

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY IZOLOVANÉ Z HMYZU

VÁCLAV ČEŘOVSKÝ

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
cerovsky@uochb.cas.cz

Došlo 23.10.13, přijato 18.11.13.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, analoga, hmyz, lucifensin, jed, hymenoptera, α -helikální struktura

Obsah

1. Úvod
2. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů a jejich působení
3. Antimikrobiální peptidy (AMP) izolované z hmyzu
 - 3.1. Lucifensin
 - 3.2. Antimikrobiální peptidy izolované z jedu blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera)
 - 3.2.1. AMP z jedu vos
 - 3.2.2. AMP z jedu mravenců
 - 3.2.3. AMP z jedu čmeláků
 - 3.2.4. AMP z jedu včely medonosné
 - 3.2.5. AMP z jedu volně žijících včel
4. Předpoklady pro využití AMP v praxi

1. Úvod

Zavedení antibiotik do praxe následně po objevu penicilinu Sirem Alexandrem Flemingem v roce 1928 (publikováno 1929)¹ bylo bezesporu významným mezníkem v historii moderní medicíny. Zlatý věk antibiotik, následující po druhé světové válce a trvající až do 70. let minulého století, znamená objevy téměř všech dnes známých typů antibiotik včetně jejich derivátů. V té době se zdálo, že bakteriální infekce jsou navždy pod kontrolou. Nadměrné a nesprávné používání antibiotik si však během doby vybralo svou daň v podobě rezistence bakterií. Příkladem jsou *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicillin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, rezistentní kmeny *Escherichia coli*, ESBL produkující *Klebsiella*, patogenní enterokoky či rezistentní původci tuberkulózy. Rychlost vstupu nových antibiotik od jejich objevu v laboratoři do klinické praxe je však stále pomalejší a nadržuje krok s rychlostí, s jakou bakterie získávají proti antibiotikům rezistenci. Zájem o objevování nových antibiotik je stále menší, neboť jejich výzkum není

pro farmaceutické firmy rentabilní. Dle slov mnoha odborníků se velmi rychle blížíme do doby „post-antibiotické“.

Vzhledem k této situaci byl již před lety, a to převážně v akademických institucích, započat výzkum nových typů antimikrobiálních látek, které zabíjejí bakterie na základě principiálně odlišného mechanismu působení než mají tradiční antibiotika, a přitom by neměly vytvářet rezistenci. Mezi tyto látky patří antimikrobiální peptidy (AMP), které ačkoliv ještě nebyly uvedeny do praxe, představují jednu z možných kategorií hledaných protinfekčních látek. Výzkumem nových AMP se od roku 2007 zabýváme v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

2. Obecné vlastnosti antimikrobiálních peptidů a jejich působení

Antimikrobiální peptidy představují evolučně zachovanou složku vrozeného imunitního systému, která tvoří první obrannou linii proti infekci. Tyto peptidy vykazující přímý antimikrobiální účinek byly identifikovány již téměř ve všech formách organismů, počínaje bakteriemi, rostlinami a konče obratlovci.

V současné době je v databázi antimikrobiálních peptidů² evidováno více než 2000 AMP. Pro některé AMP je často používán název obranné peptidy hostitele (host defense peptides), neboť u vyšších organismů byla u nich kromě přímého antimikrobiálního účinku prokázána také imunomodulační aktivita.

AMP lze rozdělit podle náboje na anionické a kationické. V tomto článku se zaměříme na kationické AMP, které jsou v přírodě daleko hojnější a též více studované. Velmi mnoho jich bylo izolováno právě z hmyzu³. Jedná se o peptidy složené z 10 až 50 aminokyselin s výrazným obsahem bazických aminokyselin Arg a Lys, které jim dodávají celkový kladný náboj (+2 až +10), ale k tomu obsahují ještě vysoké procento hydrofobních aminokyselin ($\geq 30\%$). Dále se pak dají kategorizovat na základě sekundární struktury, a to na peptidy tvořící α -helix, peptidy obsahující struktury skládaného listu (β -list), struktury smyčky a peptidy s rozvolněnou strukturou⁴.

Některé z nich mají neuspořádanou strukturu ve vodném prostředí, ale v přítomnosti biologických membrán nebo v prostředí napodobujícím membránu vytvářejí některou z výše uvedených konformací, která má amfipatický charakter. To znamená, že obsahují hydrofobní aminokyseliny na jedné straně molekuly a hydrofilní aminokyseliny včetně Arg a Lys na straně druhé. Tato charakteristická vlastnost hraje u většiny z nich významnou úlohu v mechanismu zabíjení bakterií.

V *in vitro* testech vykazují AMP aktivity srovnatelné s konvenčními antibiotiky, ale zabíjejí bakterie podstatně

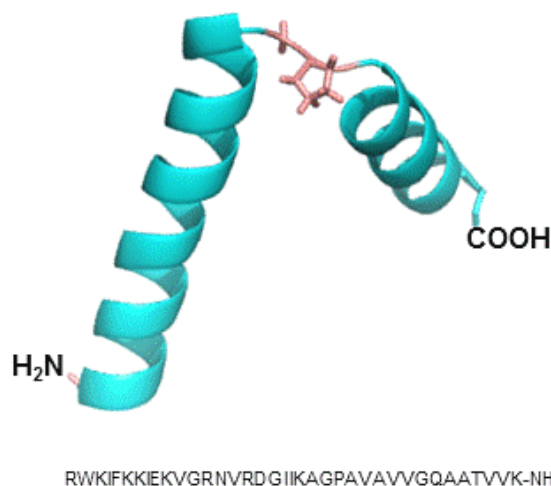
rychleji. I když samotný mechanismus účinku AMP není dostatečně probádán, obecně se přijímá, že tyto kladně nabitě peptidy jsou přitahovány k povrchu bakteriální membrány složené převážně z fosfolipidů nesoucích negativní náboj, interagují s ní, proniknou do její lipidové dvojvrstvy a různými mechanismy rozruší její strukturu. V důsledku toho dojde k porušení membránového potenciálu a úniku cytoplazmatického obsahu, a tím ke smrti bakterie. Pro tyto mechanismy bylo vypracováno několik modelů v literatuře popisované jako kobercový model, soudkový model, toroidní model a model micelárních agregátů⁴. Některé AMP nemusí nutně poškodit buněčnou membránu, ale pronikají dále do nitra bakterií, kde naruší jejich metabolismus nebo poškodí cytoplazmatické komponenty^{4,5}. Odlišné složení membrán eukaryotických buněk tvořených fosfolipidy převážně neutrálního charakteru a cholesterolu brání vlastní buňky hostitele před účinkem AMP.

3. Antimikrobiální peptidy z hmyzu

Hmyz, jenž tvoří 90 % druhů veškeré živočišné říše, prošel velmi úspěšným evolučním vývojem, a to díky svému efektivnímu vrozenému (nespecifickému) imunitnímu systému. Na rozdíl od obratlovců hmyz neprodukuje immunoglobuliny ani lymfocyty, tedy nedisponuje adaptivním (specifickým) imunitním systémem. Vzhledem k prostředí, ve kterém se hmyz pohybuje, je zřejmé, že jeho obranný systém musí být velice účinný proti mikrobiální infekci^{3,6}.

