

Bakteriocini, antimikrobni peptidi iz bakterija, kao novi lijekovi

Jerončić, Ana Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:364078>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet

**BAKTERIOCINI, ANTIMIKROBNI PEPTIDI
IZ BAKTERIJA, KAO NOVI LIJEKOVI**

Završni rad

Ana Josipa Jerončić

Split, rujan 2021.

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno – matematički fakultet

**BAKTERIOCINI, ANTIMIKROBNI PEPTIDI
IZ BAKTERIJA, KAO NOVI LIJEKOVI**

Završni rad

Ana Josipa Jerončić

Split, rujan 2021.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Bakteriocini, antimikrobni peptidi iz bakterija, kao novi lijekovi

Ana Josipa Jerončić

Sveučilišni preddiplomski studij Biologija i Kemija

Sažetak:

U zadnjih nekoliko desetljeća bakterijska rezistencija naspram antibiotika je postala jedan od gorućih zdravstvenih problema diljem svijeta. Kao potencijalni odgovor danas se, među ostalim, razmatraju antimikrobni peptidi (AMP) - multifunkcionalne molekule s direktnom antimikrobnom aktivnosti i/ili imunomodulatornim djelovanjem. Jedna važna skupina ovih peptida su bakteriocini, ribosomski sintetizirani AMP-i iz bakterija. Ovi peptidi, koje sintetiziraju gram-pozitivne i gram-negativne bakterije osim antibakterijske, pokazuju i antivirusnu, te antitumorsku aktivnost. Unatoč velikom terapijskom potencijalu, bakteriocini do danas nisu ušli u kliničku primjenu zbog nedostataka koji se povezuju s većinom poznatih AMP-a, a to su visoki troškovi proizvodnje, toksičnost naspram stanica domaćina i nestabilnost u fiziološkim uvjetima. Iz tog razloga, brojna istraživanja su fokusirana na modificiranje ovih peptida kako bi se dizajnirali i sintetizirali analozi s poboljšanim svojstvima.

Ključne riječi: antibiotici, antimikrobni peptidi, bakteriocini, multi-rezistentne bakterije

Rad sadrži: 33 stranice, 10 slika, 2 tablice, 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Mentor: doc. dr. sc. Ivica Šamanić

Neposredni voditelj: dr. sc. Tomislav Rončević

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Ivica Šamanić
izv. prof. dr. sc. Ana Maravić
dr. sc. Tomislav Rončević

Rad prihvaćen: 17.09.2021.

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Basic documentation card

University of Split

Bachelor thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacteria, as novel therapeutics

Ana Josipa Jerončić

University undergraduate study programme Biology and Chemistry

Abstract:

In the last few decades, bacterial resistance to antibiotics has become one of the largest health concerns worldwide. As a potential answer to the growing concern, antimicrobial peptides (AMPs) are being investigated. These are multifunctional molecules with direct antimicrobial activity and/or immunomodulatory properties. An important group of these types of peptides are bacteriocins, ribosomally synthesized peptides from bacteria. These peptides, which can be synthesized by gram-positive and gram-negative bacteria, show not only antibacterial, but also antiviral and anticancer activity. Even though bacteriocins show promising therapeutic potential, they are yet to be adapted into clinical use due to their shortcomings, similar as the most other known AMPs, such as high costs of production, toxicity to the host cells and low stability in physiological conditions. For that reason, current researches are focused on modifying these peptides in order to design and synthesize analogues with improved properties.

Keywords: antibiotics, antimicrobial peptides, bacteriocins, multi-drug resistant bacteria

Thesis consists of: 33 pages, 9 figures, 2 tables, 30 references. Original language: Croatian

Mentor: Assist. Prof. Ivica Šamanić

Supervisor: Dr. Tomislav Rončević

Reviewers: Assist. Prof. Ivica Šamanić

Assoc. Prof. Ana Maravić

Dr. Tomislav Rončević

Thesis accepted: September 17th 2021

Thesis deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Bakteriocini, antimikrobni peptidi, kao novi lijekovi“ izradila samostalno pod voditeljstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića i dr.sc. Tomislava Rončevića. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Ana Josipa Jerončić

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2021. godine, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivica Šamanića i dr.sc. Tomislava Rončevića predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije i kemije.

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Antimikrobni peptidi - općenite značajke	4
2.1	Fizikalno - kemijske karakteristike AMP-a.....	4
	Veličina i struktura	4
	Naboj peptida	6
2.1.1	Hidrofobnost i amfipatičnost.....	6
2.1.2	Uvijenost	7
2.1.3	Mehanizam djelovanja AMP-a	8
2.2	Mehanizam djelovanja AMP-a	8
2.2.1	Membranski aktivni AMP-i.....	8
2.2.1	Unutarstanični aktivni peptidi	10
3	Bakteriocini, antimikrobni peptidi iz bakterija	13
3.1	Klasifikacija bakteriocina	13
3.2	Biosinteza bakteriocina	15
3.3	Terapeutski potencijal bakteriocina.....	18
3.3.1	Antibakterijsko djelovanje	18
3.3.2	Antivirusno djelovanje	26
3.3.3	Antitumorsko djelovanje	26
4	Zaključak.....	28
5	Literatura.....	29

1 Uvod

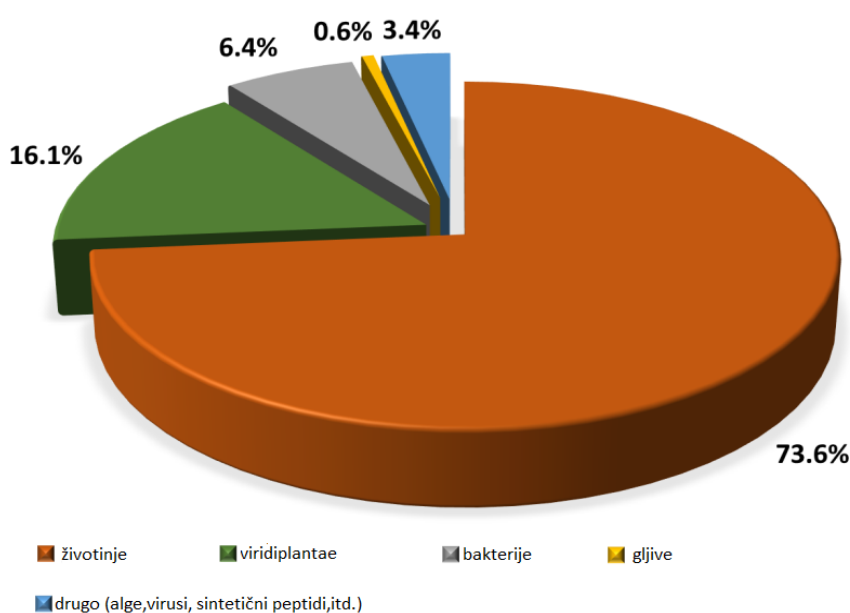
U periodu „zlatnog doba otkrića antibiotika“, 60-ih i 70-ih godina prošlog stoljeća, novi antibiotici su se relativno lako i brzo identificirali i proizvodili, te po potrebi bili upotrebljavani u kliničkoj praksi. Iz današnje perspektive, međutim, zabrinjavajući je podatak da je u zadnjih 30 godina otkriveno svega nekoliko molekula koji se mogu smatrati novim klasama antibiotika s drugačijim mehanizam djelovanja u usporedbi s lijekovima koji su trenutno u primjeni (Haney et al., 2017). Nažalost, s prekomjernim korištenjem i zlouporabom antibiotika u medicini i veterini pojavio se problem antimikrobne rezistencije (AMR) (Ferri et al., 2017). AMR nije noviji pojam, dapače, poznat je još od otkrića penicilina, no problem leži u tome što se val rezistencije širi velikom brzinom (Cavera et al., 2015). Naime, kroz četiri milijarde godina evolucije mikrobnog svijeta je akumulirao veliku količinu metaboličkih i zaštitnih mehanizama, koji se mogu aktivirati kao odgovor na vanjske utjecaje. Evolucijski odgovor na "selektivni pritisak" koji predstavljaju antimikrobni lijekovi, osnova je brzog razvoja rezistencije kod bakterija i virusa, te stvaranja otpornog potomstva koje će postupno zamijeniti ne-rezistentne prethodnike (Ferri et al., 2017). Primjerice, penicilin-rezistentni *Staphylococcus* izoliran je već 1940. godine, prije nego je počela masovna proizvodnja i uporaba ovog antibiotika, dok je meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) izoliran svega dvije godine nakon prve uporabe metecilina 1960. god. (Ferri et al., 2017).

Jasno je da su potrebna nova rješenja za uspješnu borbu protiv multi-rezistentnih bakterija, a brojne istraživačke grupe diljem svijeta nude odgovore u vidu terapije s derivatima iz biljaka (Vaseeharan & Thaya, 2014; Zhao et al., 2013), terapeutima na bazi RNA (Bajan & Hutvagner, 2020; Burnett & Rossi, 2012), nanočesticama (Baptista et al., 2018; Brigger et al., 2012), bakteriofagima (Furfaro et al., 2018; Golkar et al., 2014), ali i antimikrobnim peptidima (AMP) (Cavera et al., 2015; Soltani et al., 2021). To su raznolike multifunkcionalne skupine molekula, često kodirane genima, koje nalazimo u svim organizmima, te koje imaju direktnu antimikrobnu aktivnost, kao i imunomodulatorna svojstva (Cotter et al., 2013).

Za otkriće AMP-a zaslužan je Dubos, koji je 1939. ekstrahirao antimikrobne spojeve iz soja *Bacillus*. Kroz sljedeće dvije godine, uspješno su ekstrahirana 3 AMP-a: gramicidin, izoliran iz roda *Bacillus*, te tirocidin i purotionin, koji su izolirani iz biljke roda *Triticum aestivum* (Bahar, 2013). Prvi izolirani AMP životinjskog podrijetla je bio defensin, koji je izoliran iz zečjih leukocita 1956. god. Sljedećih godina uspješno su izolirani bombinin iz epitela velike zvonaste

žabe (*Bombina maxima*) i laktoferin iz kravljeg mlijeka, te se također dokazalo da ljudski leukociti sadrže AMP u svojim lizosomima (Bahar, 2013).

Obilje AMP-a možemo naći u svim eukariotskim organizmima uključujući gljivice, alge, biljke, beskrležnjake i kralježnjake (Rončević et al., 2019). Prema podacima u CAMP_{R3}, specijaliziranoj bazi podataka o antimikrobnim peptidima, do danas je otkriveno ~8000 AMP-a (Waghu et al., 2015). Većina peptida je identificirana u životinjama (74%), a naročito bitan i bogat izvor su žabe sa ~2000 identificiranih sekvenci (Slika 1). AMP-i su prisutni i u prokariotima, podjednako u gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama, koje sintetiziraju peptide koje nazivamo bakteriocini (Cotter et al., 2013).



Slika 1. Distribucija AMP-ova u carstvima. Slika preuzeta iz Rončević et al. (2019).

U višim se organizmima prirodni AMP-i često nazivaju "peptidi obrane domaćina" (*host defense peptides* - HDP) ili točnije, kao „peptidi urođenog obrambenog imunološkog sustava (*innate defense regulatory* - IDR *peptides*)“ (Rončević et al., 2019). Antimikrobni peptidi su idealna prva linija obrane jer se peptidi sintetiziraju mnogo brže od proteina; mogu se sintetizirati više od 100 puta brže od imunoglobulina M (jedan od izotipova antitijela kralježnjaka) (Yaxin Li, 2020), pod pretpostavkom konstantne brzine stvaranja peptidne veze. Nadalje, mali peptidi difundiraju brže od velikih molekula proteina i imunoloških stanica (Papagianni, 2003). Sposobni su inhibirati gram-negativne i gram-pozitivne bakterije, stoga pružaju novu strategiju za borbu protiv istih, (Baindara et al., 2018) te istovremeno mogu dati

velik broj prototipova peptida za proučavanje i biokemijske manipulacije (Fry, 2018). Njihova fiziološka funkcija u bakterijama uključuje inhibiciju rasta kompeticijskih mikroorganizama, ubijajući ih, čak i u nanomolarnim koncentracijama, dok su bakterije koje sintetiziraju takve peptide imune na iste.

