

Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja novo identificiranog peptida iz trakavice *Mesocestoides corti*

Cvitanović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:148558>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Cvitanović

**Antimikrobna aktivnost i mehanizam
djelovanja novo identificiranog peptida iz
trakavice *Mesocestoides corti***

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Cvitanović

**Antimicrobial activity and the mode of
action of the peptide newly-identified in the
flatworm *Mesocestoides corti***

Master Thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Tomislava Rončevića, te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravka Pavokovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvala

Prije svega, iskreno zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Tomislavu Rončeviću na prilici koju mi je pružio da sudjelujem u ovom istraživanju. Zahvalna sam za sva stečena iskustva i znanja pod Vašim vodstvom. Hvala Vam što ste vjerovali u mene i moj samostalni rad u laboratoriju. Posebno sam zahvalna na Vašem razumijevanju, strpljenju i spremnosti da uvijek pomognete, bilo stručnim savjetom ili osobnim razgovorom, izdvajajući svoje dragocjeno vrijeme za mene i moja pitanja. Suradnja s Vama, bila je uvijek puna smijeha, ali i ozbiljnosti kada je to bilo potrebno. Hvala Vam na svemu!

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Luciji Krce na svim vrijednim savjetima i prenesenom znanju iz područja mikroskopije atomskih sila. Hvala što ste uvijek bili spremni pomoći!

Najljepše hvala komentoru izv. prof. dr. sc. Dubravku Pavokoviću na vrijednim smjernicama koje su u ključnom trenutku doprinijele poboljšanju rada. Zahvaljujem na Vašoj pristupačnosti i prilagodljivosti.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i vjeri u mene, a ponajviše tati koji je moje brige shvaćao kao svoje te kroz njih ponovno proživio svoje studentske dane.

Hvala mojim divnim prijateljicama Paoli, Emi i Marini koje sam upoznala na studiju, ali i onima koje znam od djetinjstva Luciji, Bruni, Gabi i Marijani. Uvijek ste bile pune podrške kada su u pitanju moji uspjesi, ali i spremne saslušati sve poteškoće na putu koji ne bi bio isti bez vas.

Za kraj, hvala mom predivnom momku Luki koji je bio moja podrška kroz svih pet godina studiranja pa tako i poticaj i motivacija da ostvarim sve što volim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Antimikrobna aktivnost i mehanizam djelovanja novo identificiranog peptida iz trakavice *Mesocestoides corti*

Ana Cvitanović

Ravnice 48, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rastuća otpornost bakterija na postojeće antibiotike predstavlja globalni problem posljednjih desetljeća. Antimikrobni peptidi ističu se kao potencijalno rješenje zahvaljujući potentnom antimikrobnom djelovanju i multimodalnom mehanizmu djelovanja na koji bakterije teško pronalaze odgovor. Posebnu pozornost privukli su antimikrobni peptidi koje parazitski crvi luče kao dio svog urođenog imunološkog sustava na koji se oslanjaju u obrani od mikroorganizama prisutnih u okolišu domaćina kojeg nastanjuju. U sklopu ovog istraživanja, analizom genoma trakavice *Mesocestoides corti* identificiran je peptid mesco-2, koji je odabran za sintezu i daljnje istraživanje na temelju provedene bioinformatičke analize. Ispitana je sekundarna struktura ovog peptida u izotropnim i anizotropnim uvjetima te njegova antimikrobna aktivnost prema gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, kao i njegov mehanizam djelovanja. Rezultati su pokazali da peptid mesco-2 ima širok spektar antimikrobnog djelovanja, čime se otvara mogućnost njegove buduće kliničke primjene.

Ključne riječi: antimikrobni peptidi, bakterijska rezistencija, parazitski crvi

(44 stranice, 21 slika, 2 tablice, 57 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: Doc. dr. sc. Tomislav Rončević

Komentor: Izv. prof. dr. sc. Dubravko Pavoković

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Dubravko Pavoković

Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

Rad prihvaćen: 05.12.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Antimicrobial activity and the mode of action of the peptide newly-identified in the flatworm *Mesocestoides corti*

Ana Cvitanović

Ravnice 48, 10000 Zagreb, Croatia

The growing resistance of bacteria to existing antibiotics has become a global problem in recent decades. Antimicrobial peptides stand out as a potential solution due to their potent antimicrobial activity and multimodal mode of action making it difficult for bacteria to elicit resistance. Special attention has been drawn to antimicrobial peptides secreted by helminths as part of their innate immune system, which they rely on to defend against microorganisms present in the host environment they inhabit. In this study, a peptide named mesco-2 was identified through genomic analysis of the tapeworm *Mesocestoides corti* and selected for synthesis and further investigation based on bioinformatic analysis. The secondary structure of this peptide was examined under isotropic and anisotropic conditions, along with its antimicrobial activity against gram-negative and gram-positive bacteria, as well as its mechanism of action. The results showed that mesco-2 has a broad spectrum of antimicrobial activity, suggesting its potential for future clinical application.

Keywords: antimicrobial peptides, bacterial resistance, helminths
(44 pages, 21 figures, 2 tables, 57 references, original in Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assist. Prof. Tomislav Rončević, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Dubravko Pavoković, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Dubravko Pavoković, PhD

Assoc. Prof. Tomislav Ivanković, PhD

Assoc. Prof. Nenad Malenica, PhD

Thesis accepted: 05.12.2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Antimikrobni peptidi.....	2
1.2. Struktura antimikrobnih peptida.....	2
1.3. Biofizikalna obilježja AMP-a.....	4
1.4. Mehanizmi djelovanja AMP-a	5
1.5. Nedostaci antimikrobnih peptida	7
1.6. Peptidi parazitskih crva	8
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Identifikacija peptida.....	11
3.2. Sinteza peptida	12
3.3. Priprema liposoma.....	12
3.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma	13
3.5. Antimikrobna aktivnost.....	13
3.5.1. MIK eksperiment.....	14
3.5.2. MBK eksperiment	16
3.5.3. Kinetika rasta bakterija.....	17
3.6. Mikroskopija atomskih sila	17
3.7. Fluorescentna mikroskopija	20
4. REZULTATI	21
4.1. Identifikacija i analiza mesco-2 peptida.....	21
4.2. CD spektri sekundarne strukture mesco-2 peptida u različitim uvjetima	22
4.3. Antimikrobna aktivnost.....	25
4.4. Mehanizam djelovanja mesco-2 peptida	28
4.4.1. Mjerenje učinka mesco-2 na površinu stanica <i>E. coli</i> DH5 α metodom AFM.....	28
4.4.2. Vijabilnost stanica <i>E. coli</i> DH5 α mjerena fluorescentnim bojama nakon tretmana s mesco-2	29
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČAK	35
7. LITERATURA	36

Korištene kratice

AFM - mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*)

AIDS - sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*)

AMP - antimikrobni peptidi (engl. *antimicrobial peptides*)

CD - cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism*)

HDP - obrambeni peptidi domaćina (engl. *host defense peptides*)

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

MBK - minimalna baktericidna koncentracija (engl. *minimum bactericidal concentration*)

MHA - Mueller-Hinton agar (engl. *Mueller-Hinton agar*)

MHB - Mueller Hinton tekući medij (engl. *Mueller Hinton broth*)

MIK - minimalna inhibitorna koncentracija (engl. *minimum inhibitory concentration*)

OD₆₀₀ - optička gustoća uzorka izmjerena na 600 nm (engl. *optical density of a sample measured at a wavelength of 600 nm*)

PBS - standardni fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

PI - propidij jodid (engl. *propidium iodide*)

QI - kvantitativni slikovni režim (engl. *quantitative imaging*)

QSAR - kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (engl. *quantitative structure-activity relationship*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SPPS - sinteza peptida u krutoj fazi (engl. *solid state peptide synthesis*)

ST - strobilirana faza odraslog crva (engl. *strobilated adult worm stage*)

SUV - male unilamelarne vezikule (engl. *small unilamellar vesicles*)

TFA - trifluoroctena kiselina (engl. *trifluoroacetic acid*)

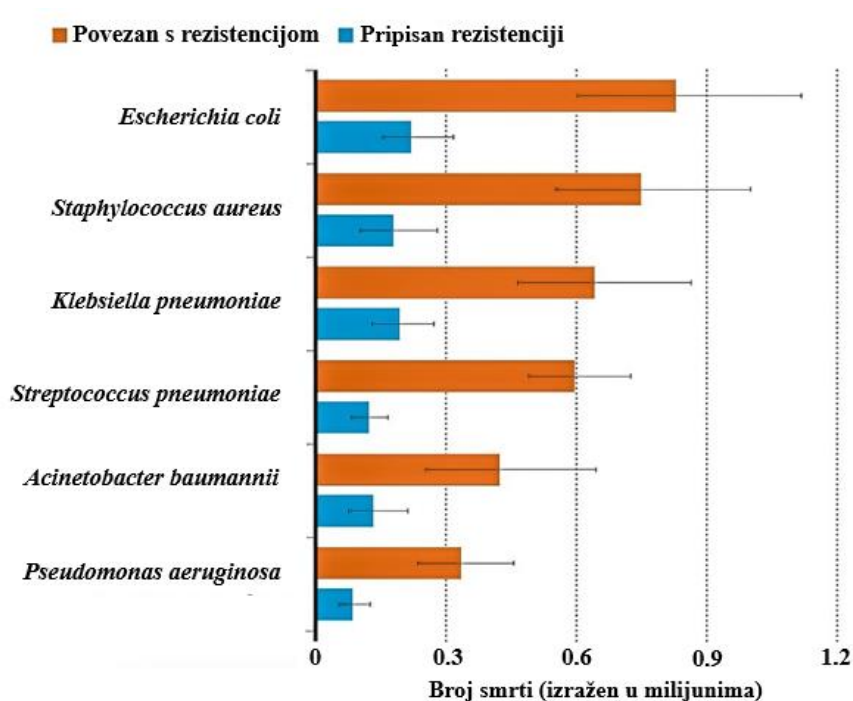
TFE - trifluoroetanol (engl. *trifluoroethanol*)

TPM - transkripti na milijun (engl. *transcripts per million*)

TT - larvalna faza (engl. *tetrathyridium stage*)

1. UVOD

Usljed brzorastuće bakterijske rezistencije na antibiotike u posljednjih nekoliko desetljeća, potrebno je pronaći djelotvorna sredstva s alternativnim načinom djelovanja naspram multirezistentnih bakterija koje dovode do velikog broja smrti diljem svijeta svake godine (Rončević i sur., 2019a). Rezistencija bakterija predstavlja globalni problem. Procjenjuje se da je u 2019. godini 4,95 milijuna smrtnih slučajeva diljem svijeta bilo povezano s bakterijskom rezistencijom, od čega je 1,27 milijuna izravna posljedica rezistencije (Slika 1). Upravo te godine je zabilježeno više smrti koje su posljedica bakterijske rezistencije nego HIV-a/AIDS-a i malarije (Thompson, 2022).



Slika 1. Rezistentne bakterije odgovorne za velik broj smrti u 2019. godini (Preuzeto i prilagođeno iz Thompson, 2022).

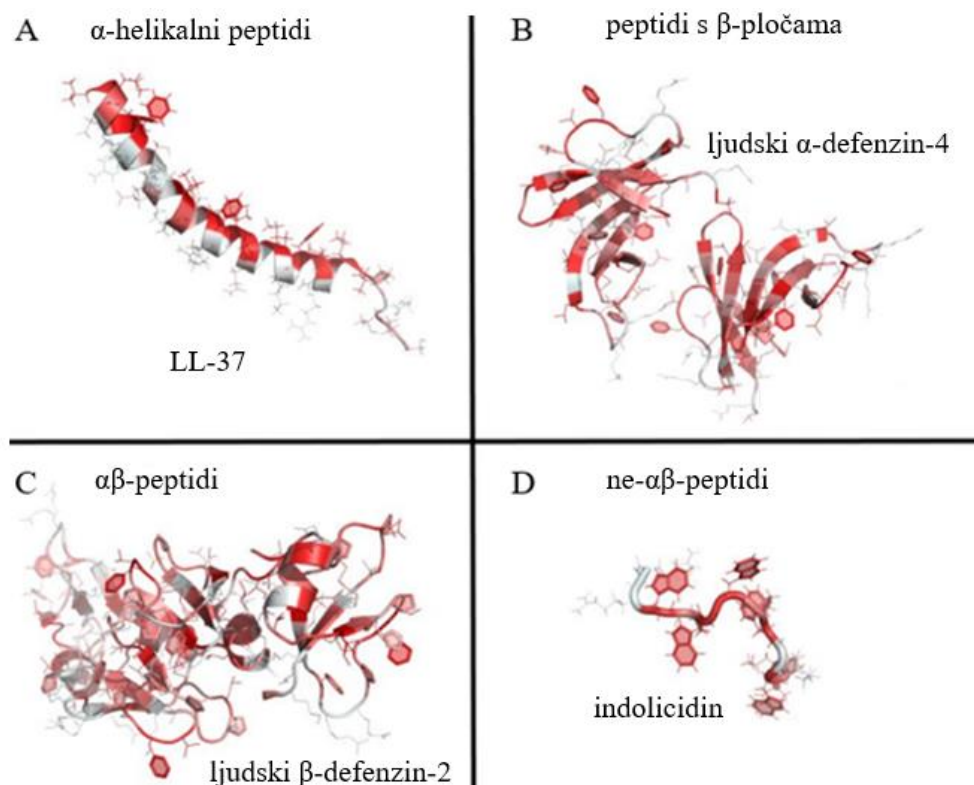
Neki od potencijalnih alternativa klasičnim antibioticima za rješavanje ovog problema su aktivni spojevi biljnog podrijetla, bakteriofagi, nanočestice, te antimikrobni peptidi (Silva i Fernandes, 2010; Bahar i Ren, 2013; Golkar i sur., 2014; Liu i sur., 2019).