Imunitní systém hmyzu^{3,6} můžeme rozdělit na vnější bariéry a složku buněčnou a humorální. Vnější mechanická bariéra je tvořena kutikulou. Buněčná reakce je zprostředkována hemocyty, které se účastní fagocytózy, nodulace a enkapsulace mikroorganismů a apoptotických buněk. Výsledkem humorální odpovědi je uvolnění zásobního lysozymu a AMP, které hmyz rychle vytváří v reakci na infekci především v tukovém tělese (tkáň, která odpovídá savčím játrům). Poté jsou AMP vyloučeny do hemolymfy, která je už snadno roznesena po celém těle. AMP mohou vznikat také v hemocytech, epitelálních buňkách epidermis, ve střevě, v slinných žlázách a v rozmnožovacích orgánech. Hmyz produkuje celou škálu AMP, které lze opět rozdělit podle jejich sekundární struktury do výše uvedených 4 základních skupin⁴, ale některé z nich mají ve své molekule více strukturních prvků (např. α -helix, β -list) a jiné nelze podle tohoto dělení jednoznačně klasifikovat.

Nejpočetnější skupinu představují hmyzí defensiny^{7,8}. Tyto cyklické peptidy složené z 30 až 60 aminokyselin jsou svým aminokyselinovým složením i strukturou velmi odlišné od defensinů savců. Jejich peptidový řetězec je, podobně jako je tomu u savčích defensinů⁹, také propojen třemi disulfidovými můstky, ale toto propojení má odlišné pořadí. Navíc mají hmyzí defensiny ve své molekule kromě antiparalelního β -listu též α -helix¹⁰. První hmyzí defensiny^{11,12} byly izolovány z dvoukřídlého hmyzu (řád Diptera), a to z larev much druhů *Sarcophaga peregrina*



Obr. 1. **Prostorová struktura a sekvence cecropinu izolovaného z hemolymfy motýla otakárka *Papilio xuthus*.** Tento cecropin složený ze 37 aminokyselin obsahuje jako dominantní strukturní prvek α -helix přerušovaný flexibilním ohybem v místě dipeptidu Gly-Pro

a *Phormia terranovae*. Hmyzí defensiny jsou aktivní hlavně proti Gram-pozitivním bakteriím a některým plísním. Další početnou skupinu představují cecropiny, lineární peptidy v délce 35–39 aminokyselin patřící do skupiny α -helikálních AMP (obr. 1). Cecropin A byl vůbec první objevený a charakterizovaný AMP. Byl izolován z hemolymfy kukly nočního motýla martináče *Hyalophora cecropia*¹³ a dal název celé rozsáhlé skupině vzájemně podobných peptidů identifikovaných výlučně v hmyzu řádu Lepidoptera a Diptera¹⁴. Do další rozsáhlé skupiny hmyzích AMP patří peptidy, které nevykazují definované strukturní uspořádání (α -helix, β -list), ale mají rozvolněnou strukturu. Jsou to lineární peptidy vyznačující se výrazným zastoupením jedné aminokyseliny jako je prolin nebo glycin^{3,6,8,15,16}.

V následujících dvou kapitolách se budeme věnovat převážně AMP, které byly v nedávné době charakterizovány v naší laboratoři ÚOCHB AV ČR. Jde o lucifensiny ze skupiny hmyzích defensinů, ale větší prostor věnujeme AMP nalezeným v jedových rezervoárech žahadlovitého hmyzu řádu blanokřídlých (Hymenoptera).

3.1. Lucifensiny

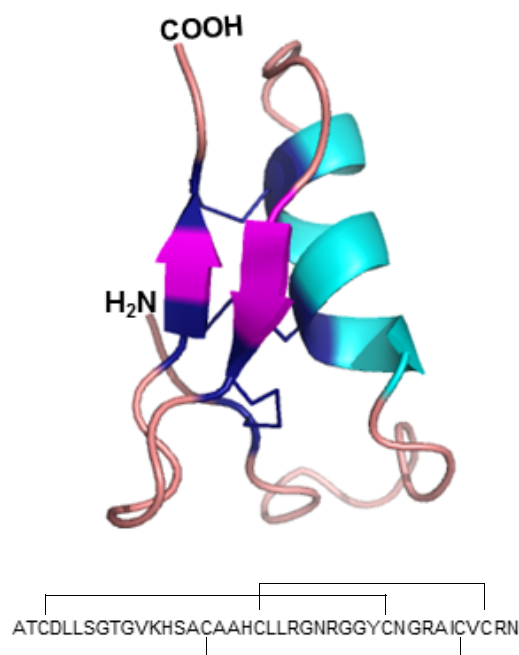
Významné místo mezi hmyzími defensiny zaujímají lucifensiny^{17,18}, izolované z larev much bzučivek *Lucilia sericata* a *L. cuprina*, které se používají k larvální terapii. Larvální terapie je léčebná metoda založená na čištění a léčení infikovaných nehojících se ran mladými larvami, které vyžíráním odstraňují nekrotickou tkáň a přitom v ráně hubí bakterie včetně těch patogenních, rezistentních na tradiční antibiotika, a tím ránu desinfikují^{19,20}. Je to

k tkáním šetrná léčebná metoda, která je v současné době součástí standardní léčby syndromu diabetické nohy a která pomáhá zachraňovat dolní končetiny diabetických pacientů před amputací²⁰. Larvy během tohoto procesu do rány vylučují lucifensin¹⁷, který působí bakteriocidně na bakterie uvnitř rány a zároveň jako součást jejich imunitního systému přispívá k ochraně larev před infekcí. Počátky cíleného použití larvální terapie v medicíně se datují od konce první světové války. Můžeme tedy považovat nasazení larev do rány jako první praktické byť nevědomé použití antimikrobiálního peptidu lucifensinu k léčebným účelům?

Lucifensin byl v larvách mouchy bzučivky zelené (*L. sericata*) identifikován až v roce 2010, a to v naší laboratoři, ve spolupráci s lékaři Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze^{17,20}. Látku s antimikrobiálním účinkem proti citlivé bakterii *Micrococcus luteus* jsme nejprve identifikovali v extraktu vypreparovaných larválních střev, ten jsme pak ultrafiltrovali a aktivní peptid izolovali metodou RP-HPLC. Následně jsme stanovili jeho primární sekvenci Edmanovým odbouráváním a hmotovou spektrometrií. Jedná se o hmyzí defensin složený ze 40 aminokyselin obsahující tři disulfidové můstky. Lucifensin jsme poté našli také v hemolymfě larev, ve slinných žlázách, tukovém tělese, ale též ve výměšcích larev¹⁷. To dokazuje, že lucifensin je larvami do rány vyměšován a přispívá k jejímu léčení. O tom také svědčí i přítomnost lucifensinu zjištěná v ráně pomocí stěru ihned po odstranění larev koncem terapie¹⁷.

