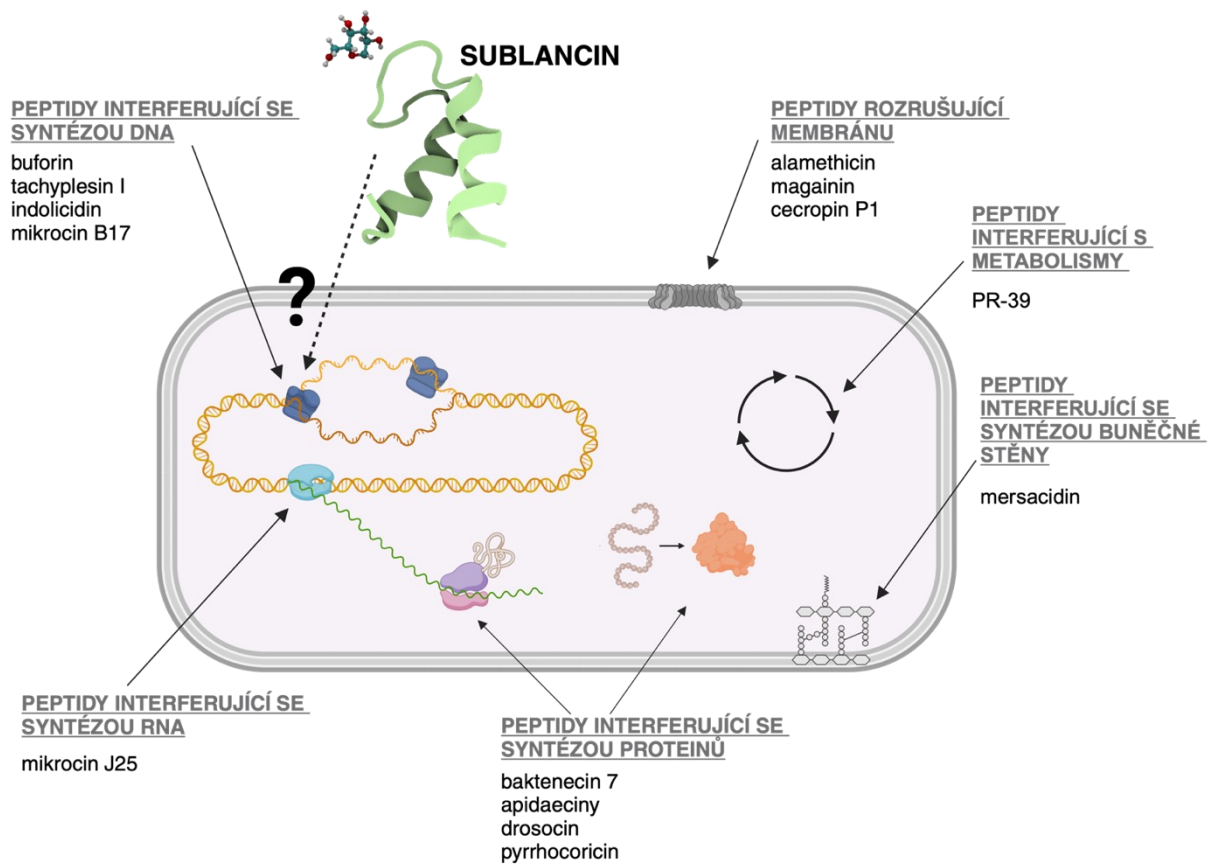
5. Závěr

AMP slouží jako ochrana proti bakteriím počtu živých organismů, včetně samotných bakterií. Jsou to velmi malé, často modifikovatelné látky, které v řadě případů nemají v bakteriální buňce pouze jeden cíl, ale mohou zasahovat několik důležitých/esenciálních procesů. Díky takovým vlastnostem má řada z nich potenciální využití při vývoji nových antibiotik. Nicméně, velmi dlouho byla v minulosti věnována pozornost především AMP, které v bakteriální membráně tvoří póry. AMP, které mají intracelulární cíle, jsou více studovány přibližně od začátku tohoto století a v mnoha případech není zatím zcela zřejmý jejich přesný mechanismus působení, i když je známo, na který buněčný proces cílí. Příkladem mohou být AMP interferující se syntézou DNA, např. buforin II či tachyplesin I.