1.1. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi (engl. *antimicrobial peptides*, AMP) ili obrambeni peptidi domaćina (engl. *host defense peptides*, HDP) predstavljaju multifunkcionalne molekule kodirane genima (Mladineo i sur., 2023), a pronađene su u gotovo svim organizmima, bili oni prokariotski ili eukariotski (Kumar i sur., 2018). Smatraju se sastavnim dijelom urođenog imunološkog sustava (Moravej i sur., 2018), te predstavljaju prvu liniju obrane domaćina zbog čega su i poznati kao HDP-i (Le i sur., 2017). Dosad je otkriveno mnoštvo AMP-a koji su pokazali direktnu antimikrobnu aktivnost prema gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, ali i prema virusima i gljivicama (Mladineo i sur., 2023). Uz to, većina regulira upalne procese u tijelu, a osim toga posjeduju i antitumorska svojstva (Moravej i sur., 2018). Antimikrobni peptidi su najčešće sintetizirani ribosomskom biosintezom (Xuan i sur., 2023), te grupirani na istom kromosomskom lokusu (Lai i Gallo, 2009). Često su eksprimirani kao neaktivni prekursori, odnosno sadrže signalni peptid i propeptid. Zreli peptid se proteolitički oslobađa od propeptida kada se prenese na mjesto infekcije i tada postaje aktivan. Osim ribosomskom biosintezom, AMP-i se mogu sintetizirati i neribosomskom biosintezom uz djelovanje neribosomskih peptidnih sintetaza (Xuan i sur., 2023) čiji su geni obično organizirani u operone u bakterija ili genske klastere u eukariota. Za neribosomske peptide karakteristična je ciklička ili razgranata struktura te postranslacijske modifikacije poput halogenacije, hidroksilacije, acetilacije, glikozilacije i dodatak N-metilne ili N-formilne grupe (Moravej i sur., 2018).

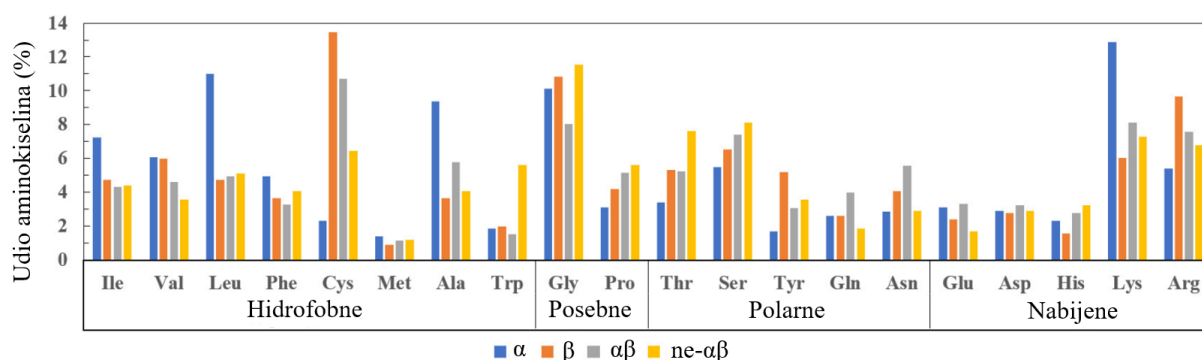
1.2. Struktura antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi su podijeljeni u nekoliko kategorija prema njihovoj sekundarnoj strukturi. Prema Wangu (2017) su razvrstani u 4 skupine (Slika 2): α -helikalni, peptidi s β -pločama, $\alpha\beta$ -te ne- $\alpha\beta$ -peptidi.



Slika 2. Podjela antimikrobnih peptida prema sekundarnoj strukturi. A) LL-37 kao primjer α -helikalnog peptida, B) ljudski α -defenzin-4 kao primjer peptida s β -pločama, C) ljudski β -defenzin-2 kao primjer $\alpha\beta$ -peptida i D) indolicidin kao primjer ne- $\alpha\beta$ -peptida. (Preuzeto i prilagođeno iz Rončević i sur., 2019a).

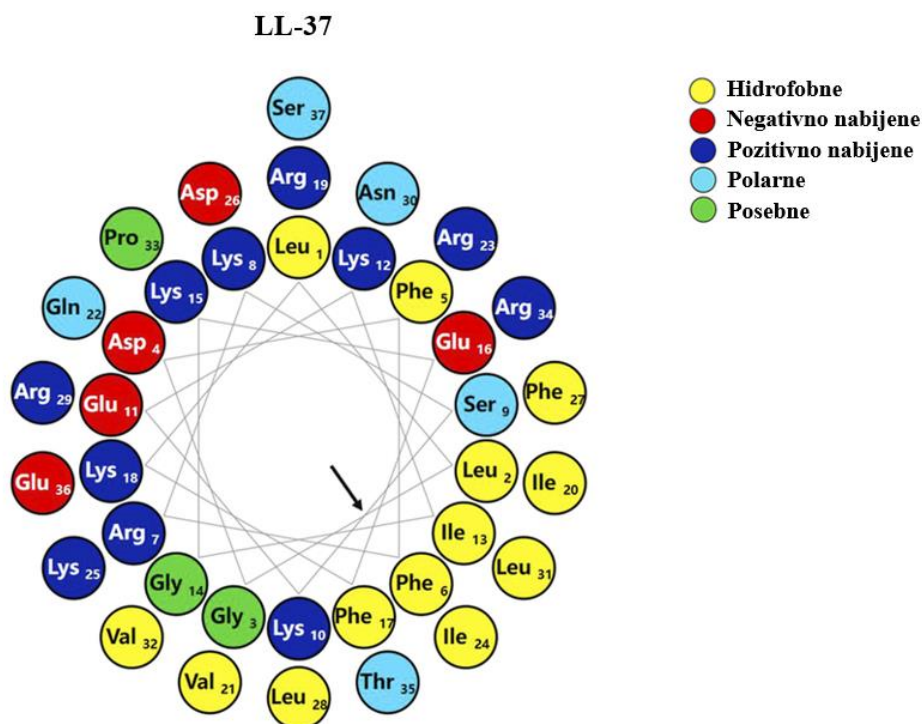
Mnogo čimbenika može utjecati na strukturiranje peptida, poput sastava aminokiselina (Slika 3), stvaranja slanih mostova, amidacije na C-terminalnom kraju koja rezultira stvaranjem dodatne vodikove veze koja stabilizira heliks, te interakcija između hidrofobnih ostataka s acilnim lancima fosfolipida u membranskom dvosloju (Tossi i sur., 2000). Lizin, leucin i alanin doprinose stabilizaciji heliksa, što može objasniti visok udio ovih aminokiselina u α -peptidima. β -peptidi su bogati cisteinima koji tvore disulfidne veze čime doprinose stabilizaciji strukture peptida. Ne- $\alpha\beta$ -peptidi ne formiraju jasno definirane sekundarne strukture, te su bogati triptofanom. Triptofan ima važnu ulogu u stvaranju vodikovih veza s molekulama vode i kolinskim grupama fosfolipida u dvosloju. Sve 4 skupine peptida sadrže visok udio glicina, što upućuje na njegovu važnost u antimikrobnoj funkciji peptida (Yan i sur., 2022).



Slika 3. Sastav aminokiselina 4 skupine AMP-a podijeljenih na temelju sekundarne strukture (Preuzeto i prilagođeno iz Yan i sur., 2022).

1.3. Biofizikalna obilježja AMP-a

Veličina antimikrobnih peptida varira, ali najčešće su dugi do 50 aminokiselina (Brogden, 2005). Duljina peptidne sekvence ima veliku važnost, budući da je za formiranje amfipatske strukture potrebno najmanje 7-8 aminokiselina (Slika 4). Raspored hidrofobnih i polarnih aminokiselina u amfipatskoj strukturi igra ključnu ulogu u aktivnosti peptida. Hidrofobni aminokiselinski ostaci amfipatske molekule ulaze u membranski dvosloj, što predstavlja ključan korak u aktivnosti peptida koji dovodi do narušavanja aktivnosti bakterijske membrane (Rončević i sur., 2019a). AMP-i najčešće sadrže približno 50% hidrofobnih ostataka (Tossi i sur., 2000), a povećanje ili smanjenje ovog postotka izvan optimalnog raspona može rezultirati smanjenjem antimikrobne aktivnosti i/ili povećanom toksičnošću prema stanicama domaćina (Rosenfeld i sur., 2010).



Slika 4. Prikaz helikalnog kotača LL-37 koji prikazuje njegovu amfipatsku prirodu. Različite skupine aminokiselina su označene različitim bojama, dok strelica ukazuje na hidrofobnu površinu peptida (Preuzeto i prilagođeno iz Lu i sur., 2022).

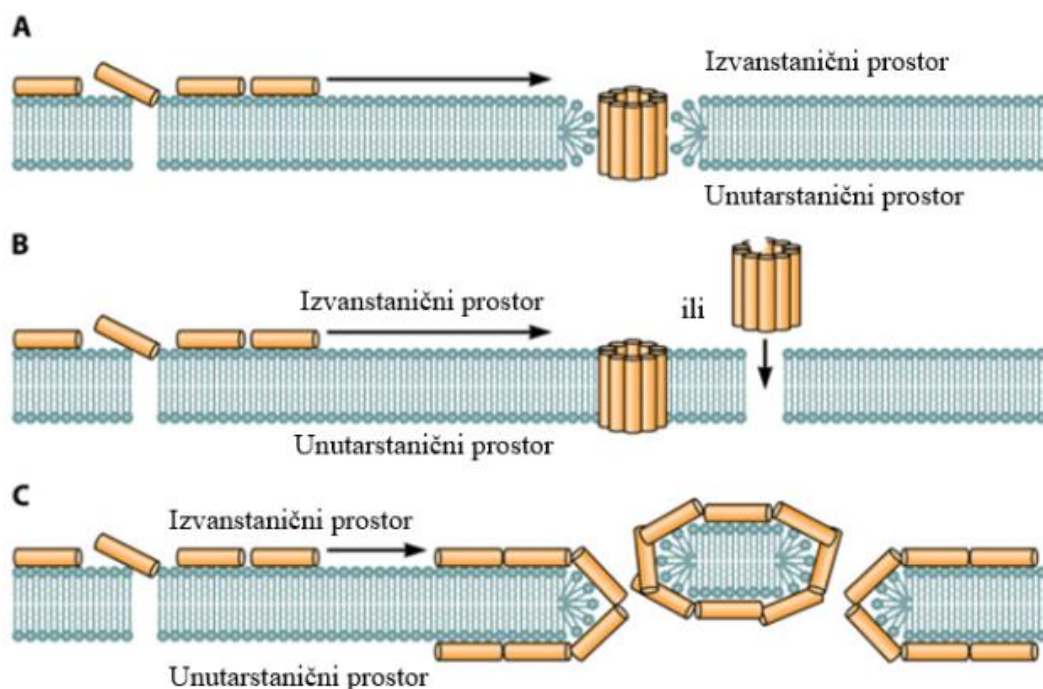
Prirodni peptidi posjeduju naboj koji se kreće od -6 do +16, no među do sada identificiranim peptidima najčešći su oni kationski s nabojem +6. Takvi peptidi relativno lako ostvaruju početnu interakciju s negativno nabijenim vanjskim dijelom bakterijske membrane. Slično kao i kod aminokiselinskog sastava, odstupanja izvan optimalnog raspona naboja dovode do smanjenja antimikrobne aktivnosti i povećane toksičnosti prema stanicama domaćina (Rončević i sur., 2019a).

1.4. Mehanizmi djelovanja AMP-a

S obzirom na postojanje velike raznolikosti među antimikrobnim peptidima, predloženo je više mehanizama njihovog djelovanja. Njihova aktivnost može obuhvaćati jedan ili više mehanizama, ovisno o koncentraciji peptida, uvjetima okoliša, fazi rasta i građi bakterijske membrane (Rončević i sur., 2019a). Danas razlikujemo dvije kategorije peptida s obzirom na mehanizam njihova djelovanja: litičke (membranski aktivne) i nelitičke AMP-e.

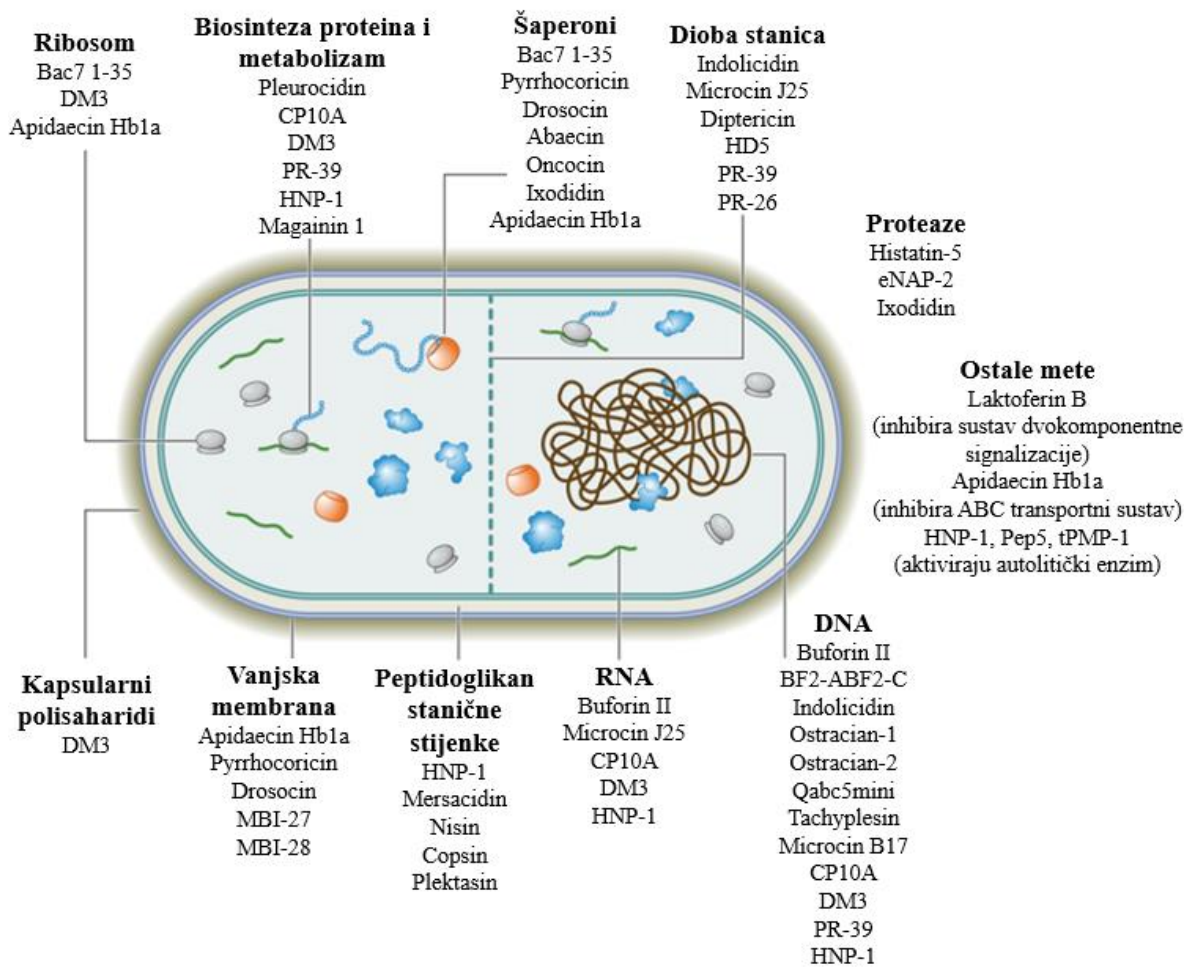
Membranski aktivni AMP-i stupaju u početnu interakciju s membranom putem elektrostatskog privlačenja između kationskih aminokiselina i negativno nabijenih lipida bakterijske membrane (Kumar i sur., 2018). U tom kontekstu, lizin i arginin su pokazali snažnu interakciju s fosfatnim grupama u lipidnom dvosloju. Nakon što AMP-i dosegnu određenu koncentraciju na membrani započinje njihova multimerizacija (Lee i sur., 2015), a zatim slijedi jedan od tri opisana litička mehanizma djelovanja:

1. Model toroidalne pore (Slika 5a), u kojem dolazi do kaskadne agregacije monomera peptida, koji se ugrađuju okomito u lipidni dvosloj s hidrofobnim regijama okrenutim prema acilnim lancima, što uzrokuje uvijanje lipidnih skupina prema unutra (Le i sur., 2017).
2. Bačva-motka model (Slika 5b), u kojem su antimikrobni peptidi paralelni s fosfolipidnim molekulama membrane te nalikuju motkama. U lipidni dvosloj se ugrađuju okomito, hidrofobnim regijama okrenuti prema dvosloju, a hidrofилnim prema unutrašnjosti bačvaste pore.
3. Model tepiha (Slika 5c), gdje nakupljanje peptida na površini membrane, orijentiranim hidrofobnim regijama prema membrani (Bahar i Ren, 2013), izaziva lokalne slabosti, te se lipidni dvosloj razgrađuje na jedinice obložene peptidima (Le i sur., 2017).



