

# Az antimikrobiális peptidekkel szemben kialakuló rezisztencia rendszer szintű vizsgálata

PhD értekezés

Daruka Lejla

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai

Intézet

SZTE-TTIK

2023.

Szeged

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

---

AMP	antimikrobiális peptid
APC	ampicillin
ASKA	A Complete Set of Escherichia coli K-12 ORF Archive
BAC 5	bactenicin 5
CAP18	nyúl 18-kDa kationos antimikrobiális peptid
CFU	colony forming unit
CHL	klóramfenikol
CP1	cecropin P1
CPR	ciprofloxacín
DOX	doxiciklin
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ERY	eritromicin
FITC-PLL	fluoreszceins-izotiocianát poly-L-lizin
FOX	cefoxitin
HBD3	humán beta-defensin-3
Hg	hemoglobin
IND	indolicidin
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactozidáz
KAN	kanamycin
LB	Luria-Bertini tápoldat
LBL	Lysogeny-Broth-Lennox
LL37	LL-37 cathelicidin
LPS	lipopoliszacharid
MIC	minimal inhibitory concentration
MS	minimal salt tápoldat
NAL	nalidixsav

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	nodule cysteine-rich peptid
NIT	nitrofurantoin
OD	optikai denzitás
OM	külső membrán (other membrane)
ORF	open reading frame
PBS	foszfát puffer
PCR	polimeráz láncreakció
PEX	pexiganan
PGLA	peptid glycine-leucin amid
PL	foszfolipid (phospholipid)
PLEU	pleurocidin
pORTMAGE	portable Multiplex Automated Genome Engineering
PR39	PR-39
PROA	protamin A
PXB	polimixin B
R8	R8
SNP	single nucleotide polymorphisms
TBS	Tris-buffered saline
TET	tetraciklin
TOB	tobramycin
TPII	tachyplesin II
TRM	trimetoprim

# ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

- 1. ábra** Az antibiotikum rezisztenciának tulajdonítható és azzal összefüggésbe hozható halálozási arány GBD régiók szerint minden életkorban (2019). A becsléseket a gyógyszerekre vonatkozóan összesítették, figyelembe véve a több gyógyszerrel szembeni rezisztencia együttes előfordulását. GBD: Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study. (Globális betegségek, sérülések és kockázati tényezők vizsgálata)<sup>9</sup> ..... 10
- 2. ábra** Az antibiotikum fejlesztés szakaszai, az adott szakaszban vizsgált molekulák száma és az ahhoz szükséges idő és anyagi támogatás mértéke.<sup>14</sup> ..... 11
- 3. ábra** Az eukarióta és prokarióta membrán felépítése és töltését kialakító foszfolipidek eloszlása. A fekete nyilak vastagsága az elektrosztatikus vonzás erősségét jelzik.<sup>37</sup> ..... 13
- 4. ábra** Az AMP-k fő bakteriális célpontjai.<sup>43</sup> ..... 14
- 5. ábra** Az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztencia folyamatok sematikus ábrázolása. a) membrán átrendeződés során megváltozhat az LPS molekulák felépítése, illetve a membránt felépítő foszfolipidek aránya. b) membránba épült pozitívan töltött fehérjék, vagy negatívan töltött csali fehérjék, amelyek gátolják az elektrosztatikus vonzást. c) AMP-k eliminálása efflux pumpákon keresztül. d) AMP-k lebontása extracelluláris proteázokkal. .... 17
- 6. ábra** A laboratóriumi evolúciós kísérlet sematikus ábrázolása ..... 25
- 7. ábra** E.coli K-12 BW25113 relatív MIC értékei az evolúciós kísérlet után. Az evolúciós kísérletben a 14 AMP (kék) vagy a 12 antibiotikum (piros) egyikéhez adaptáltattuk az E.coli törzset. Összességében az AMP-khez adaptált vonalak (N=138) szignifikánsan kisebb rezisztenciát fejlesztettek, mint az antibiotikumhoz adaptált vonalak (N=120) ( $p < 0.0001$ , egyoldali permutációs teszt). Az elért rezisztencia szint változatosabb volt az AMP-k esetében (N=14), mint az antibiotikumokkal végzett kísérletes során (N=12) ( $p=0.03478$  F-teszt). Minden adatpont egy paralel vonal relatív MIC értékét reprezentálja. A mutátor mutD5 törzssel és a TPII AMP-vel végzett evolúciós kísérlet eredményét csillag jelöli az ábrán. A relatív MIC értékeket a 2. függelék tartalmazza. .... 34
- 8. ábra** Klinikailag releváns baktériumok relatív MIC értékei. A TPII-höz adaptált törzsek szignifikánsan kisebb rezisztencia értékeket értek el, mint a PXB-hez adaptáltak. (\*\*\*) a minimum  $p=1,65 \times 10^{-4}$  értéket jelöli, kétoldali Mann-Whitney test, N=10 minden csoportban). Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium LT2 röviden S. enterica LT2 néven szerepel az ábrán. Minden adatpont egy paralel vonal relatív MIC értékét reprezentálja. A relatív MIC értékeket a 2. függelék tartalmazza. .... 35
- 9. ábra** A rezisztens vonalak relatív fitness értéke. A fitnessz antibakteriális szer mentes tápközegben mértük és kiszámoltuk a növekedési görbék görbe alatti területét. Az értékek a vad típus (szürke szín) értékére lettek normalizálva. A relatív fitnessz értékeket lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019. .... 36

**10. ábra A relatív fitness és a relatív MIC közötti korreláció.** Az AMP és antibiotikum együttes vizsgálata esetén gyenge korrelációt figyelhetünk meg (Spearman,  $\rho = -0.24$ ,  $p = 0.016$ ,  $N = 98$ ), a korreláció megszűnik, ha az antibakteriális szereket külön vizsgáljuk (antibiotikum:  $p = 0.6$ ,  $N = 60$ ; AMP:  $p = 0.39$ ,  $N = 38$ )..... 37

**11. ábra A kialakult rezisztencia korrelál az AMP-k fiziológiai tulajdonságaival.** Minden adatpont az E.coli K-12 BW25113 elvégzett evolúciós kísérletből származó átlagos relatív MIC változást reprezentálja. A.) Poláris aminosavak (Spearman's  $\rho = 0.58$ ,  $p = 0.03$ ,  $N = 14$ ) B.) Pozitívan töltött aminosavak (Spearman's  $\rho = 0.62$ ,  $p = 0.02$ ,  $N = 14$ ) C.) Az AMP hidropaticitása (Spearman's  $\rho = -0.73$ ,  $p = 0.002$ ,  $N = 14$ ). A kék vonalak a LOESS simítási módszerrel illesztett görbét jelzik. Az AMP-k további fizikai-kémiai tulajdonságait lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019..... 38

**12. ábra Az AMP rezisztens vonalak keresztrezisztenciája a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel és a humán LL37-tel szemben.** A hierarchikus klaszterezést külön-külön hajtottuk végre a sorokon és az oszlopokon, teljes összekapcsolási módszerrel, euklideszi távolság mértékkel a nyers MIC adatokon. Színkód: kék -> járulékos érzékenységet (relatív MIC minimum 0,5), narancssárga -> keresztrezisztenciát (relatív MIC minimum 2), fehér -> nincs, vagy minimális a változás (0,5 és 2 között), szürke -> nem releváns. Az AMP-rezisztens vonalakat az evolúciós kísérlet során alkalmazott AMP-ről és a megfelelő vonal sorszámáról neveztük el..... 40

**13. ábra 38 AMP rezisztens vonal rezisztencia profilja.** Az ábra a laboratóriumi evolúció során kialakult független mutációkat és egyes útvonalakat érintő mutációkat mutatja be az AMP-k függvényében. A színek az adott AMP-kkel szemben adaptált vonalakban bekövetkezett egyedi mutációk számát jelzi. OM-külső membrán (other membrane), PL-foszfolipid (phospholipid), LPS-lipopoliszacharid (lipopolysaccharide),  $\Delta$ - gén deléció. A mutációkat, lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019 ..... 42

**14. ábra Az egyes AMP adaptált vonalak és egyedi mutánsok felszíni töltöttségének változása.** A jobb oldali táblázat a vizsgált törzsekben található waa, mla illetve bas gének mutációit jelöli. Az AMP-rezisztens vonalakat az evolúciós kísérlet során alkalmazott AMP-ről és a megfelelő vonal sorszámáról neveztük el. Minden adatpont a 9 biológiai replikátum egyikének relatív fluoreszcencia egységét jelöli. A szignifikancia szintjét a boxplotoknál jelölt szürke csillagok jelölik. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , kétoldali Dunnett teszt,  $N = 9$  minden csoportban.)..... 44

**15. ábra A génamplifikáció hatása a rezisztencia szintjére.** Az ASKA plazmid könyvtár túlzott expressziója szignifikánsan nagyobb rezisztenciát eredményezett az antibiotikumokkal szemben ( $N = 11$ ), mint az AMP-kkel szemben ( $N = 14$ ) ( $P < 0,0001$ , egyoldali permutációs teszt). Minden adatpont a három biológiai ismétlés egyikének relatív MIC értékét jelenti. .... 45

**16. ábra Talajminta funkcionális metagenomikája.** A funkcionális szelekció során 41 különböző antibiotikum-rezisztenciát biztosító DNS-kontigot (piros oszlop) azonosítottunk, míg AMP-rezisztenciát átadó kontigokat nem találtunk ( $p = 2 \times 10^{-16}$  kétoldali negatív binomiális regresszió). Az azonosított kontigok listáját lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019. .... 46

<b>1. táblázat: a tanulmányban vizsgált AMP-k rövidítése, neve, forrása, aminosav sorrendje és felépítése.....</b>	<b>22</b>
<b>2. táblázat: a tanulmányban vizsgált antibiotikumok rövidítése, neve, hatásmechanizmusa és ölő hatásának típusa.....</b>	<b>23</b>
<b>3. táblázat: az inkubációs idő hatása egyes AMP-k MIC értékére.</b> Teszteltük, hogy a hosszabb inkubációs időnek van-e hatása az AMP-k MIC értékére. Ehhez négy párhuzamos AMP hígítási sort készítettünk. Az első hígítási sort a készítés napján oltottuk be E.coli K-12 BW25113 törzssel, még a maradék 3 hígítási sort elő-inkubáltuk 24, 48 illetve 72 órát, és az inkubációs idő letelte után oltottuk be. Nem tapasztaltunk jelentős különbséget az MIC értékekben az élő-inkubált és a frissen beoltott lemezekén mért MIC értékek között.....	<b>24</b>
<b>4. táblázat: az egyedi mutációk hatása egyes AMP-kkel szemben mutatott érzékenységre. ....</b>	<b>43</b>
<b>5. táblázat: TP11 és CP1 antibakteriális hatása 20 tesztelt baktériummal szemben. ....</b>	<b>47</b>
<b>6. táblázat: a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k hemolitikus aktivitása .....</b>	<b>48</b>

# TARTALOMJEGYZÉK

---

Rövidítésjegyzék	1
Ábrák és táblázatok jegyzéke	3
Tartalomjegyzék	6
1 Bevezető	8
1.1 Az antibiotikumok és az antibiotikum rezisztencia krízis	8
1.2 Antimikrobiális peptidek (AMP-k)	12
1.3 Az AMP-k hatásmechanizmusa	12
1.4 Az AMP-k fizikai-kémiai tulajdonságai	15
1.5 AMP rezisztencia folyamatok	16
1.6 Az AMP-k klinikai jelentősége	18
2 Célkitűzés	20
3 Anyagok és módszerek	21
3.1 Baktérium törzsek	21
3.2 Antibakteriális szerek	21
3.3 Használt tápoldatok	23
3.4 Laboratóriumi evolúciós kísérlet	24
3.5 Minimális gátlási koncentráció (MIC) meghatározása	26
3.6 Nagy áteresztőképességű fitneszmérés	26
3.7 Génamplifikáció hatásának mérése	26
3.8 Funkcionális metagenomika	27
3.9 Teljes genom szekvenálás	29
3.10 Rezisztencia mutációk generálása pORTMAGE módszerrel	30
3.11 Felületi töltöttség meghatározása	31
3.12 Hemolízis vizsgálat	31
4 Eredmények	33
4.1 Az AMP-kkel és antibiotikumokkal végzett laboratóriumi evolúció eredményei	33
4.2 A kialakult rezisztencia fitnesz költsége	36
4.3 Az adaptációs képességet befolyásoló fizikai-kémiai tulajdonságok	38
4.4 Korlátozott keresztrezisztencia a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel szemben	39
4.5 Az AMP rezisztencia molekuláris mechanizmusai	41
4.6 Az AMP rezisztencia a kevésbé negatív membrán következménye	43
4.7 A génamplifikáció hatása az AMP rezisztenciára	45
4.8 Talajminta funkcionális metagenomikai vizsgálata	46

4.9	TPII és CP1 széles hatásspektrumú és nem toxikus	47
5	Az eredmények megvitatása	49
6	Köszönetnyilvánítás	53
7	Irodalomjegyzék	54
8	Összefoglalás	63
9	Summary	66
10	Függelék	69



# 1 BEVEZETŐ

---

## 1.1 AZ ANTIBIOTIKUMOK ÉS AZ ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA KRÍZIS

Az antibiotikumok olyan molekulák, amelyek szelektíven fejtik ki ölő hatásukat baktériumokkal szemben, vagy gátolják azok növekedését<sup>1</sup>. Az antibiotikumok a természetben évmilliók alatt alakultak ki, általában gombák és egyéb mikroorganizmusok termelik, mint az egymás elleni versengés egyik hatékony fegyvere<sup>1</sup>. Ezt a jelenséget már az ókorban is megfigyelték és bár az okot nem ismerték a háttérben, de korlátozott szinten tudták alkalmazni egyes betegségek ellen és sebek kezelésére<sup>2</sup>. Ezek a molekulák mára a modern orvostudományban elengedhetetlen gyógyszerek, a mai orvosi eljárások alapkövét képezik. Nem csak a bakteriális fertőzések kezelésében használhatóak hatékonyan, hanem prevenciós jelleggel szervtranszplantációk<sup>3</sup>, kemoterápia és műtéti eljárások során is használják<sup>4</sup>. Ebből kifolyólag érthető, hogy a mai kor medicinája nem működhet hatékonyan antibiotikumok nélkül.

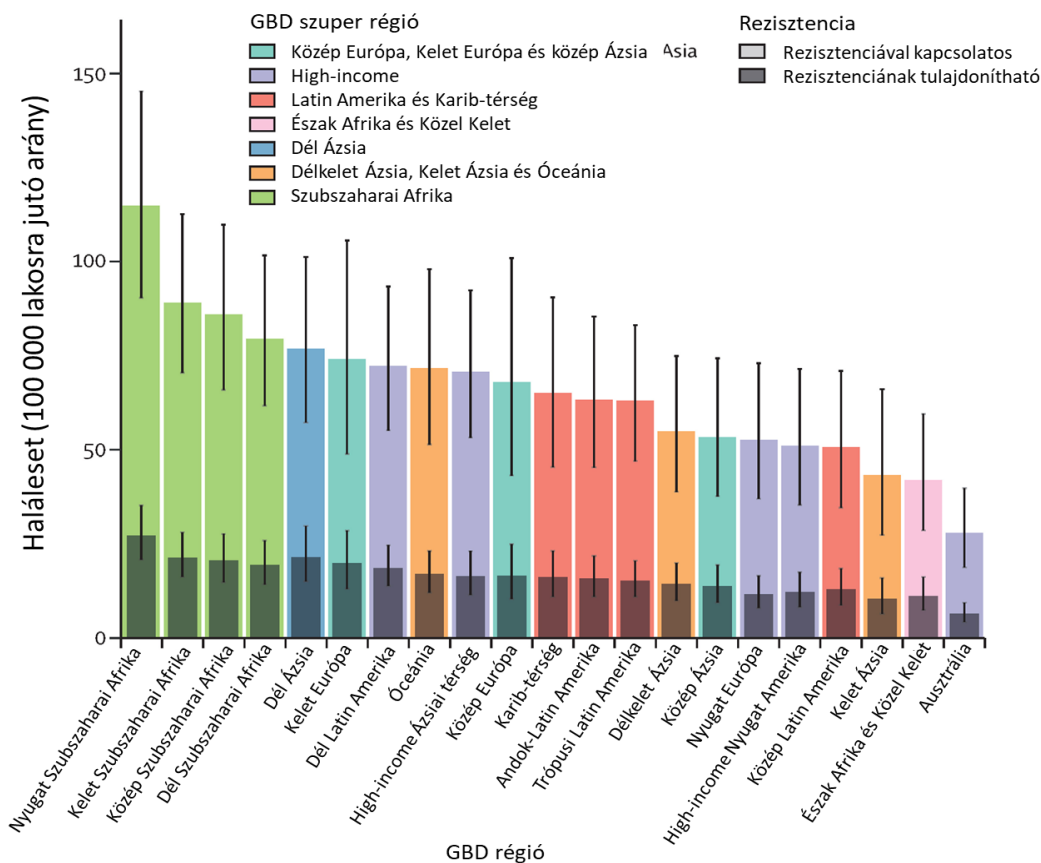
Az antibiotikumok aranykora 1930-ban kezdődött, amikor Sir Alexander Fleming felfedezte a penicillint<sup>1</sup>. Bár már előtte több kutató is megfigyelte az egyes mikroorganizmusok közötti kompetíciót, és azonosítottak antibiotikumokat, a nagyléptékű kutatásokat és a gyógyszergyári fejlesztéseket a II. világháborúban hatékonyan alkalmazott penicillin indította el<sup>5</sup>. Az azóta eltelt majd egy évszázadban több ezer antibakteriális szert azonosítottak, illetve jelentős mennyiségű félszintetikus és szintetikus antibiotikumot fejlesztettek ki<sup>5</sup>. Ma az antibiotikumok az egyik leggyakrabban felírt gyógyszerek, ellenben alkalmazásuk számos esetben indokolatlan. Olyan esetekben is alkalmaznak antibiotikum kezelést, amikor a betegséget vírusos fertőzés okozza, habár a vírusok ellen az antibiotikumok hatástalanok.

De nem csak az orvostudomány az egyetlen felhasználója az antibiotikumoknak. Az intenzív állattenyésztés során is széles körben használják különböző állatok között terjedő betegségek kezelésére, illetve megelőzésére. Az antibiotikum használat nem csak az állatok számával járul hozzá az állomány növeléséhez, hanem az egészségesebb egyedek nagyobb hozamot is eredményeznek<sup>6</sup>. Ennek következményeként a mezőgazdaságban az antibiotikumok használata hatalmas méreteket öltött.

A nagy igényeknek megfelelően az antibiotikumok gyártása is ipari méreteket öltött. Jelenleg Kína és India a világ vezető antibiotikum gyártó országai, mivel ezekben az országokban alacsonyabbak a gyártási költségek a szigorú előírások hiánya miatt. A nem megfelelő hulladékgazdálkodás és a gyártásból származó antibiotikum maradványok olyan mértékű antibiotikum szennyezést okoznak, melyek szelekciós erőként hatva elősegítik a rezisztens baktériumok elterjedését a szennyezett területeken. Mivel a rezisztens korokozók nem ismernek határokat, a szabályozások hiánya a fejlődő országok mellett a fejlett országokra is veszélyt jelent<sup>7</sup>.

Mint láthatjuk, az antibiotikumok pozitív hatásának kiaknázására azok túlhasználata következett be a gyógyászatban és a mezőgazdaságban egyaránt. Bár az antibiotikum rezisztencia kis léptékben megfigyelhető a természetben is, a globális felhasználás és a szennyezés hatására oly mértékű szelekciós nyomás alakult ki, amely jelentősen befolyásolja az antibiotikumokkal szembeni ellenállóképesség nagymértékű terjedését<sup>8</sup>. Ez a jelenség csökkenti a hatékony antibiotikumok számát, ezzel világméretű krízist okozva.

Jelenleg az antibiotikum rezisztencia miatti, vagy azzal összefüggésbe hozható egészségügyi krízis olyan nagy léptékű, mint a HIV vagy a malária<sup>9</sup>. Becslések szerint 2019-ben 1.27 millió halálesetet okozott közvetlenül az antibiotikum rezisztencia, és 4.95 millió haláleset hozható összefüggésbe a rezisztenciával (1. ábra). Ez a probléma egyaránt érinti a fejlett és a fejlődő régiókat<sup>9</sup>.



**1. ábra Az antibiotikum rezisztenciának tulajdonítható és azzal összefüggésbe hozható halálzási arány GBD régiók szerint minden életkorban (2019).** A becsléseket a gyógyszerekre vonatkozóan összesítették, figyelembe véve a több gyógyszerrel szembeni rezisztencia együttes előfordulását. GBD: Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study. (Globális betegségek, sérülések és kockázati tényezők vizsgálata)<sup>9</sup>

Tehát az antibiotikum rezisztencia krízis oka a túlhasználat miatt elterjedt bakteriális ellenállóképesség (vagy rezisztencia) növekedése a jelenlegi antibiotikumokkal szemben. A jelen krízisre az egyik lehetséges megoldás további kis molekulájú antibiotikumok felfedezése és gyógyászati célokra való fejlesztése. Az ilyen jellegű fejlesztések az utóbbi években jelentősen lelassultak, melynek két fő oka van. Az egyik, hogy az 1980-as évek óta nem fedeztek fel új antibiotikum osztályt<sup>1</sup>, mely a gyakorlatban is hasznosult volna. Tehát az elmúlt 40 évben jóváhagyott antibiotikumok csak kis része képvisel új vegyület osztályokat, míg a többség már ismert kémiai szerkezetből származott<sup>1</sup>. Emellett az antibiotikum fejlesztés, a nagyon költséges és hosszadalmas preklinikai és klinikai fejlesztések miatt, a gyógyszergyáraknak nem kifizetődő terület<sup>10</sup> (2. ábra). Ezt jól példázza, hogy míg közel 4000 immunonkológiai ágens van fejlesztés alatt<sup>11</sup>, addig körülbelül 30-40 új antibakteriális szer, és 2017 és 2021 között csak 12 új antibiotikumot engedélyeztek<sup>12,13</sup>. Éppen ezért, az akadémiai kutatások és klinikai fejlesztések támogatottsági szintje alacsony, ami tovább

nehezíti a fejlesztések előrehaladását<sup>10</sup>. Tovább hátráltatja a kutatásokat, hogy az újonnan piacra dobott antibiotikumokra hamar megjelenik a rezisztencia, ezért az idő- és pénzigényes fejlesztések hamar fölös erőfeszítésé válnak<sup>14</sup>.



**2. ábra Az antibiotikum fejlesztés szakaszai, az adott szakaszban vizsgált molekulák száma és ahhoz szükséges idő és anyagi támogatás mértéke.**<sup>14</sup>

Mint láthatjuk, jelentős probléma a már alkalmazott antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia, ami ellehetetleníti azok alkalmazását. Ezért a kutatások kezdeti lépéseinél a legnagyobb hangsúlyt arra kell fektetni, hogy olyan molekulákat fejlesszünk gyógyászati célokra, melyek használata hosszútávon lehetséges a rezisztencia elkerülésével.