Objev lucifensinu byl po dalším půlroce publikován též dánskými autory, kteří jeho přítomnost v medicíně larvách druhu *L. sericata* prokázali metodami molekulární biologie²¹. Nukleární magnetickou rezonancí (NMR) bylo zjištěno, že molekula lucifensinu zaujímá prostorové uspořádání charakteristické i pro ostatní hmyzí defensiny^{10,22}. Jeho terciární struktura obsahuje N-koncovou smyčku (1. – 12. aminokyselina), následuje α -helix (13. – 23. aminokyselina) spojený ohybem s párem β -vláken (28. – 31. a 34. – 38. aminokyselina), které vytváří anti-paraletní β -list (obr. 2). Disulfidový můstek mezi Cys3 a Cys30 připojuje N-koncovou smyčku k prvnímu β -vlákně a další dva (Cys16–Cys36 a Cys20–Cys38) spojují α -helix s druhým β -vláknem²². Spojení α -helixu a β -struktury pomocí dvou disulfidových můstků tvoří strukturální prvek¹⁰ známý jako „cysteine-stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) motif“ (obr. 2).

V následné studii jsme dokázali, že jeho přítomnost v molekule je nutná pro zachování antimikrobiální aktivity. Pro tuto studii jsme lucifensin a jeho tři analogy, z nichž každý obsahoval pouze jeden disulfidový můstek, připravili metodou syntézy peptidů na pevné fázi²³. Měřením jejich antimikrobiální aktivity proti Gram-pozitivním bakteriím se ukázalo, že analogy s jedním můstkem jsou neaktivní, s výjimkou analogu, jehož disulfidový můstek Cys16–Cys36 spojuje α -helikální část molekuly s β -strukturou. I tento analog vykazoval mnohonásobně nižší aktivitu v porovnání s lucifensinem²³. Je zřejmé, že bez „podpory“ disulfidových můstků si molekula tohoto defensinu neudrží původní stabilní terciární konformaci,



Obr. 2. **Prostorová struktura a sekvence lucifensinu.** Tento hmyzí defensin složený ze 40 aminokyselin obsahuje jako dominantní strukturální prvky α -helix a antiparalelní β -list. Tyto dva strukturální prvky jsou mezi sebou odděleny smyčkami a vzájemně je celá struktura propojena disulfidovými můstky Cys3–Cys30, Cys16–Cys36 a Cys20–Cys38

a tím ztratí svoji biologickou aktivitu. Antimikrobiální aktivitu ztratil i analog lucifensinu, jehož sekvence byla na N-konci zkrácena o 10 aminokyselin²³.

V roce 2012 jsme lucifensin identifikovali¹⁸ také v larvách mouchy *L. cuprina*, které se využívají k larvální terapii převážně v zemích horkého klimatu, např. v Egyptě či Malajsii. V tomto případě jsme zdokonalenou metodou z hemolymfy asi tisíce larev izolovali lucifensin II. Jeho sekvence potvrdila vysokou podobnost s původním lucifensinem bzučivky *L. sericata*. Lucifensin II je peptid složený rovněž ze 40 aminokyselin lišící se od lucifensinu pouze jednou aminokyselinou, a to isoleucinem v poloze 11 na místě valinu. Lucifensiny jsou jediné AMP doposud jednoznačně identifikované v medicíně larvách. Mají baktericidní účinek proti Gram-pozitivním bakteriím infikujícím ránu (*Staphylococcus aureus*), ale jsou bohužel neúčinné proti Gram-negativním bakteriím. To vysvětluje selhání larvální terapie při léčení ran infikovaných Gram-negativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Antimikrobiální peptidy izolované z jedu blanokřídlého hmyzu (Hymenoptera)

Tyto antimikrobiální peptidy byly izolovány z jedových rezervoárů žahadlovitého hmyzu (řád Hymenoptera, podřád Apocryta, skupina Aculeata). Společným

znakem skupiny Aculeata je žihadlo (přeměněné kladélko), které je spojené s jedovým rezervoárem jedové žlázy. Mezi nejznámější zástupce patří vosy, včely, čmeláci a mravenci. Obsah látek v jedu se mezi jednotlivými druhy liší a odvíjí se podle funkce, kterou žihadlový jed má. Soliterní dravé druhy, jako jsou např. kutilky, využívají jed pro paralyzu kořisti, již krmí své larvy. Jed u sociálních včel a vos plní funkci především obrannou při ochraně před predátory nebo konkurujícími společenstvími, mravenci jej mohou využívat k oběma účelům^{24,25}.

Látky obsažené v jedu lze podle molekulové hmotnosti rozdělit do tří skupin^{25–28}. Do první skupiny se řadí proteiny, a to především hojně se vyskytující enzymy hyaluronidasy a fosfolipasy. Druhou skupinu reprezentují peptidy o molekulové hmotnosti do 10 kDa představované neurotoxiny, cytolytickými peptidy, kininy, chemotaktickými peptidy a kationickými AMP. Třetí skupina se sestává z nízkomolekulárních látek, jako jsou ionty, volné aminokyseliny, biogenní aminy, neurotransmitery, polyaminy a heterocyklické sloučeniny. Funkce AMP v jedu nebyla zatím zcela jednoznačně prokázána, ale lze očekávat, že AMP ochraňuje jedince před infekcí, která by se mohla přenést z napadnuté kořisti. Dále by AMP mohly sloužit jako konzervační činidlo v případě, kdy paralyzovaná oběť má vydržet jako výživa po delší dobu larválního vývoje. U některých AMP je pak možné, že kromě antimikrobiální funkce vykazují ještě jinou aktivitu a mohou působit synergicky s dalšími komponenty jedu. Společným znakem těchto AMP je jejich amfipatická struktura a schopnost interagovat s biologickými membránami. V případě interakce se záporně nabitými membránami bakterií dochází k jejich narušení a následnému kolapsu vedoucímu ke smrti bakterie, v případě interakce s neutrálně nabitými membránami eukaryotických buněk může dojít ke spuštění různých škodlivých biologických procesů uvnitř buněk.

3.2.1. AMP z jedu vos

Podstatnou složkou jedu sociálních vos a sršní jsou mastoparany – α -helikální, amfipatické peptidy složené ze 14 aminokyselin, u nichž C-koncovou aminokyselinou je leucinamid^{28–30}. Všechny mastoparany obsahují podobnou sekvenci s převážným obsahem hydrofobních aminokyselin a 2 až 4 lysiny. Mastoparany vykazují množství biologických aktivit, jako jsou např. degranulace žírných buněk vedoucí k uvolnění histaminu či uvolnění serotoninu z krevních destiček, aktivaci fosfolipas, G-proteinu a guanylátcyklasy a vazbu ke kalmodulinu a troponinu. Od objevu prvního mastoparanu²⁹ sekvence H-Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH₂, který byl izolován z jedu sociální vosy *Vespula lewisii*, bylo popsáno a studováno několik desítek dalších mastoparanů a peptidů od nich odvozených. Některé z nich mají silný antimikrobiální účinek doprovázený slabší či silnější hemolytickou aktivitou jako třeba mastoparany, které jsme izolovali z jedu podčeledi vosíkovití (*Polistinae*) (cit.³¹). Mastoparany vykazující antimikrobiální aktivitu byly objeveny i v jedu některých soliterních vos³². V jedu soliterní vosy hrabalky *Anoplius samariensis* byl identifikován do-

posud nejkratší objevený přírodní AMP anoplín³³ (10 aminokyselin). Dekoralin³⁴ z jedu vosy jízlivky *Oreumenes decoratus* vykazuje navíc aktivitu proti protozoálnímu původci leishmaniózy.

