

## ספרייה קומבינטורית של פפטידים אנטי-מיקרוביאליים לטיפול בדלקות עטין בבקר

דר' צבי חיוקה - המכון לביוכימיה מדעי המזון והתזונה, האוניברסיטה העברית.

פרופ' נחום שפיגל - בית הספר לרפואה וטרינרית, האוניברסיטה העברית.

### תקציר מדעי

דלקות עטין קליניות ותת-קליניות הן גורמי התחלואה הנפוצים ביותר בעדרי בקר לחלב בארץ ובעולם. דלקות העטין גורמות לנזק כלכלי כבד ביותר בעקבות הפגיעה בתנובת החלב ואיכותו, יציאת פרות מהעדר ועלויות טפולים רפואיים ומניעתיים. הטיפול ובמידת מה גם מניעת דלקות עטין מתבסס כיום על שימוש בחומרים אנטיביוטיים שונים שיעילותם מוגבלת והשימוש הרחב בהם כרוך בהתפתחות זנים עמידים המהווים סכנה לבריאות הציבור ופגיעה תדמיתית במוצרי החלב. המחקר המוצע הינו חלק ממאמץ כלל עולמי לפיתוח חומרים אנטימיקרוביאליים חליפיים אשר יפחיתו את בעיית העמידות ויהוו מענה יעיל יותר ויעודי לשימוש בחיות משק מייצרות מזון. במעבדתנו פיתחנו גישה חדשה המבוססת על סינתזה של תערובות אקראיות של פפטידים לשימוש כחומרים אנטי-בקטריאליים יעילים ובטוחים. שני היתרונות המשמעותיים לחומרים אלו הם: 1. סינתזת החומרים הינה זולה ויעילה. 2. תערובות פפטידים אלה מכילות מליוני פפטידים בעלי רצפים שונים הפועלים יחד ובמנגנונים שונים כנגד מגוון רחב של חיידקים. לפיכך, אחד היתרונות הבולטים של שימוש בתערובות פפטידים הגנטיים הינו קצב פיתוח עמידות איטי בהשוואה לחומרים אנטיביוטיים ידועים. מטרת המחקר הנוכחי היא לפתח פפטידים אנטימיקרוביאליים לטיפול ומניעה של דלקות עטין בפרות חלב. עד כה תוכננו וסונטזו מספר תערובות אשר הראו פעילות אנטימיקרוביאלית גבהה כנגד חיידקים מחוללי דלקת עטין אשר בודדו ממקרי שדה בפרות חלב. בנוסף נבדקה בטיחות התערובות הפעילות בתרביות תאים ובמודל עכברות מיניקות ולא נצפו השפעות מזיקות על התאים או בלוטת החלב והעכברות. הראנו כי תערובות אלו מסוגלות לנטרל שפעול מערכת החיסון ותגובה דלקתית ע"י אנדוטוקסינים בתאי בלוטת החלב. לפיכך כבר בשלב זה של המחקר עלה בידנו לפתח תערובות פפטידים בטוחות לטיפול תוך-עטיני ובעלות פעילות כפולה; אנטימיקרוביאלית ואנטי דלקתית. לאחרונה, סרקנו זנים שונים של א. קולי מחוללי דלקת עטין ומצאנו תערובות פפטידים בעלת פעילות גבוהה לזן זה בחלב. בהמשך העמדנו בהצלחה מערכת מודל של דלקת עטין בעכברות עם הזן הנבחר בהשוואה לזן הפרוטוטיפי. בשלב הבא בעזרת מערכת מודל זו למדנו את ההשפעה של תערובות הפפטידים הנבחרת על התפתחות דלקת עטין ומדדי דלקת שונים. מהממצאים עולה כי תערובת הפפטידים הנבחרת בטוחה לשימוש אך ישנו צורך באופטימיזציה של משטר הטיפולים לשיפור יעילות הטיפול.

לראשונה הראנו כי תערובות אלו מסוגלות לנטרל שפעול מערכת החיסון ותגובה דלקתית ע"י אנדוטוקסינים בתאי בלוטת החלב. לפיכך כבר בשלב זה של המחקר עלה בידנו לפתח תערובות פפטידים בטוחות לטיפול תוך-עטיני ובעלות פעילות כפולה; אנטימיקרוביאלית ואנטי דלקתית.