Az új, kis molekulájú antibiotikumok mellett lehetséges megoldás az olyan megközelítések fejlesztése, melyek egyelőre a klasszikus antibiotikum kezelések alternatívái. Ilyen megközelítések a vakcináció, a fágterápia, a nanotechnológia, gyógyszer újrapozicionálás, illetve ennek a disszertációnak a témaköre, az antimikrobiális peptidek (röviden AMP-k)<sup>15,16,17</sup>. Az AMP-k rezisztencia hajlama vitatott a szakirodalomban. Hatásmechanizmusokat figyelembe véve a rezisztencia ritkábban alakul ki velük szemben<sup>18,19</sup>, ellenben már több tanulmányban kimutatták, hogy a baktériumok egyes AMP-kkel szemben képesek rezisztenciát fejleszteni<sup>20,21,22,23</sup>. Az AMP-k pozitív tulajdonságait kihasználva és a korai rezisztencia kísérletekkel olyan területet nyithatunk meg az antibakteriális szerek kutatásában, mely hosszútávon gyümölcsöző lehet.

## 1.2 ANTIMIKROBIÁLIS PEPTIDEK (AMP-K)

Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) rövid, 8-50 aminosavból álló fehérje molekulák<sup>24</sup>. Felépítésük, szerkezetük és töltésük alapján nagy diverzitással rendelkeznek. Az élővilág minden szintjén megtalálhatóak. Prokarióta és eukarióta szervezetek egyaránt termelik, fejlettebb immunrendszerrel rendelkező fajoknál a veleszületett immunitás szerves részét képezik<sup>24</sup>. Mivel a rovarok és növények nem rendelkeznek adaptív immunrendszerrel, az antimikrobiális peptidek jelentik elsődleges védekezésüket a kórokozó mikroorganizmusok ellen<sup>25,26</sup>. Az AMP-k aktivizálódnak a mikrobiális fertőzés hatására, így gyors és hatékony védelmi vonalat építenek ki a termelő szervezet számára<sup>27</sup>. Közvetlen ölő hatással rendelkeznek vírusok, Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, gombák<sup>28</sup>, továbbá rákos sejtek ellen is<sup>29</sup>. A fejlett immunrendszerrel rendelkező szervezeteknél az immunrendszer szabályozásában is részt vesznek<sup>30</sup>.

A legtöbb AMP általában pozitívan töltött peptid molekula<sup>24</sup>. Felépítésük szerint több csoportba oszthatók hosszuk, másodlagos és harmadlagos szerkezetük alapján, illetve a diszulfid hidak megléte vagy hiánya szerint<sup>24,27,28</sup>. Az  $\alpha$ -helikális peptidek, mint a cecropin és cathelicidinek, szerkezete hozzájárul az erős antibakteriális hatásához<sup>28,31</sup>. A ciszteinben gazdag AMP-k szerkezetét diszulfid hidak erősítik,  $\beta$ -redő szerkezetet vesznek fel<sup>28</sup>. Ilyen AMP-k a defenzinek, mint a humán  $\alpha$ - és  $\beta$ -defenzinek<sup>28,31</sup>. De szintén diszulfid hidakat tartalmaznak a patkórák által termelt tachyplesinek is<sup>32</sup>. Az AMP-kben, számos esetben egyes aminosavak dominálnak, mint a humán nyálból izolált hisztatin hisztidinben<sup>31</sup>, a cathelicidinek prolinban<sup>31</sup> vagy az indolicidin triptofánban gazdag AMP-k<sup>33</sup>. A baktériumok által termelt AMP-k gyakran ritka módosításokkal rendelkeznek<sup>34</sup>. Ide tartoznak a *Bacillus* nemzetség által termelt polimixinek, melyek L- $\alpha,\gamma$ -diaminóvajsavat tartalmaznak<sup>35</sup>.

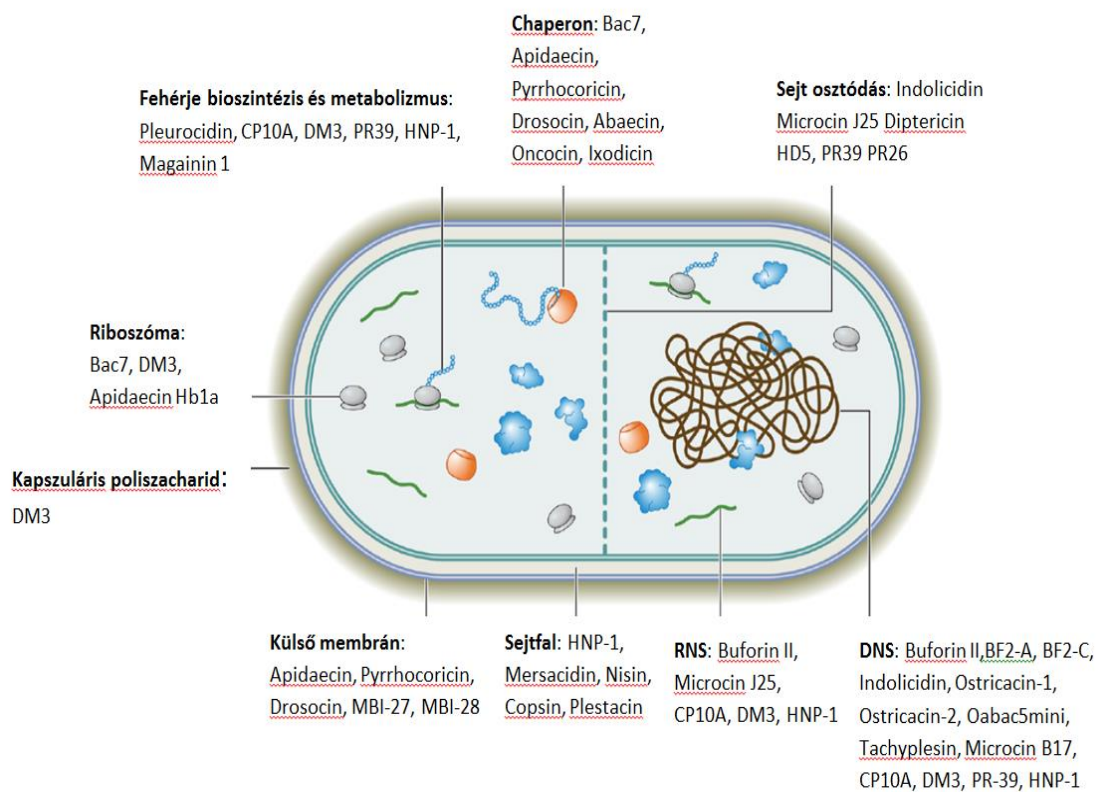
## 1.3 AZ AMP-K HATÁSMECHANIZMUSA

A kationos AMP-k szelektíven fejtik ki ölő hatásukat baktériumokkal szemben<sup>19,24</sup>. Fő támadási pontjuk a bakteriális membrán, de ölő hatásukat intracelluláris célpontokon keresztül is kifejthetik<sup>36</sup>. A szelektivitás a prokarióta és eukarióta membrán felépítése közötti különbségek következménye (3. ábra)<sup>37</sup>. Az eukarióta sejtmembrán gazdag koleszterinben, külső felszíne foszfatidil-kolin és szfingomielin foszfolipidekből épül fel, melyek semleges



modell” szerint a peptidek felgyűlnek a membrán külső felszínén és nagy koncentrációban detergenssekhez hasonlóan micellákat képezve károsítják a membrán stabilitását.<sup>27,28,42</sup>

Az AMP-k másik fő mechanizmusa az intracelluláris célpontok támadása (4. ábra)<sup>43</sup>. A bejutás történhet közvetlen penetrációval vagy endocitózissal<sup>44</sup>. A baktériumok fehérjeszintézisét, a DNS megkötéstől a chaperonok blokkolásáig, minden szinten tudják gátolni. Az indolicidin szelektíven tud kötődni a DNS-hez, ezzel gátolva a DNS replikációt és transzkripciót<sup>45,46</sup>. A tachyplestin szintén képes a DNS megkötésére, egyedi szerkezetének köszönhetően be tud kötődni a DNS hélix kis árkába<sup>47</sup>. A pleurocidin letális dózisban képes gátolni a fehérje, DNS és RNS szintézist<sup>48</sup>. A PR39 szintén képes számos metabolikus útvonalat gátolni a részt vevő enzimek translációjának gátlásával, illetve közvetlenül a ko-enzimek gátlásán keresztül<sup>49</sup>. A HBD3 képes kötődni a bakteriális membrán stabilitásában kulcsszerepet játszó lipid II-höz, ezáltal gátolni a sejtfalszintézist<sup>50</sup>. A fenti példákon túl számos tanulmányban kimutattak további folyamatokat, melyek az AMP-k sokszínű intracelluláris célpontjait mutatja be, mint az AMP-k fehérjék feltekeredését, proteolízisét, a sejtosztódás folyamatát gátló, valamint az LPS megkötni mechanizmusait<sup>43</sup>.



4. ábra Az AMP-k fő bakteriális célpontjai.<sup>43</sup>

Egyes AMP-k képesek mind a membránt mind egy adott intracelluláris célpontot is támadni<sup>43</sup>. Azt, hogy melyik célpont a domináns, azt a bakteriális faj, a baktérium növekedési fázisa és az AMP koncentrációja egyaránt befolyásolhatja<sup>51, 52, 53</sup>. Az AMP-k hatása nem minden esetben vezet a baktérium pusztulásához, hanem különböző szimbiotikus kapcsolatok kiépítésében is kulcsszerepet játszanak. A humán  $\beta$ -defenzinek hatással vannak a bélflórában található baktériumokra<sup>54</sup>, illetve az NCR peptidek a pillangósvirágú növények gyökérgümőiben található nitrogénfixáló baktériumokkal kiépített szimbiózist szabályozzák<sup>55</sup>.

#### **1.4 AZ AMP-K FIZIKAI-KÉMIAI TULAJDONSÁGAI**

Az AMP-k felépítése és az abból származó fizikai-kémiai tulajdonságok jelentős mértékben befolyásolják az antibakteriális hatékonyságát és a humán sejtekkel szembeni toxicitását<sup>56</sup>. Ezeknek a tulajdonságoknak az ismeretével lehetőség nyílik az AMP-k olyan módosításaira, amelyekkel még kedvezőbb szerkezetet alakíthatunk ki.

Az egyik legmeghatározóbb tulajdonság az AMP-k átlagos töltöttsége. A pozitív töltés biztosítja az elektrosztatikus vonzást a bakteriális membránhoz, de ez a töltöttség hatással van a humán sejtekkel szemben mutatott toxicitásra is<sup>41</sup>. Megfigyelték, ha a magainin-2 származékának töltését +3-ról +5-re növelték, akkor nagyobb volt az antibakteriális hatás, viszont ha ezt az értéket már +7-re emelték, nagyobb lett a humán sejtekkel szemben a hemolitikus aktivitás<sup>57</sup>.

A membránba való beékelődést a peptid hidrofobicitása és amfipaticitása egyaránt befolyásolja. Átlagosan az AMP-ket felépítő aminosavak 50%-a hidrofób<sup>57</sup>, ezért a membránba való beékelődés szempontjából optimális hidrofobicitás lehetővé teszi, hogy az AMP a lehető leghatékonyabban fejtsse ki ölü hatását<sup>41</sup>.

A peptid lánc hossza szintén fontos funkcionális szerepet tölt be<sup>36</sup>, hiszen befolyásolja a peptid 3D szerkezetét és aktivitását is<sup>41</sup>. A rövidebb fehérjék általában kevésbé toxikusak és jobb farmakológiai profillal rendelkeznek<sup>28,58</sup>.



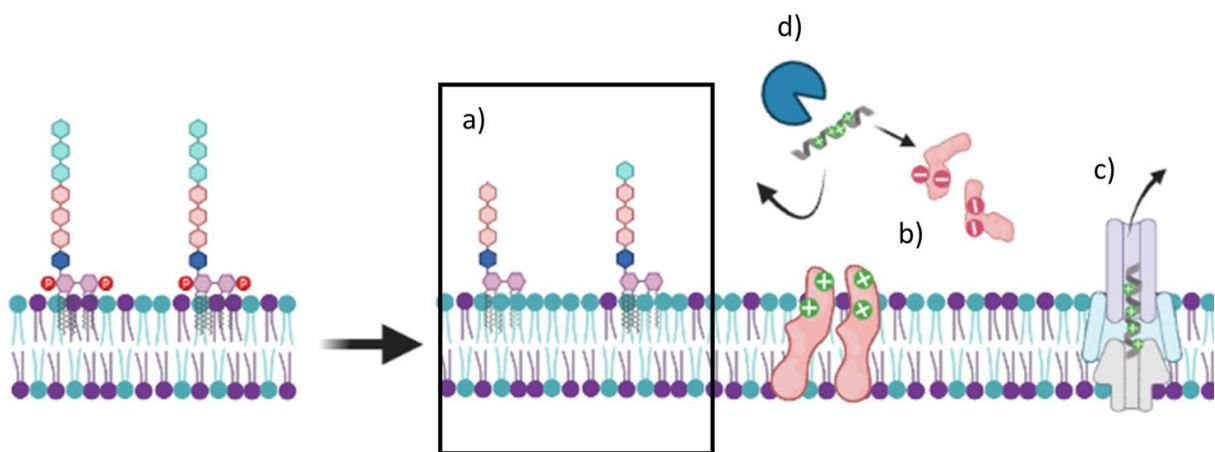
## 1.5 AMP REZISZTENCIA FOLYAMATOK

Az antibiotikumokhoz hasonlóan az AMP-kkel szemben is kialakulhat rezisztencia. A rezisztencia megjelenése ebben az esetben is történhet a baktérium saját genetikai állományában bekövetkezett, *de novo* mutációkkal, illetve a baktérium beszerezheti egy másik baktériumtól is a horizontális géntranszfer révén<sup>59</sup>. Az AMP-kkel szembeni rezisztencia leggyakoribb folyamatai a bakteriális felszín töltöttségének változtatása és az AMP-k hatástalanítása<sup>20</sup>.

Mivel az AMP-k hatásának első lépése a membránnal való kölcsönhatás, a membrán átrendeződés kulcsfolyamat a védekezésben<sup>60</sup>. A Gram-negatív baktériumok komplex membrán rendszerrel rendelkeznek, amely külső és belső membránból épül fel. A kettő között található a periplazmatikus tér és a peptidoglikán réteg<sup>61</sup>. A külső membránba aszimmetrikusan épülnek be a foszfolipidek, és az LPS (lipopoliszacharid) molekulák<sup>37</sup>. A külső membrán úgy működik, mint egy szűrő réteg, védi a baktériumot a hidrofil molekuláktól<sup>62</sup>. A belső membrán ezzel szemben szimmetrikus felépítésű, a hidrofób molekuláktól védi a baktériumot<sup>61</sup>. A külső membrán átrendeződésének hatására kevésbé lesz átjárható és egyidejűleg csökken a negatív töltöttsége is. Ilyen membrán átrendezési folyamatok az LPS módosítása és külső felszínre transzportálásának csökkentése, illetve a foszfolipidek szállításának megváltoztatása a külső és belső membrán között (5. ábra).

A fiziológiástól eltérő membrán összetétel és töltöttség kialakulása hozzájárul ahhoz, hogy a külső membrán kevésbé legyen negatív, ami csökkenti az érzékenységet AMP-kkel szemben<sup>60</sup>. Az LPS szintézisében szerepet játszó *waa* gének termékei foszforilálják az LPS belső magját, ezekben a génekben bekövetkezett mutációk hatására kevesebb foszfát épül be az LPS molekulába, amely így kevésbé lesz negatív<sup>63</sup>. Az LpxC a lipid A bioszintézisének első lépését katalizálja, mutációja kiegyensúlyozatlan foszfolipid-LPS arányt eredményez a külső membránban<sup>64</sup>. Az Lpx fehérjék az LPS szintézis további lépéseit is katalizálják<sup>65</sup>. Az Lpt peptidok felelősek az LPS molekula külső felszínre szállításáért, mutációik általi diszfunkciók hatására az LPS molekulák felhalmozódnak a periplazmatikus térben<sup>66</sup>. Emellett a foszfolipid transzportban szerepet játszó *mia*, *yeb* és *pqi* gének felelősek a külső membrán aszimmetriájának kiépítésében<sup>67,68</sup>.

A baktériumok képesek kapszuláris poliszacharidokkal körbevenni a felszínüket, ezáltal az AMP-k nem tudnak közel kerülni a baktérium felszínéhez<sup>69</sup>. A külső membránba beépülhetnek olyan további fehérjék, amelyek semlegesítik annak töltését, illetve a baktériumok képesek olyan kis molekulák termelésére, melyek semlegesítik az AMP-eket<sup>70,71</sup>. A bakteriális proteázok, mint az aszpartát- és metalloproteázok lebontják az AMP-eket, ezáltal semlegesítve azokat<sup>72,73</sup>. Végül az efflux pumpák általi közvetített rezisztencia szintén hatásos védekezés lehet az AMP-ekkel szemben<sup>74,75</sup> (5. ábra).



**5. ábra** Az AMP-ekkel szemben kialakuló rezisztencia folyamatok sematikus ábrázolása. **a)** membrán átrendeződés során megváltozhat az LPS molekulák felépítése, illetve a membránt felépítő foszfolipidek aránya. **b)** membránba épült pozitívan töltött fehérjék, vagy negatívan töltött csali fehérjék, amelyek gátolják az elektrosztatikus vonzást. **c)** AMP-k eliminálása efflux pumpákon keresztül. **d)** AMP-k lebontása extracelluláris proteázokkal.

A fentebb ismertetett rezisztencia folyamatok ellenére a szakirodalom gyakran emlegeti az AMP-eket, mint rezisztencia mentes, vagy rezisztenciára kevésbé hajlamos antibakteriális szereket<sup>18,19</sup>. E megállapítás szerint az AMP-k a rezisztencia szempontjából hatékonyabbak az antibiotikumoknál, bár ezt szisztematikusan még nem vizsgálták. Mivel a különböző AMP-k hatásmechanizmusa hasonló, aggodalomra ad okot, hogy, ha a gyógyszerként alkalmazott szintetikus AMP-kre kialakuló rezisztencia csökkent ellenállást biztosíthat az immunrendszert képező AMP-ekkel szemben is<sup>20</sup>. Ezért a gyógyszerfejlesztések előtt elkerülhetetlenek a rezisztencia és a potenciális keresztrezisztencia vizsgálatok, hogy olyan jelölteket találjunk,

amelyekkel szemben nem alakul ki rezisztencia és ez által nem veszélyezteti az immunrendszer összetett működését.

## 1.6 AZ AMP-K KLINIKAI JELENTŐSÉGE

Az AMP-k számos kedvező tulajdonsággal rendelkeznek az antibiotikumokhoz képest, ami miatt jelentős potenciállal rendelkeznek, mint antibakteriális szerek<sup>76</sup>. Hatásspektrumuk szélesebb, de ezt a felépítésük módosításával lehet szűkíteni<sup>77</sup>. Az antibiotikum fejlesztés egyik kritikus pontja, hogy az antibiotikumnak be kell jutnia a baktériumba, hogy elérje célpontját<sup>78</sup>. Ezzel szemben az AMP-k fő támadási pontja a bakteriális membrán, ennél fogva célpontja könnyen hozzáférhető<sup>24,40,51</sup>. Emellett intracelluláris célpontjait is könnyebben eléri, mert felépítésének köszönhetően könnyebben átjut a membránon<sup>43</sup>. Az antibiotikum fejlesztés egyik iránya jelenleg olyan antibiotikumok fejlesztése melyek egyszerre több célpontot is támadnak, ezzel védekezve a potenciális rezisztencia kialakulása ellen<sup>79</sup>. Az AMP-k fentebb ismertetett hatásmechanizmusa alapján láthatjuk, hogy képesek egyszerre több célpontot is támadni<sup>43</sup>. Bár az AMP-k számos pozitív tulajdonsággal rendelkeznek, hajlamosak toxikus, allergiás reakciók kiváltására, a gyártási költségek jelentősen magasabbak, és érzékenyebbek a környezetük só összetételére és pH-jára<sup>36</sup>.

A jelenleg elérhető gyógyszerek között már több AMP-t is engedélyeztek klinikai használatra. A kolisztint, mint polimixin származékot jelenleg, mint végső lehetőséget alkalmaznak olyan bakteriális fertőzések kezelésére, amellyel szemben más antibiotikumok már hatástalanok<sup>80,81</sup>. Sajnos az elmúlt években a colistinnel szembeni rezisztencia is elterjedt, ezáltal veszélyeztetve ennek a szernek a hatékony alkalmazását<sup>82</sup>. További engedélyezett AMP-k a gramicidin és daptomicin, amelyeket Gram-pozitív baktériumok ellen alkalmaznak, illetve a nizin, amelyet élelmiszerek tartósítására használnak<sup>83-85</sup>.

Számos AMP van jelenleg preklinikai fejlesztés alatt. Ilyen AMP a PXL150, amely hatékony *Pseudomonas aeruginosa* ellen egér modellben<sup>86</sup>, az LL37 és IDR-1 tüdőgyulladás kezelésére és biofilm képző baktériumok ellen<sup>87</sup>, illetve a nizin, amely hatékony *Clostridioides difficile* fertőzések kezelésére<sup>88</sup>. A klinikai fejlesztések első fázisában jelenleg több polimixin származék is található, mint például az SPR-206, MRX-8 illetve QPX9003<sup>13</sup>. A polimixin származékok fő fejlesztési iránya a vesetoxicitás mérséklése. Az elmúlt években több AMP is

eljutott a klinikai fejlesztések harmadik fázisába. Ellenben sok AMP elbukott ezeken a teszteken a nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok miatt, illetve nem volt hatékonyabb az aktuálisan alkalmazott antibiotikumnál<sup>42</sup>. Ennek ellenére ezek az AMP-k a közeljövőben hasznosulhatnak, mivel kevésbé hajlamosak a rezisztenciára és az összehasonlításra használt antibiotikumok hatékonysága csökken a terjedő rezisztencia folyamatok miatt.

Az AMP-k kedvezőtlen tulajdonságai ellen több megközelítést is hatékonyan alkalmaznak. Az egyik lehetőség, hogy rövidebbek legyenek az AMP-k, amivel csökkenthető a gyártási költség<sup>42</sup>. Az LL37 rövidebb formája, az OP-145 szintén hatékony baktériumok ellen<sup>89</sup>. A gyártási költségek szintén csökkenthetők, ha a szilárd fázisú fehérjeszintézis helyett különböző mikroorganizmusokkal termeltetik az AMP-eket<sup>90</sup>. A toxicitás csökkenthető, ha az AMP-eket valamilyen szállító molekulába csomagolják, például liposzómába vagy nanopartikulumokba, illetve ha pro-drog formában juttatjuk be a szervezetbe<sup>42</sup>. A proteolitikus stabilitás növelhető a ciklizációval, amidálással, acilálással vagy D-aminosavak használatával<sup>91,92</sup>. Mindemelett az AMP-k pozitív kölcsönhatást (szinergizmust) mutatnak antibiotikumokkal ezért, mint adjuvánsok növelik az antibiotikumok hatékonyságát<sup>93,94</sup>. Ezzel elérhető, hogy kevesebb AMP-t használjunk a kezelés során, amivel csökkenthető a költség és a toxikus mellékhatások egyaránt, illetve a kombinációban használt antibiotikum hatékonysága is visszaállítható.

## 2 CÉLKITŰZÉS

---

Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) potenciális megoldásai az antibiotikum rezisztencia krízisnek, viszont ezek a molekulák csak akkor jelenthetnek valódi megoldást, ha hosszú távon, rezisztencia kialakulása nélkül alkalmazhatóak. A szakirodalomban jelenleg vitatott, hogy az AMP-ekkel szemben milyen mértékű rezisztencia alakul ki antibiotikumokkal összehasonlítva. Emellett további kérdés, hogy a rezisztencia mechanizmusai AMP specifikusak-e vagy növelik az ellenállóképességet számos AMP-vel szemben.