2 Antimikrobni peptidi - općenite značajke

2.1 Fizikalno - kemijske karakteristike AMP-a

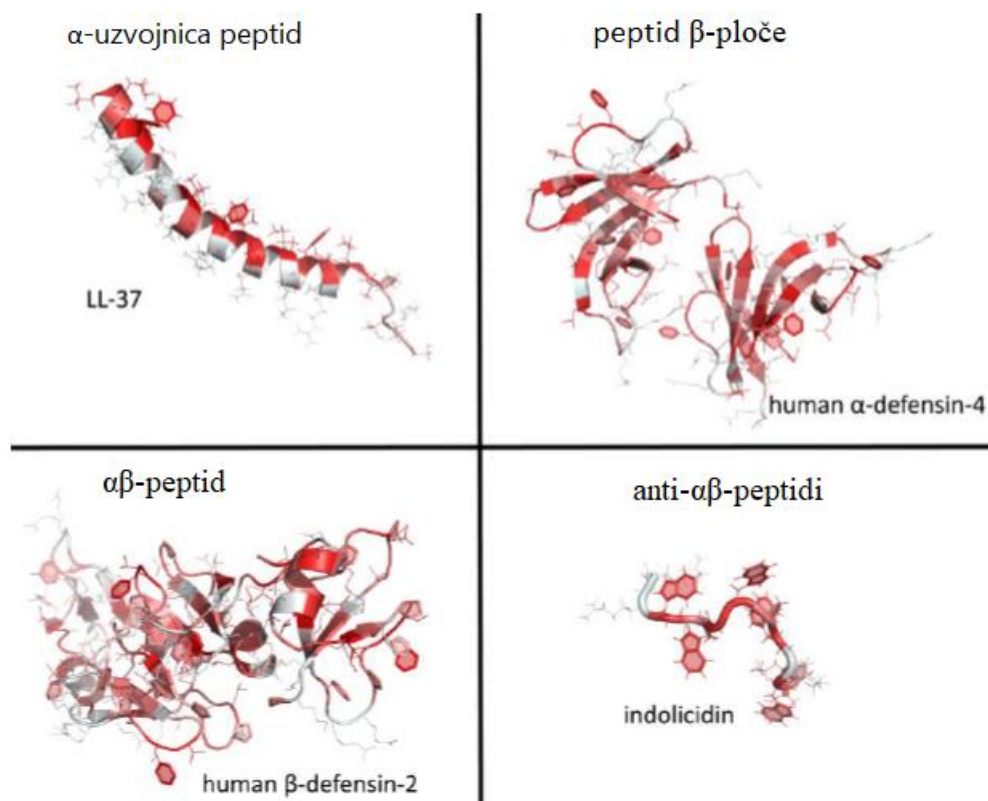
Poznavanje fizikalno-kemijskih karakteristika AMP-a je osnova za razumijevanje aktivnosti i mehanizma djelovanja peptida. Na osnovu toga možemo djelomično predvidjeti način interakcije s molekulama fosfolipida koje čine lipidni dvosloj staničnih membrana, te koreliraju s biološkom aktivnošću i specifičnošću peptida. Međutim, bitno je napomenuti da mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen, čemu ide u prilog i činjenica da čak i peptidi koji su strukturno jako slični mogu imati bitno različite mehanizme djelovanja (npr. buforin i magainin 2). Zbog izrazite kompleksnosti, interakcija AMP-a s drugim komponentama stanične membrane još je veća nepoznanica (Rončević et al., 2019).

Veličina i struktura

2.1.1 Iako su antimikrobni peptidi produkti koje sintetiziraju različiti organizmi, posjeduju određene značajke koje ih međusobno povezuju i karakteriziraju. Primjer takve karakteristike je veličina i dužina peptidnog lanca; većinom su građeni od 20 – 60 aminokiselinskih ostataka (Haney et al., 2017). Duljina peptidnog lanca je bitna pri njegovoj funkciji, točnije pri formiranju amfipatske strukture (vidi dolje), za što je potrebno minimalno 7,8 aminokiselinskih ostataka. Jedan od najkraćih zabilježenih peptida s antimikrobnom aktivnosti je PGLa-H, izoliran iz kože afričke žabe vrste *Xenopus laevis*, građen od samo 10 aminokiselinskih ostataka (Rončević et al., 2019).

S obzirom na njihovu sekundarnu strukturu, peptide dijelimo na peptide α -uzvojnice, $3/10$ uzvojnice, π -uzvojnice, beta-ploče i neuređene uzvojnice (engl. *disordered coil*) (koja se može odnositi na cijeli peptid ili samo na njegove dijelove). Ukratko, navedena klasifikacija ih u osnovi dijeli na peptide α -uzvojnice, β -ploču i produžene (Rončević et al., 2019), a vodeći se klasifikacijom koju su osmislili Wang et al. (Wang, 2017) AMP-e dijelimo u peptide α -uzvojnice, peptide β -ploče, $\alpha\beta$ -peptide i ne- $\alpha\beta$ -peptide (Slika 2).

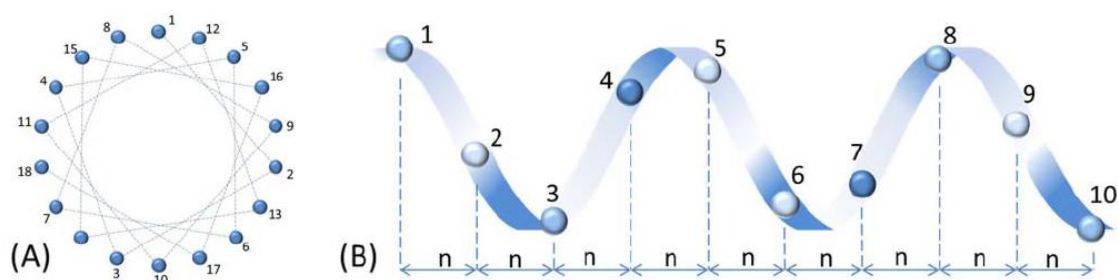
Određene vrste AMP-a ne poprimaju sekundarnu strukturu u vodenom okolišu, nego tek kada su izložene lipidima, kao što je npr. bakterijska stanična membrana, ili miclele natrijevog dodecil sulfata. Aktivna infekcija ili bakterijski endotoksin, koje detektiraju stanice domaćina, induciraju sintezu takvih AMP-a kao primarni imunološki odgovor (Fry, 2018).



Slika 2. Prikaz četiri osnovne strukture antimikrobnih peptida; α -uzvojnica, struktura β -ploče, struktura $\alpha\beta$ -peptida, te ne- $\alpha\beta$ -peptida. Slika preuzeta iz Rončević et al. (2019).

Peptidi strukture α -uzvojnice (Slika 3) su najviše proučeni AMP-i, te su jedni od onih koji ne poprimaju aktivnu strukturu odmah nakon sinteze, već u anizotropnom okruženju poput stanične membrane. Na usvajanje strukture α -uzvojnice utječu određene aminokiseline u primarnoj strukturi (poput leucina, alanina, lizina), hidrofobni aminokiselinski ostaci, te formiranje solnih mostova (Rončević et al., 2019).

Peptidi β -ploče sastoje se od najmanje dva β -lanca (Bahar, 2013) koji mogu biti orijentirani paralelno ili antiparalelno. Radi stabilizacije strukture, povezani su intramolekulskim disulfidnim mostovima. Određeni peptidi iz ove kategorije, poprimaju strukture β -ukosnice u kojima su lanci povezani s 2 disulfidna mosta (Cys-1 i Cys-4, te Cys-2 i Cys-3). Kao i peptidi α -uzvojnice neki od ovih peptida poprimaju strukturu tek kad se nađu u anizotropnom uređenju, najčešće u prisustvu membrane (Edwards et al., 2016).



Slika 3. Shematski prikaz peptida strukture α -uzvojnice. (A) Pogled na strukturu od gore. Kut između dvije uzastopne aminokiseline u slijedu je 100 stupnjeva. Isprekidane crte prikazuju dvije susjedne aminokiseline u primarnoj strukturi. (B) Bočni pogled na strukturu; udaljenost između dvije susjedne aminokiseline, "n", iznosi 0,15 nm. Slika preuzeta iz Bahar et al. (2013).

Naboj peptida

2.1.2 Parametri poput naboja su ključni u mehanizmu djelovanja peptida. Antimikrobni peptidi mogu biti kationske ili anionske molekule, ali u većini slučajeva riječ je o kationskim peptidima. Ova kationska priroda im omogućava uspješnu interakciju sa staničnim membranama, koje su negativno nabijene, te ostvaruju s njima elektrostatske veze. Neto naboj ima značajan utjecaj na afinitet s kojim se molekula veže za ciljno mjesto, te varira od +16 do -6 (Rončević et al., 2019). Smatra se da naboj peptida utječe na njihovu antimikrobnu aktivnost, stoga veće ili niže vrijednosti izvan navedenog raspona mogu rezultirati smanjenom aktivnošću prema bakterijskim stanicama ili povećanom toksičnošću prema stanicama domaćina. Odnos između ovih parametara najviše je istražen kod peptida α -uzvojnice. Povećani pozitivni naboj peptida, zbog povećane gustoće naboja (točnije nakupljanja pozitivnih naboja u jednom dijelu strukture) dovodi do međusobnog odbijanja. Takvi uvjeti smanjuju mogućnost formiranja spiralne zavojnice, čime se smanjuje aktivnost peptida (Rončević et al., 2019). Također, i negativni naboj može imati negativan utjecaj na njihovu aktivnost zbog mogućnosti elektrostatskog odbijanja peptida i stanične membrane (Edwards et al., 2016). U globalu, raspodjela naboja peptida ne bi trebala znatno utjecati na njihovu aktivnost koja svakako ovisi o ukupnom naboju AMP-a. S druge strane, raspodjela naboja može biti bitna u slučajevima kad onemogućava formiranje sekundarnih struktura (Rončević et al., 2019).

Hidrofobnost i amfipatičnost

Još jedan parametar vrijedan proučavanja je udio hidrofobnih aminokiselinskih ostataka u strukturi peptida (Rončević et al., 2019). Hidrofobne aminokiseline olakšavaju peptidima interakciju s masnim kiselinama unutar fosfolipidnog dvosloja staničnih membrana, te

omogućuju efikasniju permeabilizaciju istih. Rosenfeld et al. (2010) su pokazali da je odnos između hidrofobnosti i mogućnosti permeabilizacije staničnih membrana više-manje linearan. Naravno, kao i kod drugih fizikalno-kemijskih parametara, postoji optimalni raspon hidrofobnosti koji je bitan za aktivnost peptida. Prevelika hidrofobnost može negativno utjecati na peptide onemogućavajući uspješno formiranje sekundarne strukture (slično kao i prevelika gustoća naboja), (Rončević et al., 2019) dok relativno niska hidrofobnost umanjuje mogućnost vezivanja za membrane stanica domaćina, što rezultira niskom toksičnošću (Edwards et al., 2016). Isto tako, treba naglasiti da peptidi sa sličnim postotkom hidrofobnosti različito stupaju u interakciju s membranom, a peptidi s istom aktivnošću imaju značajne razlike u postotcima hidrofobnosti (Rosenfeld et al., 2010), što još jednom podcrtava kompleksnost mehanizma djelovanja AMP-a.

Amfipatičnost peptida igra bitnu ulogu pri aktivnosti peptida, čak i više nego njegova hidrofobnost. Peptide smatramo amfipatskim ako u svojoj strukturi sadrže hidrofobne i polarne aminokiselinske ostatke, koji su unutar molekule prostorno odvojeni. Točnije, jedan kraj peptida je hidrofoban, dok je drugi kraj polaran i hidrofilan. Zahvaljujući prostornoj razdvojenosti hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina, peptidi se lakše ugrađuju među molekule koje izgrađuju stanične membrane (Edwards et al., 2016). Kad je u pitanju aktivnost peptida, amfipatičnost mora biti precizno balansirana kako bi se dobio najbolji omjer antimikrobne aktivnosti i potencijalne citotoksičnosti. Generalno gledajući, poželjni najveći postotak hidrofobnih aminokiselina u peptidu je ~60% jer se povećanjem ovog postotka ne povećava potentnost peptida, dok toksičnost naspram stanica domaćina izrazito raste (Rončević et al., 2019).