Dále je jedním z takových AMP sublancin, na který jsem se v této práci zaměřila. Ačkoli byl sublancin objeven před více než 20 lety (Paik *et al.*, 1998), jeho interakce s cílovou bakteriální buňkou je popsána jen velmi omezeně. Nicméně, poměrně podrobně je popsán proces maturace tohoto peptidu. Sublancin je syntetizován jako 56 aminokyselin dlouhý prepeptid. Je glykosylovaný pomocí enzymu SunS, v jeho struktuře jsou vytvořeny dva disulfidické můstky proteiny BdbA a BdbB. Transportér SunT sublancin zbavuje vedoucího peptidu a zároveň ho transportuje z buňky (Dorenbos *et al.*, 2002; Oman *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 1998). Byly navrženy některé molekuly, se kterými sublancin nejspíše přímo interaguje, nebo alespoň nepřímo ovlivňují jeho aktivitu, jako transportní systém pro cukerné zdroje uhlíku PTS, nebo mechanosensitivní kanál MscL (Garcia De Gonzalo *et al.*, 2015; Kouwen *et al.*, 2009). Poslední výzkumy ukazují, že má sublancin pravděpodobně největší vliv na syntézu DNA (C. Wu *et al.*, 2019), ale o jeho mechanismu působení v cílové buňce je známo velmi málo.

Tato práce byla vypracována pod Laboratoří mikrobiální genetiky a genové exprese, kde je momentálně část výzkumu sublancinu věnována. Práci jsem proto vypracovala jako literární rešerši shrnující známé poznatky o AMP interferujících s buněčnými procesy a především sublancinu, kterému se budu dále experimentálně věnovat. Mým cílem v budoucí diplomové práci tedy bude přispět k rozluštění mechanismus působení tohoto AMP.

Konkrétní zmíněné mechanismy působení AMP na bakteriální buňku znázorňuje schéma přiložené závěrem této práce (**Obr. 17**).



Obrázek 17: Schéma různých mechanismů působení AMP

Grafické znázornění všech zmíněných funkcí AMP s konkrétními příklady, včetně AMP membránu rozrušujících i nerozrušujících. Otazníkem a přerušovanou šipkou je znázorněna nejasná role sublancinu (zeleně) v působení na cílovou buňku. Nakresleno pomocí BioRender.

Seznam použité literatury

- Agerberth, B., Lee, J., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H. G., Mutt, V., & Jörnvall, H. (1991). Amino acid sequence of PR-39. *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 849–854. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16442.x>
- *Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- *Baquero, F., & Moreno, F. (1984). The microcins. *FEMS Microbiology Letters*, 23(2–3), 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01046.x>
- Baumann, G., & Mueller, P. (1974). A molecular model of membrane excitability. *Journal of Supramolecular Structure*, 2(5–6), 538–557. <https://doi.org/10.1002/jss.400020504>
- Bayro, M. J., Mukhopadhyay, J., Swapna, G. V. T., Huang, J. Y., Ma, L.-C., Sineva, E., Dawson, P. E., Montelione, G. T., & Ebright, R. H. (2003). Structure of Antibacterial Peptide Microcin J25: A 21-Residue Lariat Protoknot. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41), 12382–12383. <https://doi.org/10.1021/ja036677e>
- *Bhat, A. H., Nguyen, M. T., Das, A., & Ton-That, H. (2021). Anchoring surface proteins to the bacterial cell wall by sortase enzymes: how it started and what we know now. *Current Opinion in Microbiology*, 60, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.013>
- Bird, R. E., Louarn, J., Martuscelli, J., & Caro, L. (1972). Origin and sequence of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 70(3), 549–566. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90559-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90559-1)
- Biswas, S., Garcia De Gonzalo, C. V., Repka, L. M., & van der Donk, W. A. (2017). Structure–Activity Relationships of the S-Linked Glycocin Sublancin. *ACS Chemical Biology*, 12(12), 2965–2969. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00819>
- *Boman, H. G. (1995). Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annual Review of Immunology*, 13(1), 61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425>
- Boman, H. G., Agerberth, B., & Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*, 61(7), 2978–2984. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2978-2984.1993>
- Bonner, C. A., Hays, S., McEntee, K., & Goodman, M. F. (1990). DNA polymerase II is encoded by the DNA damage-inducible *dinA* gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7663–7667. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7663>
- Bramhill, D., & Kornberg, A. (1988). Duplex opening by *dnaA* protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, 52(5), 743–755. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90412-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90412-6)
- *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>
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., & Sahl, H.-G. (1998). The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 154–160. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.154>
- Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E., & Sahl, H. G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 714–719. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.714>
- Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E., & Sahl, H. (1997). The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Biosynthesis at the Level of Transglycosylation. *European Journal of Biochemistry*, 246(1), 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x>
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., & Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14893–14897.