Doktori munkám során ezért célul tűztem ki, hogy nagy áteresztőképességű módszerekkel vizsgáljam az AMP-ekkel szemben kialakuló rezisztenciát, és azt konvencionális antibiotikumokkal kialakuló rezisztenciával hasonlítsam össze. Munkám során az alábbi kísérletek elvégzését tűztem ki célul:

- Rendszer szinten vizsgálni a *de novo* mutációk hatását az AMP rezisztenciára, antibiotikumokkal összehasonlítva. Ehhez egy hosszútávú laboratóriumi evolúciós kísérletet végzünk el 14 AMP-vel és 12 konvencionális antibiotikummal. Vizsgálataink a laboratóriumi *E.coli* törzsek mellett kiterjedtek klinikailag releváns patogén baktérium fajokra is.
- Rendszer szinten vizsgálni a horizontális géntranszfer, illetve a génamplifikáció hatását az AMP-ekkel szemben kialakuló rezisztenciára.
- A kialakult rezisztencia folyamatok általánosságának vizsgálata, az AMP keresztrezisztencia hálózat feltérképezése.
- A kialakult rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálata.

## 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

---

### 3.1 BAKTÉRIUM TÖRZSEK

A kísérletek jelentős részétben *Escherichia coli* K-12 BW25113 törzset használtunk. Ez a törzs általánosan használt molekuláris és mikrobiológiai kísérletek elvégzéséhez. Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a mutációs ráta hatását az AMP-kel szemben kialakuló rezisztenciára egy *E. coli* mutD5 mutátor törzset használtunk, mely törzs mutációt hordoz a *dnaQ* génben (L73W és A164V). Ez a törzs  $10^2$ - $10^3$ -szor nagyobb mutációs rátával rendelkezik<sup>95</sup>. A TPII-vel és PXB-vel szemben kialakuló rezisztenciát szintén tanulmányoztuk az *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (*S. enterica* LT2), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 100301 és *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 törzsekkel. Vizsgáltuk a legígéretesebb AMP-k aktivitási spektrumát az alábbi törzsekkel szemben: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* NCTC 13351, *E. coli* ATCC BAA-2469, *E. coli* ATCC BAA-2340, *Shigella sonnei* HNCMB 25021, *Shigella flexneri* HNCMB 20018, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *S. enterica* LT2, *Salmonella* Enteritidis HNCMB 10092, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *K. pneumoniae* NCTC 13440, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 17978, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecium* ATCC 700221, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 és *S. aureus* ATCC 43300.

### 3.2 ANTIBAKTERIÁLIS SZEREK

14 különböző AMP-t vizsgáltunk a tanulmányunkban, melyek nevét és tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza. Az AMP-eket a ProteoGenix cég szintetizálta, kivéve a PROA és PXB AMP-eket, melyeket a Sigma-Aldrich-tól szereztünk be. Az AMP-eket steril vízben oldottuk fel és felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tároltuk.

Antimikrobiális peptid (AMP)		Forrás	Szekvencia	3D szerkezet
Rövidítés	Név			
BAC 5	Bactenicin 5	Szarvasmarha	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPP FRPPLGPPF	PR gazdag <sup>96</sup>
CAP18	Nyúl 18-kDa kationos antimikrobiális is peptid	Nyúl	GLRKRLRKFNRKIKKELKIGQKIQGFVPKL APRTDY	$\alpha$ hélix <sup>97</sup>
CP1*	Cecropin P1	Vékonybél orsóféreg	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	$\alpha$ hélix <sup>98</sup>
HBD3	Humán beta-defensin-3	Humán	GIINTLQKYRVRGGRAVLSPKEEQIGKST RGRKRRKK	kombinált $\alpha$ hélix és $\beta$ szerkezet <sup>99</sup>
IND*	Indolicidin	Szarvasmarha	ILPWKWPWWPWRR	$\beta$ redő <sup>33</sup>
LL37	LL-37 cathelicidin	Humán	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV PRTES	$\alpha$ hélix <sup>100</sup>
PEX	Pexiganan	Szintetikus	GIGKFLKAKKFGKAFVKILKK	$\alpha$ hélix <sup>101</sup>
PGLA	Peptid Glycine-Leucin Amid	Béka	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL	$\alpha$ hélix <sup>102</sup>
PLEU	Pleurocidin	Hal	GWGSFFKAAHVKGKHAALHLYL	$\alpha$ hélix <sup>103</sup>
PR39	PR-39	Sertés	RRRPPPYLPRPPPPFFPRLPPRIPPGFPP RFPPRF	PR gazdag <sup>104</sup>
PROA	Protamin	Hal	TSSPPAAVVVRRRRRRRRRRRRRRRRRR	R gazdag <sup>105</sup>
PXB	Polimixin B	Baktérium	KTKKKFLKKT	$\beta$ és $\gamma$ hurok <sup>35</sup>
R8*	R8	Szintetikus	FLGKVFKLASKVFAVFGKV	ismeretlen <sup>106</sup>
TPII*	Tachyplesin II	Tőrfarkú rák	RWCFRVCYRGICYRKCR	$\beta$ szerkezet diszulfid hidakkal <sup>32</sup>

**1. táblázat: a tanulmányban vizsgált AMP-k rövidítése, neve, forrása, aminosav sorrendje és felépítése**

A tanulmányban 12 antibiotikumot vizsgáltunk, amelyek nevét és tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza. Mindegyik antibiotikumot a Sigma-Aldrich-től szereztünk be, kivéve az ERY (AMBRESCO) és DOX (AppliChem) antibiotikumokat. A megfelelő oldószer alkalmazása után (víz vagy DMSO) az oldatokat szűréssel sterilizáltuk, majd -20 °C tároltuk felhasználásig.

Antibiotikum		Hatásmechanizmus	Antibakteriális hatás típusa
Rövidítés	Név		
TET	Tetraciklin	30s riboszóma alegység gátló	Bakteriosztatikus
DOX	Doxiciklin	30s riboszóma alegység gátló	Bakteriosztatikus
CHL*	Klóramfenikol	50s riboszóma alegység gátló	Bakteriosztatikus
ERY	Eritromicin	50s riboszóma alegység gátló	Bakteriosztatikus
TRM*	Trimetoprim	folsav bioszintézis gátló	Bakteriosztatikus
APC	Ampicillin	sejtfalszintézis gátló	Baktericid
FOX	Cefoxitin	sejtfalszintézis gátló	Baktericid
NAL	Nalidixsav	giráz gátló	Baktericid
CPR*	Ciprofloxacín	giráz gátló	Baktericid
NIT	Nitrofurantoin	összetett hatásmechanizmus	Baktericid
TOB*	Tobramycin	fehérjészintézis gátlás	Baktericid
KAN	Kanamycin	fehérjészintézis gátlás	Baktericid

**2. táblázat: a tanulmányban vizsgált antibiotikumok rövidítése, neve, hatásmechanizmusa és élő hatásának típusa.**

Az egyes AMP-k és antibiotikumok dózis-hatás görbéit az 1. függelék mutatja be.

### 3.3 HASZNÁLT TÁPOLDATOK

A kísérletek jelentős részében Minimal Salt (MS) médiumot használtuk. Az MS az általánosan használt gazdag tápokkal ellentétben állandó, kevésbé változékony környezetet biztosít az evolúciós kísérletekhez. Ezzel az állandósult környezettel biztosítható, hogy az evolúciós kísérlet során a növekvő antibakteriális szer hatását vizsgáljuk. Az MS összetételét előzetesen optimalizáltuk, ezért az általunk használt tápoldat összetétele a következő: 1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  és 7 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{FeCl}_3$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tiamin hidroklorid, 0.2% Casamino sav és 0.2% glükóz<sup>107</sup>.



Azokban az esetben, amikor a kísérlet gazdag táp használatát írta elő Luria-Bertini (LB) tápot használtunk. Az LB tápoldat összetevői: 5g/L NaCl, 5g/L élesztőkivonat, 10g/L tripton. Minden összetevőt a Sigma-Aldrich-tól szereztünk be.

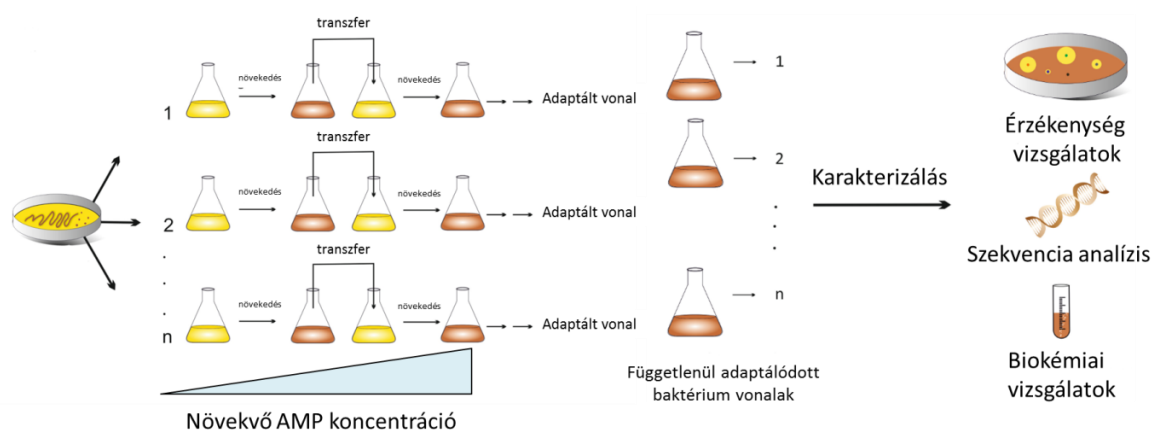
### 3.4 LABORATÓRIUMI EVOLÚCIÓS KÍSÉRLET

Az evolúciós kísérletet úgy alakítottuk ki, hogy a populációk kihalását elkerülhessük és a legnagyobb rezisztenciájú törzsekre tudjunk szelektálni. Azáltal, hogy csak a legmagasabb rezisztenciát elérő populációt oltottuk tovább, a lehető legmagasabb rezisztencia elérésére kényszerítettük az adott populációt. Egy adott szerhez 10 párhuzamos vonalat adaptáltattunk. A párhuzamos vonalakat 370 µl végtérfogatú MS médiumban növesztettük 96 lyukú „deep-well” lemezekben. Az *E.coli* K-12 BW25113 és *E.coli* mutD5 törzset 30 C°, az *E.coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *A. baumannii* ATCC 17978 és *S. enterica* LT2 37 C° hőmérsékleten inkubáltuk 72 órán keresztül 300 r.p.m rázással. Az egyes AMP-k gátlási hatékonyságára nem volt hatással a hosszabb inkubációs idő (3. táblázat). A keresztfertőzések megelőzése érdekében sakktábla elrendezést használtunk a lemezekben. A mérések pontosságának és reprodukálhatóságának maximalizálása érdekében egy robotizált folyadékkezelő (Hamilton Star Workstation) rendszert alkalmaztunk.

A baktériumok növekedési ideje (óra)	MIC (elő-inkubáció nélkül)			MIC (elő-inkubáció után)		
	24	48	72	24	48	72
TPII (µg/mL)	5	5	5	6	6	6
PXB (µg/mL)	4.2	4.2	4.2	5	5	5
LL37 (µg/mL)	14.5	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4
BAC5 (µg/mL)	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5

**3. táblázat: az inkubációs idő hatása egyes AMP-k MIC értékére.** Teszteltük, hogy a hosszabb inkubációs időnek van-e hatása az AMP-k MIC értékére. Ehhez négy párhuzamos AMP hígítási sort készítettünk. Az első hígítási sort a készítés napján oltottuk be *E.coli* K-12 BW25113 törzssel, még a maradék 3 hígítási sort elő-inkubáltuk 24, 48 illetve 72 órát, és az inkubációs idő letelte után oltottuk be. Nem tapasztaltunk jelentős különbséget az MIC értékekben az élő-inkubált és a frissen beoltott lemezekben mért MIC értékek között.

A kísérletet egy, az adott antibakteriális szer 50%-os gátlási koncentrációján kezdtük. Ezt követően az adott populációt a használt antibakteriális szer 4 különböző koncentrációjára oltottuk át (0.5x; 1x; 1.5x; 2.5x). A további átoltások során a következő módon jártunk el: minden átoltás előtt a populációk növekedését azok optikai denzitásának mérésével becsültük meg. Ehhez egy Biotek Synergy 2 lemez olvasót használtunk. Csak azokat a populációkat oltottuk tovább a 4-ből, amelyek a legmagasabb koncentráció mellett is mutattak növekedést ( $OD_{600} > 0.2$ , 96-os lemezen mért). Az átoltások során a legsikeresebb populációból 20  $\mu\text{l}$ -t oltottunk tovább 4 egymástól független lemez ugyanazon lyukába, amelyekben az adott antibakteriális szer koncentrációja az átoltott populáció előző koncentrációjának adott számú (0.5x; 1x; 1.5x; 2.5x) többszöröse volt. Ennél fogva a 4 populációból csak az egyik, a legmagasabb rezisztenciával rendelkező populációval folytattuk az evolúciós kísérletet. A kísérlet során 20 ilyen transzfer hajtottunk végre (6. ábra). Összességében 138 AMP adaptált (2 törzset azok limitált növekedése miatt kizártunk a további analízisekből) és 120 antibiotikum adaptált *E.coli* K-12 BW25113 vonalat generáltunk. Az *E.coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *A. baumannii* ATCC 17978 és *S. enterica* LT2 törzseket PXB-hez és TPII-höz adaptáltattuk, 10 párhuzamos vonalat hoztunk létre mindegyik AMP és baktérium faj esetében. Az *E.coli* mutD5 törzset TPII-höz adaptáltattuk szintén 10 párhuzamos populációval.



**6. ábra** A laboratóriumi evolúciós kísérlet sematikus ábrázolása

### 3.5 MINIMÁLIS GÁTLÁSI KONCENTRÁCIÓ (MIC) MEGHATÁROZÁSA

Az MIC (minimal inhibitory concentration) meghatározását egy standard lineáris hígítási soron alapuló technikával végeztük<sup>108</sup>. 11 lépéses hígítási sorokat készítettünk 96 lyukú lemezekben 3 replikátumban törzsenként és antibakteriális szerenként. Minden mérést minimum kétszer ismételtünk meg. Minden lyukba  $5 \times 10^5$  sejt/ml-t oltottunk és a lemezeket  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (*E. coli* K-12 BW25113 és mutD5) illetve  $37\text{ }^\circ\text{C}$  (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *A. baumannii* ATCC 17978 és *S. enterica* LT2) hőmérsékleten inkubáltuk 18-24 óráig 300 r.p.m. rázatás mellett. A sejtek növekedésének meghatározásához megmértük azok optikai denzitását ( $OD_{600}$ , Biotek Synergy 2 lemezolvasó). Az MIC értéknek azt a koncentrációt tekintettük, ahol teljes volt a növekedés gátlása ( $OD_{600} < 0.05$ ). A relatív MIC értéket a következő módon számoltuk ki:  $MIC_{\text{relatív}} = MIC_{\text{evolált}}/MIC_{\text{kontrol}}$

### 3.6 NAGY ÁTERESZTŐKÉPESSÉGŰ FITNESZMÉRÉS

Az evolált vonalak fitnessét a sejtek optikai denzitásának ( $OD_{600}$ ) folyamatos monitorozásával vizsgáltuk, MS médiumban, 384 lyukú lemezekben. 60 antibiotikum adaptált vonal és 38 AMP adaptált vonal fitnessét mértük le, legalább 4-t a 10 adaptált vonalból. Minden mérést minimum kétszer ismételtünk meg (mérésenként 6 technikai replikátum). A kiindulási kultúrákat 96 lyukú lemezekben növesztettük stationer fázisig MS médiumban. Ez után a növekedési periódus után a kultúrákat azok optikai denzitása alapján úgy hígítottuk ki, hogy 50 000 sejt legyen 60  $\mu\text{l}$ -ben. A sejtek növekedését 5 percenként mértük Biotek Synergy 2 lemez olvasóval 24 órán keresztül. A növekedési görbék integrál értékét Biotek Gen5 Data Analysis Softver segítségével számoltuk ki az 1 és 24 óra között mért értékekből. A mérés kezdetén bekövetkezett párosodás miatt az első 1 órától származó adatokat kizártuk az adatelemzésből.

### 3.7 GÉNAMPLIFIKÁCIÓ HATÁSÁNAK MÉRÉSE

Az ASKA könyvtár tartalmazza az összes *E. coli* ORF-t egy expressziós vektorba klónozva (pCA24N)<sup>109</sup>. A plazmidokon található ORF-ek túltermeltetését  $500\mu\text{M}$  izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktosidáz (IPTG) segítségével indukáltuk. Az MIC mérések során az LB médiumot 20  $\mu\text{g/ml}$  CHL-el egészítettük ki, mivel ez az antibiotikum az ASKA plazmidok szelekciós markere.

Kontroll törzsnek úgynevezett üres, ORF-t nem tartalmazó ASKA plazmiddal transzformált *E.coli* törzset használtunk. A méréseket megelőzően, az egyedi ASKA plazmidokat egybegyűjtöttük és *E. coli* K-12 BW25113 törzsbe transzformáltuk<sup>110</sup>, amellyel létrehoztuk az ASKA könyvtárat. Az ASKA könyvtárral elvégzett MIC mérésekhez az előzetesen leírt módszerrel hígítási sort készítettünk, a lyukakat 500 000 sejttel oltottuk be, mely a könyvtár ~100x lefedettségét biztosítja. Inkubáció után az MIC értékeket optikai denzitás méréssel határoztuk meg (OD<sub>600</sub>, Biotek Synergy 2 lemezolvasó).

### 3.8 FUNKCIONÁLIS METAGENOMIKA

A horizontálisan terjedő rezisztom karakterizálásához talaj mikrobiomból készítettünk funkcionális metagenomika könyvtárat, amellyel 4 antibiotikumot és 4 AMP-t teszteltünk. Ehhez kis genomiális fragmenteket (1.5-5 kb) klónoztunk nagy kópiaszámú plazmidba (pZErO-2), ahol indukálható promóterrel tudtuk a fragmentek expresszióját indukálni. A plazmidokat *E. coli* K-12 BW25113 törzsekbe transzformáltuk és teszteltük, hogyan befolyásolja a transzformált sejtek érzékenységét az adott antibakteriális szerrel szemben. A metagenomika könyvtárhoz a talajmintát Kaposvárról gyűjtöttük. A talajban található bakteriális DNS-t Quick-DNA Fecal/Soil Miniprep Kit (Zymo Research) segítségével izoláltuk a gyártó által leírt protokoll szerint. Ezek után Kintses és kollégái által leírt protokoll szerint végeztük a funkcionális metagenomika könyvtár építését<sup>111</sup>. A DNS fragmensek átlagos mérete ~ 2kb volt. A könyvtár méretét (3,6 Gb) úgy becsültük meg, hogy az átlagos DNS fragmens méretét megszoroztuk a teljes kolóniaképző egységek (CFU- colony forming unit) számával.

A funkcionális szelekciót agar lemezeken hajtottuk végre, ahol a lemezek a 4 AMP egyikét (R8, TPII, CP1, IND) vagy a kontrollként használt 4 antibiotikum egyikét (CPR, CHL, TRM, TOB) tartalmazta. Az általánosan használt protokoll helyett egy gradiens lemezes vizsgálatot végeztünk el, ahol a baktériumokat az adott antibakteriális szer koncentráció gradiensére szélesztettük az egyedi koncentrációk helyett<sup>112</sup>.  $2 \times 10^8$  sejtet inokuláltunk a funkcionális metagenomika könyvtárból a gradiens lemezekre. Ezáltal a metagenomika könyvtár minden tagja reprezentálva volt 10-100-szoros lefedettségben minden lemezen. Ez után a lemezeket 30 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. Kontroll törzsnek egy olyan *E. coli* K-12 BW25113

törzset használtunk, melyet olyan plazmiddal transzformáltunk, amelynek az inszert helyére egy hasonló méretű, funkció mentes fragmentet helyeztünk. A kontroll törzset szintén szélesztettük gradiens lemezekre. A kontroll lemezhez hasonlítva összegyűjtöttük azokat a telepeket, melyek rezisztenciát biztosító plazmidokat hordoztak. Az összegyűjtött kolóniákban található plazmidokat PCR reakcióban szaporítottuk fel a további Illumina szekvenáláshoz. Ehhez a plazmidokat izoláltuk a sejtekből InnuPREP Plasmid Mini Kit (Analytic Jena) felhasználásával. Az így kapott plazmidok szolgáltak templátként a PCR reakcióhoz.

Az Illumina szekvenálási leolvasásokhoz hosszabb DNS kontigokba való összeállításához egy korábban létrehozott munkafolyamatot módosított protokollját alkalmaztuk<sup>113</sup>. Egy próba mintán validáltuk és optimalizáltuk a munkafolyamatokat. Ez a próbaminta 5, már korábban szekvenált DNS kontigot tartalmazott. Ezek a minták korábbi metagenomikai minták szekvenálási adataiból választottuk ki. A MiSeq 2 × 250 bp PE szekvenálásból származó leolvasásokat a Genomics Workbench Tool program 9.0-s verziójában (CLC Bio) dolgoztuk fel, beleértve a következő lépéseket: az olvasások minőségét először 0.05-ös hiba küszöbértékkel levágtuk. Ezután az egymást átfedő PE-párokat egyesítettük. Az egyesített és nem egyesített leolvasásokat a pZErO-2 referencia plazmidra térképeztük, és csak azokat a leolvasásokat tartottuk meg, amelyek nem egyeztek a plazmid szekvenciával. A nyers adatokat ezután véletlenszerűen lemintáztuk 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 és 100%-ra, és minden mintavételi ponton két ismétlést generáltunk (MIRA 4.0.2.). Ezt követően a *de novo* szekvencia összeállítást minden ismétlésen külön-külön végeztük el. A MIRA *de novo* kontigjait a PCR oligonukleotidok jelenlétére és megfelelő orientációjára szűrtük, csak a teljes összeállítási termékeket megtartva. A teljes kontigokat tovább szűrtük az átlagos lefedettség értékei alapján úgy, hogy az egyes mintavételi pontokon belül csak a felső 20%-os legjobb lefedettséget tartottuk meg. Ezután összegyűjtöttük az összes mintavételi pontból származó kontigokat. Az egymással legalább 90%-os szekvencia azonosságot mutató redundáns kontigokat hosszuk legalább 80%-án történő NCBI *blastp* segítségével csoportosították, klaszterenként csak egy reprezentatív szekvenciát tartva meg. A fennmaradó kontigokat még egyszer szűrtük átlagos lefedettségük alapján, amíg csak azok az Illumina kontigok maradtak a mintában, amelyeknek megfelelő darabjuk van a referencia Sanger-szekvenciákban 100%-os lefedettséggel. Ez a kritérium akkor teljesült, ha azokat a

kontigokat eltávolítottuk, amelyek a lefedettségi eloszlások sűrűségi görbéjében külön csúcst alkottak. Az optimalizált munkafolyamatot alkalmaztuk a metagenomikus szelekcióból származó DNS kontigok összeállítására. Az így kapott kontigok ORF-jeinek funkcionális elemzéséhez az ORF-eket a Prokka programcsomag (1.1169-es verzió<sup>114</sup>) segítségével annotáltuk.