Slika 5. Litički mehanizmi djelovanja AMP-a. A) Model toroidalne pore, B) Bačva-motka model, C) Model tepiha (Preuzeto i prilagođeno iz Le i sur., 2017).

Nelitički AMP-i ne dovode do narušavanja integriteta membrane, već djeluju ciljajući i ometajući unutarstanične ili izvanstanične procese (Slika 6) poput biosinteze peptidoglikana i proteina, stanične diobe, replikacije DNK i RNK, transkripcije te smatanja proteina (Le i sur., 2017). Neki AMP-i uzrokuju povećanje propusnosti membrane čak u koncentracijama manjima od njihovih MIK (engl. *minimum inhibitory concentration*) vrijednosti (Bahar i Ren, 2013) te ulaze u stanicu direktnom translokacijom ili procesom endocitoze (Luo i Song, 2021).



Slika 6. Mete nelitičkih mehanizama djelovanja navedenih primjera AMP-a (Preuzeto i prilagođeno iz Bahar i Ren, 2013).

1.5. Nedostaci antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi, iako predstavljaju obećavajuću alternativu antibioticima, nisu još ušli u kasnije faze kliničkih istraživanja prvenstveno zbog relativno visoke toksičnosti prema stanicama domaćina i njihove nestabilnosti *in vivo* (Rončević i sur., 2019a). Oralna primjena AMP-a dovodi do njihove proteolitičke razgradnje probavnim enzimima, stoga su klinička

istraživanja često ograničena na topikalnu primjenu AMP-a. Ovaj problem se danas pokušava premostiti kemijskim modifikacijama peptida i korištenjem vezikula za ciljanu dostavu AMP-a. Kemijska modifikacija AMP-a jedna je od najčešćih metoda za poboljšanje njihove aktivnosti, ali može biti poprilično skupa. Primjerice, upotreba D-aminokiselina u AMP-ima sprječava njihovu proteolizu i smanjuje toksičnost prema stanicama domaćina, dok istovremeno zadržavaju antimikrobnu aktivnost iako potencijalno u smanjenom obujmu (Kumar i sur., 2018; Matsuzaki, 2009). Druga metoda je korištenje sustava za dostavu AMP-a koja omogućuje kontrolu otpuštanja tih molekula na ciljano mjesto. AMP-i se mogu kovalentno vezati za različite organske ili anorganske sustave dostave ili nekovalentno inkapsulirati surfaktantima (Nordström i Malmsten, 2017).

Također, jedan od načina zaobilaznja gore navedenih problema je *in silico* dizajn AMP-a, utemeljen na razvoju molekularnih deskriptora koji kvantificiraju biofizikalna obilježja i strukturu AMP-a. Ovi deskriptori koriste se u izradi modela QSAR (engl. *quantitative structure-activity relationship*) koji omogućuju povezivanje strukturnih obilježja AMP-a s biološkim aktivnostima, poput antimikrobnog djelovanja i selektivnosti prema ciljanim patogenima. Metodom QSAR, koristeći bazu podataka poznatih molekula s već izmjerenim aktivnostima, moguće je predvidjeti sekvence s poželjnim svojstvima, kao što su povećana antimikrobna učinkovitost, bolja otpornost na proteolitičku razgradnju te smanjena toksičnost prema ljudskim stanicama. Ovaj pristup omogućuje dizajn umjetnih AMP-a na učinkovit i povoljan način, pri čemu se štedi vrijeme i sredstva. Usprkos tome, metoda može biti poprilično složena zbog potrebe za opsežnom bazom podataka postojećih AMP-a (Fjell i sur., 2012).

1.6. Peptidi parazitskih crva

Parazitski crvi su beskralježnjaci koji se dijele u oblice i plošnjake (metilji i trakavice) (Castro, 1996). Životni ciklus im je složen, a uključuje jednog ili više posrednih domaćina tijekom juvenilnog stadija te konačnog domaćina (McKay i sur., 2017). Prilikom infekcije, najčešće nastanjuju lumen crijeva domaćina (Castro, 1996). Odnos između parazitskih crva, domaćina i mikrobiote domaćina nije dovoljno istražen (Irvine i sur., 2023). Parazitski crvi se za opstanak u okruženju s obiljem mikroorganizama oslanjaju na urođeni imunološki sustav. Nije potpuno razjašnjeno iz kojeg razloga bakterije prisutne u okolišu nemaju nepovoljan utjecaj na parazitske crve, ali pretpostavlja se da bitnu ulogu u tome imaju AMP-i koje oni luče kako bi se obranili od patogena (Yeshi i sur., 2022). Primjer takvih AMP-a su anisaksini, koji su

pokazali snažnu antimikrobnu aktivnost i visoku selektivnost prema bakterijskim membranama (Rončević i sur., 2022). Njihova toksičnost na stanice domaćina pokazala se zanemarivom, s vrijednostima letalne koncentracije značajno višim od koncentracija potrebnih za baktericidno djelovanje. Niska citotoksičnost ovih peptida potencijalno se objašnjava time što su se paraziti kroz evoluciju prilagodili tako da smanje štetne učinke na domaćina, što je ključno za njihovo preživljavanje i reprodukciju. Generalno gledajući, zbog sposobnosti parazitskih crva da se prilagode različitim nišama tijekom životnog ciklusa te potencijalno snažnim upalnim imunološkim odgovorima domaćina, dolazi do razvoja molekularne raznolikosti njihovih AMP-a. Oni moduliraju imunološki odgovor domaćina, što ih čini izuzetno vrijednim molekulama za razvoj novih generacija antibiotika s dodatnim protuupalnim učincima (Mladineo i sur., 2023).

U ovom istraživanju detaljno je proučen peptid mesco-2 identificiran u vrsti *Mesocestoides corti* koja inficira male životinje poput miševa i žaba kao posredne domaćine, dok konačne domaćine predstavljaju mačke, psi, lisice, ali može doći i do slučajne infekcije ljudi (Adolph i Peregrine, 2021).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Ispitati antimikrobnu aktivnost novo identificiranog peptida mesco-2 iz trakavice *Mesocestoides corti* naspram gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija.
2. Odrediti sekundarnu strukturu mesco-2 u različitim okolišnim uvjetima.
3. Odrediti potencijalni mehanizam djelovanja peptida naspram bakterije *Escherichia coli* kao modelnom organizmu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Identifikacija peptida

Referentni genom *Mesocestoides corti* (verzija M_corti_Specht_Voge_0011_upd) preuzet je 11. travnja 2023. iz baze podataka WormBase (Harris, 2004). Generirane proteinske sekvence su analizirane korištenjem skripte razvijene na Odjelu za životne znanosti Sveučilišta u Trstu, a daljnju analizu u svrhu identificiranja onih s potencijalnim antimikrobnim svojstvima proveo je izv. prof. dr. sc. Marco Gerdol. Odabrani su proteini kompatibilne duljine s prekursorima AMP-a (<200 aminokiselina) koji imaju signal za sekreciju (detektiran pomoću SignalP v.6.0; Petersen i sur., 2011) i nemaju transmembranske domene (detektirane pomoću TMHMM v.2.0; Sonnhammer i sur., 1998). U daljnjoj analizi peptidi su sortirani prema tome imaju li visok pozitivni naboj ($pI > 10$). Nakon toga su ručno pregledane i odbačene sekvence s visokim postotkom homologije s proteinima bez antimikrobne aktivnosti, što je određeno BLASTp (Altschul i sur., 1990) pretragama naspram UniprotKB (The UniProt Consortium, 2023), te one koje su sadržavale konzervirane domene za koje je poznato da nemaju antimikrobna svojstva (određeno pomoću InterProScan v.5). Dobivene sekvence su provjerene poravnanjem dostupnih podataka RNK sekvenciranja za *Mesocestoides corti* s referentnim genomom korištenjem alata za mapiranje čitanja s velikim prazninama koji se nalazi u sklopu *CLC Genomics Workbench v.24* (Qiagen, Hilden, Njemačka). Korišteni su podaci iz PRJNA433559 (Basika i sur., 2019), PRJEB2679 (Foth i sur., 2014), PRJNA950029 i PRJNA1039817 (Costábile i sur., 2024) *BioProjects*. Dodatno, za procjenu razine ekspresije gena kandidata AMP-a u dvije različite razvojne faze, larvalnoj (TT) i strobiliranoj fazi odraslog crva (ST), korišteni su podaci iz PRJNA433559 (Basika i sur., 2019). Razine ekspresije gena izražene su kao TPM vrijednosti (transkripti na milijun, engl. *transcripts per million*) (Wagner i sur., 2012), a analiza je provedena mapiranjem sekvenci na referentni genom (postavke parametara za duljinu i frakciju sličnosti bile su postavljene na 0,75 i 0,95) koristeći *CLC Genomics Workbench v.24* (Qiagen, Hilden, Germany). Ovo je postupak normalizacije koji omogućuje usporedbu ekspresije gena unutar uzorka. Za svakih 1 000 000 RNK molekula u RNK-seq uzorku određuje se koliko njih potječe iz određenog gena. Za svaki transkript unutar modela gena, broj mapiranih očitavanja dijeli se s duljinom transkripta, čime se dobiva normalizirani izraz na razini transkripta. Zatim se zbroj svih normaliziranih vrijednosti podijeli s 1 000 000 kako bi se izračunao faktor skaliranja. Normalizirani izraz svakog transkripta dijeli se faktorom

skaliranja, čime se dobiva TPM vrijednost pojedinog transkripta. Za svaki gen, TPM vrijednosti svih pripadajućih transkripta zbrajaju se kako bi se dobio ukupni TPM na razini gena.

3.2. Sinteza peptida

Peptid mesco-2 sintetiziran je od strane tvrtke GenicBio (Šangaj, Kina) koristeći SPPS (engl. *solid state peptide synthesis*). Čistoća peptida je utvrđena reverzno faznom HPLC analizom koristeći SinoChrom ODS-BP kolonu (C18, 5 μ m, 120 Å, 4,6 mm \times 250 mm), te je bila >95%. Kromatografsko razdvajanje provedeno je u gradijentu 25-50% acetonitrila s 0,1% trifluoroctene kiseline (engl. *trifluoroacetic acid*, TFA) u trajanju od 25 minuta pri brzini protoka od 1 mL/min. Masenom spektrometrijom potvrđena je sekvenca peptida, a potom pripremljena peptidna štok otopina preciznim otapanjem točno odmjerenih količina peptida u dvostruko destiliranoj vodi. Koncentracija peptida je potvrđena korištenjem ekstincijskih koeficijenata na 214 nm kao što su prethodno odredili Kuipers i Gruppen (2007).

3.3. Priprema liposoma

Liposomi su umjetne vezikule građene od dvosloja fosfolipida i jedan od najčešćih sustava za istraživanje interakcija između antimikrobnih peptida i membrana jer vjerno oponašaju membranski dvosloj živih stanica. S obzirom na veličinu dijele se na male, velike i gigantske unilamelarne vezikule (Rideau i sur., 2018).

U svrhu istraživanja, dr. sc. Andrea Caporale s Instituta za kristalografiju (CNR, Basovizza, Italija) pripremio je anionske i neutralne male unilamelarne vezikule (engl. *small unilamellar vesicles*, SUVs) otapanjem PG:dPG (L-alfa fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol u omjeru 95:5) i PC:SM:Ch (L-alfa fosfatidilkolin, sfingomijelin, kolesterol u omjeru 40:40:20) u kloroformu koji omogućuje jednoliko otapanje i miješanje lipidnih molekula, što rezultira formiranjem stabilnih lipidnih dvosloja (Axelsson i Gentili, 2014; Duong i sur., 2020). Kloroform je uklonjen isparavanjem uz pomoć struje dušika, čime zaostaje sloj lipida koji se potom liofilizira preko noći. Za rehidraciju uzorka korišten je fosfatni puffer (10 mM, pH 7,4) tijekom 1 sata i provedena je sonifikacija u trajanju 45 minuta. Ciklusima smrzavanja i odmrzavanja razbijene su multilamelarne vezikule u suspenziji te potom propuštene kroz mini ekstruder (Croda, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, SAD) što omogućuje formiranje unilamelarnih vezikula (Çağdaş i sur., 2014). Propuštanjem kroz polikarbonatne filtere s

porama od 0,1 μm , 0,4 μm i 1 μm , dobivene su vezikule čije su dimenzije provjerene dinamičkim raspršenjem svjetlosti (Zetasizer Nano, Malvern Panalytical, Malvern, UK), a male unilamelarne vezikule su potom korištene za titraciju peptida unutar 24 sata.