3.2.2. AMP z jedu mravenců

Přes velkou rozmanitost mravenců byly AMP objeveny jen u několika druhů. Tyto druhy ovšem disponují větším počtem AMP odlišujících se biologickými aktivitami. Z jedu mravence *Pachycondyla goeldii* bylo izolováno 15 peptidů označených jako ponericyny³⁵, z nichž většina vykazuje hemolytickou aktivitu. Jed australského mravence *Myrmecia pilosula* obsahuje neobvyklé pilosuliny – lineární peptidy, které se vyskytují také ve formě dimerů, které se tvoří z monomerních jednotek spojených disulfidovým můstkem^{36,37}. V jedu mravence *Tetramorium bicarinatum* byl objeven jen jeden AMP, ale zcela odlišný od výše zmíněných AMP. Bicarinalin³⁸ obsahující 20 aminokyselin vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu a jen slabou hemolytickou aktivitu.

3.2.3. AMP z jedu čmeláků

AMP z jedu různých druhů čmeláků nesou společný název bombolitiny. Obsahují 17–19 aminokyselin a sdílejí velice podobnou sekvenci. Prvních pět bombolitín³⁹ bylo izolováno z jedu čmeláka *Megabombus pennsylvanicus*. Další pak následovaly izolací z jedu čmeláků *Bombus lapidarius*⁴⁰ a *B. ignitus*⁴¹, u kterých byla podrobně studována antimikrobiální aktivita, podobně jako u šesti bombolitínů⁴², které jsme izolovali z jedu *B. pascuorum*. Většina bombolitínů však vykazuje značný hemolytický účinek.

3.2.4. AMP z jedu včely medonosné (čeled' Apidae)

Hlavní peptidovou složkou jedu včely medonosné (*Apis mellifera*) je melittin⁴³, který tvoří 40–50 % suché váhy včelího jedu. Je to lineární peptid složený z 26 aminokyselin, který ve vodě vytváří rozvolněnou strukturu, ale v přítomnosti membrán a organických rozpouštědel zaujímá konformaci dvou amfipatických α -helixů spojených krátkým ohybem. Melittin je znám již od 50. let minulého století hlavně díky jeho hemolytickým vlastnostem, zatímco jeho antimikrobiální aktivita⁴⁴ byla popsána prvně v roce 1968. Od té doby až do současnosti se tento peptid stal předmětem studia stovek vědeckých prací, a to nejen z pohledu svých biologických aktivit. Je poněkud překvapivé, že kromě melittinu doposud žádný jiný AMP nebyl v jedu včely medonosné identifikován.

3.2.5. AMP z jedu volně žijících včel

Tyto AMP jsme izolovali v naší laboratoři v ÚOCHB AV ČR z jedů volně žijících včel čeledi Apidae, Halictidae, Andrenidae a Colletidae. Převážně se jedná o kratší lineární amfipatické α -helikální peptidy v délce 12–18 aminokyselin s poměrně značným zastoupením Arg a Lys a amidované na C-konci. Jejich sekvence byla určena Edmanovým odbouráváním na základě jejich molekulární hmotnosti stanovené hmotnostní spektrometrií. Některé z nich vykazují značnou antimikrobiální aktivitu, ale niz-

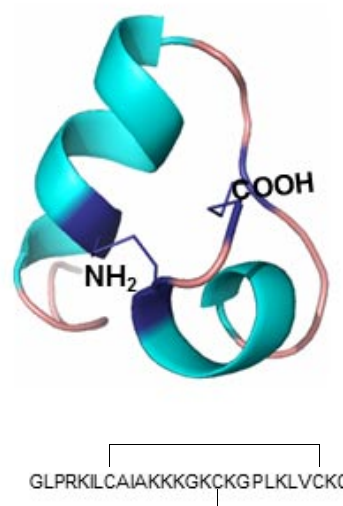
Tabulka I
Antimikrobiální peptidy izolované z jedu volně žijících včel

Název peptidu	Sekvence peptidu	Druh (čeleď)
Melectin (MEP)	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂	<i>Melecta albifrons</i> (Apidae)
Lasioglossin-I (LL-I)	VNWKKVLGKIIKVAK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Lasioglossin-I (LL-II)	VNWKKILGKIIKVAK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Lasioglossin-I (LL-III)	VNWKKILGKIIKVVK-NH ₂	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Halictin-1 (HAL-1)	GMWSKILGHLIR-NH ₂	<i>Halictus sexcinctus</i> (Halictidae)
Halictin-2 (HAL-2)	GLWMSLLKHILK-NH ₂	<i>Halictus sexcinctus</i> (Halictidae)
Macropin (MAC-1)	GFGMALKLLKKVL-NH ₂	<i>Macropis fulvipes</i> (Melittidae)
Lasiocepsin (Las)	GLPRKILCAIAKKKGKCKGPLKLVCKC	<i>Lasioglossum laticeps</i> (Halictidae)
Panurgin (PNG-1)	LNWGAILKHIK-NH ₂	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)
PNG-K	LDVKKIICVACKIKPNPACKKICPK	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)
PNG-R	LDVKKIICVACKIRPNPACKKICPK	<i>Panurgus calcaratus</i> (Andrenidae)

kou, popřípadě jen mírnou toxicitu vůči eukaryotním buňkám. Ve srovnání s obdobnými peptidy objevenými jinými vědeckými týmy mají vyšší antimikrobiální účinky. Kupodivu v žádném z těchto jedů nebyla zjištěna přítomnost výše zmíněného melittinu.

V roce 2008 jsme z jedu kleptoparazitické včely smutilky obecné (*Melecta albifrons*, čel. Apidae) izolovali první peptid této skupiny, pojmenovaný melectin⁴⁵. Tento lineární peptid složený z 18 aminokyselin (tab. I) vykazoval značnou aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (tab. II), degranuloval žírné buňky, ale jeho hemolytická aktivita byla nízká. Měřením spekter cirkulárního dichroismu (CD) byla dokázána jeho schopnost zaujmout v přítomnosti trifluoroethanolu či dodecylsulfátu sodného (SDS) amfipatickou α -helikální strukturu. Pro melectin je charakteristická přítomnost prolinu (pozice 11) uprostřed peptidového řetězce, který je příčinou mírného ohybu α -helixu. Tento tzv. „Pro kink“ je důležitý pro selektivitu účinku peptidu na prokaryotní a nikoli eukaryotní buňky, jak bylo prokázáno sledováním biologické aktivity několika analogů melectinu. V případě nahrazení Pro11 některými aminokyselinami, které stabilizují helikální konformaci (Ala, Lys), byla hemolytická aktivita podstatně zvýšena.