### 3.9 TELJES GENOM SZEKVENÁLÁS

Azokból az adaptációs kísérletekből választottunk vonalakat, amelyekre a 10 adaptált vonalból legalább 2 vonal ötszörös relatív MIC változást ért el a laboratóriumi evolúció során. Összesen 38 AMP-adaptált vonalat választottunk ki a teljes genom szekvenáláshoz. Az *E. coli* K-12 BW25113 genomiális DNS-t Sigma GenElute Bacterial Genomic DNA kit segítségével izoláltuk, és kvantifikáltuk Qubit dsDNA BR vizsgálattal Qubit 2.0 fluorométerben (Invitrogen). 200 nanogramm genomiális DNS-t fragmentáltunk Covaris M220 fókuszált ultrahang szonikátorban (csúcsteljesítmény: 55 W, terhelési tényező: 20%, 200 ciklus/sorozat, időtartam: 45 s) Covaris AFA csavaros kupakos szálas mikroTUBE-k segítségével. A fragmens méret eloszlást kapilláris gélelektroforézissel elemeztük, Agilent High Sensitivity DNA kit használatával Bioanalyzer 2100 műszerben (Agilent), majd indexelt szekvenáló könyvtárakat készítettünk TruSeq Nano DNA LT kit (Illumina) segítségével a gyártó protokollja szerint. Ez röviden magában foglalja a DNS-fragmensek vég javítását, a fragmentum méretének kiválasztását, az indexelt adapterek ligálását és a könyvtár gazdagítását korlátozott ciklusú PCR-rel. A szekvenáló könyvtárakat a Bioanalyzer 2100 készülékben lévő Agilent High Sensitivity DNA kit segítségével validáltuk (meghatároztuk a könyvtárak méretét), majd a mennyiségi meghatározást a qPCR alapú NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England, Biolabs) és egy Piko-Real valós idejű PCR rendszer (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. A 12 indexelt könyvtárból álló csoportokat egyesítettük, 0,1 N NaOH-val denaturáltuk, és hígítás után MiSeq Reagent Kit V2-500 (Illumina) készletbe töltöttük 8 pM koncentrációban. A 2 × 250 bp-os párvégi szekvenálást Illumina MiSeq szekvenszerrel, az elsődleges szekvenciaelemzést BaseSpace felhő alapú számítástechnikai környezetben, Generate FASTQ 2.20.2 munkafolyamattal végeztük. A párosított szekvenálási adatok FASTQ fájlformátumban lettek exportálva. A leolvasott értékeket Trim Galore (Babraham Bioinformatics) és cutadapt<sup>115</sup> segítségével vágtuk le, hogy

eltávolítsuk az adaptereket és alapokat, ahol a PHRED minőségi érték <20 volt. A levágott szekvenciákat eltávolítottuk, ha 150 bázisnál rövidebbek voltak. A FASTQC programot (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) használtuk az eredeti és vágott read-ek minőségének értékelésére. A Breseq programot alapértelmezett paraméterekkel használták minden mintához. A gdttools-t a mutációk hatásainak annotálására és több minta összehasonlítására használták. Az elemzés során a BW25113.gb referencia genomot használtuk.

### **3.10 REZISZTENCIA MUTÁCIÓK GENERÁLÁSA PORTMAGE MÓDSZERREL**

A 3 AMP rezisztens mutáns létrehozására a pORTMAGE<sup>116</sup> protokollt használtuk. A mutánsokat *E. coli* K-12 BW25113 genetikai háttéren hoztuk létre. A lehetséges AMP rezisztenciát biztosító mutációkat egy HBD3-hoz adaptált vonalból azonosítottuk. A mutánsok, melyeket létrehoztunk az alábbi mutációkat hordozták: *basS* L194R, *miaD* a342del és *waaY* M1†.

A módszer során az egyedi mutánsokat egy szintetikus ssDNS mediált rekombinációs módszerrel generáltuk a pORTMAGE3 vektor segítségével. A 90 nukleotid hosszú ssDNS oligókat a MODEST eszköz segítségével terveztük<sup>116</sup>. Az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) szabványos só mentesítésével állítottuk elő. A rekombinációt elektrokompetens, pORTMAGE3 plazmidot hordozó *E. coli* K-12 BW25113 törzsben hajtottuk végre. A pORTMAGE3 plazmidot 42 °C-on 15 percig indukáltuk, hogy lehetővé tegyük a mutációk hatékony beépülését és elkerülhessük az off-target mutagenézist. 40 µl indukált elektrokompetens sejtet transzformáltunk 1 µl 100 µM mutációt hordozó oligóval. A sejteket 5 ml Terrific-Broth (TB) tápközegbe (24 g élesztőkivonat, 12 g tripton, 9.4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) oltottuk elektroporáció után, majd 30 °C-on 60 percig inkubáltuk. 5 ml Lysogeny-Broth-Lennox (LBL) tápközeget (10 g tripton, 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl) adtunk hozzá, majd ezt követően a sejteket egy éjszakán át 30 °C-on inkubáltuk. A tenyészetek megfelelő hígításait ezután LBL agar lemezekre szélesztettük az egyedi klónok izolálásához, és 30 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Az egyes telepeket allél-specifikus PCR-rel szűrtük, hogy azonosítsuk azokat az egyedi klónokat, amelyek a kívánt módosításokat hordozzák. Ehhez allél-specifikus primert terveztünk és gradiens PCR

protokollal határoztuk meg a kellő hőmérsékletet, amelyhez Bio-Rad CFX96 Touch thermocycler alkalmaztunk. A telepek szűréséhez szükséges PCR-illesztési hőmérsékletet ezután 1 °C-kal magasabb hőmérsékletre állítottuk be, mint az a hőmérséklet, amelynél a gradiens PCR után a vad típusú telep segítségével az utolsó látható fragmentum is kimutatható volt. A jelölt kolóniákat ezt követően Sanger kapilláris szekvenálás segítségével ellenőriztük. Végül a pORTMAGE3 plazmidot a szekvencia-ellenőrzött telepekből kiűztük úgy, hogy a sejteket egy éjszakán át 42 °C-on antibiotikum mentes LBL tápközegben növesztettük.

### **3.11 FELÜLETI TÖLTÖTTSÉG MEGHATÁROZÁSA**

A baktériumok felületi töltöttségében bekövetkezett változások vizsgálatához egy fluoreszceins-izotiocianát poly-L-lizin (FITC-PLL) (Sigma) kötődési vizsgálatot végeztünk el. FITC-PLL egy polikationos molekula, amit széles körben használnak a kationos AMP-k és töltött bakteriális membrán közötti interakciók vizsgálatára<sup>117</sup>. A vizsgálatához a bakteriális sejteket egy éjszakán át növesztettük MS médiumban, utána kétszer átmostuk foszfát pufferben (PBS). A sejteket OD<sub>600</sub> 0.1 értékre hígítottuk PBS-ben és a szuszpendált sejteket 6.5 µg/ml FITC-PLL felhasználásával inkubáltuk 10 percig, majd az inkubált szuszpenziót lecentrifugáltuk (5500 r.p.m., 5 perc). A FITC-PLL kötődik a membrán külső felszínén található negatív töltésekhez, ezáltal a felülúszóban maradt FITC-PLL mennyiségéből következtetni lehet a membrán töltöttségi szintjéhez. A felülúszóban maradt FITC-PLL mennyiségét fluorometriai módszerrel határoztuk meg (gerjesztés 500 nm, kibocsátás 530 nm, Biotek Synergy H1 lemez leolvasó). A kötődött FITC-PLL mennyiségét a kontroll és a nem kötött FITC-PLL mennyisége közötti különbségből következtettünk. Minél kisebb a kötött FITC-PLL mennyisége, annál kevésbé negatív töltésű a sejt felszín.

### **3.12 HEMOLÍZIS VIZSGÁLAT**

Kísérleteink során vizsgáltuk a legígéretesebb AMP-k toxicitását. Ehhez hemolízis vizsgálatot végeztünk. A humán vörösvértesteket egészséges páciensektől gyűjtöttük EDTA tartalmú csövekbe. (hemoglobin (Hg) koncentráció 150-160 g/l). 600µl EDTA-vér keveréket mostunk TBS pufferben (10nM TRIS, 150nM NaCl) és centrifugáltuk (1500 g, 1 perc), így a felülúszó színtelen lett. A pelletet 5 ml TBS pufferben szuszpendáltuk fel. Az így kapott



sejtszuszpenzióból 100  $\mu$ l-t pipettáztunk az adott szerből készült hígítási sorra. A mintákat 1 órán át inkubáltuk 37 C°-on, majd lecentrifugáltuk (1500 g, 1 perc). A felülúszó optikai denzitását 96 lyukú lemezekon mértük le 565 nm-en (Multiskan FC lemezolvasó, Thermo Scientific). Pozitív kontrollnak 50  $\mu$ g/ml mellitint, negatív kontrollnak TBS-t használtunk. A hemolitikus hatást az alábbi módon számoltuk ki: Hemolitikus hatás = (szer OD<sub>565</sub> – TBS OD<sub>565</sub>) x 100/(mellitín OD<sub>565</sub> – TBS OD<sub>565</sub>).

## 4 EREDMÉNYEK

---

### 4.1 AZ AMP-KKEL ÉS ANTIBIOTIKUMOKKAL VÉGZETT LABORATÓRIUMI EVOLÚCIÓ EREDMÉNYEI

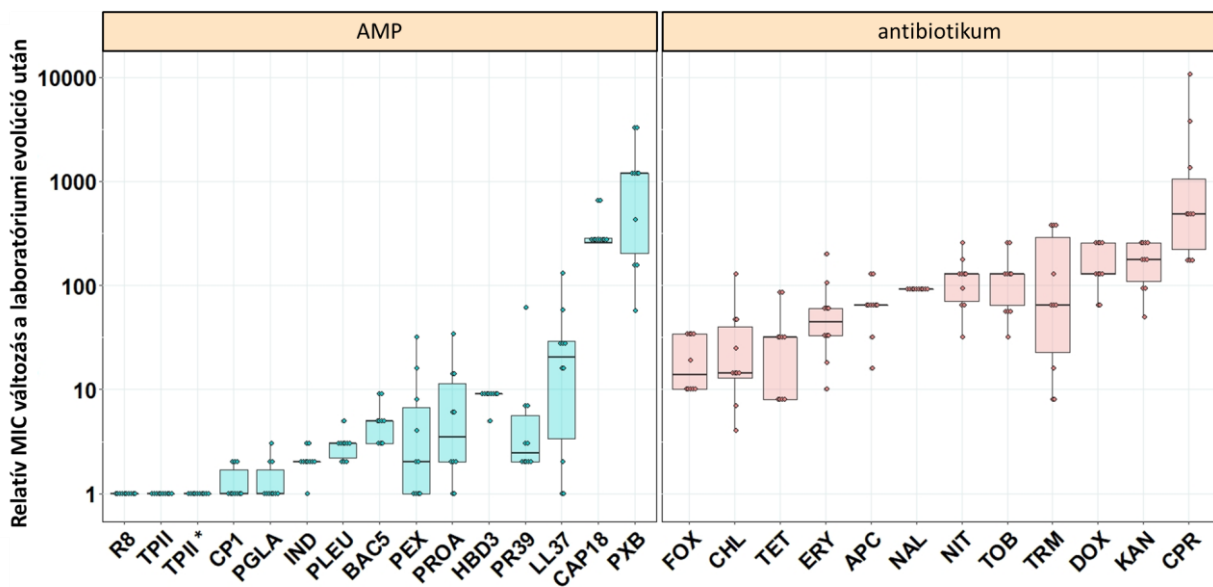
Munkánk fő célja az AMP-kkel és antibiotikumokkal szembeni adaptációs képesség összehasonlítása volt. Ehhez elsődlegesen egy széles körben alkalmazott *Escherichia coli* K-12 BW 25113 törzset vizsgáltunk, mint kiindulási törzset. Az evolúciós kísérletet ennek a törzsnek egy egyedi klónjával végeztük el a 14 AMP vagy 12 antibiotikum egyikére. Minden szerrel szemben 10 párhuzamos populációt adaptáltattunk, a kísérlet végén 138 AMP adaptált vonalat és 120 antibiotikum adaptált vonalat generáltunk. Az evolúciós kísérlet felépítése lehetővé tette, hogy a legnagyobb rezisztenciát alakíthassák ki a populációk egy adott idő periódusban. A 20 átoltás során ~120 generáción keresztül vizsgáltuk az *E.coli* adaptációs képességét az egyes szerekkel szemben. Az evolúciós kísérlet végén minden adaptált populációból egyedi klónt izoláltunk és ennek az egyedi klónnak az MIC értékét hasonlítottuk a kiindulási törzs MIC-hoz. A tanulmány során ennek a relatív MIC változásnak az értékével vizsgáltuk az AMP-kkel és antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztenciát.

Az evolúciós kísérletek során antibiotikumokkal szemben nagymértékű rezisztencia alakult ki, mint azt korábbi tanulmányokból jól ismert<sup>118-120</sup>. Az antibiotikumokkal szemben kialakult relatív MIC változás mediánja 90, és tízszeres és tízezerszeres közötti értékeken mozog. Mind a 10 párhuzamos vonal tudott valamilyen szintű rezisztenciát kialakítani minden antibiotikum esetében (7. ábra).

Ezzel ellentétben az AMP-kkel szemben sokkal változatosabb rezisztencia mintázatot láthatunk. Az antibiotikumokhoz hasonlóan több AMP-vel szemben is kialakult rezisztencia, bár az AMP-k esetében a kialakult rezisztencia szignifikánsabb kisebb és sokkal változatosabb ( $p < 0.0001$ , egyoldalú permutációs teszt). A 14 AMP-ből két AMP-vel szemben az antibiotikumokkal összevethető mértékű rezisztencia alakult ki. A legmagasabb relatív MIC értékek a Polymixin- B-vel (PXB) szemben alakultak ki. A PXB, mely szerkezetét és hatásmechanizmusát tekintve közeli rokona a kolisztinnek, amit a klinikumban mint utolsó mentsvárat alkalmaznak, és a vele szembeni rezisztenciát már széles körben tanulmányozták

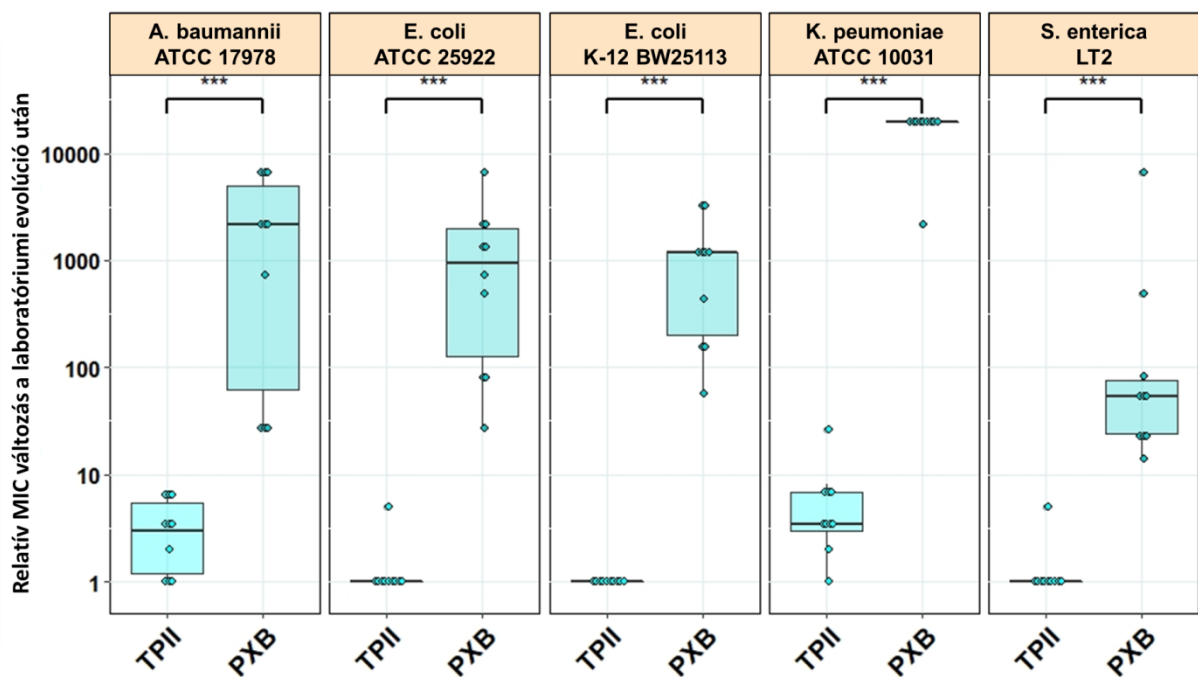
és leírták<sup>121</sup>. Korábbi tanulmányokkal összhangban egyaránt kialakult rezisztencia a protamin A (PROA), PR39 és pexiganan (PEX) antibiotikumokkal szemben<sup>21,22,122</sup>. Emellett az általunk használt humán AMP-kkel (HBD3, LL37) szemben is kialakult rezisztencia (7. ábra).

Az antibiotikumoknál tapasztalt rezisztencia evolúcióval ellentétben több AMP-vel szemben nem, vagy csak kismértékű rezisztencia alakult ki az. A kialakult átlagos relatív MIC kisebb volt, mint 3 CP1, IND, PGLA és PLEU AMP-k esetében. A TPII és R8 AMP-k kiemelkednek az általunk használt szerek közül, hiszen az evolúciós kísérlet után nem detektáltunk relatív MIC változást ezekkel a szerekkel szemben. Ahhoz, hogy a TPII rezisztencia mentességét tovább vizsgáljuk, elvégeztük az evolúciós kísérletet egy mutátor *E.coli* törzssel is (*E.coli* mutD5)<sup>123</sup>, de a megnövekedett mutációs ráta sem eredményezett relatív MIC változást (7. ábra).



**7. ábra *E.coli* K-12 BW25113 relatív MIC értékei az evolúciós kísérlet után.** Az evolúciós kísérletben a 14 AMP (kék) vagy a 12 antibiotikum (piros) egyikéhez adaptáltattuk az *E.coli* törzset. Összességében az AMP-khez adaptált vonalak (N=138) szignifikánsan kisebb rezisztenciát fejlesztettek, mint az antibiotikumhoz adaptált vonalak (N=120) ( $p < 0.0001$ , egyoldalú permutációs teszt). Az elért rezisztencia szint változatosabb volt az AMP-k esetében (N=14), mint az antibiotikumokkal végzett kísérletes során (N=12) ( $p=0.03478$  F-teszt). Minden adatpont egy paralel vonal relatív MIC értékét reprezentálja. A mutátor mutD5 törzssel és a TPII AMP-vel végzett evolúciós kísérlet eredményét csillag jelöli az ábrán. A relatív MIC értékeket a 2. függelék tartalmazza.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a két szélsőséges relatív MIC változás megfigyelhető-e klinikailag jelentős patogén törzsek esetében is. Ehhez olyan evolúciós kísérleteket végeztünk el, melyben *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 10031, *A.baumannii* ATCC 17978 és *S. enterica* LT2 törzseket adaptáltattunk PXB és TPII -hez. A korábbi eredményekhez hasonlóan a törzsek nagymértékű rezisztenciát fejlesztettek ki PXB-vel szemben. Ezzel ellentétben az TPII-vel szemben nem, vagy csak nagyon kismértékű relatív MIC változást tapasztaltunk minden törzs esetében (8. ábra).

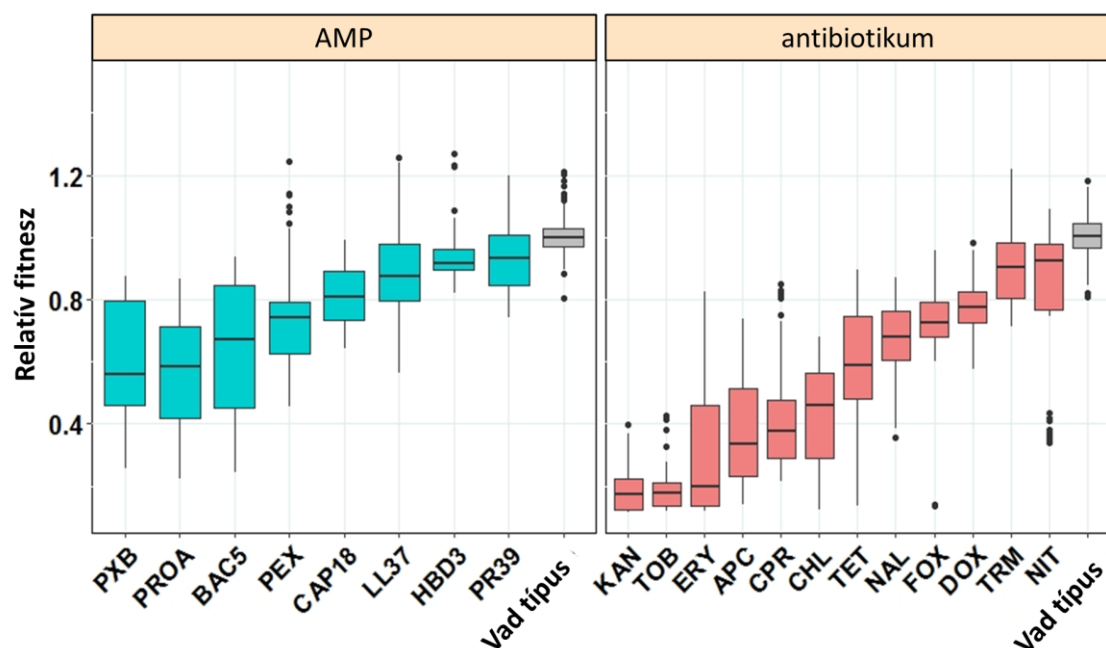


**8. ábra Klinikailag releváns baktériumok relatív MIC értékei.** A TPII-höz adaptált törzsek szignifikánsan kisebb rezisztencia értékeket értek el, mint a PXB-hez adaptáltak. (\*\*\*) a minimum  $p=1,65 \times 10^{-4}$  értéket jelöli, kétoldalú Mann-Whitney test,  $N=10$  minden csoportban). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 röviden *S. enterica* LT2 néven szerepel az ábrán. Minden adatpont egy paralel vonal relatív MIC értékét reprezentálja. A relatív MIC értékeket a 2. függelék tartalmazza.