3.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja se često upotrebljava za analizu sekundarne strukture proteina, poput α -heliksa i β -ploča, te praćenja promjena u strukturi. Ovom metodom se mjeri razlika u apsorpciji lijevo i desno kružno polarizirane svjetlosti prilikom prolaska kroz uzorak. Različite sekundarne strukture imaju karakteristične spektralne profile pa je tako za α -helikalni peptid karakterističan negativni vrh na 208 i 222 nm (Miles i sur., 2021). Apsorbancija je opisana Beer-Lambertovim zakonom prema kojem ovisi o molarnim apsorpcijskim koeficijentima lijevog i desnog polariziranog svjetla (ϵ_L i ϵ_R), molarnoj koncentraciji peptida (c) i duljini puta svjetla kroz otopinu (l).

$$A = (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c \times l$$

Prolazak kružno polariziranog svjetla kroz kiralne molekule, poput aminokiselina (s iznimkom glicina), rezultira razlikom u apsorpciji. Rezultati se mogu kvantificirati kao eliptičnost (θ) koja se može izraziti kao $\theta = 32.98 \Delta A$, dok molarna eliptičnost iznosi $[\theta] = 3298 \Delta A$ (Kelly i Price, 2000).

Sekundarnu strukturu peptida mesco-2 odredio je dr. sc. Andrea Caporale s Instituta za kristalografiju (CNR, Basovizza, Italija) u ultraljubičastom području spektra (200-240 nm). CD spektri su dobiveni pomoću J-710 spektropolarimetra (Jasco, Tokio, Japan) kao prosječna vrijednost tri skeniranja napravljena s 20 μM mesco-2 u izotropnom i anizotropnim okolišima: a) u otopini standardnog fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), b) u 10 mM PBS-u s različitim koncentracijama (5-50%) trifluoroetanolu (engl. *trifluoroethanol*, TFE), c) u prisutnosti 10 mM natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) u PBS-u, d) u prisutnosti anionskih SUV-a u PBS-u i e) u prisutnosti neutralnih SUV-a u PBS-u. Neutralne i anionske SUV su predstavljale model za eukariotske i bakterijske membrane.

3.5. Antimikrobna aktivnost

Kako bi provjerila antimikrobni potencijal peptida mesco-2, provela sam dva *in vitro* testa kojima se mjerila bakteriostatska i baktericidna aktivnost. Testove sam provela na gram-

negativnim i gram-pozitivnim laboratorijskim sojevima pribavljenim od *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland, SAD). Riječ je o gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 te o gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i ATCC 25923. Također, testovi su provedeni i na bakteriji *Escherichia coli* DH5 α koja je kasnije korištena kao model za određivanje mehanizma djelovanja mesco-2 putem mikroskopa atomskih sila (vidi dolje). Navedene bakterije bile su pohranjene na -80 °C, a za potrebe istraživanja su revitalizirane i uzgojene na Mueller Hinton agaru (engl. *Mueller Hinton agar*, MHA) pri temperaturi od 37 °C.

3.5.1. MIK eksperiment

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) predstavlja najnižu koncentraciju AMP-a pri kojoj je inhibiran vidljiv rast bakterija.

U 10 mL Mueller Hinton tekućeg medija (engl. *Mueller Hinton broth*, MHB), sterilnom ezom sam inokulirala otprilike 2 bakterijske kolonije te inkubirala tijekom noći na 37 °C uz lagano treskanje (ES-20/80, Biosan SIA, Riga, Latvija). Sljedeći dan sam 500 μ L prekonoćne bakterijske kulture razrijedila u 4,5 mL MHB te inkubirala 1 - 1,5 sat na 37 °C uz lagano treskanje dok bakterije nisu postigle logaritamsku fazu rasta. Za to vrijeme u jažice od drugog do dvanaestog stupca (u redovima A-C i F-H) dodala sam 50 μ L MHB, a u jažice prvog stupca peptid mesco-2 u koncentraciji 64 μ M, čija je početna koncentracija iznosila 1,44 mM, u volumenu od 100 μ L prema sljedećem izračunu:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1 = 4,44 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{MHB}} = V_2 - V_1 = 95,56 \mu\text{L}$$

gdje je c_1 početna koncentracija peptida (1,44 mM), V_1 volumen peptida koji je potrebno dodati u jažicu, c_2 konačna koncentracija peptida u jažici (64 μ M), V_2 konačni volumen u jažici (100 μ L), a V_{MHB} volumen Mueller Hinton tekućeg medija kojeg je potrebno dodati u jažicu.

Zatim sam napravila dvostruko serijsko (mikro)razrijeđenje prebacivanjem 50 μ L suspenzije multikanalnom pipetom iz prvog stupca u drugi te resuspendirala i ponovljala taj proces

zaključno s jedanaestim stupcem. Pozitivna kontrola rasta bakterija, bila je u dvanaestom stupcu (Slika 7).

Prethodno sam metodom brojanja živih bakterijskih kolonija odredila koncentraciju bakterija (CFU/mL), pri poznatoj optičkoj gustoći izmjerenoj na 600 nm (OD_{600}), na sljedeće opisan način. Pripremila sam prekonoćnu bakterijsku kulturu te ju sljedeći dan razrijedila na već prethodno naveden način. Nakon inkubacije u trajanju 1 - 1,5 sat na 37 °C uz lagano treskanje, izmjerila sam optičku gustoću na 600 nm uz pomoć spektrofotometra (BioPhotometer D30, Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Nakon toga pripremila sam bakterijsku kulturu u šest različitih koncentracija u epruветama od 1,5 mL na način da sam u svaku epruветu dodala 900 μ L MHB, nakon čega sam nadodala 100 μ L bakterijske suspenzije u prvu epruветu, resuspendirala, te ponovila postupak s narednih pet epruветa. Inokulirala sam po 20 μ L svake koncentracije na tri MH agar ploče. Nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C, ručno sam izbrojala kolonije te srednju vrijednost tri brojanja pomnožila s 50 kako bi izračunala koncentraciju bakterija izraženu u CFU/mL.

Početnu koncentraciju bakterija u suspenziji potrebnu za MIK eksperiment odredila sam mjerenjem OD_{600} nakon završene inkubacije uz lagano treskanje, te sljedećim izračunom:

$$x = OD_{600(2)} \times c / OD_{600(1)}$$

gdje x predstavlja početnu koncentraciju bakterija u suspenziji, $OD_{600(2)}$ optičku gustoću izmjerenu u logaritamskoj fazi rasta bakterija u svrhu određivanja početne koncentracije bakterija u suspenziji, c koncentraciju bakterija dobivenu brojanjem živih bakterijskih kolonija (CFU/mL), a $OD_{600(1)}$ optičku gustoću izmjerenu prije provedenog brojanja živih bakterijskih kolonija.

Nakon izračunate početne koncentracije bakterija u suspenziji, izračunala sam volumen koji je potrebno dodati u Falcon epruветu kako bi u 10 mL bila željena konačna koncentracija za MIK eksperiment koja iznosi $1 \times 10^6 \frac{CFU}{mL}$:

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1$$

gdje c_1 označava početnu koncentraciju bakterija u suspenziji, c_2 konačnu koncentraciju bakterija ($1 \times 10^6 \frac{CFU}{mL}$), V_2 konačni volumen u Falcon epruветi (10 mL), a V_1 volumen bakterija u suspenziji potreban za razrjeđenje u MHB.

Konačno, u svaku jažicu od prvog do dvanaestog stupca (u redovima A-C i F-H) dodala sam 50 µL pripremljene bakterijske suspenzije što je za duplo smanjilo koncentracije peptida u jažicama, a koncentracija bakterija u svim jažicama iznosila je $5 \times 10^5 \frac{CFU}{mL}$. Pripremljenu mikrotitratrsku pločicu sa suspenzijom bakterija i peptida (Slika 7) sam stavila u inkubator preko noći (otprilike 18 – 20 sati) na 37°C. Sljedeći dan sam vizualno očitala rezultate.

Mikrotitratrska ploča	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola
B	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola
C	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola
D												
E												
F	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola
G	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola
H	32 µM	16 µM	8 µM	4 µM	2 µM	1 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,125 µM	0,0625 µM	0,03125 µM	Pozitivna kontrola

E. Coli
 ATCC
 25922

S. Aureus
 ATCC
 29213

Slika 7. Shematski prikaz jedne mikrotitratrske pločice za MIK eksperiment.

Odradila sam MIK eksperiment u triplikatima za svaku bakteriju i ponovila minimalno dva puta kako bi se osigurala pouzdanost i reproducibilnost rezultata. Rezultate sam prikazala kao konsenzusne vrijednosti.

3.5.2. MBK eksperiment

Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) predstavlja najnižu koncentraciju AMP-a pri kojoj 99,9% početnog bakterijskog inokuluma umire.

Kako bi odredila MBK, sterilnom ezom sam inokulirala 5 µL bakterijske suspenzije na MH agar, iz jažica mikrotitratrske ploče koje odgovaraju 1 × MIK, 2 × MIK i 4 × MIK. Suspenziju sam inkubirala 18 - 20 sati na 37 °C, a rezultate sam vizualno očitala sljedeći dan.

3.5.3. Kinetika rasta bakterija

Utjecaj različitih koncentracija mesco-2 na *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213 pratila sam testom kinetike rasta. Prekonoćnu kulturu i mikrotitarsku pločicu sam pripremila na isti način kao i za MIK eksperiment, no ukupan volumen u jažicama je iznosio 200 μL tj. volumen dodanog peptida, medija i bakterija je bio dvostruko veći. Također, u redove D i E u jedanaestom i dvanaestom stupcu nadodana je slijepa proba (MHB) (Slika 8). Pratila se promjena populacije bakterija kroz 12 sati na 37 °C uz periodično protresanje. Svakih 15 minuta na 600 nm valne duljine mjerena je optička gustoća odnosno zamućenje otopine koje korelira s brojem prisutnih mikroorganizama u jažici koristeći čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Infinite Pro 200, Männedorf, Švicarska). Dobiveni podaci su obrađeni tako da su izračunate prosječne vrijednosti OD₆₀₀ za pozitivne kontrole i za različite koncentracije peptida; 16 μM , 8 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,25 μM , 0,125 μM , 0,0625 μM i 0,03125 μM . Za izradu grafova u programu Excel korištene su izračunate prosječne vrijednosti OD₆₀₀ za svakih sat vremena tijekom 12 sati.

Test sam za obje bakterije napravila u triplikatima, a rezultate izrazila kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (S.D.).

Mikrotitarska ploča	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola
B	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola
C	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola
D												Slijepa proba
E												Slijepa proba
F	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola
G	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola
H	32 μM	16 μM	8 μM	4 μM	2 μM	1 μM	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM	0,0625 μM	0,03125 μM	Pozitivna kontrola

E. Coli
ATCC
25922

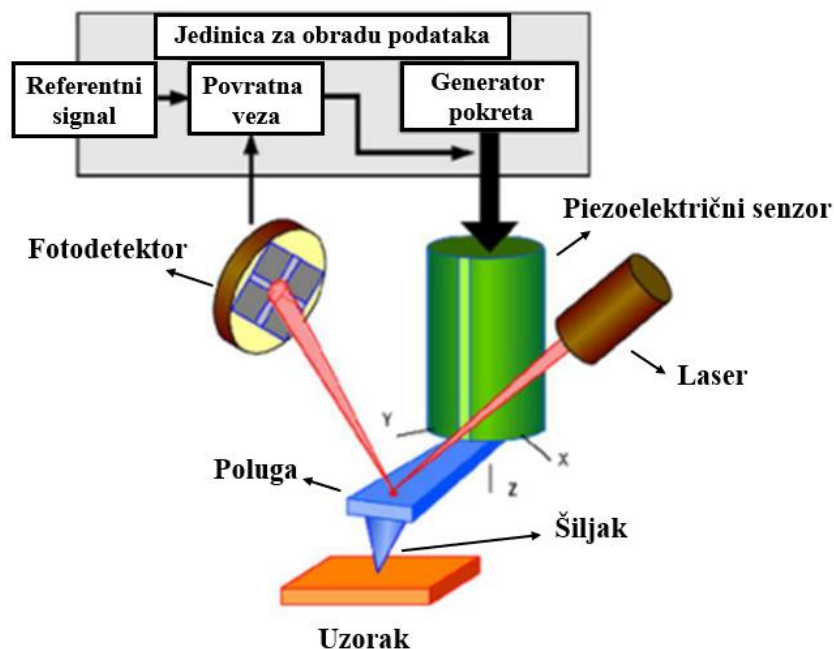
S. Aureus
ATCC
29213

Slika 8. Shematski prikaz mikrotitarske pločice za test kinetike rasta bakterija.

3.6. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) je metoda koja omogućava dobivanje topografije uzorka. Princip rada AFM-a (Slika 9) zasniva se na pomicanju vrha sonde (šiljka) po površini uzorka, što omogućava piezoelektrični senzor pretvorbom električne

energije u mehanički pokret, dok pretvornik sile (u ovom slučaju poluga) detektira silu između uzorka i vrha sonde. Poluga se savija pod utjecajem sile, što se detektira pomoću lasera koji se odbija od vrha poluge u fotodetektor koji prenosi dobiveni signal povratnoj vezi. Signal koji daje upute o smjeru i jačini sile između vrha sonde i uzorka, ovisi o tome u koji od 4 kvadranta fotodetektora će se laser reflektirati. Signal se dalje prenosi u generator pokreta koji upravlja piezoelektričnim senzorom prenoseći mu električni signal, čime se osigurava konstantna sila tijekom cijelog skeniranja. Ovisno o jačini i smjeru električnog signala, piezoelektrični senzor pokreće sondu u x, y ili z smjeru, omogućujući precizno pomicanje po površini uzorka. Praćenjem dobivenog električnog signala koji kontrolira pomicanje piezoelektričnog senzora u z smjeru (prema uzorku), mogu se dobiti podaci o visini uzorka (Eaton i West, 2010).



Slika 9. Princip rada AFM-a (Preuzeto i prilagođeno iz Rokov, 2023).

Razlikuje se nekoliko režima rada u mikroskopiji atomskih sila, no u ovom radu korišten je kvantitativni slikovni (engl. *quantitative imaging*, QI) režim kojim su prikupljeni podaci o uzorku odnosno njegovim površinskim svojstvima uz stvaranje slika visoke rezolucije. Osim toga, ovaj režim rada je pogodan za meke materijale poput stanica zbog mogućnosti kontrole parametara sile. Na taj način spriječena je deformacija i oštećenje uzorka (Rokov, 2023).