Z hlediska biologických aktivit představují významnou skupinu tři patnáctipeptidy (tab. I a II), pojmenované jako lasioglossiny⁴⁶ (LL-I, LL-II a LL-III), které jsme našli v jedu primitivně eusociální včely ploskočelky velkohlavé (*Lasioglossum laticeps*, čel. Halictidae). Mají vysokou antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím⁴⁶, proti kvasinkám⁴⁷ a nevykazují hemolytickou aktivitu. Jejich schopnost degranulovat žírné buňky je podstatně nižší v porovnávání s mastoparany. LL-III též prokazoval aktivitu proti některým rakovinným buňkám, a to hlavně proti leukemickým liniím⁴⁸. Jak bylo potvrzeno měřením CD a NMR spekter, lasioglossiny též zaujímají amfipatickou α -helikální konformaci v přítomnosti trifluoroethanolu nebo SDS. Měření



Obr. 3. **Prostorová struktura a sekvence lasiocepsinu.** Lasiocepsin je složený ze 27 aminokyselin, obsahuje jako dominantní strukturální prvky dva α -helixy, které jsou od sebe odděleny smyčkami a vzájemně propojeny disulfidovými můstky Cys8-Cys25 a Cys17-Cys27

NMR v přítomnosti trifluoroethanolu navíc ukázalo, že α -helix je mírně ohnut do oblouku, přičemž postranní řetězce hydrofilních aminokyselin jsou soustředěny převážně na konvexní a hydrofobní aminokyseliny na konkávní straně oblouku⁴⁶. Toto mírné zakřivení je důsledkem přítomnosti glycinového zbytku situovaného uprostřed peptidového řetězce (pozice 8), kolem něhož dochází k ohybu. Pokud byl tento glycin ve studovaných analogích zaměněn prolinem, antimikrobiální aktivita všech tří lasioglossinů proti patogenním bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa* několikrát poklesla, a to důsledkem narušení jejich α -helikální konformace, což bylo dokázáno CD spektrometrií. Následná studie LL-III ukázala, že jeho antimikro-

Tabulka II

Antimikrobiální a hemolytická aktivita peptidů izolovaných z jedu volně žijících včel

Peptid	Antimikrobiální aktivita MIC [μM]						Hemolytická aktivita ^g LC ₅₀ [μM]
	<i>M.l.</i> ^a	<i>B.s.</i> ^b	<i>S.a.</i> ^c	<i>E.c.</i> ^d	<i>P.a.</i> ^e	<i>C.a.</i> ^f	
MEP	–	0,8	6,8	2,0	18,5	8,3	>100
LL-I	–	0,8	14,3	1,7	15,8	9,1	>200
LL-II	–	0,7	9,0	1,4	14,4	10,0	>200
LL-III	–	0,7	3,9	1,4	18,7	11,7	>200
HAL-1	–	0,8	7,7	3,8	45	6,2	82
HAL-2	–	1,0	8,1	2,5	42,1	6,6	78,1
MAC-1	–	1,3	3,7	3,0	35,0	6,3	160
Las	–	0,4	93	8,6	15	3,6	>200
PNG-1	1,5	1,3	10,6	3,7	51,7	7,3	119
PNG-K	1,6	3,3	>100	63,3	>100	24,2	>200
PNG-R	0,8	1,5	>100	32,5	>100	18,7	>200

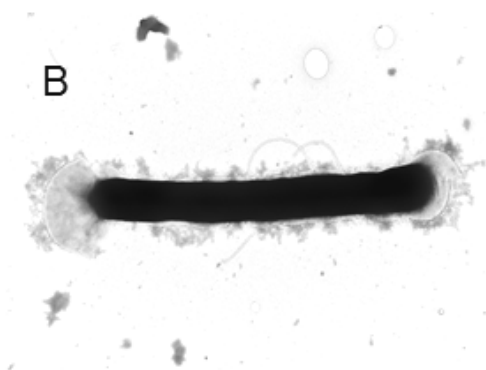
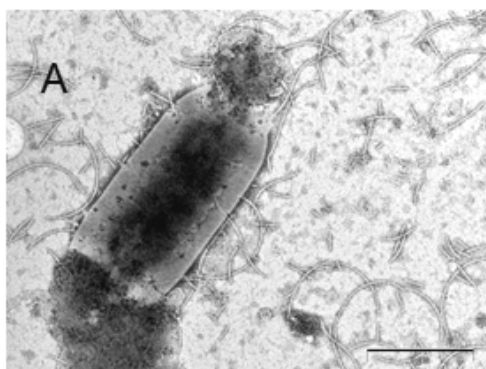
^a *Micrococcus luteus*; ^b *Bacillus subtilis*; ^c *Staphylococcus aureus*; ^d *Escherichia coli*; ^e *Pseudomonas aeruginosa*; ^f *Candida albicans*; ^g vyjadřuje míru toxicity vůči eukaryotickým buňkám

biální aktivita není ovlivněna přítomností solí a iontů ve fyziologických koncentracích a že peptid zabraňuje tvorbě bakteriálních biofilmů⁴⁹. LL-III si svoji aktivitu zachoval i po kovalentní imobilizaci přes polyethylenglykolové raménko na silikonový povrch nosiče; zdá se tedy být vhodným kandidátem na antimikrobiální úpravu povrchů tělních implantátů a různých kloubních náhrad náchylných pro tvorbu bakteriálního biofilmu⁴⁹.

V jedu této ploskočelky jsme kromě lasioglossinů objevili i cyklický AMP složený z 27 aminokyselin a dvou disulfidových můstků spojených v pořadí Cys8-Cys25 a Cys17-Cys27 (obr. 3). Toto pořadí jsme zjistili stanovením molekulové hmotnosti peptidových fragmentů izolovaných RP-HPLC po předchozím štěpení přírodního peptidu trypsinem. Peptid jsme pojmenovali lasiocepsin⁵⁰ a pro další studie ho připravili metodou syntézy na pevné fázi s využitím regioselektivního chránění čtyř cysteinových můstků, zajišťující tvorbu disulfidových můstků ve správném pořadí. Zároveň jsme syntetizovali analogy s jedním disulfidovým můstkem (zbývající dva cysteiny byly nahrazeny alaninem), lineární analog (všechny cysteiny byly nahrazeny alaninem) a dva analogy s nesprávným propojením můstků. Antimikrobiální aktivita analogů byla těmito zásahy do struktury molekuly dramaticky snížena. To dokazuje, že disulfidové můstky, a to ve správném pořadí, hrají podstatnou úlohu pro zachování terciární struktury lasiocepsinu, která je potřebná pro zachování jeho biologické aktivity⁵⁰. Terciární strukturu lasiocepsinu jsme stanovili⁵¹ dvojdimensionální NMR ve vodném prostředí (obr. 3). Je pro ni charakteristická přítomnost dvou α -helikálních úseků, z nichž první (Arg4-Lys13) je dvakrát delší než úsek druhý (Pro20-Val24). Disulfidový můstek Cys8-Cys25 spojuje střed prvního helixu s C-koncem dru-