## **Abstract**

Mastitis, an inflammatory response of the mammary tissue to invading pathogenic bacteria, is a common disease in breast-feeding women and dairy animals. Bovine mastitis is a worldwide problem and causes multibillion-dollar economic losses due to reduce milk production and quality. The disease is commonly caused by bacterial infection ascending through the teat canal and frequent pathogens are *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *streptococcus uberis* and *agalactiae*, and *mycoplasma*. Currently, the administration of antibiotics is the most common method for its treatment and prevention, but this strategy has several disadvantages including the emergence of bacterial resistance, low cure rate and presence of antibiotic residues in milk and meat products exposing consumers to public health hazards. Therefore, there is an urgent need to develop novel approaches for managing bovine mastitis more efficiently. In recent years, anti-microbial peptides (AMPs) have emerged as potential biocompatible candidates to tackle bacterial antibiotic resistance crisis and filling the current void in novel antibiotic discovery. In our lab, we have developed a novel approach to synthesize AMPs mixtures. An important advantage of the AMPs mixtures is their low cost, simple synthesis, broad spectrum, and low probability for bacterial resistance occurrence due to the repertoire of AMPs sequences received throughout the synthesis.

Here we aimed to develop and evaluate the anti-microbial and anti-inflammatory roles of AMPs mixtures, random antimicrobial peptide mixture (RPMs) as well as their feasibility to treat acute coliform mastitis, using *in vitro* and *in vivo* model systems. We have discovered that random peptide mixture displayed strong and broad antimicrobial activity towards mammary pathogenic *Escherichia coli* (MPEC) bacteria and in addition showed strong antimicrobial activity towards rough mutants of MPEC bacteria in bovine raw milk. In addition, we have demonstrated that RPMs abrogated mouse mammary epithelial cell line (Eph4) inflammatory response elicited by lipopolysaccharide (LPS), the most significant pathogen-associated molecular pattern (PAMP) in coliform mastitis. We have demonstrated that treatment of RPMs did not affect the morphology of mammary

epithelial cells (MAECs) indicating on the safety of RPMs. In addition, RPMs partially succeeded to reduce the MPEC microbial load in the mammary gland. These results demonstrate the potential of RPMs to treat mastitis but for future studies are needed to improve and optimize RPMs activity.

## 1. מבוא

למרות מאמצים רבים לאורך שנים, דלקות עטין הן עדיין מצב התחלואה החשוב ביותר מבחינה כלכלית ברפתות החלב בארץ ובעולם [1, 2]. שיטת הטיפול והמניעה עדיין מתבססות במידה רבה על שימוש בחומרים אנטיביוטיים שונים ונוגדי דלקת ממשפחת NSAID. במחקרים שונים נמצא שטיפולים כנגד דלקות עטין הינן מקור חשוב להמצאות שאריות חומרים אנטיביוטיים בחלב ומוצריו העלולים להוביל להתפתחות זני חיידקים עמידים וסכנה לבריאות הציבור. לאור הביקורת הרבה כנגד השימוש בחומרים אנטיביוטיים בחיות מיצרות מזון והפגיעה התדמיתית במוצרי החלב נעשה מאמץ רב השנים האחרונות להקטין שימוש זה ולפתח שיטות חליפיות לשליטה במחלה.

פפטידים הגנטיים נוצרים באופן טבעי ע"י יונקים, דו-חיים, חרקים וצמחים ונחשבים כמועמדים פוטנציאליים טובים למטרה זו [3]. פפטידים אלו ממלאים תפקיד חשוב במערכת החיסון המולדת ובמערך ההגנה של הפונדקאי [4]. לפפטידים אלה פעילות אנטימיקרוביאלית כנגד מגוון חיידקים פתוגנים מחוללי מחלות באדם ובבעלי חיים. בנוסף לפעילות זו נמצא שלחלק מפפטידים אלה פעילות אנטיאינפלמטורית ולפיכך עשויים לשמש לטיפולים במחלות זהומיות [5]. ישנן מספר רב של חומרים אנטיביוטיים כגון פולימקסין B ודפטומיצין שהינם פפטידים בעלי פעילות אנטימיקרוביאלית. חומרים אלה נמצאים בשימוש ברפואת האדם וברפואה וטרינרית מזה שנים רבות. עד כה לא תועדה התפתחות של תגובה חיסונית כנגד פפטידים אלה אף בשימוש כרוני ושימוש חוזר לטיפול במצבי תחלואה שונים כולל דלקות עטין. עקרונית יש לציין שתגובה חיסונית אינה מתפתחת כנגד פפטידים אלה, אלא אם הינם מצומדים לנשאים או אדג'וונטים מתאימים. לפיכך אנו סבורים שהסיכוי להתפתחות תגובה חיסונית כנגד התערובות המוצעות בעבודה זו, ובמיוחד בטיפול תוך-עטיני, הינו נמוך מאד.