- Campbell, J. L., & Kleckner, N. (1990). E. coli oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*, 62(5), 967–979. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90271-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90271-F)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, S. J., Phansalkar, M. S., Rupp, R. H., Ganguli, B. N., Fehlhaber, H.-W., & Kogler, H. (1992). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus Fermentation*, isolation, purification and chemical characterization. *The Journal of Antibiotics*, 45(6), 832–838. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.832>
- Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (1994). Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochemical Journal*, 300(2), 567–575. <https://doi.org/10.1042/bj3000567>
- Cooper, S., & Helmstetter, C. E. (1968). Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 31(3), 519–540. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90425-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90425-7)
- Coskun-Ari, F. F., & Hill, T. M. (1997). Sequence-specific Interactions in the Tus-Ter Complex and the Effect of Base Pair Substitutions on Arrest of DNA Replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26448–26456. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26448>
- *Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Czihal, P., Knappe, D., Fritsche, S., Zahn, M., Berthold, N., Piantavigna, S., Müller, U., Van Dorpe, S., Herth, N., Binias, A., Köhler, G., De Spiegeleer, B., Martin, L. L., Nolte, O., Sträter, N., Alber, G., & Hoffmann, R. (2012). Api88 Is a Novel Antibacterial Designer Peptide To Treat Systemic Infections with Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *ACS Chemical Biology*, 7(7), 1281–1291. <https://doi.org/10.1021/cb300063v>
- de Massy, B., Béjar, S., Louarn, J., Louarn, J. M., & Bouché, J. P. (1987). Inhibition of replication forks exiting the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome occurs at two loci separated by 5 min. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 1759–1763. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1759>
- Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Fariás, R. N., & Salomón, R. A. (2001). *Escherichia coli* RNA Polymerase Is the Target of the Cyclopeptide Antibiotic Microcin J25. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4543–4550. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4543-4550.2001>
- Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Jannièrè, L., & Ehrlich, S. D. (2001). Two Essential DNA Polymerases at the Bacterial Replication Fork. *Science*, 294(5547), 1716–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1066351>
- *Deutscher, J., Francke, C., & Postma, P. W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 939–1031. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-06>
- Di Nardo, A., Vitiello, A., & Gallo, R. L. (2003). Cutting Edge: Mast Cell Antimicrobial Activity Is Mediated by Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2274–2278. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2274>
- Dorenbos, R., Stein, T., Kabel, J., Bruand, C., Bolhuis, A., Bron, S., Quax, W. J., & van Dijl, J. M. (2002). Thiol-Disulfide Oxidoreductases Are Essential for the Production of the Lantibiotic Sublancin 168. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16682–16688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201158200>
- Dragoš, A., Andersen, A. J. C., Lozano-Andrade, C. N., Kempen, P. J., Kovács, Á. T., & Strube, M. L. (2021). Phages carry interbacterial weapons encoded by biosynthetic gene clusters. *Current Biology*, 31(16), 3479–3489.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.05.046>
- Dubois, J.-Y. F., Kouwen, T. R. H. M., Schurich, A. K. C., Reis, C. R., Ensing, H. T., Trip, E. N., Zweers, J. C., & van Dijl, J. M. (2009). Immunity to the Bacteriocin Sublancin 168 Is Determined by the SunI (YofF) Protein of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 651–661. <https://doi.org/10.1128/AAC.01189-08>
- Escarceller, M., Hicks, J., Gudmundsson, G., Trump, G., Touati, D., Lovett, S., Foster, P. L., McEntee, K., & Goodman, M. F. (1994). Involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase II in response to oxidative