## 4.2 A KIALAKULT REZISZTENCIA FITESZ KÖLTSÉGE

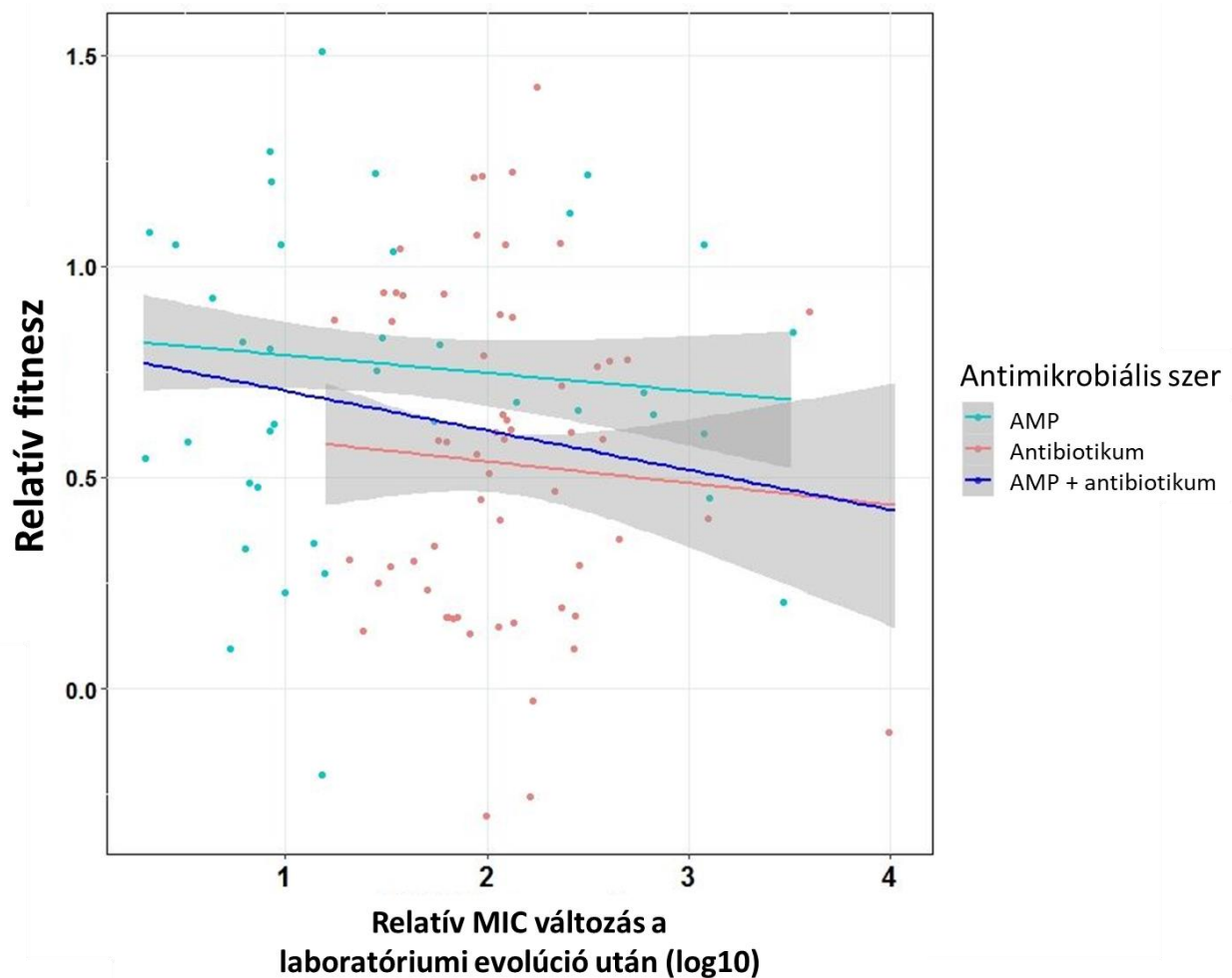
Mint antibiotikum rezisztencia vizsgálatokból tudjuk<sup>124</sup>, a kialakult rezisztenciának bizonyos költségei vannak. Ez a költség a rezisztens baktériumok növekedési képességet befolyásolja antibiotikum mentes környezetben, ezért jelentős hatása van a kialakult rezisztencia elterjedésére<sup>125</sup>. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen költsége van a kialakult AMP rezisztenciának a fitnessre, laboratóriumi körülmények között mértük a rezisztens vonalak növekedési képességeit és összehasonlítottuk az antibiotikum rezisztens törzsek növekedési képességeit. Ehhez megmértük 38 AMP rezisztens vonal és 60 antibiotikum rezisztens vonal növekedési görbéjét antibiotikum mentes tápközegben és kiszámoltuk a görbe alatti területet. Az antibiotikum rezisztens vonalak 96.7%-nak és az AMP rezisztens vonalak 92.1%-nak szignifikánsan alacsonyabb fitnessze volt a vad típushoz képest.

A relatív fitness jelentősen eltért az antibiotikumok és az AMP-k között. Az AMP-adaptált vonalak fitnessz költsége (N = 38) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az antibiotikumhoz adaptált vonalak fitnessze (N = 60) ( $P < 2,2e-16$ , kétoldali Mann–Whitney U-teszt) (9. ábra).



**9. ábra A rezisztens vonalak relatív fitness értéke.** A fitnesszt antibiotikum mentes tápközegben mértük és kiszámoltuk a növekedési görbék görbe alatti területét. Az értékek a vad típus (szürke szín) értékére lettek normalizálva. A relatív fitness értékeket lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019.

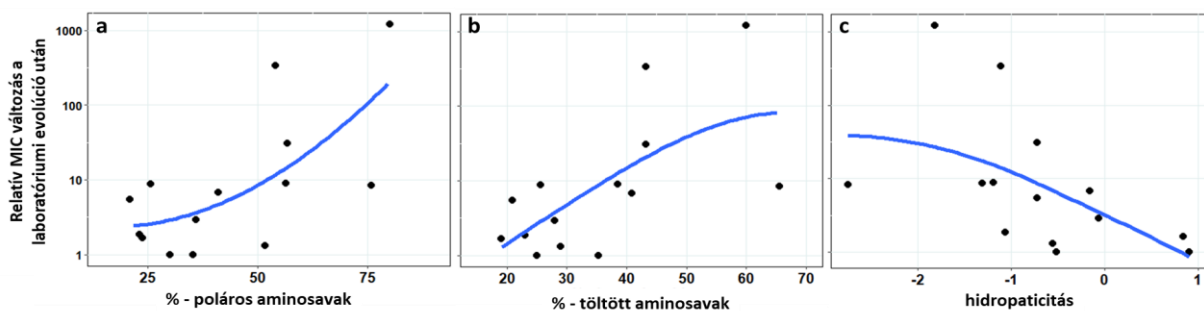
Az általunk megfigyelt mintázat nem tükrözi az AMP és az antibiotikum törzsek közötti rezisztencia szintek különbségeit. Csak gyenge, marginálisan szignifikáns negatív korreláció figyelhető meg a rezisztencia és a fitness költség között (Spearman,  $\rho = -0.24$ ,  $p = 0.016$ ,  $N = 98$ ), és ez a különbség megszűnik, ha az antibiotikumokat és AMP-ket külön vizsgáljuk (antibiotikum:  $p = 0.6$ ,  $N = 60$ ; AMP:  $p = 0.39$ ,  $N = 38$ ) (10. ábra). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált AMP-kkel szembeni rezisztencia hiánya a laboratóriumi evolúció során nem magyarázható a fitness költségek különbségével.



**10. ábra** A relatív fitness és a relatív MIC közötti korreláció. Az AMP és antibiotikum együttes vizsgálata esetén gyenge korrelációt figyelhetünk meg (Spearman,  $\rho = -0.24$ ,  $p = 0.016$ ,  $N = 98$ ), a korreláció megszűnik, ha az antibakteriális szereket külön vizsgáljuk (antibiotikum:  $p = 0.6$ ,  $N = 60$ ; AMP:  $p = 0.39$ ,  $N = 38$ )

### 4.3 AZ ADAPTÁCIÓS KÉPESSÉGET BEFOLYÁSOLÓ FIZIKAI-KÉMIAI TULAJDONSÁGOK

Az AMP-k fizikai-kémiai tulajdonságainak jelentős szerepe van az antibakteriális hatásra illetve a toxicitásra. Ellenben ezeknek a tulajdonságoknak a rezisztenciára gyakorolt hatása még nem ismert. Ezért megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az AMP-k fizikai-kémiai tulajdonságai és a velük szemben kialakult relatív MIC értékek között. Ehhez az általunk használt 14 AMP-nek összegyűjtöttük, illetve kiszámoltuk a fizikai-kémiai sajátosságait és megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben korrelálnak ezek a tulajdonságok az AMP-vel szemben kialakult rezisztenciával. Elemzésünk kimutatta, hogy a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k általában kevesebb poláris és pozitív töltésű aminosavat tartalmaznak, és fokozott hidropaticitással rendelkeznek (11. ábra).



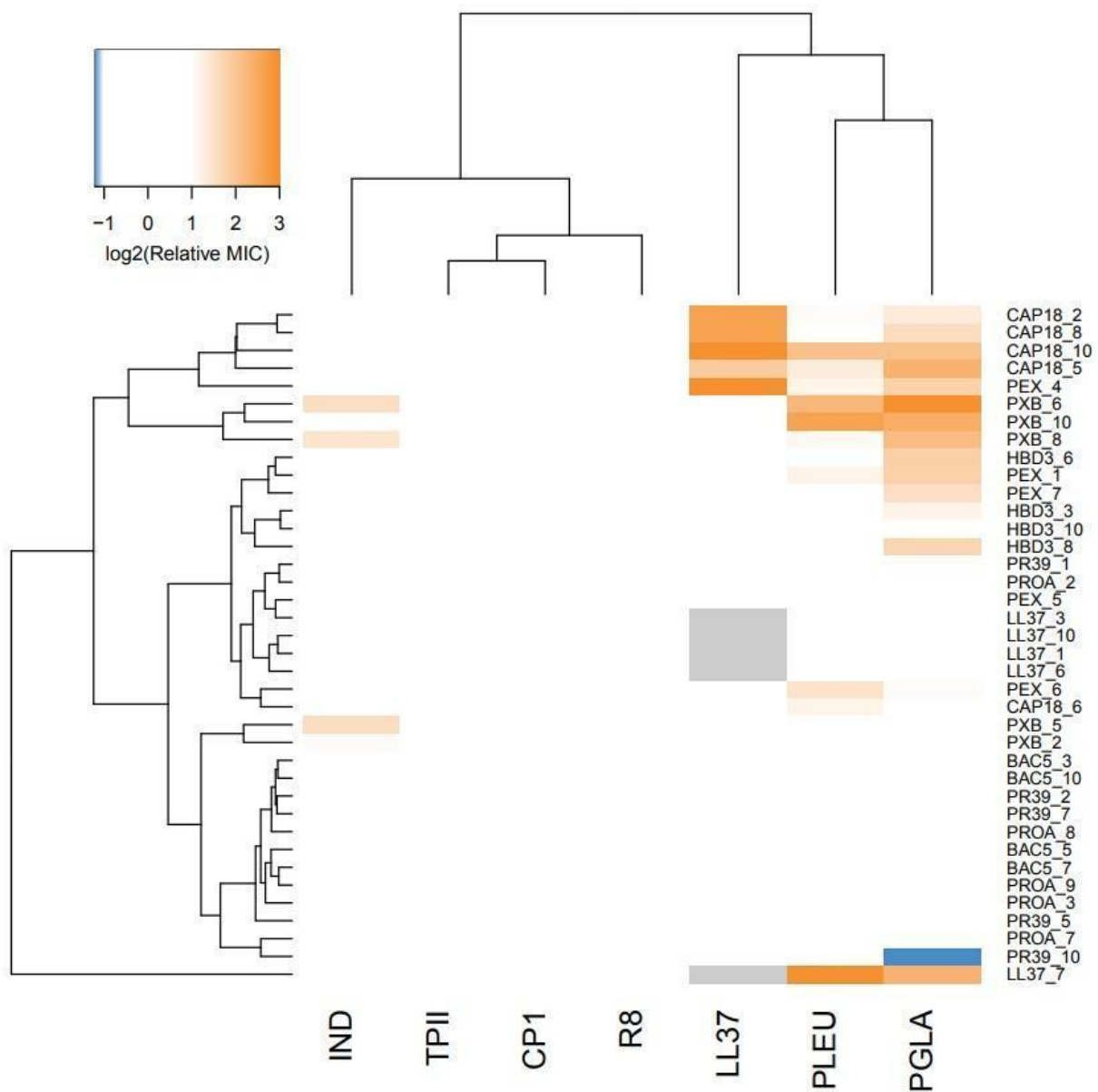
**11. ábra** A kialakult rezisztencia korrelál az AMP-k fiziológiai tulajdonságaival. Minden adatpont az *E.coli* K-12 BW25113 elvégzett evolúciós kísérletből származó átlagos relatív MIC változást reprezentálja. A.) Poláris aminosavak (Spearman's  $\rho=0.58$ ,  $p=0.03$ ,  $N=14$ ) B.) Pozitívan töltött aminosavak (Spearman's  $\rho=0.62$ ,  $p=0.02$ ,  $N=14$ ) C.) Az AMP hidropaticitása (Spearman's  $\rho=-0.73$ ,  $p=0.002$ ,  $N=14$ ). A kék vonalak a LOESS simítási módszerrel illesztett görbét jelzik. Az AMP-k további fizikai-kémiai tulajdonságait lást: Spohn et al. Nat. Comm. 2019

#### **4.4 KORLÁTOZOTT KERESZTREZISZTENCIA A REZISZTENCIÁRA KEVÉSBÉ HAJLAMOS AMP-KKEL SZEMBEN**

Ha egy adott szerrel szemben kialakult rezisztencia mechanizmus rezisztenciát biztosít egy másik antibiotikummal szemben is, akkor keresztrezisztenciáról beszélünk. Ez a jelenség gyakori az antibiotikumok körében, és főleg azoknál az antibiotikumoknál figyelhető meg, melyeknek hasonló a hatásmechanizmusa. Mivel az AMP-k egyik fő célpontja a bakteriális membrán, ezért a kialakult rezisztencia folyamatok hatással lehetnek más AMP-kkel szembeni érzékenységre is. Megvizsgáltuk, hogy azok a vonalak, melyek rezisztenciát fejlesztettek ki egy AMP-vel szemben, rendelkeznek-e csökkent érzékenységgel azokkal az AMP-kkel szemben, ahol a laboratóriumi evolúció során nem, vagy csak kismértékű rezisztencia alakult ki. Ehhez izoláltunk 38 független vonalat azokból az adaptációs kísérletekből, ahol a laboratóriumi evolúció során jelentős rezisztencia alakult ki és megmértük az érzékenység változásokat a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel szemben (PLEU, PGLA, R8, IND, TPII és CP1). Megvizsgáltuk azt is, hogy ezeknek a vonalaknak hogyan változott az érzékenysége a humán LL37 AMP-vel szemben. Keresztrezisztenciának tekintjük, ha egy vonal rezisztenciája kétszeresére növekedett a kiindulási törzshöz képest.

A lehetséges AMP és rezisztens vonal kombinációk 13.4% mutat keresztrezisztenciát. (12. ábra) Emellett az általunk vizsgált 38 vonalból csak 5 mutat keresztrezisztenciát a humán LL37 AMP-vel szemben. Ebből az öt vonalból 4 CAP18 adaptált vonal. A CAP18, az LL37-hez hasonlóan szintén cathelicidine AMP, vagyis jelentős kémiai- és funkcióbeli hasonlóság van a két AMP között<sup>126</sup>, ami magyarázhatja a keresztrezisztenciát. Egy vonal sem mutat érzékenység változást a TPII, CP1 és R8 AMP-kkel szemben. Ez az eredmény további bizonyíték, hogy a rezisztencia ezekkel az AMP-kkel szemben nagyon ritka.





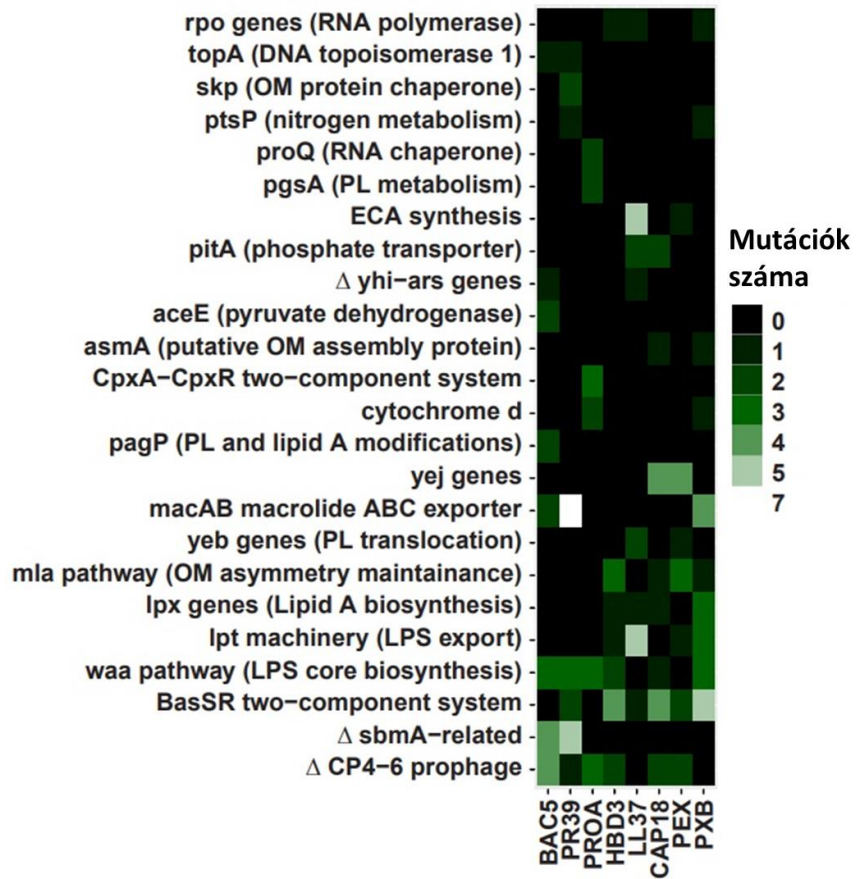
**12. ábra** Az AMP rezisztens vonalak keresztrezisztenciája a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel és a humán LL37-tel szemben. A hierarchikus klaszterezést külön-külön hajtottuk végre a sorokon és az oszlopokon, teljes összekapcsolási módszerrel, euklideszi távolság mértékkel a nyers MIC adatokon. Színkód: kék -> járulékos érzékenységet (relatív MIC minimum 0,5), narancssárga -> keresztrezisztenciát (relatív MIC minimum 2), fehér -> nincs, vagy minimális a változás (0,5 és 2 között), szürke -> nem releváns. Az AMP-rezisztens vonalakat az evolúciós kísérlet során alkalmazott AMP-ről és a megfelelő vonal sorszámaról neveztük el.

## 4.5 AZ AMP REZISZTENCIA MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSAI

A rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálatához az előzetesen kiválasztott 38 AMP rezisztens vonal teljes genomját megszekvenáltuk. Ehhez az Illumina platformot alkalmaztuk és bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk az evolúció során felhalmozódott pontmutációkat (single nucleotide polymorphisms (SNP)), kis inszerciókat és deléciókat. A számítások alapján, 197 független mutációs eseményt azonosítottunk. Átlagosan 1.45 deléciót, 0.61 inszerciót és 2.21 SNP-t azonosítottunk vonalanként. Annak statisztikai tesztelésére, hogy a nem szinonim és a szinonim SNP-k aránya magasabb-e a vártnál egy neutrális evolúciós modell alapján, egy korábban ismertetett módszert alkalmaztunk<sup>127</sup>. A model különösen alkalmas olyan kísérleti evolúciós vizsgálatok elemzéséhez, ahol korlátozott számú mutációs esemény következik be<sup>128</sup>. Röviden, figyelembe vettük a fehérjekódoló régiókban megfigyelt összes különböző pontmutációt, és kiszámítottuk annak valószínűségét, hogy vajon 94% vagy nagyobb mértékű szubsztitúció nem szinonim szubsztitúciót eredményez, ha véletlenszerű kódoló pozícióban fordul elő. A szekvenált vonalak genomjában megfigyelt nem szinonim szubsztitúciók szignifikánsan gyakoribbak, mint a szinonim szubsztitúciók ( $p = 0,000004$ , egyoldali permutációs teszt<sup>128</sup>).

Az érintett gének 30 százaléka ismételt (legalább három esetben) mutációt szenvedett el, és ezeknek a géneknek a 94%-a szerzett mutációkat legalább két különböző AMP-hez adaptált vonalban. Az általunk megfigyelt mutációkból már többet leírtak korábbi tanulmányokban. A leggyakoribb mutációkat a *waa* génekben figyeltük meg. Ezek a gének a lipopoliszacharid (LPS) felépítésében töltenek be kulcsszerepet. A *waaY* mutációja által biztosított rezisztenciát már korábban leírták LL37-nek ellenálló *S. enterica* esetében<sup>129</sup>. Emellett több vonalban is azonosítottunk mutációkat a BasS-BasR kétkomponensű szenzor fehérjék génjeiben, mely jelentős szabályozó szerepet tölt be a stressz hatására bekövetkező külső membrán átrendeződésben. A *basS-basR* génekben, vagy azok analógjaiban bekövetkezett mutációkat korábban megfigyeltek PXB vagy kolisztin rezisztens *E.coli* illetve *S. enterica* esetében<sup>130,131,132</sup>. A PROA-val szemben kialakult rezisztencia kialakulhat a CpxAR kétkomponensű szabályozó rendszer génjeinek mutációján keresztül, amelyeket korábbi tanulmányokból már ismerünk<sup>133,134</sup>. A szakirodalomban leírt és az általunk is megfigyelt *lpxC* mutációja colistin rezisztenciát okoz *A.baumannii* törzsekben is<sup>135</sup>. Az általunk vizsgált prolin-arginin gazdag AMP-k esetében gyakran megfigyelhető *sbmA* mutáció szintén megtalálható

több vonalban is. Az SbmA egy transzporter fehérje, amely kulcsszerepet játszik a prolin-arginin gazdag AMP-k felvételében. Mutációja meggátolja az AMP sejtbe való jutását, ezzel ellehetetlenítve a célpontjának megközelítését<sup>20,136</sup>. Végezetül több vonalban is mutációkat figyeltünk meg a *pitA* génben, melyet korábban PROA rezisztens *Yersinia pestis* esetében is leírtak<sup>137</sup>. A PitA egy foszfát transzporter, mutációja által közvetített rezisztencia nem teljesen tisztázott. (13. ábra)



**13. ábra 38 AMP rezisztens vonal rezisztencia profilja.** Az ábra a laboratóriumi evolúció során kialakult független mutációkat és egyes útvonalakat érintő mutációkat mutatja be az AMP-k függvényében. A színek az adott AMP-ekkel szemben adaptált vonalakban bekövetkezett egyedi mutációk számát jelzi. OM-külső membrán (other membrane), PL-foszfolipid (phospholipid), LPS-lipopoliszacharid (lipopolysaccharide), Δ- gén deléció. A mutációkat, lást: Spohn et al. Nat. Comm. 2019

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a gyakori mutációk okoznak-e rezisztenciát azokkal az AMP-kkel szemben, melyekre nem alakult ki rezisztencia a laboratóriumi evolúció során. Ehhez a humán HBD3 adaptált vonalakban azonosított BasS (*basS* L194R), MlaD (*mldA* a342del) és WaaY (*waaY* M1†) fehérjéket mutáltattuk az eredeti *E.coli* K-12 BW25113 törzsben pORTMAGE technológiával. A visszavitt mutációk továbbra is rezisztenciát biztosítanak HBD3-mal szemben, de TPII, R8 és CP1-gyel szemben nem (4. táblázat). Ezekből következtethetünk, hogy a gyakori AMP rezisztencia mutációk nem biztosítanak rezisztenciát az általunk azonosított rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel szemben. Megvizsgáltuk, hogy az általunk használt másik humán AMP-vel, az LL37-tel szemben biztosítanak-e rezisztenciát ezek a gyakori mutációk. A visszavitt mutációk csak elhanyagolható mértékű keresztrezisztenciát biztosítottak az LL37-tel szemben.