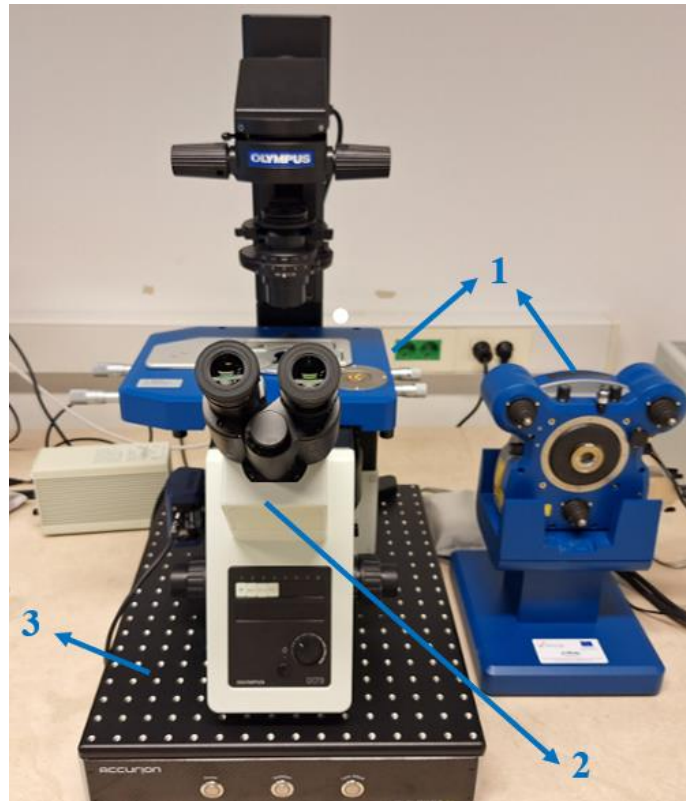
Sva AFM mjerenja su provedena u Mueller Hinton tekućem mediju na 25 °C, a pripremu uzorka sam provela kako slijedi. Pripremila sam prekonocnu kulturu *E. coli* DH5 α na isti način kao i za MIK eksperiment. Sljedeći dan sam 500 μ L prekonocne bakterijske kulture razrijedila u 7

mL MHB te inkubirala 1 - 1,5 sat na 37 °C uz lagano treskanje. Potom sam 50 µL pripremljene kulture inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi u Petrijevoj zdjelici (WPI, Sarasota, Florida, SAD) obloženoj Cell-Tak otopinom (Corning, Corning, New York, SAD) pripremljenoj kao što je opisano u Rončević i sur. (2018). Nakon perioda inkubacije određeni broj bakterija se adherirao za površinu Petrijeve zdjelice, a one koje nisu, ili su labavo adherirale, sam isprala nekoliko puta s 1 mL MHB. Imobilizirane stanice sam pratila oko 30 minuta pod svjetlosnim mikroskopom kako bi potvrdila da su žive tj. da se izdužuju i dijele, a potom sam ih opet isprala s MHB. Napravila sam AFM mjerenja netretiranih stanica s Nano-wizard IV sustavom (Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD) (Slika 10) u QI načinu rada koristeći MLCT-BIO-DC (E) sondu (Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD). Zatim sam stanice tretirala s mesco-2 u koncentraciji 4×MIK odnosno 2 µM. Početna koncentracija štok otopine peptida iznosila je 100 µM, a volumen koji je bilo potrebno dodati u 1 mL u Petrijevoj zdjelici izračunala sam prema sljedećoj formuli:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1 = 20 \mu\text{L}$$

Nakon dodatka 20 µL otopine peptida, pričekala sam 45 minuta da peptid difundira u stanice te tek onda započela s AFM mjerenjem. Parametre mjerenja sam postavila uz pomoć doc. dr. sc. Lucije Krce s Odjela za fiziku PMF-a u Splitu, kao i obradu dobivenih podataka mjerenja. Podaci su prikupljeni pri sili od 1 µN. Brzina produženja i povlačenje bila je do 130 µm/s, a Z-duljina do 3000 nm pri rezoluciji 128×128 piksela. Podaci su obrađeni uz pomoć JPK softvera, na način da su uklonjene neravnine kako bi se dobila ravna površina za lakšu analizu te su prošli kroz niskopropusni filter koji uklanja šum i omogućuje jasniji prikaz površine. Eksperiment sam ponovila tri puta kako bi se dobiveni rezultati potvrdili sa sigurnošću.



Slika 10. AFM uređaj korišten u ovom istraživanju. 1) tijelo AFM-a, 2) optički mikroskop, 3) antivibracijska podloga

3.7. Fluorescentna mikroskopija

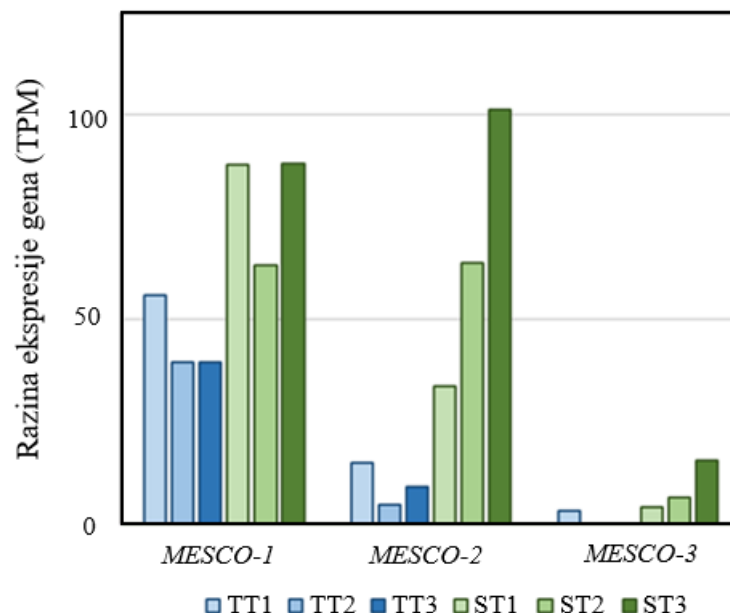
Fluorescentna mikroskopija je metoda kojom se mogu proučavati svojstva membrane. U ovom istraživanju imala je svrhu praćenja promjena u membranskoj propusnosti.

Stanicama *E. coli* DH5 α sam nakon približno 3 sata tretmana s mesco-2 medij zamijenila sa sterilnom fiziološkom otopinom. Potom sam ih obojala fluoroforima iz *LIVE/DEAD*TM *BacLight*TM *Bacterial Viability Kit*-a (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. Ovaj komplet sadrži zeleni fluorofor SYTO 9 koji boji sve stanice neovisno o stanju njihove membrane te crveni fluorofor propidij jodid (PI) koji ne prodire u zdrave, već oštećene stanice s narušenom membranom, nakon čega interkalira s nukleinskim kiselinama, što omogućava njihovo razlikovanje. Koristeći IX73 optički fluorescentni inverzni mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) snimila sam fluorescentne slike na zelenom i crvenom filteru, u zamračenoj prostoriji, pola sata nakon bojanja.

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija i analiza mesco-2 peptida

Identificirana su tri proteinska prekursora, kodirana genima MCU_005415, MCU_006988 i MCU_000972, koja su zadovoljavala prethodno postavljene kriterije. Geni MCU_005415 i MCU_006988 su bili kompletni, te bez introna. Suprotno tome, gen MCU_000972 je imao kratku neodređenu unutarnju sekvencu, stoga je cjelovita cDNK sekvenca rekonstruirana iz *de novo* sastavljenih podataka transkriptoma. Proteinske sekvence su nazvane mesco-1, -2 i -3. Ekspresija ova tri gena bila je veća u ST fazi (strobilarna faza odraslog crva), nego u TT fazi (larvalna faza) *Mesocostoides corti* (Slika 11).



Slika 11. Razina ekspresije *MESCO* gena u dvije razvojne faze *Mesocostoides corti*. Prikazana razina ekspresije gena temelji se na jednom biološkom uzorku, a rezultati tri nezavisna eksperimenta prikazani su zasebno. TPM - transkripti na milijun, TT - larvalna faza i ST - strobilarna faza odraslog crva.

Peptidi kodirani svim trima sekvencama imali su poželjna biofizikalna obilježja kao što su amfipatičnost i pozitivni naboj, no mesco-2 je odabran za kemijsku sintezu i analizu. Mesco-2 je peptid građen od 40 aminokiselina te je pozitivnog naboja (+11). Ima najmanju hidrofobnost, no unatoč tome mu je predviđen potencijal da formira helikalnu strukturu s najvećim

hidrofobnim momentom (Tablica 1), što bi moglo rezultirati boljom djelotvornosti i smanjenom toksičnošću (Rončević i sur., 2019a). Izračun hidrofobnosti i relativnog hidrofobnog momenta napravljen je koristeći CCS skalu (engl. *Combined Consensus Scale*) prema Tossiju (2002).

Tablica 1. Sekvence i biofizikalna obilježja mesco peptida.

Ime	Sekvenca	Neto naboj	H ^a	H ^{rel b}
mesco-1	WRRLRRRISGGLRRIFRKPRRICFPYCPTGPRYPGPRPY	+13	-0,475	0,071
mesco-2	FFRRIGRAFSRVGRGIGRGFRQLGRLMPRGNYKICLGRCP	+11	-0,232	0,106
mesco-3	FLRRIGRAFSRVGRGIGRGFRQLGRLMPRGNYRICLGRCPR	+12	-0,316	0,095

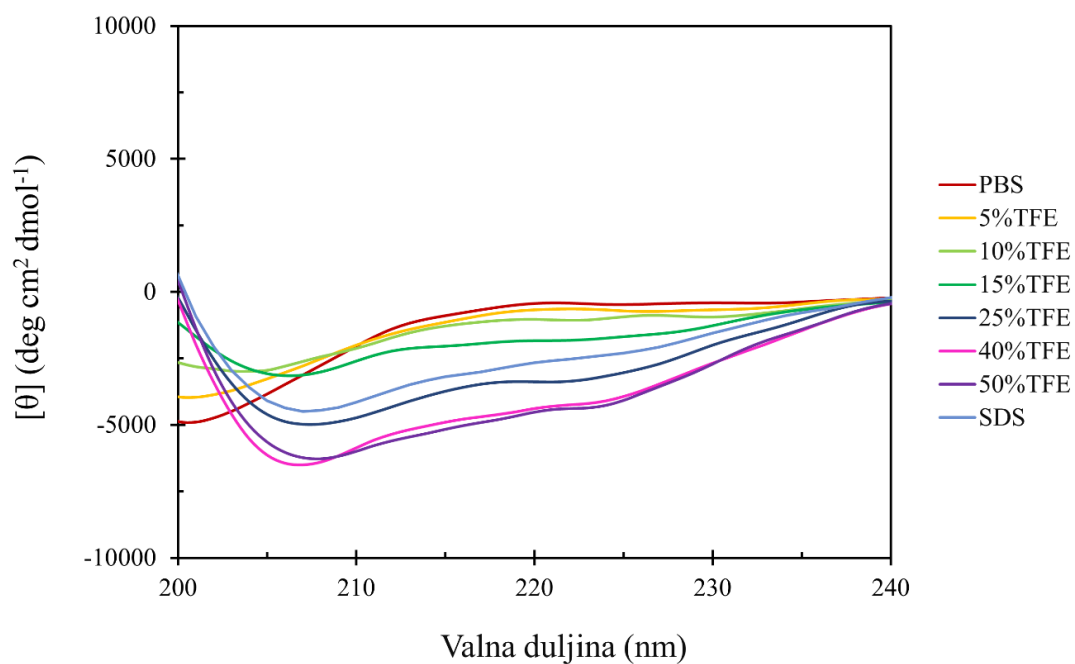
^aHidrofobnost

^bRelativni hidrofobni moment

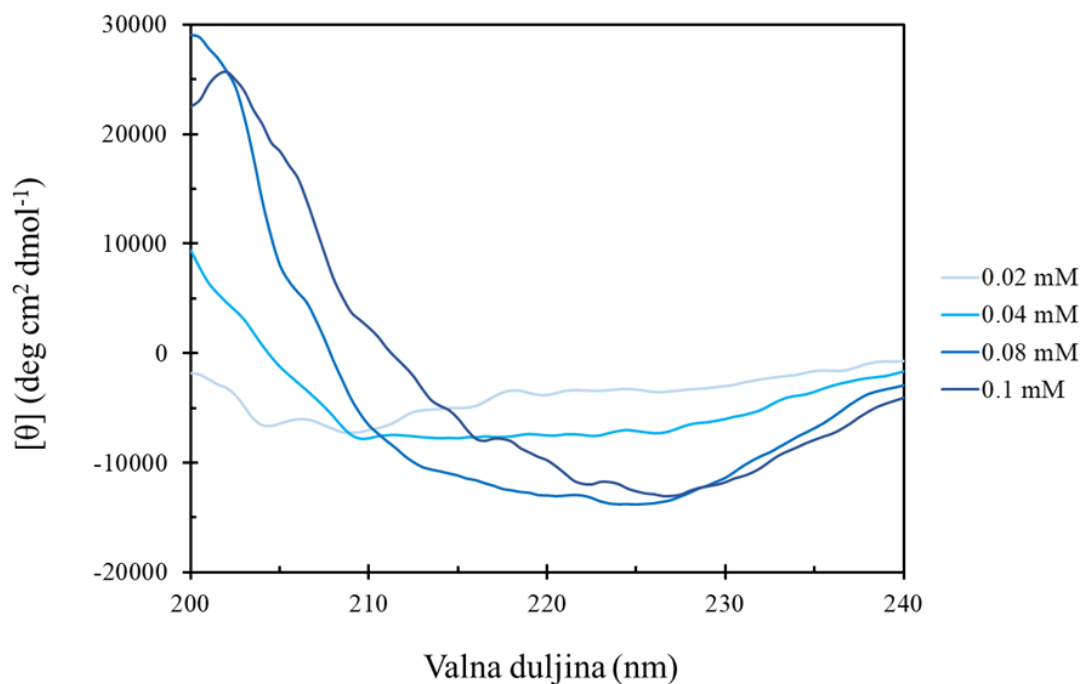
4.2. CD spektri sekundarne strukture mesco-2 peptida u različitim uvjetima

Spektroskopijom cirkularnog dikroizma procijenjena je sklonost peptida mesco-2 da formira sekundarne strukture u različitim izotropnim i anizotropnim uvjetima. U otopini standardnog fosfatnog pufera, peptid je bio neuređen, dok je pri višim koncentracijama TFE-a (25 - 50 %) formirao helikalnu strukturu što je vidljivo po dvama karakterističnim negativnim vrhovima na 208 nm i 222 nm (Slika 12). Slično tome, primijećena je i tendencija peptida da formira heliks u prisutnosti SDS micela koje oponašaju krajnje jednostavne membranske uvjete (Slika 12).

U prisustvu anionskih liposoma, uočeno je strukturiranje peptida, ali sasvim sigurno ne na način koji je karakterističan za α -heliks (Slika 13). Razlika u strukturi se potencijalno može objasniti slaganjem helikalnih segmenata u unutrašnjosti peptida (Wagschal i sur., 1999). Interakcija između peptida i anionskih liposoma koja dovodi do strukturiranja je očekivana s obzirom da mesco-2 ima visok pozitivni naboj.