hého helixu. C-koncová oblast je stabilizována dalším disulfidovým můstkem mezi C-koncovým Cys27 a Cys17 situovaným uprostřed smyčky, která odděluje oba helixy. Pro lasiocepsin je charakteristický velký počet bazických aminokyselin (8 \times Lys a 1 \times Arg), které vytvářejí dvě kladně nabitě oblasti na povrchu molekuly: Arg4 a Lys5 a druhou větší oblast obsahující zbývajících 7 lysinů. Tyto pozitivně nabitě oblasti zaujímají téměř 53 % celkového povrchu molekuly a jsou důvodem značné preference peptidu pro membrány tvořené anionickými fosfolipidy včetně kardiolipinu. To jsme zjistili studiem interakcí lasiocepsinu s uměle vytvořenými modely membrán⁵¹. Antimikrobiální účinek lasiocepsinu na *Bacillus subtilis* jsme sledovali pomocí transmisního elektronového mikroskopu⁵⁰. Pozorovali jsme rozrušení povrchové struktury bakterií *B. subtilis*, a to především na pólech buněk, kudy unikaly vnitrobuněčné komponenty (obr. 4a). Právě v těchto pólech bakteriální membrána obsahuje zvýšenou koncentraci výrazně anionického kardiolipinu.

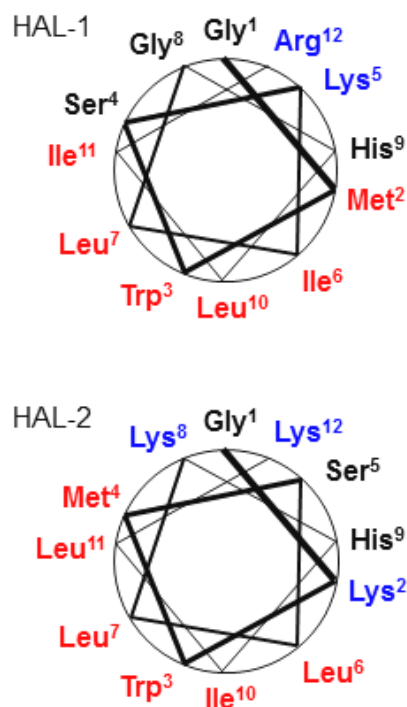
Značnou pozornost jsme věnovali strukturně aktivnímu studiu dvou peptidů izolovaných z jedu eusociální ploskočelky šestipásé (*Halictus sexcinctus*, čel. Halictidae) pojmenovaných halictiny (HAL-1, HAL-2) (tab. I). Halictiny⁵² jsou lineární α -helikální dvanáctipeptidy, které vytvářejí dokonalou amfipatickou strukturu. Po vložení jejich sekvence do Edmunsonovy projekce je totiž patrné rozložení všech hydrofobních aminokyselin po jedné straně helixu a hydrofilních aminokyselin včetně bazických aminokyselin (Arg, Lys) na opačné straně helixu (obr. 5). Oba halictiny vykazovaly značnou aktivitu vůči Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím, ale zároveň měly i mírnou hemolytickou aktivitu. Syntetizovali jsme rozsáhlou řadu analogů ve snaze snížit jejich hemolytickou akti-



Obr. 4. Baktericidní účinek antimikrobiálního peptidu lesiocepsinu (A) a jedním z analogů PNG-1 (B) na Gram pozitivní bakterii *Bacillus subtilis* sledovaný transmisí elektronovou mikroskopií po 60min působení. Měřitko představuje 1 μm

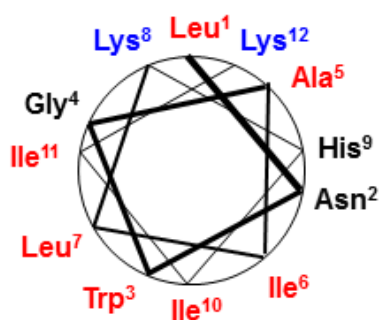
vítu při zachování aktivity antimikrobiální, popř. docílit i jejího navýšení vůči patogenním bakteriím. Toho mělo být dosaženo empirickou výměnou stávajících aminokyselin v sekvenci jinými aminokyselinami. Tyto výměny směřovaly k ovlivnění celkového náboje peptidu, hydrofobicity, α -helicity a amfipaticity. Je třeba poznamenat, že záměna jakékoliv aminokyseliny za jinou, směřující ke změně jednoho z těchto fyzikálně chemických parametrů, zároveň více či méně ovlivní parametry zbývající. Obecně je známo, že zvýšení kladného náboje doprovází zvýšení antimikrobiální aktivity, zvýšení hydrofobicity a helicity přispívá spíše ke zvýšení hemolytické aktivity. Helikální struktura je nutná k vytvoření amfipatického uspořádání. Je tedy zřejmé, že pouze správnou kombinací těchto parametrů lze získat analog s optimální biologickou aktivitou. V případě halictinů to byly analogy se zvýšeným kladným nábojem, ve kterých vybrané aminokyseliny v sekvenci byly zaměněny lysinem⁵².

Z včely pískohrabky ostruhaté (*Panurgus calcaratus*, čel. Andrenidae) jsme izolovali tři AMP pojmenované panurginy⁵³. Panurgin-1 (PNG-1) je dvanáctipeptid, který je svojí sekvencí, sekundární strukturou i biologickou aktivitou podobný halictinům (tab. I). PNG-1 však v Edmunsonově projekci nevykazuje úplně optimální amfipatické uspořádání (obr. 6). Ze série připravených analo-



Obr. 5. Amfipatické α -helikální struktury halictinů HAL-1 a HAL-2 izolované z jedu volně žijící včely ploškočelky šesti-pásé (*Halictus sexcinctus*) zobrazené Edmunsonovou kruhovou projekcí. Hydrofilní aminokyseliny (černě) včetně kladně nabitých lysinů a argininu (modře) jsou umístěny na jedné straně α -helixu, zatímco hydrofobní aminokyseliny (červeně) jsou na jeho opačné straně

gů měly, podobně jako v případě halictinů, zlepšenou biologickou aktivitu analogy se zvýšeným kladným nábojem, a to pouze ty, u nichž byla výměna za lysin provedena v hydrofilní části amfipatického helixu (obr. 6). Pokud byla náhrada za lysin provedena v hydrofobní části helixu, antimikrobiální aktivita dramaticky poklesla, a to v důsledku snížené amfipaticity peptidu. Další dva panurginy (PNG-K a PNG-R) jsou cyklické peptidy o 25 aminokyselinách mající dva disulfidové můstky v pořadí Cys8-Cys23 a Cys11-Cys19. Oba peptidy mají téměř stejnou sekvenci s výjimkou jedné aminokyseliny v poloze 14, a to Lys (PNG-K) a Arg (PNG-R) (tab. I). I když tyto dva peptidy mají výrazný kladný náboj i určitou podobu s lasiocepsinem, byly účinné pouze proti citlivým bakteriím, jako jsou *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*. PNG-1 včetně jeho analogů i PNG-K(R) narušovaly membrány umělé vytvořených vezikulů. K tomuto studiu byly použity velké unilamelární vezikuly, připravené kombinací záporně nabitých fosfolipidů, jako je diolelylfosfatidylglycerol (DOPG) a kardiolipin (CL), a ze zwitteriontových fosfolipidů, jako je diolelylfosfatidylcholin (DOPC) či diolelylfosfatidylethanolamin (DOPE). Záporně nabitě vezikuly napodobují