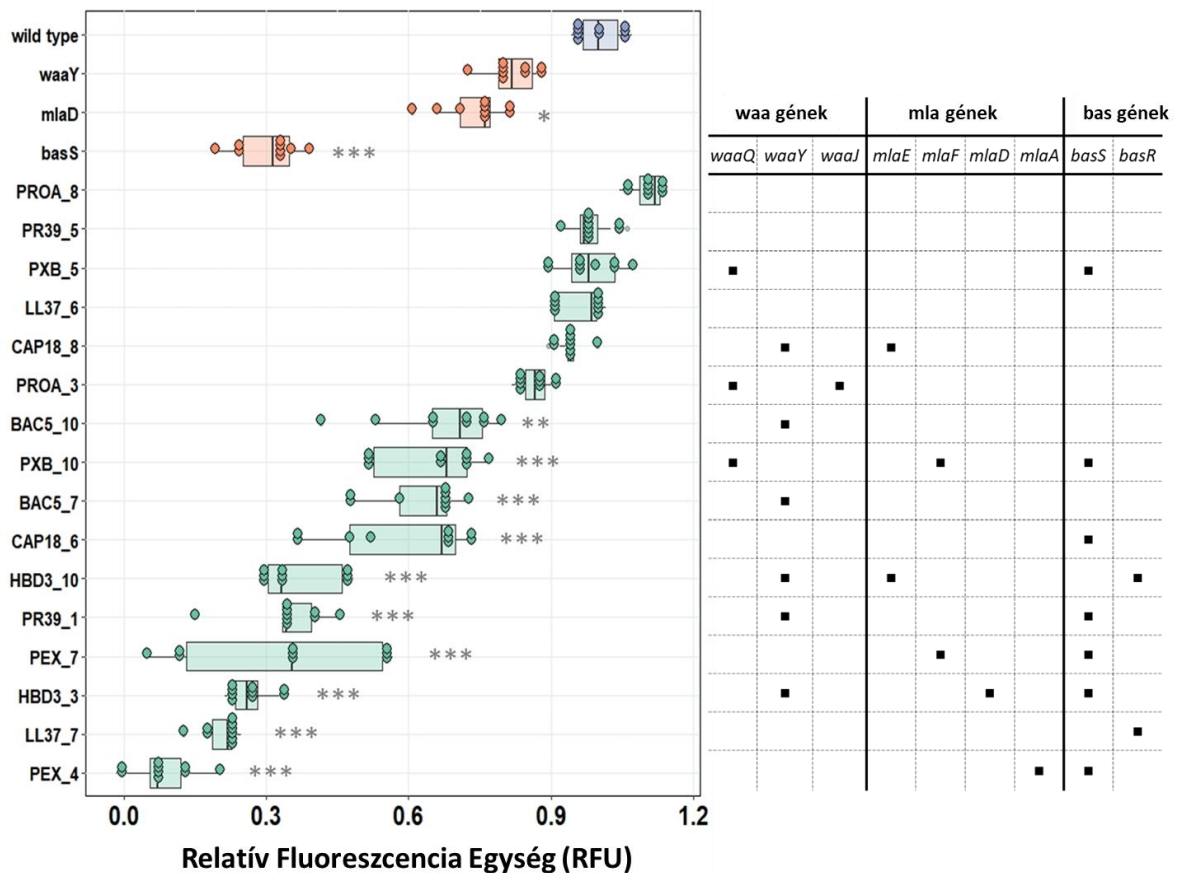
Gén	Visszavitt mutáció	A mutációt hordozó törzs	Mutációt hordozó vonalak száma	Relatív MIC								
				HBD3	LL37	PLEU	PGLA	IND	R8	TPII	CP1	
<i>basS</i>	L194R (CTG→CGG)	HBD3_3	15	>25.6	1.2	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>mldA</i>	a342del	HBD3_3	2	3.4	1.2	1.0	1.6	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>waaY</i>	M1† (ATG→CTG)	HBD3_3, HBD3_10	9	2.3	1.2	1.0	1.4	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0

4. táblázat: az egyedi mutációk hatása egyes AMP-kkel szemben mutatott érzékenységre.

#### 4.6 AZ AMP REZISZTENCIA A KEVÉSBÉ NEGATÍV MEMBRÁN KÖVETKEZMÉNYE

Az LPS a bakteriális külső membrán egyik meghatározó felszíni képlete, többek között hatással van a bakteriális külső membrán negatív töltésére<sup>138</sup>. Szerkezetének megváltozása ez által befolyásolja a sejtfal felszíni negatív töltöttségét, mely az elektrosztatikus kölcsönhatáson keresztül befolyásolja a baktérium ellenálló képességét a pozitívan töltött AMP-kkel szemben. A teljes genom szekvenálási eredményekből láthatjuk, hogy a mutálódott gének jelentős részének hatása van az LPS szintézisére és külső membránba transzportálására. Ezért feltételeztük, hogy a rezisztens törzsek ellenálló képessége a csökkent felszíni töltöttséggel magyarázható. A hipotézisünk teszteléséhez megmértük 16 reprezentatív vonal felszíni töltöttségét. A relatív felszíni töltöttséget a baktériumok felszínéhez kötött, pozitívan töltött FITC-PLL mennyiségéből számoltuk a vad típus értékéhez viszonyítva. Kísérletekben kimutattuk, hogy a 16 AMP rezisztens vonalból 10 esetben szignifikánsan csökkent a felszíni negatív töltés a vad típushoz képest (14. ábra). Azok a

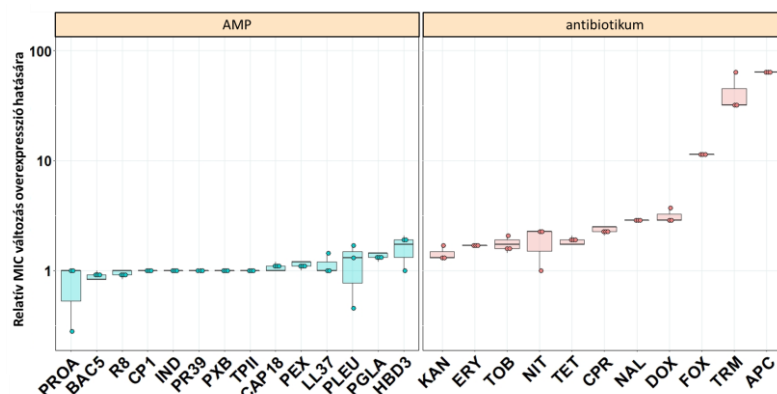
törzsek, amelyeknél szignifikáns különbséget mutattunk ki gyakran hordoznak mutációt a BasS-BasR kétkomponensű szenzor rendszerben. A *basS* gén mutációja jelentősen befolyásolta a felszíni negatív töltöttséget, ha visszavittük *E.coli* K-12 BW25113 törzsbe. Emellett valószínű, hogy a mutáns gének kombinációjának is jelentős befolyással van a felszíni negatív töltöttség kialakulására.



**14. ábra** Az egyes AMP adaptált vonalak és egyedi mutánsok felszíni töltöttségének változása. A jobb oldali táblázat a vizsgált törzsekben található *waa*, *mld* illetve *bas* gének mutációit jelöli. Az AMP-rezisztens vonalakat az evolúciós kísérlet során alkalmazott AMP-ről és a megfelelő vonal sorszámáról neveztük el. Minden adatpont a 9 biológiai replikátum egyikének relatív fluoreszcencia egységét jelöli. A szignifikancia szintjét a boxplotoknál jelölt szürke csillagok jelölik. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , kétoldali Dunnett teszt,  $N=9$  minden csoportban.)

## 4.7 A GÉNAMPLIFIKÁCIÓ HATÁSA AZ AMP REZISZTENCIÁRA

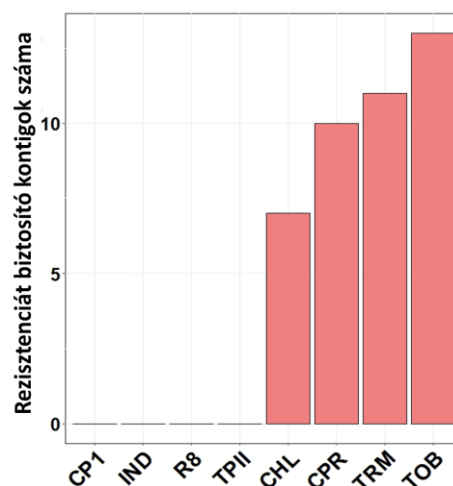
A génamplifikáció jelensége lehetővé teszi, hogy egy génből egyszerre több kópia is megtalálható legyen a genomban, mely ezáltal további lehetőségeket biztosít rezisztenciát biztosító mutációk megjelenésére, majd elterjedésére<sup>139,140</sup>. A génamplifikáció a természetben a nagy fitneszköltség miatt instabil, ezért nehezen figyelhető meg laboratóriumi körülmények között<sup>141</sup>. Ezért a génamplifikáció jelentőségének vizsgálatához az ASKA kollekciónak használtuk, mely tartalmazza az *E.coli* minden ORF régióját egy túltermeltető plazmidon<sup>109</sup>. Ezzel a mesterségesen felépített könyvtárral vizsgáltuk a génamplifikáció jelentőségét az általunk vizsgált 14 AMP és 11 antibiotikum rezisztenciájára. A CHL az ASKA plazmid szelektációs markere<sup>109</sup>, ezért ezt az antibiotikumot kizártuk ebből a kísérletből. Az *E. coli* K-12 BW25113 törzset transzformáltuk az egyesített ASKA plazmidokkal és ezt a genetikailag kevert populációt tettük ki AMP és antibiotikum növekvő koncentrációjának. Mindegyik gyógyszer esetében meghatároztuk az egyesített ASKA plazmid könyvtár MIC-értéket és összehasonlítottuk az üres ASKA plazmidot hordozó vad típusú törzs MIC értékével. Antibiotikumok esetében az egyesített ASKA könyvtár 2-64-szeres MIC növekedést eredményezett, ami jelzi, hogy a génamplifikációnak jelentős hatása van az antibiotikum rezisztencia kialakulására. Korábbi tanulmányokkal összhangban a TRM MIC 32-szeresére növekedett a génamplifikáció hatására<sup>142</sup>. Ezzel ellentétben a 14 tesztelt AMP-ből 8 esetben nem növekedett meg az MIC. De a legnagyobb megfigyelt MIC növekedés is 1.6-szoros növekedést eredményezett (15. ábra).



**15. ábra A génamplifikáció hatása a rezisztencia szintjére.** Az ASKA plazmid könyvtár túlzott expressziója szignifikánsan nagyobb rezisztenciát eredményezett az antibiotikumokkal szemben ( $N = 11$ ), mint az AMP-kkel szemben ( $N = 14$ ) ( $P < 0,0001$ , egyoldalú permutációs teszt). Minden adatpont a három biológiai ismétlés egyikének relatív MIC értékét jelenti.

## 4.8 TALAJMINTA FUNKCIONÁLIS METAGENOMIKAI VIZSGÁLATA

A talaj egy jelentős forrása a rezisztencia géneknek. Antibiotikumok esetében már kimutatták, hogy patogén baktériumok be tudnak szerezni rezisztenciát biztosító géneket talajlakó baktériumoktól<sup>113,143</sup>. AMP-ket változatos organizmusok termelnek, melyek a különböző élőhelyek széles skáláján megtalálhatóak, ennél fogva a talajban is találhatunk olyan baktériumokat, amelyek AMP-t termelnek<sup>144,145,146</sup>. Ezen okok miatt feltételezzük, hogy a talaj nemcsak antibiotikum, hanem AMP rezisztenciát biztosító mechanizmusok forrásai is lehet. Ennek vizsgálatához a módszereknél ismertetett módon funkcionális metagenomika könyvtárat készítettünk talajmintából és ferde agar lemezen izoláltuk a mutációt biztosító kontigokkal rendelkező kolóniákat és a megfelelő DNS fragmenseken (kontigokon) található géneket. A kísérletben arra a 4 AMP-re fókuszáltunk, melyek a korábbi vizsgálatokban kevésbé voltak hajlamosak a rezisztenciára (R8, IND, TP11 és CP1). Emellett 4 klinikailag jelentős antibiotikumot vizsgáltunk (TRM, TOB, CHL és CPR). Korábbi tanulmányokkal összehangban a vizsgált antibiotikumokkal szemben minden esetben találtunk független kontigokat, melyek rezisztenciát biztosítottak a vizsgált antibiotikumok ellen<sup>113,147</sup>. Ezzel szemben egyik vizsgált AMP esetében sem találtunk rezisztens kolóniákat (16. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az AMP-vel szembeni rezisztencia gének ritkák a talajban.



**16. ábra Talajminta funkcionális metagenomikája.** A funkcionális szelekció során 41 különböző antibiotikum-rezisztenciát biztosító DNS-kontigot (piros oszlop) azonosítottunk, míg AMP-rezisztenciát átadó kontigokat nem találtunk ( $p = 2 \times 10^{-16}$  kétoldali negatív binomiális regresszió). Az azonosított kontigok listáját lásd: Spohn et al. Nat. Comm. 2019.

#### 4.9 TPII ÉS CP1 SZÉLES HATÁSSPEKTRUMÚ ÉS NEM TOXIKUS

Komplex elemzésünkből láthatjuk, hogy az általunk vizsgált 14 AMP-ből több is kevésbé hajlamos arra, hogy a baktériumok rezisztenciát fejlesszenek velük szemben. Ebből a szempontból a TPII és CP1 különösen ígéretes jelöltek a további gyógyszerfejlesztési vizsgálatokhoz.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy milyen széles a TPII és a CP1 antibakteriális spektruma. Méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a TPII aktív Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben is, míg a CP1 Gram-pozitív baktériumok ellen már kevésbé hatékony (5. táblázat).

Strain		MIC ( $\mu$ M)		MIC ( $\mu$ g/ml)		
		CP1	TPII	CP1	TPII	
Gram-negatív	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1.2	1.8	4	4
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	1.2	1.8	4	4
	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 13351	0.6-1.2	0.9-1.8	2-4	2-4
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC BAA 2469	1.2	0.9	4	2
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC BAA 2340	1.2	0.9-1.8	4	2-4
	<i>Shigella sonnei</i>	HNCMB 25021	0.6-1.2	0.9	2-4	2
	<i>Shigella flexneri</i>	HNCMB 20018	1.2	1.8	4	4
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	ATCC 13047	>9.6	3.5	>32	8
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>	LT2	1.2-2.4	1.8	4-8	4
	<i>Salmonella enteritidis</i>	HNCMB 10092	1.2	1.8	4	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	1.2-2.4	0.9-1.8	4-8	2-4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13440	1.2	1.8	4	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	ATCC 700603	2.4	1.8	8	4
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 17978	0.6-1.2	1.8	2-4	4
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	2.4	1.8	8	4
Gram-pozitív	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 700221	>9.6	3.5	>32	8
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19653	>9.6	0.9	>32	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 25923	>9.6	3.5	>32	8
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 29213	>9.6	3.5	>32	8
	<i>Methicillin-resistant</i> <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 43300	>9.6	3.5	>32	8

5. táblázat: TPII és CP1 antibakteriális hatása 20 tesztelt baktériummal szemben.



Hemolízis assay-vel teszteltük a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k toxicitását. Az általunk vizsgált AMP-k alacsony hemolitikus hatást mutatnak (<10%) MIC körüli koncentrációban, de az R8 és IND magasabb koncentrációkban már jelentős hemolitikus hatással rendelkezik (6. táblázat).

koncentráció (µg/ml)	hemolitikus hatás			
	TPII	CP1	IND	R8
2500	33	4	74	131
1250	21	3	89	139
625	15	2	56	128
312	10	5	14	107
156	6	1	4	55
78	3	1	3	24
39	3	1	2	9
19.5	2	1	2	3
9.75	2	1	2	2
0	1	1	1	2

**6. táblázat: a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k hemolitikus aktivitása**

## 5 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

---

Doktori munkám során az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztenciát vizsgáltam antibiotikumokkal összehasonlítva. Kísérleteim során nagy áteresztőképességű módszereket alkalmaztam, azért, hogy egy megfelelően átfogó képet kapjunk az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztenciáról, mindezt antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztenciával összevetve. A vizsgált antibakteriális szereket úgy válogattuk össze, hogy azok hatásmechanizmusa és felépítése változatos legyen, ezért 14 AMP-t és 12 antibiotikumot vizsgáltunk. A tanulmány során a *de novo* rezisztenciára fókuszáltunk, de figyelembe vettük a rezisztencia terjedésének további kulcsfolyamatait is: kitértünk a horizontális géntranszfer és a génamplifikáció rezisztenciára gyakorolt hatásaira is. Az általunk generált AMP-rezisztens baktériumok teljes genomját megszekvenáltuk, így azonosítani tudtuk a rezisztenciát biztosító folyamatokat.

Eredményeink alapján az alábbi fő következtetésekre jutottunk:

A laboratóriumi evolúciós kísérletek alapján kimutattuk, hogy az AMP-kkel szemben általánosan kisebb mértékű rezisztencia alakul ki, mint antibiotikumokkal szemben. Emellett kimutattuk, hogy a rezisztenciát biztosító folyamatok az AMP-k esetében nagyobb fitness költséggel jártak, amelyek negatívan befolyásolják a rezisztencia terjedését. Viszont ez a fitnessköltség önállóan nem elegendő a rezisztencia mentességhez.

Az általunk vizsgált 14 AMP közül hattal szemben nem, vagy csak nagyon kismértékű rezisztencia alakult ki, mely az egyik legjelentősebb megfigyelésünk. Ezek közül az AMP-k közül vizsgáltuk a TPII, CP1, IND és R8 hemolitikus aktivitását, és kimutattuk, hogy a TPII és CP1 MIC értékeken felüli koncentrációban sem toxikus a humán sejtekre. Továbbá a TPII és CP1 széles hatásspektrummal rendelkezik. Emellett a TPII-vel szemben, a mesterségesen megemelt mutációs rátával rendelkező, *E.coli* mutD5 törzs és a klinikailag releváns patogén kórokozók sem tudtak jelentős mértékű rezisztenciát fejleszteni. Ezért ezek, a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k alkalmasak arra, hogy a rezisztencia mentes, hosszú távon hatékony antibiotikum fejlesztések középpontjába helyezzék.

Az általunk vizsgált AMP-k közül azonosítottunk olyanokat, amelyekkel szemben nagymértékű, az antibiotikumokkal összevethető, rezisztencia alakult ki. A legmagasabb

relatív MIC értékeket a PXB-vel szemben figyeltük meg, amely felépítését tekintve rokona a kolisztin antibiotikumnak. A kolisztin egy úgynevezett “last-resort drug”, vagyis azokban az esetekben alkalmazzák, mikor már más antibiotikum nem hatékony a fertőzést okozó baktérium multidrog rezisztenciája miatt<sup>84</sup>. Fontos megjegyezni, hogy az elmúlt években kifejlesztett új antibiotikumok között gyakoriak a polimixin származékok<sup>13</sup>. Így a PXB-vel szembeni nagymértékű rezisztencia komoly aggodalomra ad okot.

Az AMP-kkel szemben a rezisztencia kialakulása, az antibiotikumokkal összehasonlítva, további mechanizmusok által is korlátozott. A horizontális géntranszfer a természetben gyakran bekövetkezik, és lehetővé teszi az egyazon fajhoz tartozó baktériumok közötti és az interspecifikus genetikai információ átvitelt, amellyel az akceptor sejtek különböző rezisztenciát biztosító folyamatokat szerezhetnek<sup>143</sup>. Ennek a folyamatnak vizsgálatához funkcionális metagenomikai módszereket alkalmaztunk. A vizsgált könyvtárat talajmintából nyert genetikai anyagból állítottuk össze. A talaj antibiotikumok tekintetében egy gazdag rezisztencia forrás<sup>143</sup>. Az általunk vizsgált antibiotikumok esetében ki is mutattuk, hiszen több olyan kontigot is azonosítottunk, amelyek rezisztenciát biztosítanak CHL, CPR, TOB és TRM antibiotikumokkal szemben. Ugyanakkor az általunk vizsgált AMP-kkel szemben nem azonosítottunk ilyen rezisztenciát biztosító kontigokat.

Megvizsgáltuk a génamplifikáció hatását is, ami szintén jelentősen befolyásolja a rezisztencia kialakulását<sup>141</sup>. Kísérleteinkben egy mesterséges génamplifikációs modellt alkalmaztunk, melyben egy túltermelő plazmid modellezi az egyes *E.coli* ORF-ek amplifikációját<sup>111</sup>. A túltermelő plazmidokat egy könyvtárba gyűjtöttük, majd egy eredetileg érzékeny *E.coli* baktériumba transzformáltuk, és mértük a fellépő MIC változást. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy antibiotikumokkal összehasonlítva, a génamplifikáció nem biztosít rezisztenciát az általunk vizsgált AMP-kkel szemben. Kísérleteink során nem vizsgáltunk egyéb olyan folyamatokat, amelyek növelhetik az ellenálló képességet AMP-vel szemben. Az ilyen folyamatok, mint a perzisztencia<sup>148</sup> vagy biofilm kialakulása<sup>149</sup> további kutatásokat igényelnek.

Az általunk megfigyelt rezisztencia folyamatok nem általánosak minden AMP-re. Korábbi kutatások kimutatták, hogy egy antibiotikummal szemben kialakult rezisztencia növeli az ellenálló képességet más antibiotikumokkal szemben is<sup>118</sup>. Mivel az AMP-knek hasonló a hatásmechanizmusuk, ezért komoly aggodalomra adhat okot, hogy egy kialakult rezisztencia

folyamat keresztrezisztenciát okoz a humán immunrendszerben megtalálható AMP-kre is. Ennek vizsgálatára megmértük, hogy milyen mértékben változik az ellenálló képessége azoknak az adaptált vonaloknak, amelyek jelentős rezisztenciát fejlesztettek ki az evolúciós kísérletben azokkal az AMP-kkel szemben, ahol jelentős rezisztencia nem volt megfigyelhető. Kimutattuk, hogy a keresztrezisztencia ritka. TPII, CP1 és R8 AMP-k esetében továbbra sem biztosítanak rezisztenciát a már kialakult mutációk. Emellett LL37-tel szemben csak a CAP18 adaptált vonalak mutatnak keresztrezisztenciát. A CAP18 és LL37 hasonló szerkezeti felépítéssel rendelkezik<sup>126</sup>, ami magyarázza a csökkent ellenálló képességet.

Kimutattuk, hogy az AMP-k fizikai-kémiai tulajdonságai hatással vannak az ellenük kialakuló rezisztencia mértékére. Azok az AMP-k, melyek több poláros illetve kevesebb töltött aminosavat tartalmaznak, vagy nagyobb a hidropaticitása, kevésbé hajlamosak a rezisztenciára. Az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztencia és az AMP fizikai-kémiai tulajdonsága közötti kapcsolat további kutatásokat igényel. Hipotézisünk, hogy a peptidok hidropaticitása befolyásolja a membránba inszertálódás folyamatát, továbbá a csökkent pozitív töltéssel rendelkező fehérjék kevésbé érzékenyek az általunk megfigyelt csökkent felszíni töltöttség általi rezisztenciára. Ezek az eredmények iránymutatást adhatnak olyan peptidomimetikus molekulák fejlesztésére, melyek kevésbé hajlamosak a rezisztenciára és hosszú távon alkalmazhatóak.