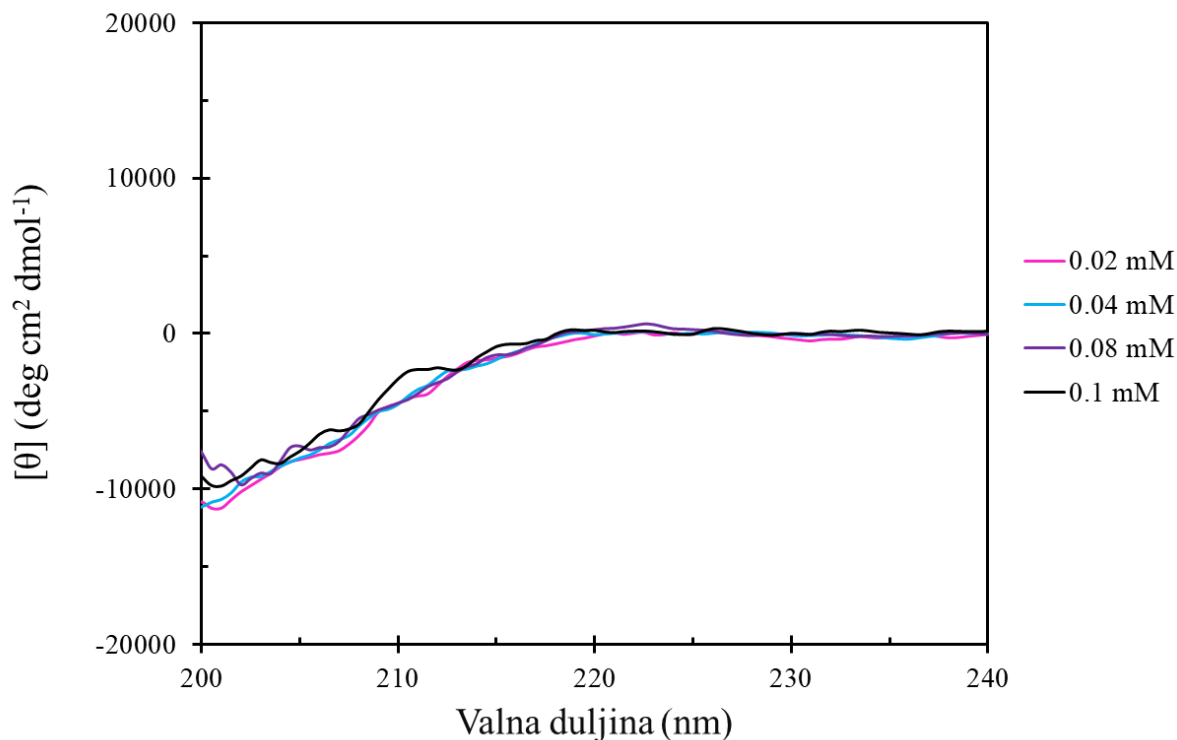


Slika 12. CD spektri mesco-2 u PBS-u, 10mM SDS-u u PBS-u i 5-50% TFE-u u PBS-u. Prikazane su prosječne vrijednosti tri mjerenja napravljena s peptidom pri 20 μ M koncentraciji, kao promjena molarne eliptičnosti ($[\theta]=3298\Delta A$, izražena u $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) u ovisnosti o valnoj duljini svjetlosti (nm), koja odražava sekundarnu strukturu peptida.



Slika 13. CD spektri mesco-2 u prisutnosti različitih koncentracija anionskih liposoma (PG:dPG; L-alfa fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol u omjeru 95:5). Prikazane su prosječne vrijednosti tri mjerenja napravljena s peptidom pri 20 μM koncentraciji, kao promjena molarne eliptičnosti ($[\theta]=3298\Delta A$, izražena u $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) u ovisnosti o valnoj duljini svjetlosti (nm), koja odražava sekundarnu strukturu peptida.

U prisustvu neutralnih liposoma nije primijećena promjena u strukturi mesco-2 što je vidljivo iz CD spektra koji je jako sličan onome u prisutvu fosfatnog pufera (Slika 14). Sve opaženo sugerira na slab afinitet mesco-2 prema eukariotskim membranama neutralnog naboja.



Slika 14. CD spektri mesco-2 u prisutnosti različitih koncentracija neutralnih liposoma (PC:SM:Ch; L-alfa fosfatidilkolin, sfingomijelin, kolesterol u omjeru 40:40:20). Prikazane su prosječne vrijednosti tri mjerenja napravljena s peptidom pri 20 μM koncentraciji, kao promjena molarne eliptičnosti ($[\theta]=3298\Delta A$, izražena u $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) u ovisnosti o valnoj duljini svjetlosti (nm), koja odražava sekundarnu strukturu peptida.

4.3. Antimikrobna aktivnost

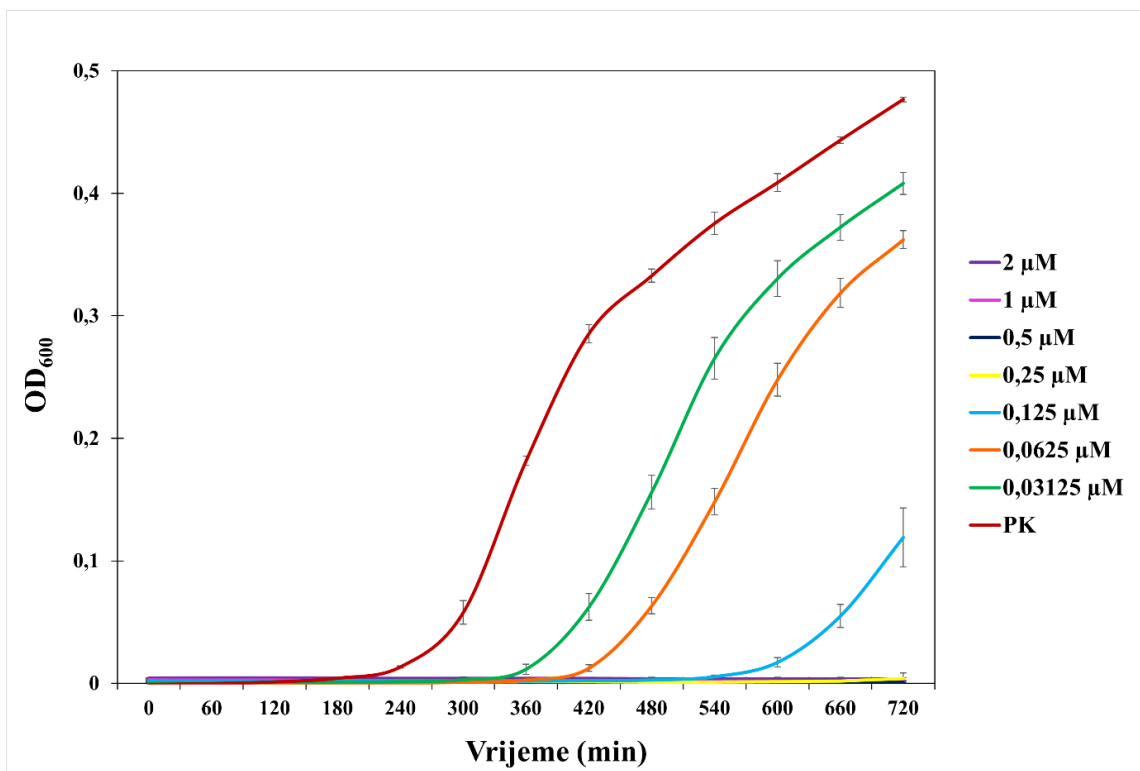
Mesco-2 je pokazao visoku djelotvornost i širok spektar antimikrobnog djelovanja protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Raspon minimalne inhibitorne koncentracije kretao se od submikromolarnog (0,5 μM) za oba soja *E. coli* i za *K. pneumoniae*, prema nisko mikromolarnom za *A. baumannii* i *P. aeruginosa* (1 - 2 μM). Slične mikromolarne vrijednosti uočene su i za 2 soja gram-pozitivnog zlatnog stafilokoka što govori u prilog širokog spektra djelovanja (Tablica 2). Uz iznimku *S. aureus* ATCC 25923, gdje je MBK 4 puta veća od MIK, minimalne baktericidne koncentracije jednake su minimalnim inhibitornim koncentracijama, što upućuje na baktericidno djelovanje mesco-2 peptida.

Tablica 2. Antimikrobna aktivnost peptida mesco-2 izražena kroz MIK i MBK vrijednosti.

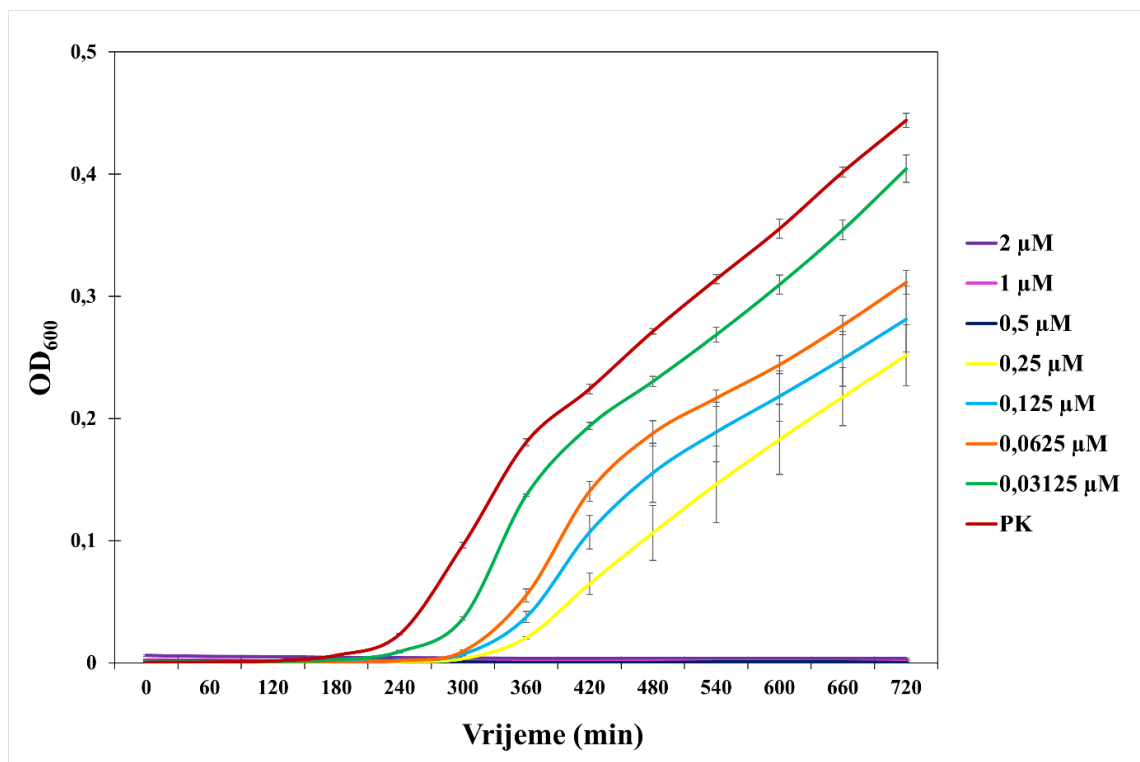
Bakterijska vrsta	Mesco-2	
	MIK (μM)	MBK (μM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5	0,5
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	0,5	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	0,5	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1-2	1-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2	8

Antimikrobna aktivnost dodatno je ispitana kroz mjerenje inhibicije rasta *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213 praćenjem apsorbancije pri OD₆₀₀ i pri različitim koncentracijama peptida. Mesco-2 inhibira rast *E. coli* ATCC 2592 pri $\frac{1}{4}$ MIK (0,125 μM) prvih 9 sati mjerenja, dok je pri $\frac{1}{2}$ MIK (0,25 μM) rast inhibiran cijelo vrijeme trajanja eksperimenta (Slika 15). Pri koncentracijama 0,0625 i 0,03125 μM također je primijećena inhibicija rasta u prvih nekoliko sati eksperimenta nakon čega su bakterije uspjele kompenzirati te uvjete i nastaviti s rastom približavajući se kontrolnoj skupini nakon 12 h mjerenja.

Utjecaj peptida na *S. aureus* ATCC 29213 (Slika 16) bio je sličan kao i naspram *E. coli*. Rast bakterija je u potpunosti inhibiran za cijelo vrijeme trajanja eksperimenta pri koncentraciji 0,5 μM ($\frac{1}{2}$ MIK) i većim od nje. Pri nižim koncentracijama *S. aureus* je rastao uz minimalno kašnjenje za kontrolom, no za razliku od *E. coli* ukupni broj bakterija nakon 12 sati se znatno razlikovao u usporedbi s kontrolom.



Slika 15. Učinak različitih koncentracija mesco-2 na kinetiku rasta *E. coli* ATCC 25922. PK - pozitivna kontrola.

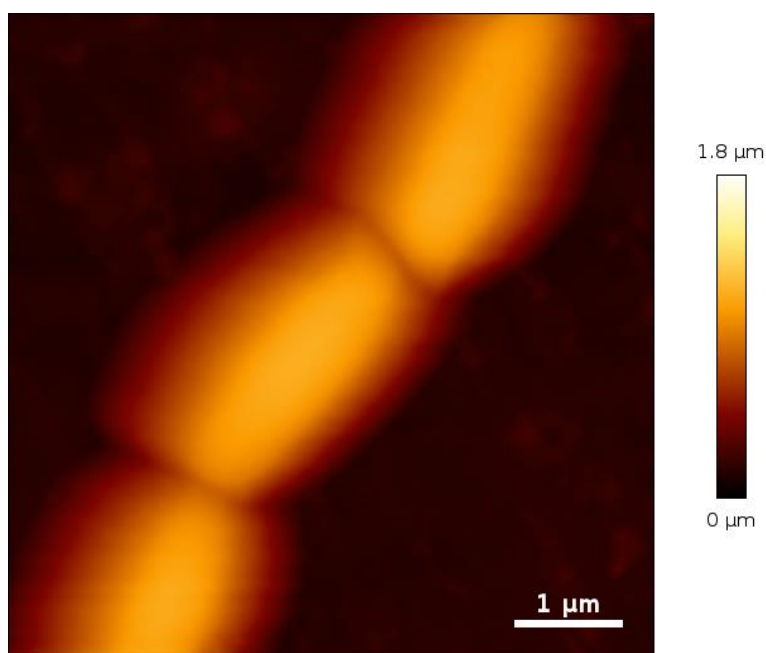


Slika 16. Učinak različitih koncentracija mesco-2 na kinetiku rasta *S. aureus* ATCC 29213. PK - pozitivna kontrola.