Uvijenost

Uvijenost predstavlja sposobnost AMP-a da formira strukturu α -uzvojnice, što utječe na njegovu biološku aktivnost. Općenito, povećanje stabilnosti strukture α -uzvojnice rezultira s poboljšanom antimikrobnom aktivnosti. Naime, navedena struktura peptida ima i svoju negativnu stranu. Povećana sklonost stvaranju spirale rezultirati će stvaranjem "ljepljivih" molekula uslijed izlaganja hidrofobnog sektora vodenoj okolini. Takve molekule imaju tendenciju oligomerizirati ili stupiti u interakciju s drugim hidrofobnim površinama. U oba slučaja to negativno utječe na aktivnost peptida i njegovu interakciju sa ciljnom membranom (Rončević et al., 2019).

Uvijenost više utječe na citotoksičnost peptida nego na njegovu antimikrobnu aktivnost (Bahar, 2013). Stoga, pri modifikaciji sintetskih peptida, možemo smanjiti uvijenost adicijom

D-aminokiselina u strukturu, tj. zamjenjivanjem L-aminokiseline s njenim D-enantiomerom (Rončević et al., 2019). Uvijenost se također može smanjiti ugradnjom prolina i glicina, koji imaju niže sklonosti formiranja zavojnice (Bahar, 2013). Rezultat su peptidi sa smanjenom hemolitičkom aktivnosti i pojačanom stabilnosti protiv proteolitičkog cijepanja (Bahar, 2013).

2.2 Mehanizam djelovanja AMP-a

Antimikrobni peptidi, kao prva linija obrane raznih organizama, su razvili raznolike mehanizme obrane protiv patogena. Najpoznatiji su po svom mehanizmu razaranja bakterijske membrane formiranjem transmembranskih pora, pri čemu najčešće dolazi do isticanja staničnog sadržaja i smrti stanice. Uz to, posjeduju razne unutarstanične mehanizme, pri čemu najčešće inhibiraju unutarstaničnu sintezu proteina, nukleinskih kiselina, stanične membrane ili procese nabiranja proteina, diobu stanice i sl. (Le et al., 2017).

Mnoštvo čimbenika utječu na aktivnost AMP-a, poput koncentracije peptida, vrste i životne faze bakterije i sl., a do sada se pokazalo da veliki broj AMP-a posjeduje dva ili više mehanizma djelovanja. Primjerice, peptidi s različitim primarnim sekvencama i sekundarnim strukturama mogu imati iste mehanizme djelovanja (npr. histatin 5 i humani neutrofil defensin-1), dok peptidi sa sličnim sekvencama mogu imati različite mehanizme djelovanja (npr. buforin i magainin-2) (Rončević et al., 2019). S tim u vidu, zaključujemo da su membranski i nemembranski mehanizmi djelovanja izrazito komplicirani procesi i da je naše trenutno razumijevanje istih samo djelomično (Le et al., 2017).

2.2.1 Membranski aktivni AMP-i

Antimikrobni peptidi se vežu za staničnu membranu, odnosno ciljne molekule stanične membrane, bez posredovanja receptora. Kod gram-pozitivnih bakterija taj proces je olakšan, dok je kod gram-negativnih bakterija mehanizam kompliciraniji. Kao što je već ranije navedeno, AMP-i su kationske molekule koje se elektrostatski vežu za ciljne stanice, a u slučaju gram-negativnih bakterija najprije dolaze u kontakt s lipopolisaharidima vanjske membrane. Mehanizam djelovanja uključuje izmjenu naboja, gdje se kationski peptidi natječu s Ca^{2+} i Mg^{2+} ionima vezanim za lipopolisaharide. Navedeni lipopolisaharidi su vezani za vanjske proteine membrane, što peptidima omogućava dopiranje do unutrašnje membrane (Bechinger & Gorr, 2017).

Najnovija istraživanja, obavljena korištenjem fluorescentnih sonda ukazuju da se AMP-i ne distribuiraju na staničnoj površini, već ciljno napadaju mjesta povezana sa staničnom diobom pregradnjom stanične membrane ili mjesta sekrecije. Ovim načinom ometaju navedene procese

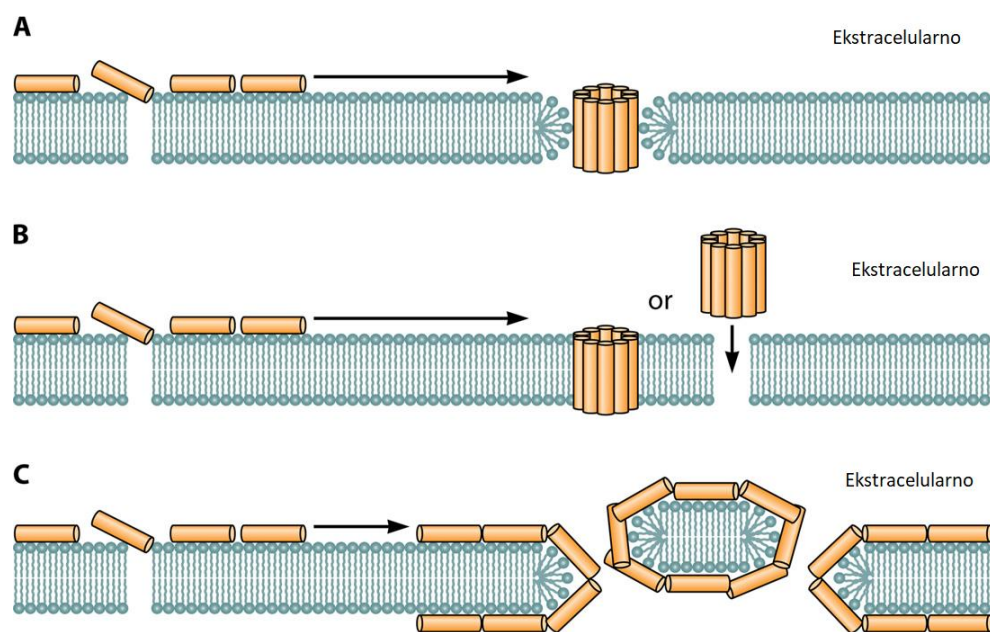
ili uzrokuju lizu stanica. Kad je riječ o prodiranju stanične membrane bakterija, AMP-i napadaju negativno nabijene komponente stijenke, poput teikoične kiseline i lipoteikoične kiseline. Veći unutarnji negativni transmembranski potencijal u bakterijama dodatno pojačava elektrostatsku privlačnost (Bechinger & Gorr, 2017). Eukariotske membrane, za razliku od bakterijskih, sastoje se od *zwitter*-ionskih (u cjelini neutralnih) lipida, što djelomično objašnjava selektivnost peptida između eukariotskih i prokariotskih stanica.

Mehanizam djelovanja AMP-a se temelji na lizi bakterijske stanične membrane, gdje razlikujemo tri različita načina djelovanja: *i*) mehanizam toroidalnih-pora, *ii*) *barel-stave* model i *iii*) *carpet* model. Ova tri predložena mehanizma su svojevrsni pokušaj da raščlanimo kompleksne mehanizme djelovanja peptida na staničnu membranu. Danas se, međutim, smatra da se mehanizam djelovanja peptida ne može definirati kao niz točno određenih događaja koji dovode do stvaranja pore, već kao svojevrsni „mehanički krajolik“ koji varira ovisno o varijablama poput koncentracije peptida, temperature, pH, ionske snage i sastava stanične membrane (Rončević et al., 2019).

Kod mehanizma toroidalnih pora, nakon vezanja jednog peptida slijedi kaskadna agregacija sa slijedećim nadolazećim peptidima, te se lipidne jedinice stanične membrane preklope prema unutra, tvoreći kanal za AMP (Le et al., 2017). Unutar pore, hidrofobni aminokiselinski ostaci su umetnuti među acilne lance, a hidrofilno područje peptida tvori toroidalnu poru. Za AMP-e koji posjeduju navedeni mehanizam poznato je da imaju kratki životni vijek, što omogućava konstitutivnim AMP-ima da se ugrade u membrane, ili pak miceliziraju iste (Slika 4) (Rončević et al., 2019).

Barel-stave model također djeluje na način da formira poru u staničnoj membrani ciljne stanice, ali mehanizam se ipak razlikuje. Naime, kod ovog modela peptidni monomeri koji se unose su paralelni obzirom na molekule koje grade membranu. Lumen transmembranskog kanala grade hidrofilni dijelovi peptida, dok hidrofobni dijelovi čine vanjski dio kanala (Le et al., 2017). Ovaj mehanizam je također najstariji predloženi mehanizam djelovanja, ali je i najrjeđi (Slika 4) (Rončević et al., 2019).

Posljednji mehanizam je *carpet* model. U ovome mehanizmu peptidi se prvo akumuliraju na površini ciljne stanice, gdje induciraju lokalnu slabost, te nakon toga razaraju membranu (Le et al., 2017). Ovaj mehanizam omogućuje formiranje micela od ciljne membrane, poput deterdženta (Slika 4) (Rončević et al., 2019).



Slika 4. Mehhanizmi djelovanja antimikrobnih peptida. Pod (A) je prikazan model toroidalnih pora, gdje se formira kanal unutar stanične membrane unutarnjim preklapanjem lipida membrane. „Barel-stave“ model je prikazan pod (B); peptidi se paralelno uvlače unutar membrane formirajući hidrofилnu poru. Prikaz pod (C) prikazuje „carpet“ model, gdje se peptidi prvo vežu na vanjski dio membrane, te prodirući kroz istu formiraju micelle. Slika preuzeta iz Le et al. (2017).

2.2.1

Unutarstanični aktivni peptidi

U zadnje vrijeme otkriva se sve više AMP-a koji posjeduju unutarstanične mehanizme djelovanja. Ovaj tip AMP-a djeluje na ciljne komponente unutar citoplazme, inhibirajući stanične procese. Prvi korak njihovog mehanizma se temelji na prolasku kroz staničnu membranu, direktnom penetracijom ili endocitozom. Vežanjem peptida na receptor, dolazi do invaginacije membrane (pomoću proteina membrane klatrina ili kaveolina), što rezultira formiranjem vezikule i endocitozom peptida. Drugi način unošenja peptida endocitozom je mikropinocitoza, gdje dinamin (enzim odgovoran za endocitozu; vezan za membranu) olakšava formaciju makropinosoma preko stanične membrane (Le et al., 2017).

Inhibitori sinteze nukleinskih kiselina (Slika 5) i metabolizma su primjer antimikrobnih peptida s unutarstaničnim mehanizmom, te posjeduju veliki afinitet vezanja za DNA ili RNA. Razna istraživanja su napravljena proučavajući AMP-e navedenog mehanizma djelovanja, čime je otkriveno da njihovom penetracijom kroz membranu ne dolazi do stanične smrti. Povećavanjem koncentracije peptida dolazi do povećane i kontinuirane permeabilizacije kroz membranu, nakon čega slijedi njihovo inhibicijsko djelovanje (Le et al., 2017). Ono što je

interesantno kod DNA-vezujućih peptida je činjenica da većina njih, na svom C-terminalnom ili N-terminalnom kraju, posjeduju sekvence homologne histonima (DNA-vezujući proteini). Uzmimo indolicin za primjer, koji djeluje vezujući se na DNA, čime inhibira replikaciju i transkripciju. Određeni peptidi djeluju mehanizmom inaktiviranja enzima DNA-giraze (čija je funkcija odmotavanje i zamotavanje DNA), blokirajući hidrolizu ATP-a, što inhibira DNA replikaciju (Subbalakshmi & Sitaram, 1998).

Mikrocin, J25, djeluje na način da se veže za beta podjedinicu RNA polimeraze, što sprečava vezanje supstrata za navedeni katalitički centar (Le et al., 2017). Navedeni peptid također ima bitnu ulogu u inhibiciji diobe stanica. Istraživanjima je otkriveno da *E. coli* tretirane s istim peptidom se produlje, ali ne dođe do odvajanja stanica. Slično njemu, ljudski α -defensin nakon permeabilizacije membrane uzrokuje unutarstaničnu štetu, pri čemu dolazi do elongacije stanice i onemogućene diobe (Le et al., 2017; Solbiati et al., 1996).