Végezetül a rezisztens sejtvonalak teljes genom szekvenálása során megfigyeltük, hogy a rezisztenciát biztosító folyamatok jelentős része a bakteriális külső membrán felépítését befolyásolja. A mutációkat hordozó géneknek jelentős szerepe van a membrán lipid összetételének kialakításában (*mldA*)<sup>67</sup>, illetve az LPS molekula szintézisében és külső a felszínre transzportálásában (*waaY*, *basSR*)<sup>150,151</sup>. Ezek a folyamatok hatással vannak a külső felszín töltésére. Az AMP-k szelektív baktériumölő képessége az AMP pozitív töltése és a bakteriális membrán negatív töltése közötti elektrosztatikus kölcsönhatáson alapszik. Kimutattuk, hogy a rezisztenciával rendelkező sejtvonalak jelentős részének kevésbé negatív lett a felszíne a mutációk miatt, ami így biztosította a rezisztenciát.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy egyes AMP-kkel szemben laboratóriumi körülmények között nem vagy csak nagyon kismértékű rezisztencia alakul ki. Ezek a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-k (TPII, CP1, R8, IND, PGLA, PLEU) a jövőbeli antibiotikum fejlesztési folyamatokban jó kiindulási pontok lehetnek olyan gyógyszerek fejlesztésére, melyeket hosszú

távon alkalmazhatunk a klinikumban a patogén baktériumokkal szembeni harcban. Az, hogy miért nem alakult ki rezisztencia egyes AMP-kkel szemben további kutatásokat igényel. Lehetséges magyarázatok, hogy az AMP-knek nem csak egy célpontjuk van, és a több célponttal rendelkező antibiotikumokkal szembeni rezisztencia komolya genetikai kihívást jelent a baktériumoknak<sup>43,79</sup>. A több célpontú antibiotikumok fejlesztése jelenleg az egyik fő irányvonal, ezért az AMP-k ebből a szempontból is ígéretes jelöltek lehetnek. További magyarázat, hogy az AMP-k farmakodinamikai tulajdonságaikban jelentősen eltérnek az antibiotikumoktól. Baktericid hatásukat általában egy szűk dózis tartományon belüli fejtik ki, meredekebb dózis-hatás görbe figyelhető meg az AMP-k esetében, amely ellentétben áll számos antibiotikum farmakodinamikájával<sup>152</sup>. Ezek a megfigyelések szintén további, *in vivo* kutatásokat igényelnek.

## 6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pál Csabának, hogy a kutatócsoportjában végezhettem szakdolgozói, majd doktori munkámat. Köszönettel tartozom a téma felvetéséért, a szakmai iránymutatásért és az eredményeink publikálása során nyújtott munkájáért és segítségéért. Hálás vagyok a szakmai fejlődésemben vetett hitéért.

Köszönettel tartozom Spohn Rékának, Lázár Viktóriának és Ana Martinsnak, akikre a mindennapi feladatok során számíthattam. Köszönöm, hogy bevezettek a laboratóriumi munkába, és hogy a projekthez szükséges kísérleteket optimalizálták.

Köszönettel tartozom Kinstes Bálintnak és kollégáinak, Méhi Orsolyának, Számel Mónikának, Pramod K. Jangirnak és Vidovics Fanninak a funkcionális metagenomikai és a génamplifikációs kísérletek elvégzésében nyújtott szakmai segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani Csörgő Bálintnak az egyedi mutánsok előállításáért, Grézal Gábornak és Györkei Ádámnak a bioinformatikai elemzések elvégzéséért, Bódai Lászlónak és Faragó Annának a szekvenálási munkák elvégzéséért, valamint Földesi Imrének és Kata Diánának a hemolízis assay elvégzéséért.

Köszönöm a családomnak a sok éves támogatást, mert nélkülük ez nem jöhetett volna létre. Külön köszönöm Pál Ferencnek a lelki támogatást és hogy inspiráló otthoni légkört teremtett, amellyel jelentősen hozzájárult a szakmai sikereimhez.

## 7 IRODALOMJEGYZÉK

---

1. Durand, G. A., Raoult, D. & Dubourg, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 371–382 (2019).
2. Gould, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 572–575 (2016).
3. Abbo, L. M. & Grossi, P. A. Surgical site infections: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* **33**, 1–19 (2019).
4. Avershina, E., Shapovalova, V. & Shipulin, G. Fighting Antibiotic Resistance in Hospital-Acquired Infections: Current State and Emerging Technologies in Disease Prevention, Diagnostics and Therapy. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
5. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, 1–7 (2010).
6. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E. & Okoh, A. *Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications.* *Molecules* **23**, (2018).
7. Larsson, D. G. J. & Flach, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 257–269 (2022).
8. Palumbi, S. R. Humans as the world’s greatest evolutionary force. *Urban Ecol. An Int. Perspect. Interact. Between Humans Nat.* **293**, 15–24 (2008).
9. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
10. Miethke, M. *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 726–749 (2021).
11. Xin Yu, J., Hubbard-Lucey, V. M. & Tang, J. Immuno-oncology drug development goes global. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 899–900 (2019).
12. WHO. *2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development.* World Health Organization 2021 (2021).
13. WHO. *2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development.* World Health Organization 2021 (2021).
14. Gould, I. M. & Bal, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* **4**, 185–191 (2013).
15. Rello, J., Parisella, F. R. & Perez, A. Alternatives to antibiotics in an era of difficult-to-treat resistance: new insights. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **12**, 635–642 (2019).
16. Braitmaier, H. Bacteriophages as alternatives to antibiotics. *Antibiotics* 1–5 (2017).
17. Boyd, N. K., Teng, C. & Frei, C. R. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 1–12 (2021).
18. Ghosh, C. & Haldar, J. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. *ChemMedChem* **10**, 1606–1624 (2015).
19. Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N. & Straus, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of

- action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules* **8**, (2018).
20. Andersson, D. I., Hughes, D. & Kubicek-Sutherland, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* **26**, 43–57 (2016).
  21. Perron, G. G., Zasloff, M. & Bell, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **273**, 251–256 (2006).
  22. Sallum, U. W. & Chen, T. T. Inducible resistance of fish bacterial pathogens to the antimicrobial peptide cecropin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3006–3012 (2008).
  23. Pranting, M., Negrea, A., Rhen, M. & Andersson, D. I. Mechanism and Fitness Costs of PR-39 Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2734–2741 (2008).
  24. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
  25. Wu, Q., Patočka, J. & Kuča, K. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins (Basel)*. **10**, 1–17 (2018).
  26. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. & Yang, X. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Bot. Stud.* **62**, (2021).
  27. Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. **6**, 1543–75 (2013).
  28. Lei, J. *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 3919–3931 (2019).
  29. Zhang, C., Yang, M. & Ericsson, A. C. Antimicrobial peptides: Potential application in liver cancer. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
  30. Mookherjee, N. & Hancock, R. E. W. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 922–933 (2007).
  31. De Smet, K. & Contreras, R. Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1337–1347 (2005).
  32. Miyata, T. *et al.* Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* **106**, 663–8 (1989).
  33. Rozek, A., Friedrich, C. L. & Hancock, R. E. W. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**, 15765–15774 (2000).
  34. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. & Lotfipour, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 723–736 (2012).
  35. Pristovšek, P. & Kidrič, J. Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: An NMR and molecular modeling study. *J. Med. Chem.* **42**, 4604–4613 (1999).
  36. Magana, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect. Dis.* **20**, e216–e230 (2020).
  37. Ciumac, D., Gong, H., Hu, X. & Lu, J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *J.*



- Colloid Interface Sci.* **537**, 163–185 (2019).
38. Bertani, B. & Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* **8**, 1–33 (2018).
  39. Wu, X., Han, J., Gong, G., Koffas, M. A. G. & Zha, J. Wall teichoic acids: Physiology and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **45**, 1–23 (2021).
  40. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236–248 (2002).
  41. Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **57**, 1–24 (2003).
  42. Dijksteel, G. S., Ulrich, M. M. W., Middelkoop, E. & Boekema, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
  43. Le, C.-F., Fang, C.-M. & Sekaran, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02340-16 (2017).
  44. Gräslund, A., Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü. & Futaki, S. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, (2011).
  45. Subbalakshmi, C. & Sitaram, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 91–6 (1998).
  46. Marchand, C. *et al.* Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5157–5165 (2006).
  47. Yonezawa, A., Kuwahara, J., Fujii, N. & Sugiura, Y. 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**, 2998–3004 (1992).
  48. Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V. & Hancock, R. E. W. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 605–614 (2002).
  49. Ho, Y. H., Shah, P., Chen, Y. W. & Chen, C. S. 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. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1837–1847 (2016).
  50. Sass, V. *et al.* Human  $\beta$ -defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci. *Infect. Immun.* **78**, 2793–2800 (2010).
  51. Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464–472 (2011).
  52. Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**, 179–186 (2002).
  53. Powers, J. P. S. & Hancock, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681–1691 (2003).
  54. Meade, K. G. & O’Farrelly, C. B-Defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Front. Immunol.* **10**, 1–20 (2019).
  55. Maróti, G., Downie, J. A. & Kondorosi, É. Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **26**, 57–

- 63 (2015).
56. Lee, E. Y., Wong, G. C. L. & Ferguson, A. L. Machine learning-enabled discovery and design of membrane-active peptides. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 2708–2718 (2018).
  57. Dathe, M. *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* **403**, 208–212 (1997).
  58. Madanchi, H. *et al.* Design and Synthesis of Lipopolysaccharide-Binding Antimicrobial Peptides Based on Truncated Rabbit and Human CAP18 Peptides and Evaluation of Their Action Mechanism. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **12**, 1582–1593 (2020).
  59. Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-Kehler, R. V. & Andersson, D. I. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 689–696 (2017).
  60. Abdi, M., Mirkalantari, S. & Amirmozafari, N. Bacterial resistance to antimicrobial peptides. *J. Pept. Sci.* **25**, 1–10 (2019).
  61. Kleanthous, C. & Armitage, J. P. The bacterial cell envelope. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, 1–17 (2015).
  62. May, K. L. & Grabowicz, M. The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 8852–8854 (2018).
  63. Klein, G. *et al.* Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in escherichia coli: Incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. *J. Biol. Chem.* **288**, 8111–8127 (2013).
  64. Kloser, A. W., Laird, M. W. & Misra, R. *asmB*, a suppressor locus for assembly-defective OmpF mutants of Escherichia coli, is allelic to *envA* (*lpxC*). *J. Bacteriol.* **178**, 5138–5143 (1996).
  65. Moosavian, M., Emam, N., Pletzer, D. & Savari, M. Rough-type and loss of the LPS due to *lpx* genes deletions are associated with colistin resistance in multidrug-resistant clinical Escherichia coli isolates not harbouring *mcr* genes. *PLoS One* **15**, 1–14 (2020).
  66. Polissi, A. & Sperandio, P. The lipopolysaccharide export pathway in Escherichia coli: Structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Mar. Drugs* **12**, 1023–1042 (2014).
  67. Malinverni, J. C. & Silhavy, T. J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8009–8014 (2009).
  68. Ekiert, D. C. *et al.* Architectures of Lipid Transport Systems for the Bacterial Outer Membrane. *Cell* **169**, 273-285.e17 (2017).
  69. Llobet, E., Tomás, J. M. & Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**, 3877–3886 (2008).
  70. Buchanan, J. T. *et al.* Streptococcus iniae phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infect. Immun.* **73**, 6935–6944 (2005).
  71. Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H. & Hancock, R. E. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1542–8 (1999).
  72. Sieprawska-Lupa, M. *et al.* Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4673–4679 (2004).

73. Schmidtchen, A., Frick, I. M., Andersson, E., Tapper, H. & Björck, L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* **46**, 157–168 (2002).
74. Shafer, W. M., Qu, X.-D., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1829–1833 (1998).
75. Mason, K. M., Bruggeman, M. E., Munson, R. S. & Bakaletz, L. O. The non-typeable *Haemophilus influenzae* Sap transporter provides a mechanism of antimicrobial peptide resistance and SapD-dependent potassium acquisition. *Mol. Microbiol.* **62**, 1357–1372 (2006).
76. Browne, K. *et al.* A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23 (2020).
77. Ostorhazi, E. *et al.* Advantage of a narrow spectrum host defense (Antimicrobial) peptide over a broad spectrum analog in preclinical drug development. *Front. Chem.* **6**, 1–11 (2018).
78. Lewis, K. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* **181**, 29–45 (2020).
79. Wang, K. K. *et al.* A hybrid drug limits resistance by evading the action of the multiple antibiotic resistance pathway. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 492–500 (2016).
80. Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K. & Padhy, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *J. Biosci.* **46**, (2021).
81. Huttner, B. *et al.* Drugs of last resort? the use of polymyxins and tigecycline at us veterans affairs medical centers, 2005-2010. *PLoS One* **7**, 2005–2010 (2012).
82. Gao, R. *et al.* Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* **12**, 1–19 (2016).
83. Zervas, B. L., Joo, Y. & Gao, J. Gramicidin A Mutants with Antibiotic Activity against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *ChemMedChem* **11**, 629–636 (2016).
84. Sauermann, R., Rothenburger, M., Graninger, W. & Joukhadar, C. Daptomycin: A review 4 years after first approval. *Pharmacology* **81**, 79–91 (2008).
85. Chen, C. H. & Lu, T. K. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics* **9**, (2020).
86. Björn, C. *et al.* Efficacy and safety profile of the novel antimicrobial peptide PXL150 in a mouse model of infected burn wounds. *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 519–524 (2015).
87. Hou, M. *et al.* Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in vivo. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**, 614–623 (2013).
88. Bartoloni, A. *et al.* In-vitro activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile*. *J. Chemother.* **16**, 119–121 (2004).
89. Nell, M. J. *et al.* Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides* **27**, 649–660 (2006).
90. Cao, J. *et al.* Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. *ACS Synth. Biol.* **7**, 896–902 (2018).
91. Strömstedt, A. A., Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. & Malmsten, M. Evaluation of strategies for

- improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 593–602 (2009).
92. Chu, H. L. *et al.* Boosting salt resistance of short antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4050–4052 (2013).
  93. Nuding, S., Frasnich, T., Schaller, M., Stange, E. F. & Zabel, L. T. Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5719–5725 (2014).
  94. Sheard, D. E., O'Brien-Simpson, N. M., Wade, J. D. & Separovic, F. Combating bacterial resistance by combination of antibiotics with antimicrobial peptides. *Pure Appl. Chem.* **91**, 199–209 (2019).
  95. I J Fijalkowska, R. M. S. M. Effects of *Escherichia coli* dnaE antimutator alleles in a proofreading-deficient mutD5 strain. **177**, 5979–5986 (1995).
  96. Gennaro, R., Skerlavaj, B. & Romeo, D. Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* **57**, 3142–3146 (1989).
  97. Chen, C. *et al.* The solution structure of the active domain of CAP18 - a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett.* **370**, 46–52 (1995).
  98. SIPOS, D., ANDERSSON, M. & EHRENBERG, A. The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur. J. Biochem.* **209**, 163–169 (1992).
  99. Schibli, D. J. *et al.* The solution structures of the human  $\beta$ -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8279–8289 (2002).
  100. Wang, G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J. Biol. Chem.* **283**, 32637–32643 (2008).
  101. Gottler, L. M. & Ramamoorthy, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan - A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 1680–1686 (2009).
  102. Bechinger, B., Zasloff, M. & Opella, S. J. Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membranes by solution and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* **74**, 981–987 (1998).
  103. Syvitski, R. T., Burton, I., Mattatall, N. R., Douglas, S. E. & Jakeman, D. L. Structural characterization of the antimicrobial peptide pleurocidin from winter flounder. *Biochemistry* **44**, 7282–7293 (2005).
  104. Agerberth, B. *et al.* Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.* **202**, 849–854 (1991).
  105. Gatewood, J. M., Schroth, G. P., Schmid, C. W. & Bradbury, E. M. Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines. *J. Biol. Chem.* **265**, 20667–72 (1990).
  106. Loose, C., Jensen, K., Rigoutsos, I. & Stephanopoulos, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. *Nature* **443**, 867–9 (2006).
  107. Lázár, V. *et al.* Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to

- antimicrobial peptides. *Nat. Microbiol.* **3**, (2018).
108. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163–175 (2008).
  109. Kitagawa, M. *et al.* Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**, 291–299 (2005).
  110. Notebaart, R. A. *et al.* Network-level architecture and the evolutionary potential of underground metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11762–11767 (2014).
  111. Kintses, B. *et al.* Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **4**, 447–458 (2019).
  112. SZYBALSKI, W. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. IV. Cross resistance of Bacillus megaterium to forty-four antimicrobial drugs. *Appl. Microbiol.* **2**, 57–63 (1954).
  113. Forsberg, K. J. *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* **337**, 1107–11 (2012).
  114. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–9 (2014).
  115. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10 (2011).
  116. Nyerges, Á. *et al.* A highly precise and portable genome engineering method allows comparison of mutational effects across bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 2502–2507 (2016).
  117. Assi, F., Textor, M., Rossetti, F. F. & Reviakine, I. Interaction of Poly ( L-Lysine ) - g -Poly ( Ethylene Glycol ) with Supported Phospholipid Bilayers. **87**, (2004).
  118. Lázár, V. *et al.* Genome-wide analysis captures the determinants of the antibiotic cross-resistance interaction network. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
  119. Lázár, V. *et al.* Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 700 (2013).
  120. Horinouchi, T. *et al.* Prediction of Cross-resistance and Collateral Sensitivity by Gene Expression profiles and Genomic Mutations. *Sci. Rep.* **7**, 14009 (2017).
  121. Olaitan, A. O., Morand, S. & Rolain, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 29–30 (2014).
  122. Pránting, M. & Andersson, D. I. Mechanisms and physiological effects of protamine resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 876–887 (2010).
  123. Schaaper, R. M. Mechanisms of mutagenesis in the Escherichia coli mutator mutD5: role of DNA mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8126–8130 (1988).
  124. Andersson, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 461–465 (2006).
  125. Munck, C., Gumpert, H. K., Wallin, A. I. N., Wang, H. H. & Sommer, M. O. A. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. *Sci. Transl. Med.* **6**, 262ra156 (2014).

126. Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S. & Ramamoorthy, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1408–1425 (2006).
127. Barrick, J. E. *et al.* Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**, 1243–1247 (2009).
128. Kalapis, D. *et al.* The Genomic Landscape of Compensatory Evolution. **12**, (2014).
129. Lofton, H., Pránting, M., Thulin, E. & Andersson, D. I. Mechanisms and Fitness Costs of Resistance to Antimicrobial Peptides LL-37, CNY100HL and Wheat Germ Histones. *PLoS One* **8**, e68875 (2013).
130. Roland, K. L., Martin, L. E., Esther, C. R. & Spitznagel, J. K. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* **175**, 4154–64 (1993).
131. Herrera, C. M., Hankins, J. V. & Trent, M. S. Activation of *PmrA* inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* **76**, 1444–60 (2010).
132. Sun, S., Negrea, A., Rhen, M. & Andersson, D. I. Genetic Analysis of Colistin Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2298–2305 (2009).
133. Audrain, B. *et al.* Induction of the Cpx envelope stress pathway contributes to *Escherichia coli* tolerance to antimicrobial peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7770–7779 (2013).
134. Weatherspoon-Griffin, N., Yang, D., Kong, W., Hua, Z. & Shi, Y. The CpxR/CpxA two-component regulatory system up-regulates the multidrug resistance cascade to facilitate *Escherichia coli* resistance to a model antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.* **289**, 32571–82 (2014).
135. Moffatt, J. H. *et al.* Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4971–7 (2010).
136. Mattiuzzo, M. *et al.* Role of the *Escherichia coli* *SbmA* in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol. Microbiol.* **66**, 151–163 (2007).
137. Guo, J., K.M. Nair, M., Galván, E., Liu, S.-L. & Schifferli, D. Tn5AraOut Mutagenesis for the Identification of *Yersinia pestis* Genes Involved in Resistance towards Cationic Antimicrobial Peptides. *Microb. Pathog.* **51**, 121–132 (2011).
138. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
139. Sandegren, L. & Andersson, D. I. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 578–88 (2009).
140. Sun, S., Berg, O. G., Roth, J. R. & Andersson, D. I. Contribution of Gene Amplification to Evolution of Increased Antibiotic Resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **182**, 1183–1195 (2009).
141. Andersson, D. I. & Hughes, D. Gene amplification and adaptive evolution in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 167–95 (2009).
142. Soo, V. W. C., Hanson-Manful, P. & Patrick, W. M. Artificial gene amplification reveals an abundance of promiscuous resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.* **108**, 1484–9 (2011).
143. Nesme, J. & Simonet, P. The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ. Microbiol.* **17**, 913–930 (2015).
  144. Baindara, P. *et al.* Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express* **3**, 1–11 (2013).
  145. Shaheen, M., Li, J., Ross, A. C., Vederas, J. C. & Jensen, S. E. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 produces variants of polymyxin B-type antibiotics. *Chem. Biol.* **18**, 1640–1648 (2011).
  146. Bizani, D. *et al.* Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *Int. Microbiol.* **8**, 125–131 (2005).
  147. Forsberg, K. J. *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* **509**, 612–616 (2014).
  148. Balaban, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 441–448 (2019).
  149. Verderosa, A. D., Totsika, M. & Fairfull-Smith, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* **7**, 1–17 (2019).
  150. Yethon, J. A., Heinrichs, D. E., Monteiro, M. A., Perry, M. B. & Whitfield, C. Involvement of waaY, waaQ, and waaP in the Modification of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide and Their Role in the Formation of a Stable Outer Membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 26310–26316 (1998).
  151. Ogasawara, H., Shinohara, S., Yamamoto, K. & Ishihama, A. Novel regulation targets of the metal-response BasS-BasR two-component system of *Escherichia coli*. *Microbiology* **158**, 1482–92 (2012).
  152. Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R. & Rolff, J. Predicting drug resistance evolution: Insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, (2018).

## 8 ÖSSZEFOGLALÁS

---

Az antibiotikumok felfedezése jelentős mértékben hozzájárult a nyugati orvoslás sikereihez. A bakteriális fertőzések miatti halálozások száma csökkent és az antibiotikumok használata lehetőséget biztosított egyéb sebészeti eljárások eredményes kivitelezéséhez. Az ilyen sikerek után az antibiotikumokat felelőtlenül alkalmazták akkor is, amikor az antibiotikum kezelés indokolatlan volt. Az antibiotikumok előnyeit a mezőgazdaság is kihasználta, úgymint tömeges használatukkal növelték az állományt és ezzel a hozamot. A nagymértékű használatnak köszönhetően a baktériumokat olyan globális szelekciós hatás érte, mely lehetővé tette a rezisztencia folyamatok elterjedését, ezzel elkezdődött egy azóta is tartó versengés az antibiotikum fejlesztők és rezisztens baktériumok között. Az antibiotikumok aranykora óta több ezer antibiotikumot fedeztek fel, illetve fejlesztettek ki. Ennek ellenére mostanra az antibiotikum rezisztencia olyan méreteket öltött, hogy egyes baktériumokra már nem hatnak a forgalomba lévő antibiotikumok, vagyis multidrog rezisztensek lettek. Az ilyen kórokozók egyre gyakoribbak. Ahhoz, hogy fel tudjuk venni a harcot a multidrog rezisztens baktériumokkal újabb szereket kell felfedezni, de az elmúlt negyven évben jelentősen csökkent az újonnan felfedezett antibiotikumok száma. A klasszikus antibiotikumok felfedezése során tapasztalt kudarcok vezettek az antibiotikumok alternatíváinak népszerűsödéséhez.