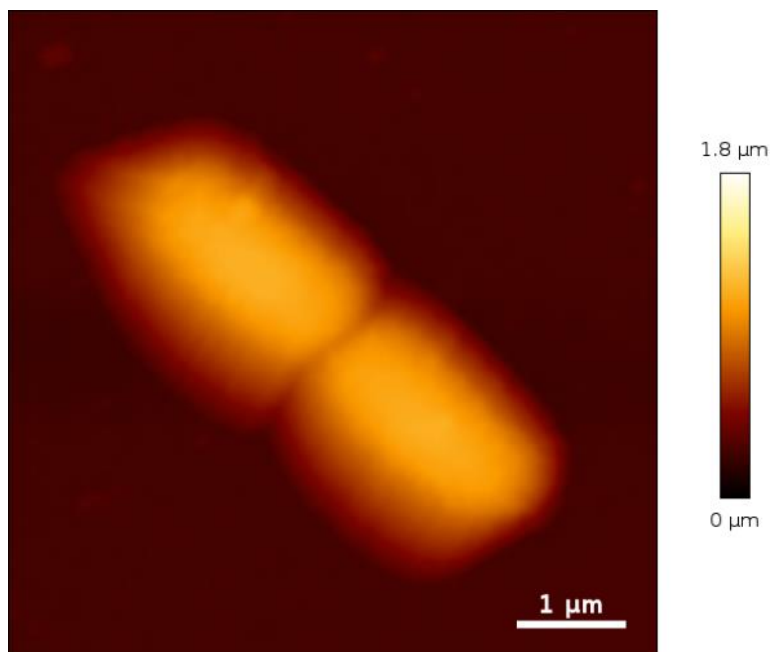
4.4. Mehanizam djelovanja mesco-2 peptida

4.4.1. Mjerenje učinka mesco-2 na površinu stanica *E. coli* DH5 α metodom AFM

Metodom mikroskopije atomskih sila vizualiziran je učinak mesco-2 peptida na površinu stanica *E. coli* DH5 α . Stanice su bile tretirane koncentracijom od 4 \times MIK, pri čemu je vrijednost MIK iznosila 0,5 μ M. Mjerenja netretiranih *E. coli* DH5 α pokazala su prirodnu morfologiju stanica s glatkom površinom (Slika 17). Tretirane stanice mjerenjima nisu pokazale vidljive promjene na površini stanica (Slika 18) u usporedbi s mjerenjima netretiranih kontrolnih stanica. Na temelju provedenih mjerenja, zaključuje se da je morfologija stanica *E. coli* DH5 α ostala nepromijenjena, bez vidljivih oštećenja membrane. S obzirom na to da nema vidljivog negativnog učinka mesco-2 na stanice, mehanizam djelovanja peptida ostaje nejasan na temelju provedenih AFM mjerenja.



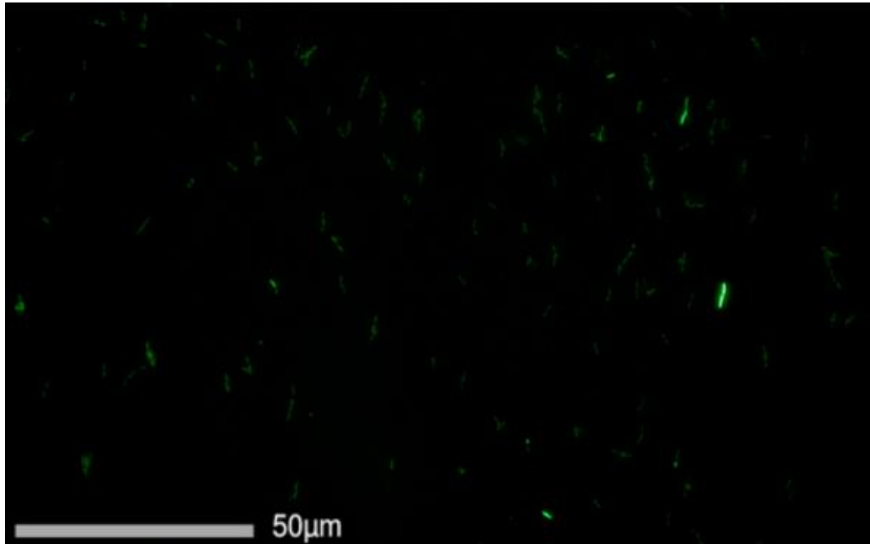
Slika 17. AFM prikaz netretiranih stanica *E. coli* DH5 α . Na ljestvici desno bojama su prikazane visinske razlike u uzorku, s maksimalnom visinom od 1.8 μ m.



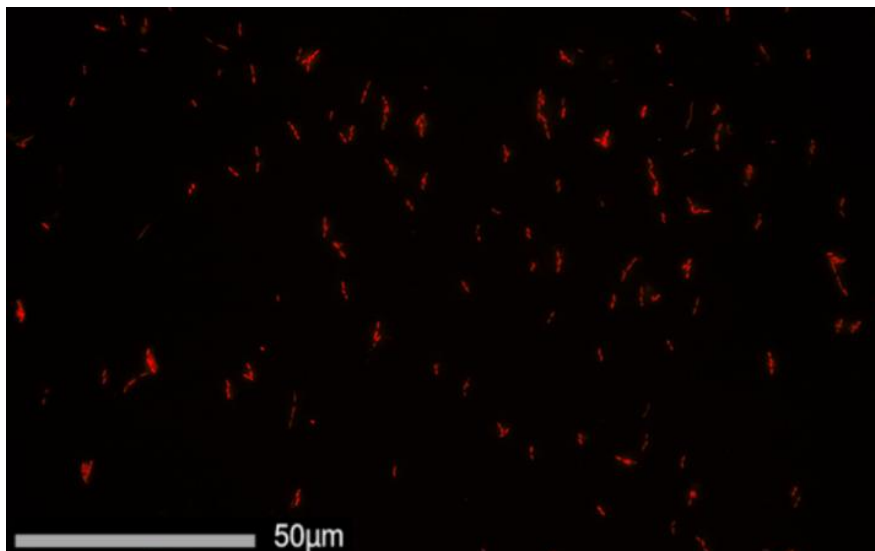
Slika 18. AFM prikaz dvije stanice *E. coli* DH5 α tretiranih s mesco-2 peptidom u koncentraciji od 4 \times MIK. Na ljestvici desno bojama su prikazane visinske razlike u uzorku, s maksimalnom visinom od 1.8 μm .

4.4.2. Vijabilnost stanica *E. coli* DH5 α mjerena fluorescentnim bojama nakon tretmana s mesco-2

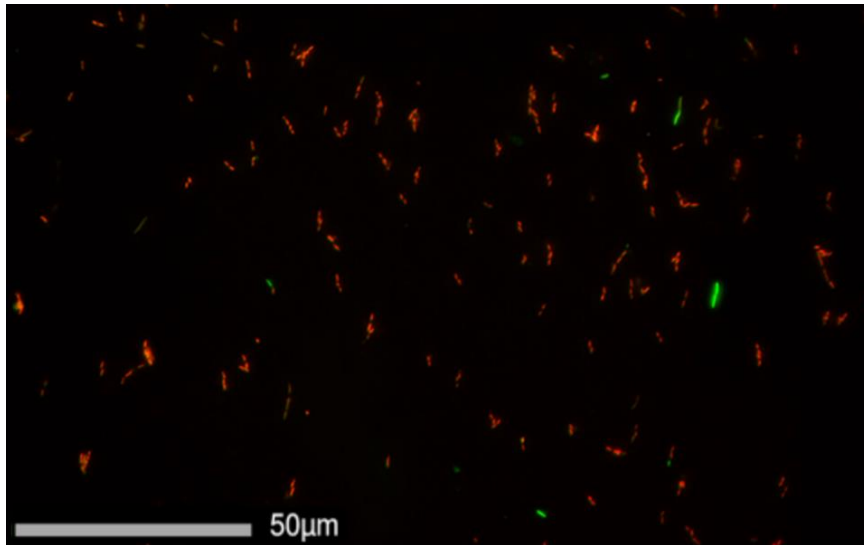
Unatoč tome što AFM mjerenja nisu pokazala promjenu u morfologiji stanica *E. coli* DH5 α tretiranih s mesco-2, one su pod fluorescentnim mikroskopom pokazale oslabljenu zelenu fluorescenciju SYTO 9 (Slika 19), koja se javlja uslijed ulaska propidij jodida (PI) u stanice (Slika 20). Stanice su emitirale jak crveni signal propidij jodida (PI), što upućuje na povećanu propusnost membrane. Budući da PI ulazi isključivo u mrtve stanice ili one s narušenom membranom te interkalira s nukleinskim kiselinama, ovi rezultati sugeriraju da mesco-2 djeluje putem membranolitičkog mehanizma. Usporedba dviju slika ukazuje na to da većina stanica ima kompromitiranu membranu uz iznimku nekoliko stanica koje su vidljive samo pod zelenim filterom i emitiraju jak zeleni signal (Slika 21).



Slika 19. Tretirane stanice *E. coli* DH5 α s mesco-2, obojane bojom SYTO 9 (480/500 nm), promatrane na fluorescentnom mikroskopu pod zelenim filterom. Povećanje 600x.



Slika 20. Tretirane stanice *E. coli* DH5 α s mesco-2, obojane propidij jodidom (PI) (490/635 nm), promatrane na fluorescentnom mikroskopu pod crvenim filterom. Povećanje 600x.



Slika 21. Stanice *E. coli* DH5α tretirane mesco-2, s preklopljenim zelenim (SYTO9) i crvenim (PI) signalom. Preklapanje signala ukazuje na učinak mesco-2 na stanice, odnosno na narušen integritet membrane tj. povećanu propusnost membrane. Povećanje 600x.

5. RASPRAVA

Današnji antibiotici gube učinkovitost zbog brzorastuće rezistencije bakterija u posljednjim desetljećima, zbog čega je iznimno važno otkriti nove antimikrobne spojeve. Antimikrobni peptidi ističu se kao alternativno rješenje koje se istražuje već desetljećima (Rončević i sur., 2019a). Prisutni su u gotovo svim organizmima kao dio urođenog imunološkog sustava te pokazuju širok spektar djelovanja što ih čini obećavajućim kandidatima u borbi protiv rezistencije na antibiotike (Zhang i Gallo, 2016; Mladineo i sur., 2023). AMP-i parazitskih crva igraju ključnu ulogu u njihovoj prilagodbi različitim domaćinima i okruženjima bogatim mikroorganizmima tijekom životnog ciklusa. Kako bi opstali, parazitski crvi se oslanjaju isključivo na urođeni imunološki sustav, a među ostalim, luče i AMP-e za imunomodulaciju imunološkog odgovora domaćina koji im je ključan za preživljavanje (Yeshi i sur., 2022). Zbog tih jedinstvenih prilagodbi, AMP-i parazita mogu imati potencijalno korisna svojstva i otvaraju nove mogućnosti za razvoj terapijskih opcija u budućnosti.

U ovom istraživanju identificirana su 3 proteinska prekursora iz trakavice *Mesocestoides corti*, od kojih je peptid mesco-2 odabran za sintezu i daljnju analizu. Mesco-2 posjeduje poželjna biofizikalna obilježja, poput pozitivnog naboja (+11) i amfipatičnosti, koja imaju važnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti peptida (Rončević i sur., 2019a). Sekvenca ovog peptida sastoji se od ukupno 40 aminokiselinskih ostataka.

Sekundarna struktura mesco-2 peptida određena je primjenom spektroskopije cirkularnog dikroizma u izotropnom i anizotropnim okolišima. Prema očekivanjima, peptid je u hidrofilnom okruženju u PBS-u ostao nestrukturiran, dok je pri većim koncentracijama TFE-a poprimio helikalnu strukturu zbog prisutnosti hidrofobnog okruženja (He i sur., 2021), kao i u prisutnosti SDS-a koji oponaša membranske uvjete (Takaramoto i sur., 2021). Mesco-2 je u otopini s neutralnim SUV-ama ostao nestrukturiran, što upućuje na slabu interakciju peptida s neutralnim membranama, poput onih prisutnih u eukariotskim stanicama. Nizak afinitet prema eukariotskim membranama može upućivati na nisku toksičnost peptida prema stanicama domaćina (Matsuzaki, 2009). Za razliku od neutralnih membrana, peptid je pokazao visok afinitet prema negativno nabijenim bakterijskim membranama, što se očitovalo strukturiranjem u otopini s anionskim SUV-ama čak i pri niskim koncentracijama. CD spektri u ovim uvjetima razlikovali su se od onih dobivenih u prisutnosti TFE-a, što sugerira da peptid potencijalno formira složenu helikalnu strukturu s višeslojnim ili paralelnim rasporedom (Wagschal i sur., 1999). Ovakva organizacija može dodatno stabilizirati peptid u specifičnim okruženjima poput

negativno nabijenih membrana, jer potiče hidrofobne interakcije između slojeva (Abosheasha i sur., 2021).

Širok spektar djelovanja peptida mesco-2 potvrđen je eksperimentalnim određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije, pri čemu su MIK vrijednosti bile u rasponu od submikromolarnih za *E. coli* i *K. pneumoniae* (0,5 μ M) do niskih mikromolarnih koncentracija za *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, i *S. aureus* (1-2 μ M). Minimalne baktericidne koncentracije (MBK) bile su jednake minimalnim inhibitornim koncentracijama, osim u slučaju *S. aureus* ATCC 25923, što ukazuje na baktericidno djelovanje peptida jer ne samo da inhibira rast bakterija već ih i ubija pri tim koncentracijama. Antimikrobno djelovanje peptida dodatno je potvrđeno praćenjem kinetike rasta bakterija *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213, omogućujući detaljniju analizu inhibicije rasta i preciznije opažanje djelovanja peptida od MIK eksperimenta. Opaženo je da peptid inhibira rast bakterija i pri znatno nižim koncentracijama od MIK. Ovisno o bakteriji i koncentraciji peptida, bakterije su nakon nekog vremena uspjevale kompenzirati nepovoljne uvjete i nastaviti s rastom.