- damage and adaptive mutation. *Journal of Bacteriology*, 176(20), 6221–6228. <https://doi.org/10.1128/jb.176.20.6221-6228.1994>
- Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Wilson, D. N., Rodnina, M. V., & Mankin, A. S. (2017). An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(9), 752–757. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3439>
- Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., & Romeo, D. (1990). Amino acid sequences of two proline-rich bacterenecins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 18871–18874.
- Fujita, M. Q., Yoshikawa, H., & Ogasawara, N. (1989). Structure of the dnaA region of *Pseudomonas putida*: Conservation among three bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *P. putida*. *Molecular and General Genetics MGG*, 215(3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/BF00427033>
- Fujita, M. Q., Yoshikawa, H., & Ogasawara, N. (1990). Structure of the dnaA region of *Micrococcus luteus*: conservation and variations among eubacteria. *Gene*, 93(1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90138-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90138-H)
- Fuller, R. S., Funnell, B. E., & Kornberg, A. (1984). The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell*, 38(3), 889–900. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90284-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90284-8)
- Fuller, R. S., & Kornberg, A. (1983). Purified dnaA protein in initiation of replication at the *Escherichia coli* chromosomal origin of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(19), 5817–5821. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.19.5817>
- Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1986). Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(12), 5616–5624.
- Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1987). In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 10327–10334.
- Gagnon, M. G., Roy, R. N., Lomakin, I. B., Florin, T., Mankin, A. S., & Steitz, T. A. (2016). Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2439–2450. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw018>
- Garcia De Gonzalo, C. V., Denham, E. L., Mars, R. A. T., Stülke, J., van der Donk, W. A., & van Dijk, J. M. (2015). The Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System Is Involved in Sensitivity to the Glucosylated Bacteriocin Sublancin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6844–6854. <https://doi.org/10.1128/AAC.01519-15>
- Garcia De Gonzalo, C. V., Zhu, L., Oman, T. J., & van der Donk, W. A. (2014). NMR Structure of the S-Linked Glycopeptide Sublancin 168. *ACS Chemical Biology*, 9(3), 796–801. <https://doi.org/10.1021/cb4008106>
- Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R., & Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *The EMBO Journal*, 7(6), 1853–1862. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03018.x>
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G., & Shai, Y. (1995). Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry*, 34(36), 11479–11488. <https://doi.org/10.1021/bi00036a021>
- *Genest, O., Wickner, S., & Doyle, S. M. (2019). Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 2109–2120. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002806>
- Gennaro, R., Skerlavaj, B., & Romeo, D. (1989). Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and Immunity*, 57(10), 3142–3146. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.3142-3146.1989>
- Ghosh, A., Kar, R. K., Jana, J., Saha, A., Jana, B., Krishnamoorthy, J., Kumar, D., Ghosh, S., Chatterjee, S., & Bhunia, A. (2014). Indolicidin Targets Duplex DNA: Structural and Mechanistic Insight through a Combination of Spectroscopy and Microscopy. *ChemMedChem*, 9(9), 2052–2058. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402215>

- *Graf, M., & Wilson, D. N. (2019). *Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery* (pp. 73–89). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_6
- *Hale, J. D., & Hancock, R. E. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(6), 951–959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Hammond, R. A., Barnes, M. H., Mack, S. L., Mitchener, J. A., & Brown, N. C. (1991). Bacillus subtilis DNA polymerase III: complete sequence, overexpression, and characterization of the polC gene. *Gene*, 98(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90100-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90100-P)
- *Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 156–164. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00092-5)
- *Hancock, R. E. W., & Chapple, D. S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1317–1323. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1317>
- *Haney, E. F., Mansour, S. C., & Hancock, R. E. W. (2017). *Antimicrobial Peptides: An Introduction* (pp. 3–22). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
- Havarstein, L. S., Diep, D. B., & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, 16(2), 229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02295.x>
- He, K., Ludtke, S. J., Worcester, D. L., & Huang, H. W. (1996). Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical Journal*, 70(6), 2659–2666. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79835-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79835-1)
- Herrero, M., & Moreno, F. (1986). Microcin B17 Blocks DNA Replication and Induces the SOS System in Escherichia coli. *Microbiology*, 132(2), 393–402. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-2-393>
- *Higgins, N. P. (2013). Gyrase. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 374–377). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00670-7>
- Hill, T. M., Henson, J. M., & Kuempel, P. L. (1987). The terminus region of the Escherichia coli chromosome contains two separate loci that exhibit polar inhibition of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 1754–1758. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1754>
- Hill, T. M., Kopp, B. J., & Kuempel, P. L. (1988). Termination of DNA replication in Escherichia coli requires a trans-acting factor. *Journal of Bacteriology*, 170(2), 662–668. <https://doi.org/10.1128/jb.170.2.662-668.1988>
- Hill, T. M., Tecklenburg, M. L., Pelletier, A. J., & Kuempel, P. L. (1989). tus, the trans-acting gene required for termination of DNA replication in Escherichia coli, encodes a DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5), 1593–1597. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1593>
- Ho, Y.-H., Shah, P., Chen, Y.-W., & Chen, C.-S. (2016). Systematic Analysis of Intracellular-targeting Antimicrobial Peptides, Bactenecin 7, Hybrid of Pleurocidin and Dermaseptin, Proline–Arginine-rich Peptide, and Lactoferricin B, by Using Escherichia coli Proteome Microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(6), 1837–1847. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054999>
- *Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement 1), S9–S15. <https://doi.org/10.1086/319370>
- Huang, X., & Helmann, J. D. (1998). Identification of target promoters for the Bacillus subtilis σ X factor using a consensus-directed search. Edited by R. Ebricht. *Journal of Molecular Biology*, 279(1), 165–173. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1765>
- Jergic, S., Horan, N. P., Elshenawy, M. M., Mason, C. E., Urathamakul, T., Ozawa, K., Robinson, A., Goudsmits, J. M. H., Wang, Y., Pan, X., Beck, J. L., van Oijen, A. M., Huber, T., Hamdan, S. M., & Dixon, N. E. (2013). A direct proofreader–clamp interaction stabilizes the Pol III replicase in the polymerization mode. *The EMBO Journal*, 32(9), 1322–1333. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.347>
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Croke, E., & Sekimizu, K. (1998). The Initiator Function of DnaA Protein Is Negatively Regulated by the Sliding Clamp of the E. coli Chromosomal Replicase. *Cell*, 94(1), 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81222-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81222-2)
- Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y., & Iwanaga, S. (1990). Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (Tachyplesus