Također je bitno spomenuti AMP-e koji inhibiraju proteaze (Slika 5) stanica domaćina i bakterija. Metaloproteaze matriksa (MMP) služe kao glavni enzimi izvanstaničnog matriksa, te disregulacijom MMP-a i bakterijskih proteaza dolazi do razvoja oralnih bolesti, artritisa, paradontitisa i tumorskih metastaza (Le et al., 2017). Stoga, peptidi koji su sposobni inhibirati proteaze su antimikrobni i smanjuju virulenciju. Uzmimo za primjer histatin 5, čije je izravno antibakterijsko djelovanje opisano za *Streptococcus mutans*, jednu od glavnih oralnih bakterija uključenih u razvoj karijesa (MacKay et al., 1984).

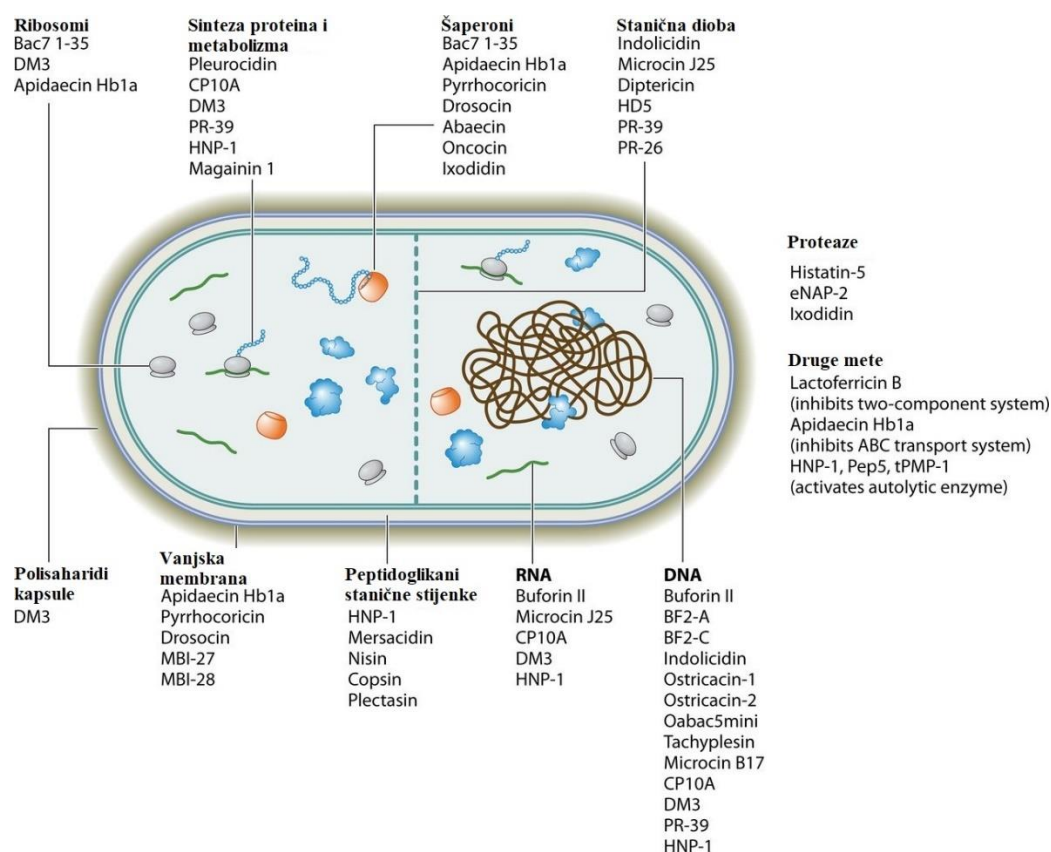
Sinteza proteina se sastoji od niza procesa, od DNA transkripcije na mRNA, translacije mRNA pomoću ribosoma, do polipeptida koji se zatim sakupljaju u svoje strukture čime dobivamo funkcionalne proteine. Bilo kakva blokada ovih procesa obustavlja sintezu proteina, na čemu se upravo temelji mehanizam određenih AMP-a (npr. Bac7 koji blokira translaciju proteina vezujući se za ribosome) (Le et al., 2017; Mardirossian et al., 2014). Određeni peptidi, poput CA10A (sintetička varijanta indolicina), su se također pokazali efikasima u inhibiciji sinteze DNA, RNA i proteina istovremeno (Friedrich et al., 2001).

Peptidi poput pyrrohokoricina i apidaecina djeluju mehanizmom inhibicije šaperona (Slika 5), proteina čija je uloga savijanje i uvijanje polipeptidnog lanca proteina, dovodeći ga u stabilnu konformaciju. Oba peptida inhibiraju DnaK i GroEL šaperone, te ometaju ATP-aznu aktivnost DnaK (Kragol et al., 2001; Le et al., 2017; Li et al., 2006).

Uz razaranje stanične membrane, antimikrobni peptidi su u mogućnosti i spriječiti njenu sintezu (Slika 5). Naime, lipid II je bitna komponenta stanične membrane. U kontaktu je sa

citoplazmatskom stranom stanice, te služi u transportu podjedinica stanične stijenke preko membrane, tako da se mogu polimerizirati i uklopiti u stijenku. Razni peptidi svojim mehanizmom inhibiraju sintezu lipida II ili sprječavaju uklapanje lipida u staničnu membranu, čime je također obustavljena sinteza stijenke (Le et al., 2017).

Još jedna meta AMP-a je hidrofobni lipid A kojeg nalazimo kod gram-negativnih bakterija. Ovaj lipid je komponenta endotoksina, te služi kao sidro lipopolisaharidnog monomera (LPS). Tijekom infekcije ili antimikrobne kemoterapije može doći do odvajanja LPS-a. U slučaju endotoksemije (izlučivanja endotoksina u krv) može doći do prekomjerne sinteze upalno-stimulacijskih molekula, pri čemu može doći do septičnog šoka. Peptidi neutraliziraju endotoksin (Slika 5) tako što se vežu za njega, što može zaustaviti aktivaciju upalnih procesa. Amfipatičnost i veliki udio pozitivnih naboja su bitni čimbenici pri vezivanju peptida za LPS (Le et al., 2017).



Slika 5. Ilustracija prikazuje glavne dijelove stanice koje ciljaju AMP-i u bakterijama. Brojni AMP-i mogu inhibirati više unutarstaničnih meta radi postizanja visoke antibakterijske učinkovitosti. Slika preuzeta iz Lee et al. (2017).

3 Bakteriocini, antimikrobni peptidi iz bakterija

Bakterije proizvode 2 tipa AMP-a: ribosomski sintetizirane, tzv. bakteriocine, i ne-ribosomski sintetizirane (Chikindas et al., 2018). Bakteriocini su velika skupina peptida koji posjeduju široki spektar bioaktivnosti (većinom antibakterijske), a služe u obrani bakterija inhibirajući rast kompetitivnih mikroorganizama, uzrokujući smrt stanice. Posjeduju visoku antimikrobnu aktivnost u nanomolarnim koncentracijama; u usporedbi s antimikrobnim eukariotskim peptidima imaju 10^2 - 10^3 puta veću aktivnost (Kaur & Kaur 2015).

3.1 Klasifikacija bakteriocina

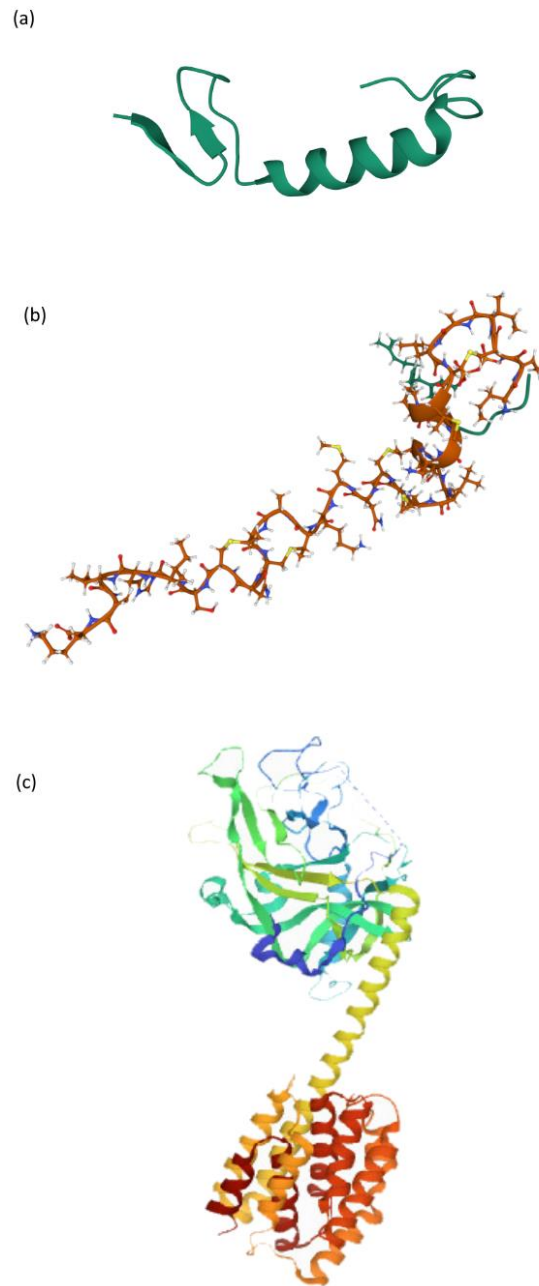
Bakteriocine dijelimo u tri klase s obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva i strukturu. Iako su u početku bili klasificirani u četiri klase, četvrta klasa, koja se sastojala od velikih kompleksa sa ugljikohidratnim ili lipidnim dijelovima, maknuta je i klasificirana kao bakteriolizini (Kumariya et al., 2019).

Bakteriocini klase I su obično toplinski stabilni peptidi koji sadrže 19-50 aminokiselina (masa < 5kDa), koje su post-traslacijski modificirane (Kaur & Kaur, 2015). Osim toga, neproteinogene aminokiseline, poput lantionina, β -metilantionina i sl. su često sastavni dio ovih peptida. Klasu I dalje dijelimo na manje podrazrede, obzirom na naboj: Ia (lantibiotici), Ib (labirintopeptini) i Ic (sanktibiotici). Nizin je najpoznatiji predstavnik bakteriocina I. klase (Kumariya et al., 2019). (Slika 6)

Klasa II sadrži male, toplinski stabilne, nemodificirane peptide koji su dalje podijeljeni u podklasu IIa, IIb, IIc i IId. Njihova struktura je najčešće α -uzvojnica, što im olakšava ugradnju u membranu ciljne stanice (Kaur & Kaur, 2015). Klasa IIa uključuje i bakteriocine slične pediocinu, a čine najdominantniju skupinu unutar klase IIa. Bakteriocini klase IIb su nemodificirani i u svojoj strukturi sadrže dva peptida. Klasu IIc čine kružni bakteriocini, dok klasu IId čine nemodificirani, linearni bakteriocini, među koje spada i baktofencin A s jedinstvenim značajkama. Vrlo je kationski nabijen i sličan je nekim eukariotskim kationskim antimikrobnim peptidima, a osim toga može smanjiti negativni naboj stanične stijenke, ometajući tako interakciju između bakteriocina i stanice (Kumariya et al., 2019). (Slika 6)

O klasi III bakteriocina imamo jako malo informacija. Poznato nam je da su to molekule velike molekulske mase (> 30 kDa), osjetljive na visoke temperature. Primjeri iz ove klase čine kolicin, kojeg proizvodi *E. coli*, helveticin M i helveticin J kojeg proizvode bakterije *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* i *E. faecalis*. Veliki potencijal ima bakteriocin

helveticin M, za kojeg je nedavno otkriveno da remeti staničnu stijenku gram-pozitivnih bakterija i vanjsku membranu gram-negativnih bakterija (Kumariya et al., 2019). (Slika 6)