Obr. 6. Amfipatická α -helikální struktura PNG-1 izolovaného z jedu volně žijící včely pískohrabky ostruhaté (*Panurgus calcaratus*) zobrazená Edmundsonovou kruhovou projekcí

membrány bakterií, zatímco vezikuly konstruované pouze z zwitteriontového DOPC simulují membránu erytrocytů. Rozsah narušení těchto membrán byl sledován měřením uvolněné fluorescenční barvy calceinu cíleně zakomponované dovnitř vezikulů. Zatímco PNG-1 způsoboval uvolnění calceinu z obou typů vezikulů s preferencí pro záporně nabitě vezikuly, PNG-K(R) působily aktivně pouze na záporně nabitě vezikuly. Výsledky těchto měření odpovídají zanedbatelné hemolytické aktivitě PNG-K(R) a značně vyšší hemolytické aktivitě PNG-1 a jeho analogů. Jeden ze studovaných analogů PNG-1 byl zvolen ke sledování antimikrobiálního účinku proti bakterii *Bacillus subtilis* transmisním elektronovým mikroskopem⁵³. V tomto případě bylo pozorováno odpadnutí flagel, podélné zúžení válcovitého tvaru bakterie doprovázené nabobtnáním obou polů bakteriální obálky s následným vyplavením vnitřního obsahu (obr. 4b).

V případě strukturálně aktivní studie peptidu macropinu⁵⁴, izolovaného z jedu solitérní včely olejnice žlutonohé (*Macropis fulvipes*, čel. Melittidae), jsme zkoumali vliv inkorporace D-aminokyseliny na změnu jeho sekundární struktury a následnou změnu biologické aktivity⁵⁵. V tomto α -helikálním třináctipeptidu (tab. I) byla postupně každá L-aminokyselina v sekvenci nahrazena odpovídající aminokyselinou v D-konfiguraci. Připravili jsme 11 analogů a pomocí metody CD sledovali jejich schopnost vytvářet α -helikální strukturu v přítomnosti trifluoroethanolu. Třídídimensionální strukturu vybraných analogů jsme určili měřením NMR v prostředí vodného trifluoroethanolu a SDS. Zjistili jsme, že proporce α -helikální struktury každého analogu byla závislá na pozici D-aminokyseliny v sekvenci, a tato postupně klesala s pozicí D-aminokyseliny ve směru od N-konce k C-konci⁵⁵. Snížená míra α -helikální struktury se projevila poklesem hemolytické aktivity analogů, ale nepříznivě též snížením jejich antimikrobiální aktivity. Pouze analog mající D-Phe v pozici 2 si zachoval biologickou aktivitu odpovídající přírodnímu macropinu. Z jeho třídídimensionální struktury určené NMR byla patrná hydrofobní interakce mezi methylenovou sku-

pinou postranního řetězce D-Phe a methylovou skupinou Ala3, která měla zvýšený stabilizační efekt na α -helikální konformaci celého analogu, a tím na zachování jeho biologické aktivity. Krom toho se inkorporace D-Phe do předposlední pozice peptidu příznivě projevila na stabilitě peptidu v krevním séru. MAC-1 a některé jeho analogy vykazovaly i silnou aktivitu proti patogenní kvasině *Candida albicans*, a to i včetně těch s nízkou antimikrobiální aktivitou⁵⁵. Zvýšenou antimikrobiální aktivitu proti patogenní *P. aeruginosa* vykazovaly dva analogy s výměnou Gly v pozici 3 buď za L-Lys nebo D-Lys, tedy v důsledku navýšení kladného náboje peptidu.

4. Předpoklady pro využití AMP v praxi

Pro využití AMP v praxi jsou žádoucí široké spektrum aktivity, selektivní toxicita vůči mikrobům, minimální vedlejší účinky a minimální riziko vyvolání bakteriální rezistence, což jsou naštěstí vlastnosti odpovídající jejich přirozené funkci. Všeobecně známý problém stability peptidů, vyplývající z jejich citlivosti vůči proteolytickému štěpení, může být překonán syntézou vhodně navrženého analogu. Principiální překážkou se ale zdá být výrobní cena, která může být podstatně vyšší než výrobní cena tradičních antibiotik. Proto se farmaceutické firmy zatím orientují spíše na komercializaci kratších AMP, jako byl Pexiganan (22 aminokyselin, analog magaininu izolovaného z žabí kůže), nebo analogy indolicidinu (13 aminokyselin, z krve skotu) či histatinu (12 aminokyselin, ze slin člověka) (cit.¹⁶).

Výsledky naší práce uvedené v tomto přehledném článku byly podpořeny grantem GA ČR 203/08/0536 a vědeckým projektem RVO 61388963 Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

LITERATURA

1. Fleming A.: Br. J. Exp. Pathol. 10, 226 (1929).
2. Wang G., Li X., Wang Z.: Nucleic Acids Res. 37, D933-D937 (2009).
3. Otvos L.: J. Pept. Sci. 6, 497 (2000).
4. Doležilková I., Macková M., Macek T.: Chem. Listy 105, 346 (2011).
5. Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. F.: Cent. Eur. J. Biol. 2, 1 (2007).
6. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.-L., Hoffmann D.: Dev. Comp. Immunol. 23, 329 (1999).
7. Hoffmann J. A., Hetru C.: Immunol. Today 13, 411 (1992).
8. Bulet P., Stöcklin R.: Protein Pept. Lett. 12, 3 (2005).
9. Schneider J. J., Unholzer A., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H. C.: J. Mol. Med. 83, 587 (2005).
10. Cornet B., Bonmatin J.-M., Hetru C., Hoffmann J. A.,