- tridentatus). NMR determination of the beta-sheet structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15365–15367.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S., & Marians, K. J. (1996). Coupling of a Replicative Polymerase and Helicase: A τ -DnaB Interaction Mediates Rapid Replication Fork Movement. *Cell*, 84(4), 643–650. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81039-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81039-9)
- Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y., & Matsuzaki, K. (2004). Membrane Translocation Mechanism of the Antimicrobial Peptide Buforin 2. *Biochemistry*, 43(49), 15610–15616. <https://doi.org/10.1021/bi048206q>
- Kobori, J. A., & Kornberg, A. (1982). The Escherichia coli dnaC gene product. III. Properties of the dnaB-dnaC protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13770–13775.
- Kouwen, T. R. H. M., Trip, E. N., Denham, E. L., Sibbald, M. J. J. B., Dubois, J.-Y. F., & van Dijk, J. M. (2009). The Large Mechanosensitive Channel MscL Determines Bacterial Susceptibility to the Bacteriocin Sublancin 168. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4702–4711. <https://doi.org/10.1128/AAC.00439-09>
- Krizsan, A., Volke, D., Weinert, S., Sträter, N., Knappe, D., & Hoffmann, R. (2014). Insect-Derived Proline-Rich Antimicrobial Peptides Kill Bacteria by Inhibiting Bacterial Protein Translation at the 70 S Ribosome. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(45), 12236–12239. <https://doi.org/10.1002/anie.201407145>
- Kwun, M. S., & Lee, D. G. (2021). Apoptosis-like death-inducing property of tachyplesin I in *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*, 61(9), 795–807. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100133>
- Lavina, M., Pugsley, A. P., & Moreno, F. (1986). Identification, Mapping, Cloning and Characterization of a Gene (sbmA) Required for Microcin B17 Action on *Escherichia coli* K12. *Microbiology*, 132(6), 1685–1693. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-6-1685>
- *Le, C. F., Fang, C. M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 61, Issue 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
- LeBowitz, J. H., & McMacken, R. (1986). The *Escherichia coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(10), 4738–4748.
- Lee, J. Y., Boman, A., Sun, C. X., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V., & Boman, H. G. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9159–9162. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9159>
- *Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
- Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 233(1), 163–170.
- *Lewis, J. S., Jergic, S., & Dixon, N. E. (2016). *The E. coli DNA Replication Fork* (pp. 31–88). <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.04.001>
- Lewis, P. J., Ralston, G. B., Christopherson, R. I., & Wake, R. G. (1990). Identification of the replication terminator protein binding sites in the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome and stoichiometry of the binding. *Journal of Molecular Biology*, 214(1), 73–84. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90147-E](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90147-E)
- Løbner-Olesen, A., Skovgaard, O., & Marinus, M. G. (2005). Dam methylation: coordinating cellular processes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.009>
- Louarn, J., Patte, J., & Louarn, J.-M. (1977). Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, 115(3), 295–314. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90156-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90156-5)
- Low, R. L., Rashbaum, S. A., & Cozzarelli, N. R. (1976). Purification and characterization of DNA polymerase III from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 251(5), 1311–1325. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33742-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33742-0)