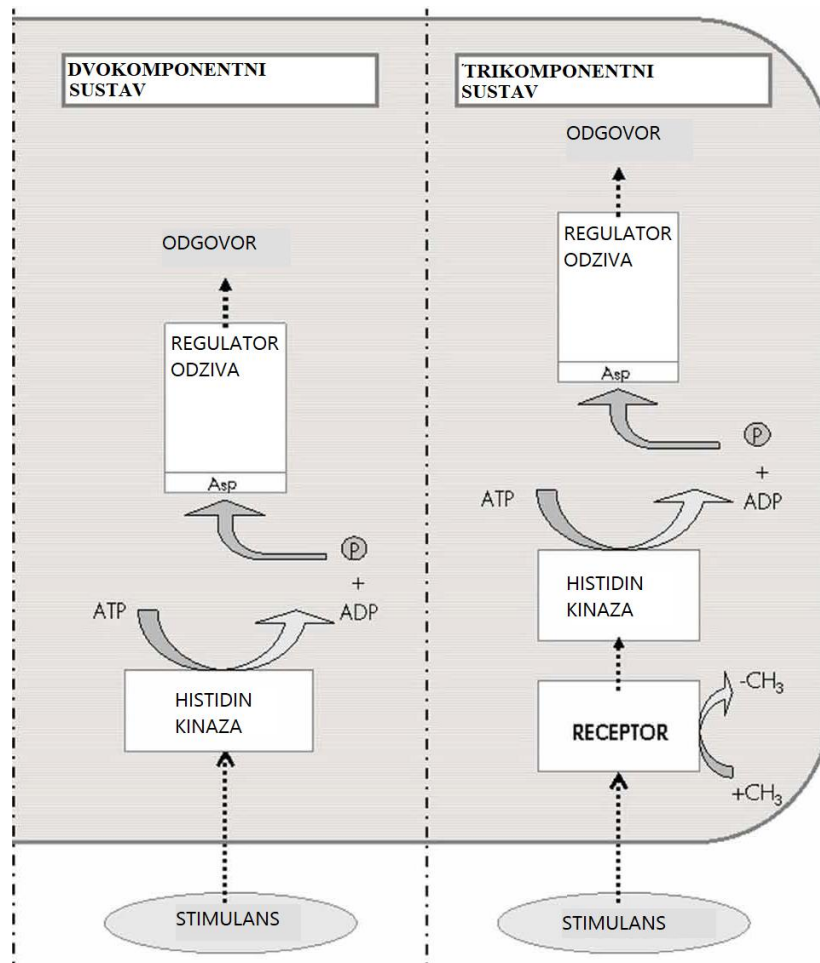
Slika 6. Prikaz peptida. (a) klase I; nizin-lipid II kompleks (PDB ID:1WCO), (b) klase II; sakacin (PDB ID: 1OG7), (c) klase III; kolicin B (PDB ID:1RH1). Slike preuzete iz PDB baze podataka (Berman, 2000).

3.2 Biosinteza bakteriocina

AMP-i su genetski kodirani i ribosomski sintetizirani ili se mogu sastaviti pomoću velikih multi-funkcionalnih enzima, ne-ribosomskih peptidnih sintetaza (NRPS) (Rončević et al., 2019). Geni koji kodiraju sintezu i imunitet bakteriocina su organizirani u operon klastere te se nalaze na kromosomima ili plazmidima, ili drugim mobilnim genetičkim elementima (Negash & Tsehai, 2020). Ti geni također kodiraju prekursore bakteriocina, koji se cijepaju, te poslije modificiraju post-translacijski. Time se dobiva zreli bakteriocin, te ovisno o vrsti, modifikacije variraju (Rončević et al., 2019).

Kao što je već prije spomenuto, bakteriocini su sintetizirani u obliku inaktivnih prekursor peptida s ekstenzijom na njihovom N-terminalnom kraju koju nazivamo *leader* peptid. Ekstenzija *leader* peptid ima važne funkcije, jer to je mjesto kojeg enzimi prepoznaju pri biosintezi. Također, štiti bakteriocine od bakterijske inhibitorne aktivnosti, i osigurava im stabilnu konformaciju (Perez et al., 2018). Ekstenzija *leader* peptida je anionske prirode, za razliku od peptida koji je kationske. Ova činjenica nam je bitna za mehanizam djelovanja peptida (Rončević et al., 2019). AMP može ostati neaktivan sve dok se ne prenese na mjesto infekcije, gdje se proteolitički oslobađa (Rončević et al., 2019). Geni za modifikaciju i izvoz nalaze se u blizini gena za biosintezu bakteriocina.

Genska ekspresija ovih operona je auto-inducibilna, pa je često regulirana regulatornim sustavom, koji može biti dvokomponentni ili trikomponentni (Slika 7), a služe za prijenos signala. Prototipni dvokomponentni sustav sastoji se od senzora kinaze koja reagira na određene signale mijenjanjem fosforiliranog stanja druge komponente, regulatora odziva. U trikomponentnim sustavima, prethodno histidin kinazi se nalazi receptor koji prima signale, te ih prenosi dalje niz sustav (Lahoz-Beltra et al., 2014) (**Error! Reference source not found.**). Ako uzmemo nizin kao primjer, on služi kao auto-indikator za ekspresiju svojih gena, na način da aktivira dvokomponentni regulatorni sustav (Kumariya et al., 2019).



Slika 7. Prikaz dvokomponentnog (lijevo) i trikomponentnog sustava (desno). Slika preuzeta iz Lahoz-Beltra et al. (2014).

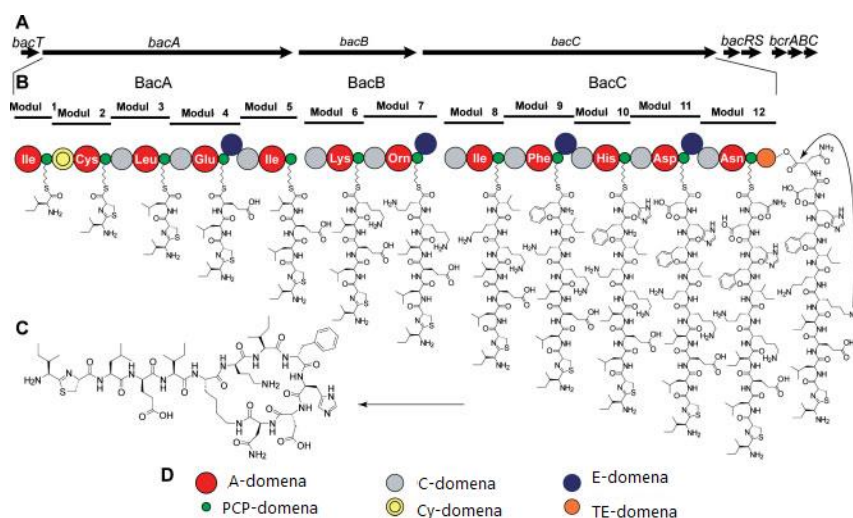
Među velikim brojem bakteriocina se nalaze i *circular* (kružni) i *leaderless* (bez *leader* peptida) bakteriocini, o kojima se jako malo zna, ali su jako interesantni zbog svog mehanizma djelovanja. *Circular*, tj. kružni bakteriocini, su prepoznatljivi po svojoj karakterističnoj građi gdje su njihovi N- i C-terminalni krajevi kovalentno povezani. Ova skupina bakteriocina prepoznatljiva je po specifičnom preklopu, tzv. *saposin foldu*. Ovakva struktura peptidima daje povećanu stabilnost protiv termičkog stresa, promjene pH i povećanu rezistencija od djelovanja proteolitičkih enzima. U navedenoj klasifikaciji postoji i podjela na manje podskupine, grupu I kružnih bakteriocina, kationske molekule visoke izoelektrične točke ($pI > 9$), te grupu II, hidrofobne peptide sa nižom električnom točkom ($pI < 7$; utjecaj veće količine kiselih aminokiselinskih ostataka). Također, grupa II pokazuje veliku međusobnu homolognost, te imaju duže *leader* peptide (kratki peptid prisutan na N-terminalnom kraju novo-sintetiziranog peptida) (Perez et al., 2018).

Pod-klasa bakteriocina koja ne sadrži navedeni nastavak, te koji su zbog iste karakteristike dobili svoj naziv, su *leaderless* bakteriocini. Navedeni peptidi nakon sinteze ne podliježu nikakvoj post-modifikaciji, nego su nedugo nakon sinteze aktivni. Zanimljiv su fenomen iz razloga što ne znamo na koji se način bakterijska stanica štiti od ove pod-klase peptida. Navedeni peptidi su značajni po tome što svi na svom N-terminalnom kraju sadrže N-formil-metionin, čija je funkcija zasad nepoznata. Provedena su istraživanja gdje je N-formil-metionin bio uklonjen sa peptida, nakon cijanogen bromidnog tretmana, što nije imalo negativnog efekta na aktivnost peptida. *Leaderless* peptidi su također međusobno jako slični; većina njih ima sličnu izoelektičnu točku (pI) i neto naboj kao i grupa I kružnih bakteriocina, ali su manje hidrofobni nego navedena pod-klasa (Perez et al., 2018).

U kontekstu bakterijskih AMP-a, nužno je napraviti osvrt na ne-ribosomski sintetizirane peptide koji imaju poseban način sinteze u kojem je omogućena ugradnja ne-proteinogenih aminokiselina u sekvencu, a koji su specifični upravo za ovu skupinu organizama (Ding et al., 2020). Danas je poznato ~800 prirodnih ne-proteinogenih aminokiselina (NPAK) i preko tisuću sintetskih varijanti. Takve aminokiseline imaju funkcionalne i strukturalne osobitosti koje mogu doprinijeti povećanoj potentnosti, permeabilnosti i proteolitičkoj stabilnosti peptida (Ding et al., 2020).

Modularno organizirani NRPS-megaenzimi (*non-ribosomal peptide synthetases*) čine niz zasebnih odjeljaka od kojih je svaki odgovoran za ugradnju i modifikaciju jednog monomera u konačni produkt (Marahiel, 2009). Unutar modula se nalaze katalitičke jedinice, čiji broj i redoslijed odgovara točnom broju i redoslijedu aminokiselina ugrađenih u peptidnu okosnicu. Svaka katalitička jedinica odgovorna je za katalizu jednog koraka sinteze (Slika 8). U svakom modulu produljenja, najmanje tri bitne domene potrebne su za tri bitne funkcije: odabir supstrata i njegovu aktivaciju, vezanje supstrata za kofaktor, te za stvaranje peptidne veze. Odabir supstrata kataliziran je adenilacijskom domenom, tzv. A-domena, te stvaranje međuprodukta koji se dalje transportira na domenu peptidilnog nosača (PCP – *peptidyl carrier protein*) (Marahiel, 2009). Holo-PCP modul odgovoran je za transport nastalih supstrata i svih međuprodukata između katalitički aktivnih mjesta, stoga se navedena domena naziva "njihajućom rukom". U sljedećem koraku sinteze NRP, dolazi do kondenzacije dva vezana PCP međuprodukta (koji se nalaze u susjednim modulima), a reakciju katalizira kondenzacijska domena, tj. C-domena. Produkt navedenih reakcija se šalje dalje niz druge module produljenja, od kojih se svaki sastoji od 3 domene: C-A-PCP (Marahiel, 2009). Bitno je naglasiti i ciklizacijsku, tj. Cy-domenu, čija je uloga adicija heterocikličkih spojeva uz formiranje

peptidne veze. Formiltransferazna (F) domena služi za prijenos formilne skupine, gdje koristi N-formil-tetrahidrofolat kao donor skupine. Na kraju sinteze peptida, oslobađanje proizvoda iz NRPS-enzima katalizira tioesterazna, tj. TE-domena, te katalizira oslobađanje linearnih peptida hidrolizom tioesterske veze, ili u nekim slučajevima makrociklizaciju pomoću unutarnjeg peptidnog nukleofila (Marahiel, 2009). (Slika 8.)