Djelovanje antimikrobnih peptida uvelike je povezano s njihovim biofizikalnim svojstvima i strukturom (Shai, 2002). Analiza mehanizma djelovanja mesco-2 provedena je metodama mikroskopije atomskih sila i fluorescentne mikroskopije, pri čemu je utvrđeno da je mehanizam djelovanja membranolitički. AFM mjerenja pokazala su očuvanu morfologiju *E. coli* DH5 α bez vidljivih znakova oštećenja nakon tretmana peptidom mesco-2 u koncentraciji 4 puta većoj od MIK, dok je snažna crvena fluorescencija propidij jodida (PI) zabilježena fluorescentnom mikroskopijom ukazala na narušavanje membrane, odnosno promjene u propusnosti membrane. Primjer takvog djelovanja već je ranije zabilježen kod peptida melitina iz pčelinjeg otrova, koji je unatoč očuvanoj površini stanice, izazivao snažan signal PI sugerirajući narušavanje membranskog integriteta (Rončević i sur., 2019b). Dobiveni rezultati nisu neočekivani s obzirom da antimikrobni peptidi, a naročito oni helikalni često imaju membranolitički mehanizam djelovanja (Sato i Feix, 2006). Na osnovu dobivenih podataka, može se zaključiti da mehanizam djelovanja mesco-2 uključuje stvaranje prolaznih pora ili lezija čime je narušen membranski integritet bez vidljivih vanjskih strukturnih promjena koje se mogu opaziti koristeći AFM. Međutim, potrebno je naglasiti da, kao i kod mnogih drugih antimikrobnih peptida, mehanizam djelovanja mesco-2 ne mora biti sveden isključivo na nespecifičnu interakciju s membranom i formiranje pora (Brogden, 2005). Budući eksperimenti, poput ispitivanja interakcije peptida s ribosomskom mašinerijom i/ili

nukleinskim kiselinama, mogu doprinijeti stvaranju potpune slike kako ovaj peptid ubija bakterijske stanice.

Ovim istraživanjem potvrđen je širok spektar djelovanja peptida mesco-2, s naznakama niske toksičnosti prema eukariotskim membranama, što čini ovaj peptid obećavajućim kandidatom za daljnji razvoj kao alternativnog antimikrobnog sredstva u borbi protiv bakterijske rezistencije. Dodatna istraživanja trebala bi se usmjeriti na ispitivanje njegove toksičnosti prema stanicama domaćina, kao i njegovu stabilnost i učinkovitost u složenijim biološkim sustavima. Razumijevanjem njegovog utjecaja na zdrave stanice, mogla bi se potvrditi njegova sigurnost za potencijalnu kliničku primjenu.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu identificiran je peptid mesco-2 iz trakavice *Mesocestoides corti*. Određena mu je sekundarna struktura u različitim izotropnim i anizotropnim uvjetima. Peptid je ostao nestrukturiran u izotropnom okolišu, dok anizotropni uvjeti rezultiraju njegovim strukturiranjem. U prisustvu TFE-a i SDS-a, peptid je većinski helikalan, dok su CD spektri mesco-2 u prisustvu anionskih liposoma takvi da sugeriraju složenu helikalnu strukturu s višeslojnim rasporedom.

Potvrđen je širok spektar antimikrobnog djelovanja testiran na 7 različitih gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, a preciznija analiza inhibicije rasta provedena je praćenjem kinetike rasta *E. coli* ATCC 25922 i *S. aureus* ATCC 29213. Na taj način je potvrđeno da do inhibicije rasta dolazi već i kod koncentracijama manjim od MIK, ali nakon određenog vremena bakterije ipak uspješno nastavljaju rast.

Interakcija mesco-2 s bakterijskom membranom utvrđena je mikroskopijom atomskih sila i fluorescentnom mikroskopijom na *E. coli* DH5 α . Utvrđeno je da nije došlo do promjene morfologije bakterijske stanice, ali dolazi do promjena u njezinoj propusnosti, najvjerojatnije uslijed formiranja prolaznih pora. Dobiveni rezultati pokazuju potencijal mesco-2 kao antimikrobnog sredstva koje bi moglo pronaći svoju ulogu u potencijalnoj kliničkoj primjeni.

7. LITERATURA

1. Abosheasha, M. A., Itagaki, T., Ito, Y., & Ueda, M. (2021). Tubular Assembly Formation Induced by Leucine Alignment along the Hydrophobic Helix of Amphiphilic Polypeptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12075. <https://doi.org/10.3390/ijms222112075>
2. Adolph, C. B., & Peregrine, A. S. (2021). Tapeworms. U *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat* (str. 1455–1484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00115-4>
3. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
4. Axelsson, M., & Gentili, F. (2014). A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLoS ONE*, 9(2), e89643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089643>
5. Bahar, A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
6. Basika, T., Paludo, G. P., Araujo, F. M., Salim, A. C., Pais, F., Maldonado, L., Macchiaroli, N., Camargo De Lima, J., Rosenzvit, M., Oliveira, G. C., Kamenetzky, L., & Ferreira, H. B. (2019). Transcriptomic profile of two developmental stages of the cestode parasite *Mesocestoides corti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 229, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.006>
7. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

8. Çağdaş, M., Sezer, A. D., & Bucak, S. (2014). Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. U A. D. Sezer (Ur.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. <https://doi.org/10.5772/58459>
9. Castro, G. A. (1996). Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. U S. Baron (Ur.), *Medical Microbiology* (4th izd.). University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>
10. Costábile, A., Domínguez, M. F., Guarnaschelli, I., Preza, M., Koziol, U., Castillo, E., & Tort, J. F. (2024). Purification and transcriptomic characterization of proliferative cells of *Mesocestoides corti* selectively affected by irradiation. *Frontiers in Parasitology*, 3, 1362199. <https://doi.org/10.3389/fpara.2024.1362199>
11. Duong, V.-A., Nguyen, T.-T.-L., & Maeng, H.-J. (2020). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, 25(20), 4781. <https://doi.org/10.3390/molecules25204781>
12. Eaton, P. J., & West, P. (2010). *Atomic force microscopy*. Oxford University Press.
13. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
14. Foth, B. J., Tsai, I. J., Reid, A. J., Bancroft, A. J., Nichol, S., Tracey, A., Holroyd, N., Cotton, J. A., Stanley, E. J., Zarowiecki, M., Liu, J. Z., Huckvale, T., Cooper, P. J., Grencis, R. K., & Berriman, M. (2014). Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. *Nature Genetics*, 46(7), 693–700. <https://doi.org/10.1038/ng.3010>

15. Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
16. Harris, T. W. (2004). WormBase: A multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 411D – 417. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh066>
17. He, L., Ying, L., Jingting, X., Chen, C., & Shuntang, G. (2021). Changes in the secondary structures and zeta potential of soybean peptide and its calcium complexes in different solution environments. *Food & Function*, 12(13), 5967–5974. <https://doi.org/10.1039/D0FO03478A>
18. Irvine, A., McKenzie, D., McCoy, C. J., Graham, R. L. J., Graham, C., Huws, S. A., Atkinson, L. E., & Mousley, A. (2023). Novel integrated computational AMP discovery approaches highlight diversity in the helminth AMP repertoire. *PLOS Pathogens*, 19(7), e1011508. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011508>
19. Kelly, S., & Price, N. (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), 349–384. <https://doi.org/10.2174/1389203003381315>
20. Kuipers, B. J. H., & Gruppen, H. (2007). Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5445–5451. <https://doi.org/10.1021/jf0703371>
21. Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

22. Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
23. Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), e02340-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02340-16>
24. Lee, T.-H., N. Hall, K., & Aguilar, M.-I. (2015). Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 25–39. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>
25. Liu, Y., Shi, L., Su, L., Van Der Mei, H. C., Jutte, P. C., Ren, Y., & Busscher, H. J. (2019). Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chemical Society Reviews*, 48(2), 428–446. <https://doi.org/10.1039/C7CS00807D>
26. Lu, F., Zhu, Y., Zhang, G., & Liu, Z. (2022). Renovation as innovation: Repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 944147. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.944147>
27. Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
28. Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013>

29. McKay, D. M., Shute, A., & Lopes, F. (2017). Helminths and intestinal barrier function. *Tissue Barriers*, 5(1), e1283385. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283385>
30. Miles, A. J., Janes, R. W., & Wallace, B. A. (2021). Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: A tutorial review. *Chemical Society Reviews*, 50(15), 8400–8413. <https://doi.org/10.1039/D0CS00558D>
31. Mladineo, I., Rončević, T., Gerdol, M., & Tossi, A. (2023). Helminthic host defense peptides: Using the parasite to defend the host. *Trends in Parasitology*, 39(5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.02.004>
32. Moravej, H., Moravej, Z., Yazdanparast, M., Heiat, M., Mirhosseini, A., Moosazadeh Moghaddam, M., & Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>
33. Nordström, R., & Malmsten, M. (2017). Delivery systems for antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*, 242, 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.01.005>
34. Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
35. Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., Wurm, F. R., & Landfester, K. (2018). Liposomes and polymersomes: A comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society Reviews*, 47(23), 8572–8610. <https://doi.org/10.1039/C8CS00162F>
36. Rokov, A. (2023). *Fixed Listeria monocytogenes imaged by atomic force microscope*. Bachelor thesis. Split: University of Split, Faculty of Science. <https://repozitorij.pmfst.unist.hr/islandora/object/pmfst%3A1807>

37. Rončević, T., Gerdol, M., Mardirossian, M., Maleš, M., Cvjetan, S., Benincasa, M., Maravić, A., Gajski, G., Krce, L., Aviani, I., Hrabar, J., Trumbić, Ž., Derks, M., Pallavicini, A., Weingarth, M., Zoranić, L., Tossi, A., & Mladineo, I. (2022). Anisaxins, helical antimicrobial peptides from marine parasites, kill resistant bacteria by lipid extraction and membrane disruption. *Acta Biomaterialia*, *146*, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.04.025>
38. Rončević, T., Krce, L., Gerdol, M., Pacor, S., Benincasa, M., Guida, F., Aviani, I., Čikeš-Čulić, V., Pallavicini, A., Maravić, A., & Tossi, A. (2019b). Membrane-active antimicrobial peptide identified in *Rana arvalis* by targeted DNA sequencing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1861*(3), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.014>
39. Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019a). Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
40. Rončević, T., Vukičević, D., Ilić, N., Krce, L., Gajski, G., Tonkić, M., Goić-Barišić, I., Zoranić, L., Sonavane, Y., Benincasa, M., Juretić, D., Maravić, A., & Tossi, A. (2018). Antibacterial Activity Affected by the Conformational Flexibility in Glycine–Lysine Based α -Helical Antimicrobial Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(7), 2924–2936. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01831>
41. Rosenfeld, Y., Lev, N., & Shai, Y. (2010). Effect of the Hydrophobicity to Net Positive Charge Ratio on Antibacterial and Anti-Endotoxin Activities of Structurally Similar Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, *49*(5), 853–861. <https://doi.org/10.1021/bi900724x>
42. Sato, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1758(9), 1245–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.021>

43. Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236–248. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>
44. Silva, N., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(3), 402–413. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>
45. Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175–182.
46. Takaramoto, S., Nakasone, Y., Sadakane, K., Maruta, S., & Terazima, M. (2021). Time-resolved detection of SDS-induced conformational changes in α -synuclein by a micro-stopped-flow system. *RSC Advances*, 11(2), 1086–1097. <https://doi.org/10.1039/D0RA09614H>
47. The UniProt Consortium (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
48. Thompson, T. (2022). The staggering death toll of drug-resistant bacteria. *Nature*, d41586-022-00228–x. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00228-x>
49. Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), 4–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)

50. Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2002). *New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids*. 416–417.
51. Wagner, G. P., Kin, K., & Lynch, V. J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences*, *131*(4), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0162-3>
52. Wagschal, K., Tripet, B., & Hodges, R. S. (1999). De novo design of a model peptide sequence to examine the effects of single amino acid substitutions in the hydrophobic core on both stability and oligomerization state of coiled-coils. 1 Edited by P. Wright. *Journal of Molecular Biology*, *285*(2), 785–803. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2284>
53. Wang, G. (Ur.). (2017). *Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies* (2nd edition). CABI.
54. Xuan, J., Feng, W., Wang, J., Wang, R., Zhang, B., Bo, L., Chen, Z.-S., Yang, H., & Sun, L. (2023). Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates*, *68*, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>
55. Yan, J., Cai, J., Zhang, B., Wang, Y., Wong, D. F., & Siu, S. W. I. (2022). Recent Progress in the Discovery and Design of Antimicrobial Peptides Using Traditional Machine Learning and Deep Learning. *Antibiotics*, *11*(10), 1451. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101451>
56. Yeshi, K., Ruscher, R., Loukas, A., & Wangchuk, P. (2022). Immunomodulatory and biological properties of helminth-derived small molecules: Potential applications in diagnostics and therapeutics. *Frontiers in Parasitology*, *1*, 984152. <https://doi.org/10.3389/fpara.2022.984152>

57. Zhang, L., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. svibnja 2000. godine u Splitu, gdje sam završila Osnovnu školu Mertojak. Nakon završene osnovne škole, upisala sam Prirodoslovno-matematičku školu u Splitu zbog iskazanog interesa prema prirodnim znanostima. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja, stekla sam prva laboratorijska iskustva kroz praktične vježbe iz kemije, biologije i fizike. 2019. godine sam nastavila tim smjerom, upisom na preddiplomski sveučilišni studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu. Po završetku preddiplomskog studija, dodijeljena mi je Dekanova nagrada za uspjeh postignut tijekom studija. 2022. godine odlučila sam se usmjeriti na specifično područje biologije, stoga sam upisala diplomski sveučilišni studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom diplomskog studija stekla sam nova laboratorijska iskustva, kroz vježbe održane na vanjskim institucijama, koja su me dodatno usmjerila prema istraživanju i laboratorijskom radu. Zbog razvijenog interesa prema području mikrobiologije i biotehnologije, odlučila sam se vratiti u Split, gdje sam diplomski rad izradila pod mentorstvom doc. dr. sc. Tomislava Rončevića. Kao rezultat provedenog istraživanja, jedan sam od autora znanstvenog rada objavljenog 2024. godine u časopisu *International Journal of Molecular Sciences*. Tijekom studija i izrade diplomskog rada stekla sam samostalnost i sigurnost u provođenju različitih laboratorijskih tehnika i metoda iz područja molekularne biologije. Uz materinji hrvatski jezik, aktivno se služim engleskim u govoru i pismu.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

- Rončević, T., Gerdol, M., Pacor, S., Cvitanović, A., Begić, A., Weber, I., Krce, L., Caporale, A., Mardirossian, M., Tossi, A., & Zoranić, L. (2024). Antimicrobial Peptide with a Bent Helix Motif Identified in Parasitic Flatworm *Mesocostoides corti*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11690. <https://doi.org/10.3390/ijms252111690>

POPIS KONGRESNIH PRIOPĆENJA

- 11th IMAP conference, London, UK
02/09/2024 - 04/09/2024
Poster: “Activity and the mode of action of a peptide from a flatworm *Mesocostoides corti*”