- Lu, M. (1994). SeqA: A negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell*, 77(3), 413–426. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90156-2)
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., & Huang, H. W. (1996). Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry*, 35(43), 13723–13728. <https://doi.org/10.1021/bi9620621>
- Luo, Y., & Helmann, J. D. (2009). Extracytoplasmic Function σ Factors with Overlapping Promoter Specificity Regulate Sublancin Production in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4951–4958. <https://doi.org/10.1128/JB.00549-09>
- Maki, H., Horiuchi, T., & Kornberg, A. (1985). The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. I. Amplification of the *dnaE* gene product and polymerase activity of the alpha subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(24), 12982–12986.
- Maki, H., Maki, S., & Kornberg, A. (1988). DNA Polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. IV. The holoenzyme is an asymmetric dimer with twin active sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(14), 6570–6578.
- Makowska-Grzyska, M., & Kaguni, J. M. (2010). Primase Directs the Release of DnaC from DnaB. *Molecular Cell*, 37(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.031>
- Mangano, K., Klepacki, D., Ohanmu, I., Baliga, C., Huang, W., Brakel, A., Krizsan, A., Polikanov, Y. S., Hoffmann, R., Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2023). Inhibition of translation termination by the antimicrobial peptide Drosocin. *Nature Chemical Biology*, 19(9), 1082–1090. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01300-x>
- Marchand, C., Krajewski, K., Lee, H.-F., Antony, S., Johnson, A. A., Amin, R., Roller, P., Kvaratskhelia, M., & Pommier, Y. (2006). Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Research*, 34(18), 5157–5165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl667>
- Mardirossian, M., Grzela, R., Giglione, C., Meinel, T., Gennaro, R., Mergaert, P., & Scocchi, M. (2014). The Host Antimicrobial Peptide Bac71-35 Binds to Bacterial Ribosomal Proteins and Inhibits Protein Synthesis. *Chemistry & Biology*, 21(12), 1639–1647. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.009>
- Masker, W., Hanawalt, P., & Shizuya, H. (1973). Role of DNA Polymerase II in Repair Replication in *Escherichia coli*. *Nature New Biology*, 244(138), 242–243. <https://doi.org/10.1038/newbio244242a0>
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., & Miyajima, K. (1996). An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. *Biochemistry*, 35(35), 11361–11368. <https://doi.org/10.1021/bi960016v>
- Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., & Scocchi, M. (2007). Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology*, 66(1), 151–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x>
- McHenry, C., & Kornberg, A. (1977). DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. Purification and resolution into subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 252(18), 6478–6484. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39983-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39983-0)
- Meselson, M., & Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(7), 671–682. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.7.671>
- Meyer, C. E., & Reusser, F. (1967). A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia*, 23(2), 85–86. <https://doi.org/10.1007/BF02135929>
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1989). Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II, and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity1. *The Journal of Biochemistry*, 106(4), 663–668. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122913>
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16709–16713.
- Narayanan, S., Modak, J. K., Ryan, C. S., Garcia-Bustos, J., Davies, J. K., & Roujeinikova, A. (2014). Mechanism of *Escherichia coli* Resistance to Pyrrolicocricin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2754–2762. <https://doi.org/10.1128/AAC.02565-13>

- *Neylon, C., Kralicek, A. V., Hill, T. M., & Dixon, N. E. (2005). Replication Termination in *Escherichia coli*: Structure and Antihelicase Activity of the Tus- Ter Complex. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(3), 501–526. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.501-526.2005>
- *Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, , Travis J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- *Norris, G. E., & Patchett, M. L. (2016). The glycocons: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology*, 40, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.09.003>
- O'Donnell, M. E., & Kornberg, A. (1985). Dynamics of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* in replication of a multiprimed template. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(23), 12875–12883.
- Ogasawara, N., Moriya, S., von Meyenburg, K., Hansen, F. G., & Yoshikawa, H. (1985). Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 4(12), 3345–3350. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb04087.x>
- Ogasawara, N., Moriya, S., & Yoshikawa, H. (1985). Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. IV. Transcription of the *oriC* region and expression of DNA gyrase genes and other open reading frames. *Nucleic Acids Research*, 13(7), 2267–2279. <https://doi.org/10.1093/nar/13.7.2267>
- Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., & Sugino, A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(2), 598–605. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.2.598>
- Oman, T. J., Boettcher, J. M., Wang, H., Okalibe, X. N., & van der Donk, W. A. (2011). Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 78–80. <https://doi.org/10.1038/nchembio.509>
- Otvos, , Laszlo, O, I., Rogers, M. E., Consolvo, P. J., Condie, B. A., Lovas, S., Bulet, P., & Blaszczyk-Thurin, M. (2000). Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, 39(46), 14150–14159. <https://doi.org/10.1021/bi0012843>
- Paik, S. H., Chakicherla, A., & Hansen, J. N. (1998). Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 23134–23142. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23134>
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(1), 253–257. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>
- Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo* gargarizans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(1), 408–413. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0071>
- Park, C. B., Yi, K.-S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., & Kim, S. C. (2000). Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8245–8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>
- Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, 89(4), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.005>
- Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R., & Scocchi, M. (2006). Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(11), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.006>
- *Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>