Slika 8. Prototip montažne linije NRPS-a (A). Slika B prikazuje genski klaster koji kodira bakitracin sintetazu (BacA, BacB i BacC) koja se sastoji od 12 modula i 40 domena označenih zasebnim bojama, a koji sudjeluju u sintezi razgranatog dodekapeptida (C). Slika preuzeta iz Marahiel et al. (2009).

3.3 Terapeutski potencijal bakteriocina

Bakteriocini pokazuju željene karakteristike značajne za medicinsku primjenu, uključujući visoku aktivnost u nanomolarnom rasponu, specifične mehanizme djelovanja i visoko specifičnu aktivnost (Soltani et al., 2021). Pozicionirani su kao potencijalno značajni lijekovi zbog velike raznolikosti komercijalno dostupnih formata. Osim toga, danas se aktivno istražuje i razvija postojeće i nove bakteriocine i tvari slične bakteriocinima (Cavera et al., 2015), te su brojni peptidi ovog tipa proučavani u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, čime se dokazao njihov potencijal u svrhu razvoja lijekova. S druge strane, pokazuju i antitumorski potencijal jer su, kao i većina AMP-a, u mogućnosti razlikovati stanice raka od zdravih stanica (Drider et al., 2016).

Antibakterijsko djelovanje

Dosadašnja saznanja demonstriraju potencijal bakteriocina kao moguću alternativu u kliničkim i terapeutskim primjenama (Baindara et al., 2018), pa su se tako pokazali uspješnim u borbi protiv brojnih rezistentnih bakterija, uključujući meticilin rezistentne *Staphylococcus*

aureus (MRSA), te mnoge gram-negativne patogene. Većina provedenih istraživanja je proučavala *in vitro* efikasnost bakteriocina protiv klinički bitnih patogena (Cotter et al., 2013). Primjerice, bakteriocini poput mutacina 1140 i salivaricina D su pokazali veliku inhibicijsku aktivnost protiv *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, koji su česti uzročnici oralnih infekcija kod ljudi (Tablica 1). Nizin, s druge strane, je uspješno inhibirao *S. pneumoniae* s MIK vrijednosti svega 0.03 µg/mL, te je bio 8-16 puta efikasniji od vankomicina u intravenoznom režimu (Cotter et al., 2013).

S druge strane, nekoliko istraživanja je dokazalo efektivnost bakteriocina protiv infekcija gastrointestinalnog trakta. Riboulet-Bisson et al. (2012) su razvili 2 soja bakterije *Lactobacillus salivarius* UCC118, od kojih je jedan sintetizirao peptid ABP118, a drugi mutirani soj nije. Miševne inficirane sa *Listeria monocytogenes* su tretirali sa jednim od dva soja, i miševi koji su bili tretirani sa sojem koji je sintetizirao ABP118 su bili izliječeni. S druge strane, mutirani soj koji nije sintetizirao navedeni peptid, nije inhibirao razvoj bakterije, tj. miševi nisu bili izliječeni, čime zaključujemo da je bakteriocin ABP118 bio razlog sprečavanja infekcije (Soltani et al., 2021).

Bakteriocini klase II su se također pokazali efikasnim protiv gram-pozitivnih bakterija, pa su enterocin CRL 35 i bakitracin, koji pripadaju klasi IIa pokazali potentnu aktivnost naspram *L. monocytogenes* u niskim nM i µM rasponima (Tablica 1) (Cotter et al., 2013; Salvucci et al., 2010).

Najveću aktivnost naspram gram-negativnih bakterija su pokazali bakteriocini koje sintetiziraju upravo gram-negativne bakterije, a koje nazivamo mikrocinima. Garcia-Bustos et al. (1985) su proučavajući mikrocin C7-C51 (Mcc C7-C51) otkrili njegovu efikasnost protiv sojeva *Escherichia* (Tablica 1), *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* te *Yersinia spp.* Također je bitno istaknuti i mikrocin MccJ25, peptid koji uspješno inhibira sojeve poput *Escherichia* i *Salmonella*, te azol-posjedujućeg peptida MccB17 koji je također efektivan protiv dosta gram-negativnih bakterija (Cotter et al., 2013).

Iako su očekivanja bila mala za slabo topljive tiopeptide, oni su se također pokazali efikasnim u *in vivo* istraživanjima. Filimicin, tiazomicin i nosiheptid su pokazali impresivne rezultate u tretiranju *S. aureus* infekcije (Haste et al., 2012; Zhang et al., 2008). (Tablica 1)

Potencijal bakteriocina se može povećati kombinacijom s drugim antimikrobnim supstancama. Primjerice, kombinacijom nizina i polimiksina E, i/ili klaritomicina (dva antibiotika koji su u kliničkoj primjeni) uspješno se suzbija rast i razvoj *Pseudomonas*

aeruginosa. Još jedan primjer vrijedan spominjanja je bakteriocin MccJ25, koji je skupa s peptidom (KFF)3K bio uspješan protiv *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. (Cotter et al., 2013).

Tablica 1. Lista bakteriocina i bakterijskih sojeva koje su inhibirali, te njihove minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

BAKTERIOCIN	BAKTERIJA	MIK
NIZIN	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0.03 µg/mL
SAVLIVARICIN D	<i>S. pneumoniae</i> D39	0.03 nM
	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	0.06 nM
	<i>S. pneumoniae</i> R6	12 nM
MUTACIN 1140	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	16 µg/mL
	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303	1 µg/mL
ENTEROCIN CRL 35	<i>L. monocytogenes</i> FBUNT	1 – 6 nM
BAKITRACIN	<i>L. monocytogenes</i> FBUNT	3.2 µM
MICROCIN C7-C51	<i>E. coli</i> GS7	0.4-1 nmol/mL
FILIPIMICIN	<i>S. aureus</i> MB2865	0.015-0.03 µg/mL
TIAZOMICIN	<i>S. aureus</i> MB2865	0.008 µg/mL
NOSIHEPTID	<i>S. aureus</i> TCH1516	0.06 µg/mL

3.3.1.1 Mehanizam djelovanja

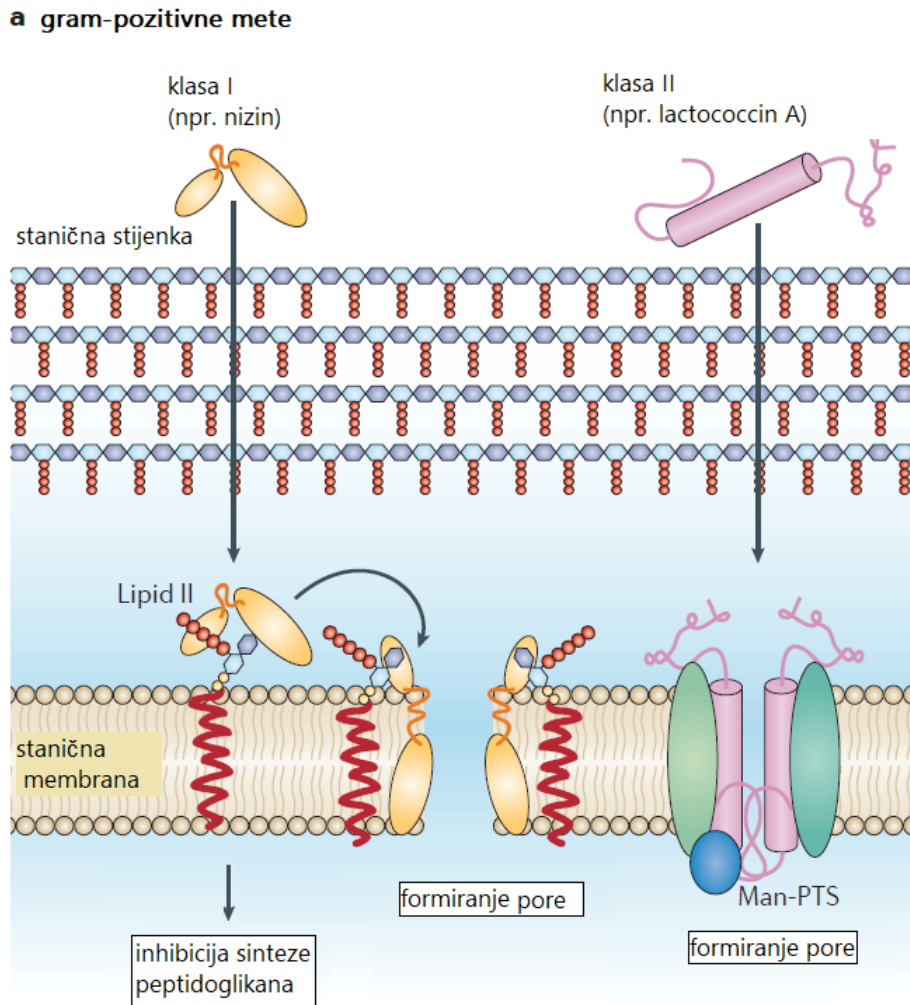
Konvencionalni antibiotici, ovisno o klasi, inhibiraju i/ili ubijaju bakterije na 4 moguća načina: djelovanjem na staničnu stijenku, inhibicijom replikacije i transkripcije DNA, inhibicijom sinteze proteina, i inhibicijom sinteze folata (Cotter et al., 2013). Baktericidno djelovanje bakteriocina također uključuje pregršt mehanizama koji se mogu podijeliti na vanstanične ili unutarstanične mehanizme (vidi gore) (Cotter et al., 2013).

- Membranski aktivni bakteriocini

Bakterijske stanice okružene su staničnom stjenkom koja je građena od dugih polimera šećera, acetilglukozamina i acetilmuraminske kiseline. Djelovanjem transglikozidaze, peptidoglikani se unakrsno povezuju, ojačavajući staničnu stijenku, na način da se peptidni lanci duljine 3 – 5 aminokiselina protežu od šećera u polimerima. Peptidni lanci su unakrsno povezani glicinom, u prisustvu penicilin vezujućeg proteina (PVP). Primjer antibiotika čiji mehanizam djelovanja ciljano napada staničnu stijenku je β -laktam. Antibiotik djeluje na način da inhibira sintezu stanične stijenke oponašanjem dijelova peptidnih lanaca koji su vezani za PVP. U takvom stanju, kada su PVP u interakciji s β -laktamima, ne mogu sintetizirati nove elemente stijenke. Dolazi do raspada stijenke i lize stanice (Kapoor, 2017). Naime, korištenjem antibiotika kroz vrijeme patogeni su razvili enzime koji degradiraju β -laktam, poput npr. karbapenemaza i penicilinaza, koje nazivamo β -laktam-degradirajućim enzimima. Bakteriocini predstavljaju potencijalno rješenje ovog problema (Cavera et al., 2015).

Nizin A je pentaciklički antibakterijski peptid male molekularne mase kojeg sintetizira *Lactococcus lactis*. Spada u klasu lantibiotika, te u svojoj strukturi sadrži i neproteinogenske aminokiseline. Ovaj peptid je jako efektivan protiv velikog spektra gram-pozitivnih bakterija, te je također relativno slabo toksičan naspram stanica domaćina (Kumariya et al., 2019). Vezanjem za lipid II, membranski vezan prekursor stanične membrane, može inhibirati sintezu membrane (Slika 9) (Cavera et al., 2015). Bitno je naglasiti da se nizin A veže za mjesto udaljeno od mjesta za koje se veže vankomicin (antibiotik koji se također veže za lipid II) i na taj način izbjegava efekt vankomicin-rezistentnih patogena (Cotter et al., 2013). Osim toga, mehanizam nizina se razlikuje od mehanizma vankomicina jer uključuje i formiranje pora, što uzrokuje lizu i smrt stanice (Cavera et al., 2015).

Određeni bakteriocini klase IIa, uz još neke bakteriocine cijele klase II, napadaju bakterijske stanice isključivo formirajući pore u staničnoj membrani. Uzmimo za primjer laktokocin A127, koji se veže na manoza fosfo-transferazni sistem (Man-PTS), nakon čega formira poru. Bakteriocini klase IIe djeluju na način da se vežu na željezne sideroforne receptore na vanjskoj membrani, prolaze kroz nju, te formiraju pore (Cavera et al., 2015). (Slika 9)



Slika 9. Prikaz stanične stijenke i membrane gram-pozitivne bakterije. Stanična stijenka je građena od peptidoglikana ili mureina, bitna u patogenom djelovanju bakterije na stanicu domaćina. Određeni bakteriocini koji napadaju navedene bakterije ciljaju staničnu stijenkku, dok drugi inhibiraju lipid II na membrani stanice. Također mogu stvarati pore za ubijanje patogenih bakterija, poput laktokocina A. Navedeni bakteriocin se veže za sistem receptora manozne fosfotransferaze (Man-PTS) te formira poru. Nizin (uz druge bakteriocine klase I) formira pore i inhibira peptidoglikansku sintezu. Slika preuzeta iz Cotter et al. (2013).