- Ptak M., Vovelle F.: *Structure* 3, 435 (1995).
11. Matsuyama K., Natori S.: *J. Biol. Chem.* 263, 17112 (1988).
 12. Lambert J., Keppi E., Dimarcq J.-L., Wicker C., Reichhart J.-M., Dunbar B., Lepage P., Van Dorselaer A., Hoffmann J., Forthergill J., Hoffmann D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 262 (1989).
 13. Hultmark D., Steiner H., Rasmusson T., Boman H. G.: *Eur. J. Biochem.* 106, 7 (1980).
 14. Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H., Lee J. Y., Lidholm D. A.: *Eur. J. Biochem.* 201, 23 (1991).
 15. Conciancich S., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. A.: *Parasitol. Today* 10, 132 (1994).
 16. Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B.: *Chem. Listy* 103, 460 (2009).
 17. Čerovský V., Žďárek J., Fučík V., Monincová L., Voburka Z., Bém R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 455 (2010).
 18. El Shazely B., Veverka V., Fučík V., Voburka Z., Žďárek J., Čerovský V.: *J. Med. Entomol.* 50, 571 (2013).
 19. Sherman R. A., Hall M. J. R., Thomas S.: *Annu. Rev. Entomol.* 45, 55 (2000).
 20. Čerovský V.: *Vesmír* 90, 266 (2011).
 21. Andersen A. S., Sandvang D., Schnorr K. M., Kruse T., Neve S., Joergensen B., Karlsmark T., Krogfelt K. A.: *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1646 (2010).
 22. Nygaard M. K. E., Andersen A. S., Kristensen H.-H., Krogfelt K. A., Fojan P., Wimmer R.: *J. Biomol. NMR* 52, 277 (2012).
 23. Čerovský V., Slaninová J., Fučík V., Monincová L., Bednářová L., Maloň P., Štokrová J.: *ChemBioChem* 12, 1352 (2011).
 24. Žďárek J.: *Hmyzí rodiny a státy*. Academia, Praha 2013.
 25. Kuhn-Nentwig L.: *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2651 (2003).
 26. Habermann E.: *Science* 177, 314 (1972).
 27. Hisada M., Satake H., Masuda K., Aoyama M., Murata K., Shinada T., Iwashita T., Ohfuné Y., Nakajima T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1048 (2005).
 28. Patočka J.: *Vesmír* 83, 392 (2004).
 29. Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C.: *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1942 (1979).
 30. Nakajima T., Uzu S., Wakamatsu K., Saito K., Miyazawa T., Yasuhara T., Tsukamoto Y., Fujino M.: *Biopolymers* 25, 115 (1986).
 31. Čerovský V., Slaninová J., Fučík V., Hulačová H., Borovičková L., Ježek R., Bednářová L.: *Peptides* 29, 992 (2008).
 32. Konno K., Hisada M., Naoki H., Itagaki Y., Kawai N., Miwa A., Yasuhara T., Morimoto Y., Nakata Y.: *Toxicon* 38, 1505 (2000).
 33. Konno K., Hisada M., Fontana R., Lorenzi C. C. B., Naoki H., Itagaki Y., Miwa A., Kawai N., Nakata Y., Yasuhara T., Neto J. R., de Azevedo W. F. Jr., Palma M. S., Nakajima T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1550, 70 (2001).
 34. Konno K., Rangel M., Oliveira J. S., dos Santos Cabrera M. P., Fontana R., Hirata I. Y., Hide I., Nakata Y., Mori K., Kawano M., Fuchino H., Sekita S., Neto J. R.: *Peptides* 28, 2320 (2007).
 35. Orivel J., Redeker V., Le Caer J.-P., Krier F., Revol-Junelles A.-M., Longeon A., Chaffotte A., Dejean A., Rossier J.: *J. Biol. Chem.* 276, 17823 (2001).
 36. Zelezetsky I., Pag U., Antcheva N., Sahl A.-G., Tossi A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 358 (2005).
 37. Inagaki H., Akagi M., Imai H. T., Taylor R. W., Wiese M. D., Davies N. W., Kubo T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 411 (2008).
 38. Rifflet A., Gavalda S., Téné N., Orivel J., Leprince J., Guilhaudis L., Génin E., Vétillard A., Treilhou M.: *Peptides* 38, 363 (2012).
 39. Argiolas A., Pisano J. J.: *J. Biol. Chem.* 260, 1437 (1985).
 40. Favreau P., Menin L., Michalet S., Perret F., Cheneval O., Stöcklin M., Bulet P., Stöcklin R.: *Toxicon* 47, 676 (2006).
 41. Choo Y. M., Lee K. S., Yoon H. J., Je Y. H., Lee S. W., Sohn H. D., Jin B. R.: *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 156, 168 (2010).
 42. Ježek R., Janechová D., Cvačka J., Slaninová J., Voburka Z., Hovorka O., Fučík V., Borovičková L., Maloň P., Čerovský V.: *Collection Symposium Series 11, 51* (2009) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague 2009.
 43. Habermann E., Jentsch J.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 37 (1967).
 44. Fennell J. F., Shipman W. H., Cole L. J.: *Exp. Biol. Med.* 127, 707 (1968).
 45. Čerovský V., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Bednářová L., Borovičková L., Slaninová J., Fučík V.: *ChemBioChem* 9, 2815 (2008).
 46. Čerovský V., Buděšínský M., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Slaninová J., Borovičková L., Fučík V., Bednářová L., Votruba I., Straka J.: *ChemBioChem* 10, 2089 (2009).
 47. Slaninová J., Putnová H., Borovičková L., Šácha P., Čerovský V., Monincová L., Fučík V.: *Cent. Eur. J. Biol.* 6, 150 (2011).
 48. Slaninová J., Mlsová V., Kroupová H., Alán L., Tůmová T., Monincová L., Borovičková L., Fučík V., Čerovský V.: *Peptides* 33, 18 (2012).
 49. Mishra B., Basu A., Saravanan R., Xiang L., Yang L. K., Leong S. S. J.: *RSC Adv.* 3, 9534 (2013).
 50. Monincová L., Slaninová J., Fučík V., Hovorka O., Voburka Z., Bednářová L., Maloň P., Štokrová J., Čerovský V.: *Amino Acids* 43, 751 (2012).
 51. Monincová L., Buděšínský M., Čujová S., Čerovský V., Veverka V.: *ChemBioChem* 15, 301 (2014).
 52. Monincová L., Buděšínský M., Slaninová J., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Straka J., Čerovský V.: *Amino Acids* 39, 763 (2010).

53. Čujová S., Slaninová J., Monincová L., Fučík V., Bednářová L., Štokrová J., Hovorka O., Voburka Z., Straka J., Čeřovský V.: *Amino Acids* 45, 143 (2013).
54. Monincová L., Slaninová J., Voburka Z., Hovorka O., Fučík V., Borovičková L., Bednářová L., Buděšínský M., Straka J., Čeřovský V.: *Collection Symposium Series 11, 77* (2009) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague 2009.
55. Monincová L., Veverka V., Slaninová J., Buděšínský M., Fučík V., Bednářová L., Straka J., Čeřovský V.: *J. Pept. Sci.*, v redakčním řízení.

V. Čeřovský (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Antimicrobial Peptides Isolated from Insects**

Antimicrobial peptides (AMP) which kill microbes by a fundamentally different mechanism of action than do traditional antibiotics are a new category of compounds capable of fighting resistant pathogens. The cationic AMP isolated from insects comprise a significant group among those 2000 peptides already registered in The Antimicrobial Peptide Database. The novel AMP include lucifensins – the insect defensins isolated from medicinal larvae of flies which are routinely used in maggot therapy and AMP ranking among α -helical amphipathic peptides isolated from the venom of stinging hymenopterans. The AMP isolated from the venom show strong antimicrobial activities and low or moderate toxicity to eukaryotic cells. Systematic structure modification of these naturally occurring AMP resulted in their analogs with enhanced antimicrobial activities.