- Pränting, M., Negrea, A., Rhen, M., & Andersson, D. I. (2008). Mechanism and fitness costs of PR-39 resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(8), 2734–2741. <https://doi.org/10.1128/AAC.00205-08>
- Rintoul, M. R., Arcuri, B. F., Salomón, R. A., Farías, R. N., & Morero, R. D. (2001). The antibacterial action of microcin J25: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella newport*. *FEMS Microbiology Letters*, *204*(2), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10895.x>
- *Rodnina, M. V. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(9), a032664. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032664>
- Roecklein, B. A., & Kuempel, P. L. (1992). *In vivo* characterization of *tus* gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *6*(12), 1655–1661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00890.x>
- *Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*, *7*(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- Rubio-Olaya, D., Cifuentes, J., Puentes, P. R., Castañeda, O. A., Reyes, L. H., Duitama, J., Muñoz, C., & Cruz, J. C. (2022). Buforin II-*Escherichia coli*'s DNA interactome: Detailed biophysical characterization revealed nanoscale complexes likely formed by DNA supercoiling. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.20.492836>
- Russell, D. W., & Zinder, N. D. (1987). Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell*, *50*(7), 1071–1079. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90173-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90173-5)
- Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *174*(22), 7428–7435. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7428-7435.1992>
- Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1993). The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *Journal of Bacteriology*, *175*(23), 7741–7742. <https://doi.org/10.1128/jb.175.23.7741-7742.1993>
- Salomón, R. A., & Farías, R. N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *Journal of Bacteriology*, *177*(11), 3323–3325. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3323-3325.1995>
- Sanders, G. M., Dallmann, H. G., & McHenry, C. S. (2010). Reconstitution of the *B. subtilis* Replisome with 13 Proteins Including Two Distinct Replicases. *Molecular Cell*, *37*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.025>
- Schaefer, C., & Messer, W. (1991). DnaA protein/DNA interaction. Modulation of the recognition sequence. *Molecular and General Genetics MGG*, *226–226*(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1007/BF00273584>
- Scheuermann, R., Tam, S., Burgers, P. M., Lu, C., & Echols, H. (1983). Identification of the epsilon-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(23), 7085–7089. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.23.7085>
- Scocchi, M., Lüthy, C., Decarli, P., Mignogna, G., Christen, P., & Gennaro, R. (2009). The Proline-rich Antibacterial Peptide Bac7 Binds to and Inhibits *in vitro* the Molecular Chaperone DnaK. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *15*(2), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s10989-009-9182-3>
- Scott, M. G., Gold, M. R., & Hancock, R. E. W. (1999). Interaction of Cationic Peptides with Lipoteichoic Acid and Gram-Positive Bacteria. *Infection and Immunity*, *67*(12), 6445–6453. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.12.6445-6453.1999>
- Seaman, E., Tarmy, E., & Marmur, J. (1964). Inducible Phages of *Bacillus subtilis* *. *Biochemistry*, *3*(5), 607–613. <https://doi.org/10.1021/bi00893a001>
- Seefeldt, A. C., Graf, M., Pérébasquine, N., Nguyen, F., Arenz, S., Mardirossian, M., Scocchi, M., Wilson, D. N., & Innis, C. A. (2016). Structure of the mammalian antimicrobial peptide Bac7(1–16) bound within the exit tunnel of a bacterial ribosome. *Nucleic Acids Research*, *44*(5), 2429–2438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1545>
- Sekimizu, K., Bramhill, D., & Kornberg, A. (1987). ATP activates *dnaA* protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, *50*(2), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90221-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90221-2)

- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W., & Cullor, J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(7), 4292–4295.
- *Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 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)
- Shi, J., Ross, C. R., Chengappa, M. M., & Blecha, F. (1994). Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analogous to PR-39, an antibacterial peptide from the small intestine. *Journal of Leukocyte Biology*, 56(6), 807–811. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.6.807>
- Shi, J., Ross, C. R., Chengappa, M. M., Sylte, M. J., McVey, D. S., & Blecha, F. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(1), 115–121. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.1.115>
- Sim, S., Wang, P., Beyer, B. N., Cutrona, K. J., Radhakrishnan, M. L., & Elmore, D. E. (2017). Investigating the nucleic acid interactions of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Letters*, 591(5), 706–717. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12574>
- Strauch, M. A., Bobay, B. G., Cavanagh, J., Yao, F., Wilson, A., & Le Breton, Y. (2007). Abh and AbrB Control of *Bacillus subtilis* Antimicrobial Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7720–7732. <https://doi.org/10.1128/JB.01081-07>
- Stukenberg, P. T., Studwell-Vaughan, P. S., & O'Donnell, M. (1991). Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11328–11334. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99166-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99166-0)
- 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>
- Taft-Benz, S. A., & Schaaper, R. M. (2004). The θ Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III: a Role in Stabilizing the ϵ Proofreading Subunit. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2774–2780. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2774-2780.2004>
- Tang, M., Shen, X., Frank, E. G., O'Donnell, M., Woodgate, R., & Goodman, M. F. (1999). UmuD' ₂ C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 8919–8924. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8919>
- Uyterhoeven, E. T., Butler, C. H., Ko, D., & Elmore, D. E. (2008). Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II. *FEBS Letters*, 582(12), 1715–1718. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.036>
- van der Ende, A., Baker, T. A., Ogawa, T., & Kornberg, A. (1985). Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: primase as the sole priming enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 3954–3958. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.3954>
- Vizán, J. L., Hernández-Chico, C., del Castillo, I., & Moreno, F. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *The EMBO Journal*, 10(2), 467–476. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07969.x>
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.-R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. P. P., & Nohmi, T. (1999). The dinB Gene Encodes a Novel *E. coli* DNA Polymerase, DNA Pol IV, Involved in Mutagenesis. *Molecular Cell*, 4(2), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80376-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80376-7)
- Wang, H., & van der Donk, W. A. (2011). Substrate Selectivity of the Sublancin S-Glycosyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41), 16394–16397. <https://doi.org/10.1021/ja2075168>
- *Wolański, M., Donczew, R., Zawilak-Pawlik, A., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2015). oriC-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00735>
- Wu, C., Biswas, S., Garcia De Gonzalo, C. V., & van der Donk, W. A. (2019). Investigations into the Mechanism of Action of Sublancin. *ACS Infectious Diseases*, 5(3), 454–459. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00320>

- 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>
- Xie, Y., Fleming, E., Chen, J. L., & Elmore, D. E. (2011). Effect of proline position on the antimicrobial mechanism of buforin II. *Peptides*, 32(4), 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.010>
- *Xu, Z.-Q., & Dixon, N. E. (2018). Bacterial replisomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 53, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.09.006>
- Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R. I., & Hong, M. (2002). Solid-State NMR Investigations of Peptide–Lipid Interaction and Orientation of a β -Sheet Antimicrobial Peptide, Protegrin. *Biochemistry*, 41(31), 9852–9862. <https://doi.org/10.1021/bi0257991>
- 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)
- Yi, G.-S., Park, C. B., Kim, S. C., & Cheong, C. (1996). Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II. *FEBS Letters*, 398(1), 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01193-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01193-3)
- Yonezawa, A., Kuwahara, J., Fujii, N., & Sugiura, Y. (1992). Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry*, 31(11), 2998–3004. <https://doi.org/10.1021/bi00126a022>
- Yung, B. Y., & Kornberg, A. (1989). The dnaA initiator protein binds separate domains in the replication origin of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(11), 6146–6150.
- Yuzenkova, J., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Mooney, R. A., Landick, R., Farias, R. N., Salomon, R., & Severinov, K. (2002). Mutations of Bacterial RNA Polymerase Leading to Resistance to Microcin J25. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50867–50875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209425200>
- Zanetti, M., Litteri, L., Gennaro, R., Horstmann, H., & Romeo, D. (1990). Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *The Journal of Cell Biology*, 111(4), 1363–1371. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.4.1363>
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5449–5453. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>

***Souborné články jsou v seznamu použité literatury označeny hvězdičkou.**