- Inhibicija genske ekspresije

Određeni antibiotici i bakteriocini djeluju na način da inhibiraju gensku ekspresiju. Primjer takvih antibiotika bi bili fluorokvinolini koji inhibiraju enzim bakterijske DNA giraze, čija je uloga zarezivanje dvolančane DNA, kataliza negativnog supermotanja DNA, te ponovno zacjeljivanje DNA. Taj proces omogućuje replikaciju ili transkripciju, te sprečava pretjerano pozitivno superzavijanje niti pri njihovom razdvajanju. Enzim se sastoji od dvije podjedinice A, čija je uloga zarezivanje i zatvaranje niti, i dvije podjedinice B, čija je uloga uvođenje

negativnih super zavojnica. Fluorokvinolini djeluju na način da se zbog visokog afiniteta veže na podjedinicu A, čime inhibira djelovanje navedenog enzima. Stanice sisavaca ne posjeduju navedeni enzim, već topoisomerasu II, koja ima vrlo nizak afinitet prema fluorokvinolinima (Kapoor, 2017).

S druge strane, inhibicija bakterijske DNA-giraze od strane bakteriocina je omogućena kompeticijskom inhibicijom za ATP-azno aktivno mjesto na B podjedinici. Time bakteriocin sprečava njeno djelovanje, tj. inhibira negativno supermotanje DNA. Na primjer, bakteriocin MccB17 prolazi kroz vanjsku membranu preko porina OmpF, te se dalje prenosi preko unutarnje membrane (vezana za unutar-membranski peptidni transporter SbmA), te time dopijeva do DNA-giraze (vidi Slika 10) (Cotter et al., 2013). Bakteriocin MccJ25 (koji također ulazi u bakterijsku stanicu pomoću posebnih transportnih molekula) inhibira gensku ekspresiju interferirajući rad RNA polimeraze (enzim potreban za sintezu RNA) (Slika 10). Peptid inhibira transkripciju blokirajući drugi kanal enzima. Interesantan je i mehanizam inhibicije MccC7-C51 bakteriocina, koji putem specifičnog transportera prolazi kroz membranu *E. coli*. Bakteriocin zatim obrađuje citoplazmatska aminopeptidaza, te dolazi do sinteze modificiranog aspartil-adenilata, koji blokira asparatil-rRNA sintetazu, inhibirajući sintezu mRNA (Cotter et al., 2013). (Slika 10)

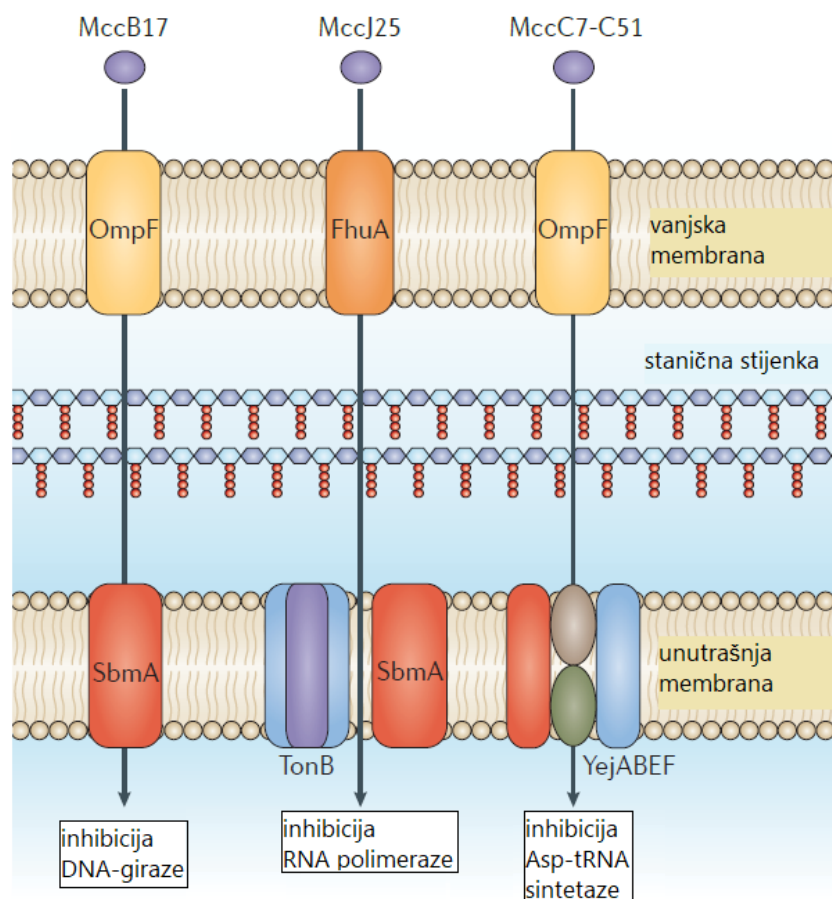
- Inhibicija sinteze proteina

Sinteza proteina je proces kojeg možemo podijeliti na 2 faze: transkripcija i translacija. U procesu transkripcije bakterijska DNA se koristi kao kalup za sintezu glasničke RNA (mRNA). Zatim, u procesu translacije, ribosom sintetizira proteine kodirane u mRNA. Ribosom je građen od dvije podjedinice, 30S i 50S, koje su ciljna mjesta antimikrobnih peptida pri inhibiciji sinteze proteina (Kapoor, 2017).

Antibiotici i bakteriocini ometaju sintezu proteina inhibirajući jednu od dvije faze sinteze. Na primjer, vezanjem bakteriocina na 50s podjedinicu inhibira se translokacija peptidil-tRNA (koja se nalazi unutar 50S podjedinice) s A mjesta na mjesto P, što izaziva pogrešno čitanje mRNA. Navedeni mehanizam dovodi do nastanka skraćenog ili ne-funkcionalnog proteina (Cavera et al., 2015). Tiopeptidi djeluju na način da se vežu na 23s rRNA, dio 50s ribosomalne podjedinice, blokirajući aminoacil-tRNA. Drugi tiopeptidi djeluju na način da se vežu na bakterijski šaperon, tj. njihov elongacijski faktor, odgovoran za inhibiciju sinteze proteina (Cotter et al., 2013). Bitno je spomenuti i kolicine koji posjeduju 16s RNAznu aktivnost, pri čemu sijeku 16s rRNA na 3' kraju njene kodirajuće sekvence, na način da režu stop kodon na

mjestu A. Smanjuje se stabilnost kodona prepoznavajućeg kompleksa rRNA, usporava se uklapanje aminoacil-tRNA na A mjestu, što dovodi do inhibicije translacije (Cavera et al., 2015).

b gram-negativne mete



Slika 10 Prikaz gram-negativne bakterije i bakteriocina koji djeluju na nju. Gram-negativne bakterije sadrže dvije stanične membrane: unutrašnju i vanjsku. Između njih se nalazi peptidoglikanski sloj (1-2 sloja) koji čini staničnu stijenku. Bakteriocini koji inhibiraju gram-negativne bakterije trebaju se transportirati kroz vanjsku i unutrašnju membranu, te nakon toga interferiraju sa DNA, RNA i metabolizmom proteina. Primjerice, MccB17 inhibira DNA-girazu, MccJ25 inhibira RNA polimerazu, a Mcc c7-C51 inhibira asparatil-tRNA sintetazu. Slika preuzeta iz Cotter et al. (2013).

3.3.1.2 Mane i prednosti nad klasičnim antibioticima

AMP-i u pravilu imaju široki spektar djelovanja naspram gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija čime se izdvajaju u odnosu na većinu antibiotika koji su danas u primjeni. Iako većina bakteriocina ima užu spektar primjene, bitno je naglasiti da bakteriocini gram-pozitivnih bakterija (lantibiotici) u pravilu djeluju inhibitory protiv bakterija iste vrste kao bakterija koja

ih sintetizira, ali i protiv drugih, drugačijih vrsta bakterija (Soltani et al., 2021). Osim toga, bakteriocini djeluju izrazito brzo, ubijaju bakterije u niskim nanomolarnim koncentracijama, mogu djelovati sinergistički s drugim peptidima ili konvencionalnim antibioticima, te neutralizirati endotoksine koje bakterije luče prilikom infekcije (vidi gore).

Premda su se ovi peptidni antibiotici pokazali izrazito efikasni u borbi protiv bakterija, kao i većina AMP-a, imaju određene nedostatke (Soltani et al., 2021). Važan čimbenik je njihova stabilnost u fiziološkim uvjetima, jer jednom kad su uneseni u organizam postaju podložni djelovanju raznih faktora poput promjene pH, proteolitičke aktivnosti enzima i sl. Dosadašnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja su dokazala njihovu nestabilnost u navedenim uvjetima (Soltani et al., 2021). Bakteriocini klase II su se pokazali nestabilnima u fiziološkim uvjetima, čime se smanjuje njihova antimikrobna aktivnost, dok su peptidi poput nizina i mikrocina J25 bili djelomično stabilni. Ovaj nedostatak bakteriocina se može poboljšati bioinženjeringom pomoću kojeg su dobiveni derivati koji su otporni na djelovanje proteolitičkih enzima (Soltani et al., 2021). S druge strane, enkapsulacija također predstavlja zaštitu peptida od vanjskih utjecaja što je potvrdila i studija koju proveli O' Shea et al. (2010) pri čemu je enkapsulirani nizin zadržao svoju stabilnost i aktivnost u fiziološkim uvjetima. Bakteriocini su kodirani genima, te su zbog svoje peptidne prirode, kao i ostali AMP-i, više podložni inženjeringu od klasičnih antibiotika. Bioinženjeringom možemo dizajnirati AMP-e u svrhu povećavanja njihove aktivnosti, smanjena citotoksičnosti ili specifikiranja mehanizma djelovanja za određene ciljne stanice. Ovo je moguće kloniranjem i manipuliranjem gena biosinteze bakteriocina, te *in vitro* rekonstrukcijom biosintetskog procesa (Soltani et al., 2021). S druge strane, kemijskim sintetskim procesima dobivaju se bakteriocini bez posttranslacijskih modifikacija, koji su bitni za daljnje razumijevanje aktivnosti, strukture i funkcije, te njihove međusobne korelacije (Baindara et al., 2018). Isto tako, *in silico* istraživanja bakterijskog genoma metagenomskom analizom DNA daju informacije o mnogim neeksprimiranim klasterima bakteriocina, koji se potencijalno mogu dalje koristiti za sintezu i inženjerstvo gena (Baindara et al., 2018).

Još jedan nedostatak ove klase peptida je njihova toksičnost. Iako su generalno sigurni za primjenu, određeni bakteriocini, poput nizina, kolicina E1, E3, E7, K, enterocina DD14, enterocina S37 i dr. su se pokazali relativno toksičnima naspram stanica domaćina. Ti eksperimenti su se proveli na različitim staničnim linijama, poput linije epitelnih stanične linije ljudskih embrionalnih bubrega HEK 293 i ljudske stanične linije epitelnog karcinoma vrata maternice HeLa (Soltani et al., 2021). Različite stanice su različito reagirale na utjecaj bakteriocina, pa su tako stanične linije SV40-HC bile osjetljivije na nizin, pediocin PA-1 i

kolicin E6 nego Vero stanice. Ovakvu razliku možemo pripisati različitoj građi staničnih membrana stanica, jer udio lipida i kolesterola utječe na fluidnost stanice, te što je stanica fluidnija to je manje otporna na djelovanje bakteriocina (Soltani et al., 2021). Razlog ovakvim razlikama može biti i razlika u hidrofobnosti membrana, no to još zasigurno ne znamo. Bitno je naglasiti da je primijećena citotoksičnost bakteriocina bila u koncentracijama većim od minimalnih inhibitornih koncentracija odnosno u koncentracijama većima od minimalne koncentracije koja inhibira vidljivi rast bakterija što ipak ide u prilog potencijalnoj primjeni bakteriocina kao nove klase lijekova.