Az antimikrobiális peptidok (AMP-k) potenciális jelöltek a bakteriális fertőzések kezelésére, mint az antibiotikumok alternatívái. Jelenleg több mint 2000 AMP-t ismerünk, melyek változatos felépítésű, általában rövid, pozitívan töltött peptid molekulák. Ölő hatásukat szelektíven fejtik ki baktériumokkal szemben, ami a pro- és eukarióta membrán felépítésének különbségéből következik. A pozitívan töltött AMP-k elektrosztatikusan vonzódnak a negatívan töltött bakteriális membránhoz, ellenben ez az elektrosztatikus vonzás nem jön létre a semleges felszíni töltéssel rendelkező eukarióta sejtekkel szemben. Az AMP-k fő támadási pontja a bakteriális membrán. Az elektrosztatikus vonzás után beékelődnek a membránba, ahol pórusokat formálva megtörik a membrán integritását, ami a bakteriális sejt halálához vezet. Emellett az AMP-kről kimutatták, hogy több sejtben belüli célponttal is rendelkeznek, képesek gátolni a DNS és fehérje szintézist, valamint a sejtek osztódását is. Az antibakteriális hatáson túl mutatva az AMP-k hatékonyak vírusok, gombák



és rákos sejtek ellen is, illetve az immunrendszer szabályozásában is aktív szerepet töltenek be. Jelenleg több AMP származék is klinikai engedélyeztetés alatt van, illetve számos nanotechnológiai és biotechnológiai megközelítés fejlesztés alatt áll, amellyel növelhető az AMP-k hatékonysága és aktivitása.

Jelen munkában arra kerestük a választ, hogy az AMP-k hosszú távon, rezisztencia mentesen használhatóak-e az antibiotikumokkal összehasonlítva. A kérdés két szempontból is fontos. Először, az AMP-k természetes formájukban nem alkalmazhatóak a klinikumban, ezért a költséges és hosszadalmas fejlesztési folyamatok előtt szükséges megvizsgálni, hogy az AMP-kkel szemben milyen mértékben alakul ki rezisztencia. Másodsor, mivel az AMP-k a természetes immunitás szerves részét képezik, a velük szemben kialakuló rezisztencia befolyásolhatja az immunrendszer hatékonyságát. Ez komoly veszélyforrást jelenthet az AMP-knek és vele egy időben az immunrendszernek is ellenálló patogén korokozók megjelenésére. A rezisztencia folyamatok felderítéséhez rendszer szinten vizsgáltuk az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztenciát, figyelembe véve az AMP-k változatos felépítését és hatásmechanizmusát. Megvizsgáltuk a rezisztencia kialakulásának a különböző lehetőségeit, mindezt úgy, hogy a kapott eredményeket összehasonlítottuk az antibiotikumok esetében megfigyelt rezisztencia mértékével. Így egy átfogó képet kaptunk arról, hogy az AMP-k mennyire hajlamosak a rezisztenciára antibiotikumokkal összehasonlítva.

Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy az AMP-k kevésbé hajlamosak a rezisztenciára. Az általunk elvégzett laboratóriumi evolúciós kísérletben megfigyeltük, hogy a vizsgált 14 AMP-vel szemben szignifikánsan kisebb rezisztencia alakult ki, mint a vizsgált 12 antibiotikum esetében. Megfigyeltük, hogy az AMP-kkel szemben kialakuló rezisztencia széles skálán mozog, hiszen egyes AMP-kkel szemben (PXB, CAP18) az antibiotikumokkal hasonló mértékű rezisztencia alakult ki, míg több AMP-vel szemben (TPII, R8, IND, PGLA) nem, vagy csak nagyon kismértékű. Hasonló mintázatot kaptunk klinikailag jelentős patogén baktériumok esetében is. Kimutattuk, hogy a kialakult rezisztenciához jelentős mértékben hozzájárulnak az olyan mutációk megjelenése, melyek csökkentik a bakteriális membrán felszíni töltöttségét, így meggátolva az AMP-k első, elektrosztatikus vonzási lépését. További vizsgálatokat végeztünk azokkal az AMP-kkel, amelyekkel szemben a laboratóriumi evolúcióban nem, vagy kismértékű rezisztencia alakult ki. Kimutattuk, hogy a keresztrezisztencia folyamatok ritkák a rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel szemben.

Emellett megfigyeltük, hogy bár a humán LL37-tel szemben ki tud alakulni rezisztencia, de a más AMP-vel szemben kialakult rezisztencia nem csökkenti az érzékenységet LL37-tel szemben. Ebből a megfigyelésből arra következtethetünk, hogy az egyes AMP-kkel szemben kialakult rezisztenciák nem univerzálisak, hanem specifikusak egy AMP-vel vagy AMP csoporttal szemben. Végül kimutattuk, hogy a génamplifikáció és a horizontális géntranszfer, mint gyakori rezisztenciaszerző folyamatok, szintén nem biztosítanak rezisztenciát az általunk vizsgált, rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-kkel szemben. Munkánkkal bebizonyítottuk, hogy előzetes vizsgálatokkal találhatunk rezisztenciára kevésbé hajlamos AMP-eket, melyek jó kiinduló pontjai lehetnek olyan antibakteriális gyógyszerek fejlesztésére, melyeket hosszú távon, biztonságosan tudunk használni.

## 9 SUMMARY

---

The discovery of antibiotics has contributed significantly to the success of western medicine. The number of deaths from bacterial infections has fallen, and the use of antibiotics has made it possible to perform other surgical procedures successfully. After this successes, antibiotics were used irresponsibly as a universal medical even when antibiotic treatment was unwarranted. The benefits of antibiotics have also been exploited by agriculture, as their mass use has increased livestock numbers and thus yields. This heavy use of antibiotics led to a selection effect on bacteria that allowed the spread of resistance processes, starting a competition between antibiotic developers and resistant bacteria that has been going on ever since. Since the golden age of antibiotics, thousands of antibiotics have been discovered and developed. However, antibiotic resistance has now reached such proportions that some bacteria are no longer affected by marketed antibiotics, and have become multidrug resistant. Such pathogens are becoming more common. To fight multidrug-resistant bacteria, new antibiotics need to be discovered, but the number of newly discovered antibiotics has fallen significantly over the last forty years. Failures in the discovery of classical antibiotics have led to the popularization of alternatives to antibiotics.

Antimicrobial peptides (AMPs) are potential candidates for the treatment of bacterial infections as alternatives to antibiotics. Currently, more than 2000 AMPs are known, which are generally short, positively charged peptide molecules with diverse structures. They exert their killing activity selectively against bacteria due to differences in the structure of the pro- and eukaryotic membrane. The positively charged AMPs are electrostatically attracted to the negatively charged bacterial membrane, whereas this electrostatic attraction does not occur against eukaryotic cells with neutral surface charge. The main site of attack of AMPs is the bacterial membrane. After electrostatic attraction, they become wedged into the membrane where they form pores and break the integrity of the membrane, leading to bacterial cell death. In addition, AMPs have been shown to have multiple intracellular targets and are able to inhibit DNA and protein synthesis as well as cell division. In addition to their antibacterial activity, AMPs have also been shown to be effective against viruses, fungi and cancer cells, and to play an active role in regulating the immune system. Currently, several AMP

derivatives are under clinical approval and several nanotechnology and biotechnology approaches are under development to enhance the efficacy and activity of AMPs.

In the present work, we sought to answer the question of whether AMPs can be used in the long term without resistance compared to antibiotics. The question is important for two reasons. Firstly, AMPs in their natural form are not clinically applicable, and it is therefore necessary to investigate the extent to which resistance to AMPs develops before embarking on costly and lengthy development processes. Secondly, as AMPs are an integral part of natural immunity, the development of resistance to them may affect the effectiveness of the immune system. This can be a major source of risk for the emergence of pathogenic pathogens that are resistant to AMPs and, in turn, to the immune system. To elucidate resistance processes, we have investigated resistance to AMPs at the system level, taking into account the diverse structure and mechanism of action of AMPs. We investigated the different possibilities for the development of resistance by comparing the results obtained with the resistance processes observed for antibiotics. In this way, we obtained a comprehensive picture of the susceptibility of AMPs to resistance compared to antibiotics.

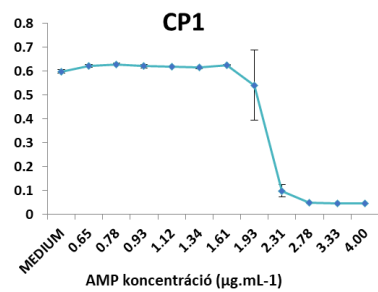
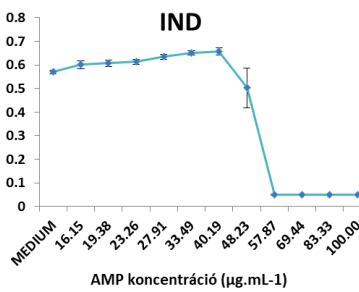
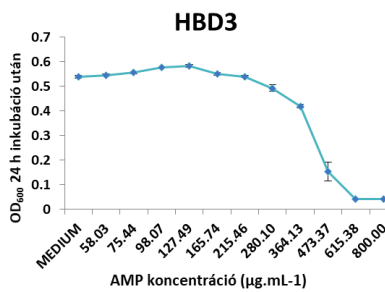
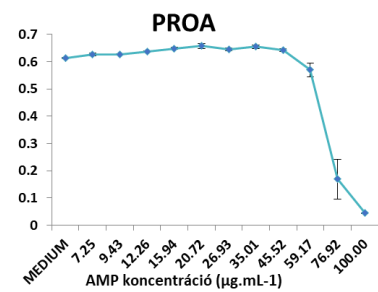
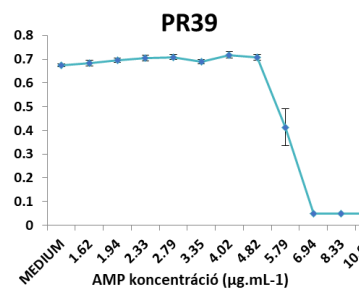
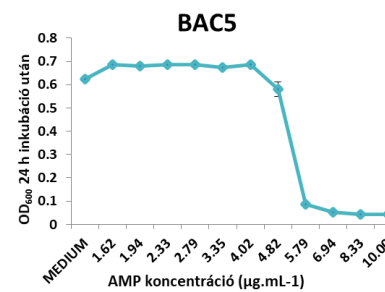
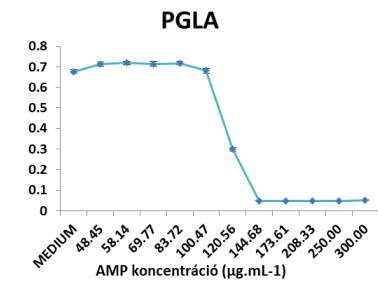
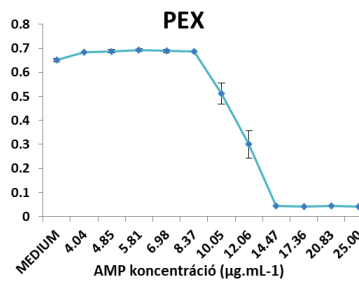
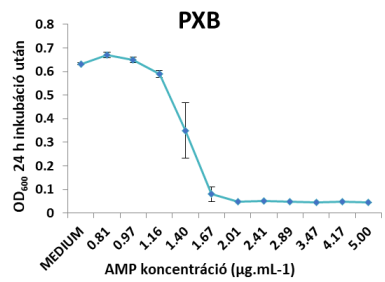
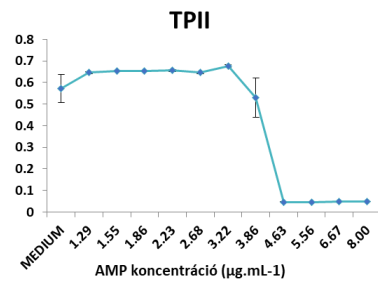
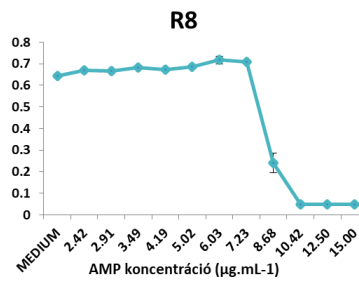
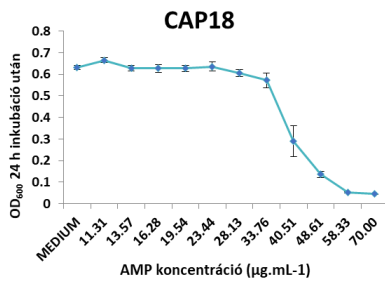
Our experiments have shown that AMPs are less prone to resistance. In our laboratory evolution experiment, we observed that the 14 AMPs tested developed significantly less resistance than the 12 antibiotics tested. We observed a wide range of resistance to AMPs, with some AMPs (PXB, CAP18) developing similar levels of resistance to antibiotics, while several AMPs (TPII, R8, IND, PGLA) showed no or very low levels of resistance. Similar patterns were obtained for clinically important pathogenic bacteria. We have shown that the emergence of mutations that reduce the surface charge of the bacterial membrane, thus preventing the first electrostatic attraction step of AMPs, is a major contributor to the resistance that develops. Further studies have been performed with AMPs for which no or little resistance has developed in laboratory evolution. We have shown that cross-resistance processes are rare for AMPs less susceptible to resistance. In addition, we observed that although resistance to human LL37 can develop, resistance to other AMPs does not reduce sensitivity to LL37. From this observation, we can conclude that resistance to individual AMPs is not universal, with resistance to different AMPs being specific to one AMP or group of AMPs. Finally, we have shown that gene amplification and horizontal gene transfer, as common resistance-authoring processes, also do not confer resistance to the AMPs we

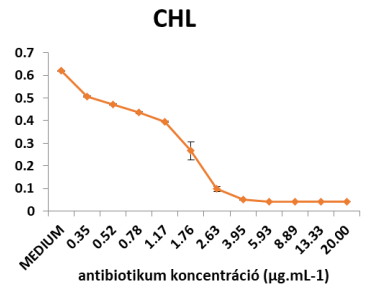
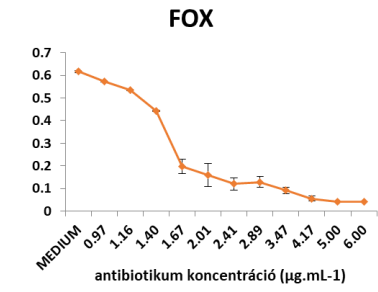
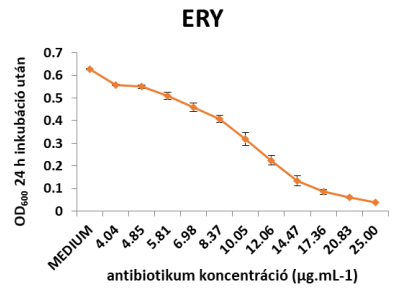
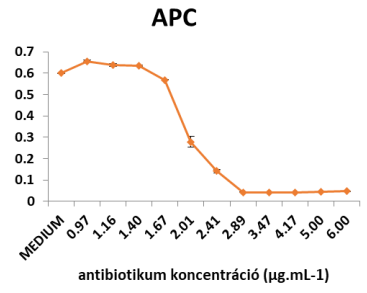
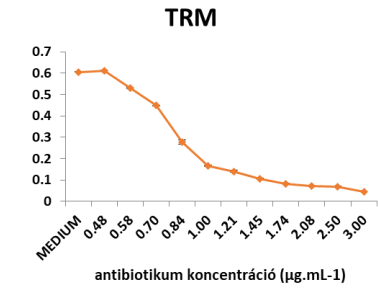
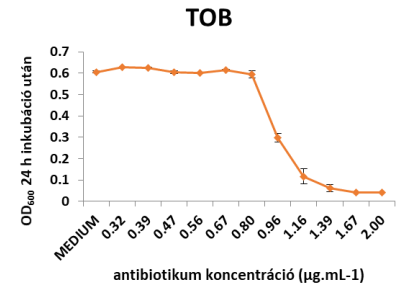
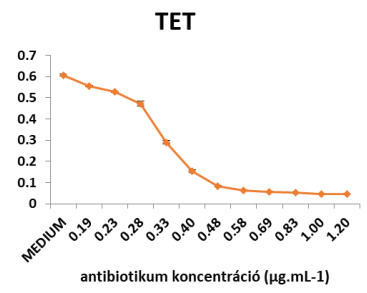
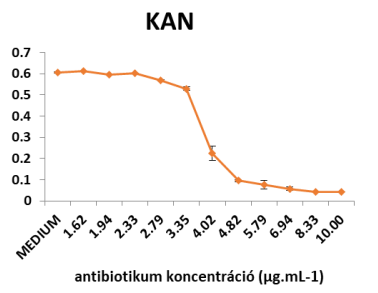
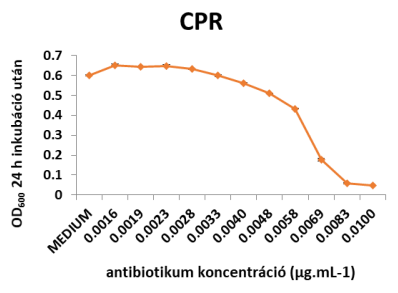
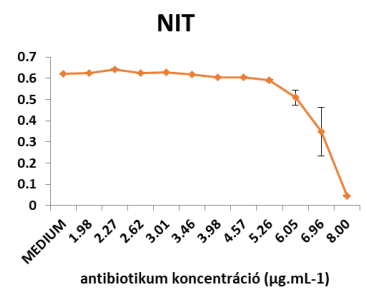
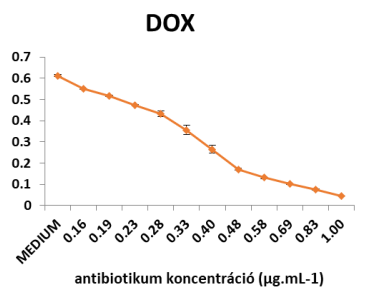
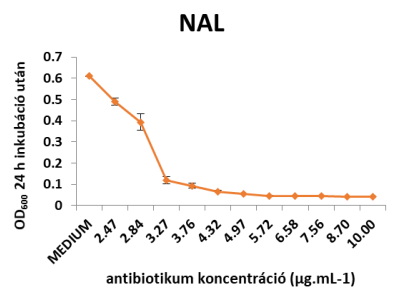
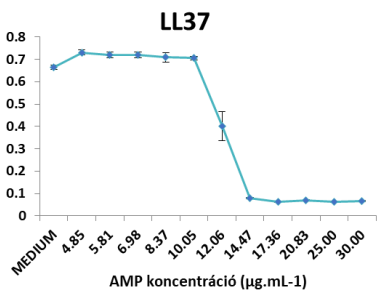
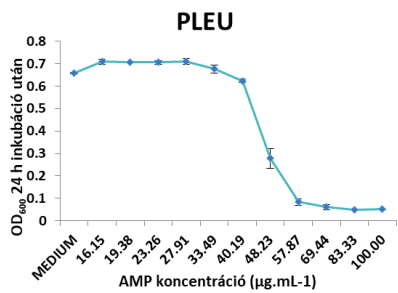
studied that are less susceptible to resistance. Our work has shown that preliminary studies can identify AMPs less susceptible to resistance, which may be a good starting point for the development of antibacterial drugs that can be used safely in the long term.

# 10 FÜGGELÉK

## 1. függelék:

*E. coli* K-12 BW25113 dózis-hatás görbéi az általunk használt AMP-kkel és antibiotikumokkal szemben. Minden adatpont 3 biológiai replikátum átlaga ( $\pm$  SE). Az antibakteriális szerek rövidítését lásd az 1. és 2. táblázatban.





2. függelék: Az evolúciós kísérlet után meghatározott relatív MIC változások

a: az AMP adaptált *E.coli* K-12 BW25113 törzsek relatív MIC értékei. A kék színnel jelölt törzsekkel végeztük a további analíziseket.

Párhuzamos	Relatív MIC változás 20 transzfer után													
	<i>Escherichia coli</i> K-12 BW25113													
	TPII	R8	CP1	PGLA	IND	PLEU	BAC5	PEX	PROA	PR39	HBD3	LL37	CAP18	PXB
1	1.0	1.0	1.0	1.4	1.7	1.8	5.3	8.0	1.0	6.6	NA	29	256	1184
2	1.0	1.0	1.0	2.7	1.0	1.8	NA	1.0	34	2.6	9.4	29	292	1184
3	1.0	1.0	2.0	1.4	2.9	3.1	9.3	1.0	5.8	1.6	9.4	16	256	57
4	1.0	1.0	2.0	1.4	1.7	3.1	5.3	16	2.4	1.6	9.4	16	256	430
5	1.0	1.0	1.0	2.0	1.7	3.1	5.3	32	2.4	6.6	9.4	1.0	657	3255
6	1.0	1.0	1.0	1.4	1.7	3.1	3.0	2.0	2.4	1.6	9.4	130	256	1184
7	1.0	1.0	1.0	1.4	1.7	1.8	9.3	4.0	14	1.6	9.4	58	256	157
8	1.0	1.0	1.0	1.4	2.9	5.4	3.0	1.0	14	1.6	9.4	1.8	256	3255
9	1.0	1.0	1.0	1.4	1.7	3.1	5.3	1.0	5.8	2.6	5.4	1.0	256	157
10	1.0	1.0	2.0	2.0	1.7	3.1	3.0	2.0	1.0	61	9.4	26	657	1184

b: az antibiotikum adaptált *E.coli* K-12 BW25113 törzsek relatív MIC értékei:

Párhuzamos	Relatív MIC változás 20 transzfer után												
	<i>Escherichia coli</i> K-12 BW25113												
	APC	FOX	TET	DOX	NIT	TRM	ERY	CHL	NAL	CPR	TOB	KAN	
1	128	34	8.0	256	177	378	33	13	91	1349	64	256	
2	64	10	32	128	93	64	10	25	91	172	128	256	
3	64	10	32	256	64	16	33	3.6	91	482	64	177	
4	16	34	32	64	128	128	18	128	91	3778	256	177	
5	128	34	86	256	64	378	33	6.9	91	482	128	93	
6	64	10	86	128	256	378	105	47	91	172	32	256	
7	64	19	32	256	128	64	61	13	91	10579	128	256	
8	64	10	8.0	128	32	8.0	198	16	91	482	128	49	
9	64	10	8.0	128	128	64	59	13	91	482	256	177	
10	32	34	8.0	64	128	8.0	59	47	91	172	49	93	

c: a TPII adaptált *E.coli* mutD5 törzs relatív MIC értékei:

Párhuzamos	Relatív MIC változás 20 transzfer után
	<i>Escherichia coli</i> mutD5
	TPII
1	1.4
2	1.0
3	1.4
4	1.0
5	1.0
6	1.0
7	1.4
8	1.0
9	1.4
10	1.4



d: az AMP adaptált klinikailag releváns törzsek relatív MIC értékei:

Párhuzamos	Relatív MIC változás 20 transzfer után							
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> LT2		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031		<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	
	TPII	PXB	TPII	PXB	TPII	PXB	TPII	PXB
1	4.8	1215	1.0	6561	5.6	19683	4.3	6561
2	1.2	2187	1.2	486	3.3	19683	1.0	2187
3	1.2	2187	1.0	49	4.3	19683	7.2	729
4	1.0	81	4.8	59	3.3	19683	1.0	27
5	1.0	729	1.2	24	2.4	19683	1.0	2187
6	1.2	6561	1.0	59	8.2	19683	3.3	2187
7	1.2	486	1.2	24	1.0	19683	2.1	27
8	1.2	27	1.0	83	25.6	19683	3.3	6561
9	1.0	81	1.0	14	7.2	19683	5.6	27
10	1.0	1458	1.0	21	2.9	2187	5.6	6561