Antivirusno djelovanje

Bakteriocini također imaju potencijalnu antivirusnu primjenu. Wachsmann et al. (2014) su pokazali da bakteriocini koje sintetizira *Enterococcus* spp. posjeduju antiviralnu aktivnost protiv virusa *Herpesviridae* obitelji. Također su otkrili da bakteriocini bakterijskog soja *Enterococcus faecium* uspješno inhibiraju intracelularno razmnožavanje *Herpes simplex* virusa. Labyrinthopeptin A1, kojeg sintetizira *Actinomadura namibiensis*, je peptid koji sadrži specifični karbociklički labioninski aminokiselinski ostatak. Interesantan je zbog antivirusnog djelovanja protiv HIV i HSV infekcije i prijenosa, mehanizmom koji inhibira stanica-stanica interakcije između HIV inficiranih T stanica i neinficiranih T stanica (Soltani et al., 2021).

Iako su navedene informacije vrijedne pažnje i daljnjeg proučavanja, još ne znamo točan mehanizam djelovanja bakteriocina na viruse. Smatra se da ovi peptidi blokiraju receptorska mjesta na stanicama domaćina, sprečavajući nakupljanje virusa, ili pak interferiraju u ključnim koracima razmnožavanja virusa. Također je moguće da se ovi peptidi, zbog svoje hidrofobne prirode, vežu za lipidne ovojnice virusa te time inhibiraju fuziju virusne i stanične membrane (Soltani et al., 2021).

3.3.3 Antitumorsko djelovanje

Uz sve navedeno, bakteriocini imaju i antitumorsko djelovanje. Iako točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, možemo pretpostaviti da se temelji na razlici strukture staničnih membrana normalnih i tumorskih eukariotskih stanica. Naime, zdrave eukariotske stanice su asimetrične, te na vanjskoj površini imaju neutralne *zwitter*-ionske fosfolipide koje sadrže kolin, poput sfingomijelina ili fosfatidilkolina. Unutarnja membrana, s druge strane, sadrži aminofosfolipide poput fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina. Ova asimetričnost kod stanica raka se gubi, te su njihove membrane negativno nabijene zbog prevelikog udjela anionskih fosfatidilserina, heparin sulfata, O-glikoziliranih mucina te sijaliranih gangliozida. Također se

razlikuju u fluidnosti membrana, jer stanice raka imaju veću membransku fluidnost obzirom na zdrave eukariotske stanice. Još jedna komponenta koja razlikuje zdrave stanice i stanice raka je broj mikrovila, koji su brojniji na membranama stanica raka. Oni omogućavaju antimikrobnim peptidima vezanje za stanicu (Kaur & Kaur, 2015).

Nekoliko vrsta bakteriocina je pokazalo antikancerogena djelovanja, od mikrocin E492, kolicina, pediocina PA-1, te nizina. Mehanizam djelovanja bakteriocina protiv stanica raka uključuje indukciju apoptoze i/ili depolarizaciju stanične membrane. Joo et al. (2012) su ispitivali djelovanje nizina na stanicama karcinoma pločastih stanica glave i vrata, te je otkriveno da je ovaj peptid inhibicijom staničnog ciklusa inducirao povećanu fragmentaciju DNA i smanjio proliferaciju stanica. Također su dokazali da je isti bakteriocin uspješno smanjio veličinu tumora kod miševa s rakom usne šupljine. Iako su navedeni rezultati impresivni, problem kod studija antikancerogenih svojstava bakteriocina je nedostatak *in vivo* validacije rezultata koji su dobiveni u *in vitro* uvjetima (Soltani et al., 2021).

4 Zaključak

Usljed porasta bakterijske rezistencije na antibiotike, brojne bolesti koje se u zadnjim desetljećima bile lako lječive, opet uzimaju milijune života godišnje diljem svijeta. Pronalazak adekvatne alternative za liječenje bakterijskih infekcija i bolesti je nužan, a jedna od takvih su i bakteriocini, ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi koje bakterije sintetiziraju radi inhibicije rasta kompetitivnih mikroorganizma. Njihov mehanizam djelovanja definiran je fizikalno-kemijskim svojstvima poput kationske prirode, hidrofobnosti, amfipatskog karaktera i sl., kao i činjenicom da su u njihovu strukturu često ugrađene neproteinogenske aminokiseline. Kao i ostali AMP-i, i kod bakteriocina razlikujemo 2 glavna mehanizma djelovanja: *i*) membranski aktivne peptide, koji formiraju pore na staničnoj membrani, te *ii*) unutarstanični aktivne peptide, koji prolaskom kroz membranu inhibiraju razne stanične procese.

Dosadašnjim eksperimentima dokazana je njihova antibakterijska, antivirusna i antitumorska aktivnost, premda mehanizmi djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Međutim, pouzdano se zna da efikasno djeluju protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih patogena, brojnih tumorskih linija kao i virusa HIV-a i *Herpes simplex*. Ukratko, mogućnosti terapijske primjene su brojne, iako je na tom putu nužno savladati brojne prepreke, poput slabe stabilnosti ovih peptida u fiziološkim uvjetima i relativno visoke toksičnosti naspram stanica domaćina. Zahvaljujući bioinženjeringu, danas smo u mogućnosti modificirati postojeće peptide i sintetizirati nove analoge s poželjnim svojstvima kako bi se približili kliničkoj fazi ispitivanja potencijalnih terapeutika na bazi bakteriocina.

5 Literatura

- Bahar, A. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Baindara, P., Korpole, S., & Grover, V. (2018). Bacteriocins: Perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10393–10408. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9420-8>
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 9(1), 137. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>
- Baptista, P. V., McCusker, M. P., Carvalho, A., Ferreira, D. A., Mohan, N. M., Martins, M., & Fernandes, A. R. (2018). Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria—“A Battle of the Titans”. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01441>
- Bechinger, B., & Gorr, S.-U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>
- Burnett, J. C., & Rossi, J. J. (2012). RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. *Chemistry & Biology*, 19(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.008>
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- 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>

- Ding, Y., Ting, J. P., Liu, J., Al-Azzam, S., Pandya, P., & Afshar, S. (2020). Impact of non-proteinogenic amino acids in the discovery and development of peptide therapeutics. *Amino Acids*, 52(9), 1207–1226. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02890-9>
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(4), 177–182. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9223-0>
- Edwards, I. A., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Zuegg, J., Blaskovich, M. A. T., & Cooper, M. A. (2016). Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. *ACS Infectious Diseases*, 2(6), 442–450. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00045>
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
- Friedrich, C. L., Rozek, A., Patrzykat, A., & Hancock, R. E. W. (2001). Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity against Gram-positive Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24015–24022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009691200>
- Fry, D. E. (2018). Antimicrobial Peptides. *Surgical Infections*, 19(8), 804–811. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.194>
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376>
- Garcia-Bustos, J. F., Pezzi, N., & Mendez, E. (1985). Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(5), 791–797. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.5.791>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Haney, E. F., Mansour, S. C., & Hancock, R. E. W. (2017). Antimicrobial Peptides: An Introduction. In P. R. Hansen (Ed.), *Antimicrobial Peptides* (Vol. 1548, pp. 3–22). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
- Haste, N. M., Thienphrapa, W., Tran, D. N., Loesgen, S., Sun, P., Nam, S.-J., Jensen, P. R., Fenical, W., Sakoulas, G., Nizet, V., & Hensler, M. E. (2012). Activity of the thiopeptide antibiotic nosiheptide against contemporary strains of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics*, 65(12), 593–598.
<https://doi.org/10.1038/ja.2012.77>
- Joo, N. E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D., & Kapila, Y. L. (2012). Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC 1. *Cancer Medicine*, 1(3), 295–305. <https://doi.org/10.1002/cam4.35>
- Kapoor, G. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. . . *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33(3), 300–305.
https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Kaur, S., & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B. A., Hoffmann, R., & Otvos, L. (2001). The Antibacterial Peptide Pyrrhocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, 40(10), 3016–3026.
<https://doi.org/10.1021/bi002656a>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171–177.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lahoz-Beltra, R., Navarro, J., & Marijuán, P. C. (2014). Bacterial computing: A form of natural computing and its applications. *Frontiers in Microbiology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00101>
- Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4).
<https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
- Li, W.-F., Ma, G.-X., & Zhou, X.-X. (2006). Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, 27(9), 2350–2359.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.016>
- MacKay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V. J., Krost, S. B., & Pollock, J. J. (1984). Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 44(3), 695–701.
<https://doi.org/10.1128/iai.44.3.695-701.1984>
- Marahiel, M. A. (2009). Working outside the protein-synthesis rules: Insights into non-ribosomal peptide synthesis: INSIGHTS INTO NON-RIBOSOMAL PEPTIDE

- SYNTHESIS. *Journal of Peptide Science*, 15(12), 799–807.
<https://doi.org/10.1002/psc.1183>
- 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>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- O’Shea, E. F., O’Connor, P. M., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2010). Synthesis of Trypsin-Resistant Variants of the *Listeria* -Active Bacteriocin Salivaricin P. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5356–5362.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00523-10>
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465–499. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00077-6)
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2085. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02085>
- Riboulet-Bisson, E., Sturme, M. H. J., Jeffery, I. B., O’Donnell, M. M., Neville, B. A., Forde, B. M., Claesson, M. J., Harris, H., Gardiner, G. E., Casey, P. G., Lawlor, P. G., O’Toole, P. W., & Ross, R. P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* Bacteriocin Abp118 on the Mouse and Pig Intestinal Microbiota. *PLoS ONE*, 7(2), e31113.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031113>
- Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5713.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
- Rosenfeld, Y., Lev, N., & Shai, Y. (2010). Effect of the Hydrophobicity to Net Positive Charge Ratio on Antibacterial and Anti-Endotoxin Activities of Structurally Similar Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, 49(5), 853–861.
- Salvucci, E., Hebert, E. M., Sesma, F., & Saavedra, L. (2010). Combined effect of synthetic enterocin CRL35 with cell wall, membrane-acting antibiotics and muranolytic enzymes against *Listeria* cells: Combined effect of enterocin CRL35 and antibiotics against *listeria*. *Letters in Applied Microbiology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02879.x>
-

- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *Journal of Bacteriology*, *178*(12), 3661–3663. <https://doi.org/10.1128/jb.178.12.3661-3663.1996>
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, *45*(1), fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- 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>
- Vaseeharan, B., & Thaya, R. (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: An alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, *22*(3), 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9729-3>
- Wachsman, V. M., Torres, N. I., Wachsman, M. B., Sinko, P. J., Castilla, V., & Chikindas, M. (2014). Antiherpes simplex virus type 2 activity of the antimicrobial peptide subtilosin. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(5), 1253–1259. <https://doi.org/10.1111/jam.12618>
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P., & Idicula-Thomas, S. (2015). *CAMP3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides*. 5.
- Wang, G. (Ed.). (2017). *Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies* (2nd edition). CABI.
- Yaxin Li, J. X. (2020). *Structural insights into immunoglobulin M*. 367(6481), 1014–1017.
- Zhang, C., Occi, J., Masurekar, P., Barrett, J. F., Zink, D. L., Smith, S., Onishi, R., Ha, S., Salazar, O., Genilloud, O., Basilio, A., Vicente, F., Gill, C., Hickey, E. J., Dorso, K., Motyl, M., & Singh, S. B. (2008). Isolation, Structure, and Antibacterial Activity of Philipimycin, A Thiazolyl Peptide Discovered from *Actinoplanes philippinensis* MA7347. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(36), 12102–12110. <https://doi.org/10.1021/ja803183u>
- Zhao, T., Ding, K., Zhang, L., Cheng, X., Wang, C., & Wang, Z. (2013). Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of β -Carboline and Quinoline Alkaloids Derivatives from the Plants of Genus *Peganum*. *Journal of Chemistry*, *2013*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/717232>