במעבדתו של ד"ר חיוקה פותחה בשנים האחרונות טכנולוגיה חדשנית לתכנון, יצור וסריקה של ספריות קומבינטוריות של תערובות פפטידים לפעילות אנטימיקרוביאלית [6-9] ואנטיאינפלמטורית. תערובות פפטידים אלה מכילות מליוני פפטידים בעלי רצפים שונים הפועלים יחד ובמנגנונים שונים כנגד מגוון רחב של חיידקים. לפיכך, אחד היתרונות הבולטים של שימוש בתערובות פפטידים הגנטיים הינו קצב פיתוח עמידות איטי מאד בהשוואה לחומרים אנטיביוטים ידועים. תוצאות ראשוניות ממעבדתו של ד"ר חיוקה מצביעות על פעילות גבוהה ורחב טווח כנגד חיידקים מחוללי דלקות עטין בפרות חלב. פפטידים הגנטיים בעלי פעילות רחבת טווח כנגד מחוללי דלקות עטין ופעילות כנוגדי דלקת בבלוטת החלב עשויים להוות

חלופה אטרקטיבית לחומרים הנמצאים בשימוש כיום. במחקר זה יפותחו תערובות פפטידים בעלי פעילות כפולה; פעילות אנטי מיקרוביאלית רחבת טווח ופעילות אנטי דלקתית בבלוטת החלב.

## **מטרות המחקר-**

מטרת המחקר הנוכחי הינה פיתוח של פפטידים בעלי פעילות כפולה; אנטימיקרוביאלית רחבת טווח ופעילות נוגדת דלקת, לטיפול ומניעה של דלקות עטין בפרות חלב. בהצעת המחקר הנוכחית נתכנן ונסנתז ספריות של תערובות פפטידים אנטימיקרוביאליים רנדומליים ונבחן את פעילותן כנגד חיידקים שונים מחוללי דלקת עטין בפרות חלב ופעילותן כנגדי דלקת בעטין. בשלב הבא תבדק בטיחות השימוש בתערובות הפעילות ביותר במבחנים טוקסיקולוגים בתאים וחיות מעבדה. לאחר מכן תבדק היתכנות השימוש בתערובות הפעילות לטיפול בדלקות עטין במודל עכברות מיניקות. ההצעה הינה רב תחומית המשלבת מומחיות בכימיה של פפטידים אנטימיקרוביאליים ושיטות מחקר מתקדמות בתחום דלקות עטין במודלים בחיות מעבדה ובפרות חלב.

## **2. תוצאות**

### **2.1 סינטזה של ספריות פפטידים רנדומליים וסריקת פעילותם האנטי מיקרוביאלית**

סונתזו שבע תערובות פפטידיים שונות, כל תערובת מכילה מליוני או עשרות פפטידים השונים ברצף המבני שלהן. סינטזת התערובות התבצעה בשיטת סינטזת פפטידים על מצע מוצק כאשר בכל צימוד משתמשים בתערובת של חומצות אמיניות לאוצין וליזין, פנילאלנין וליזין ביחס מולרי של 1:1 סינטזה זו מאפשרת יצירת ספריה קומבינטורית המכילה מליוני או עשרות (תלוי באורך הפפטיד) פפטידים עם רצפים שונים בעלי אורך שרשרת קבוע. כפי שמסכם בטבלה מספר 1, הראנו פעילות גבוהה של מספר תערובות פפטידים כנגד חיידקים מחוללי דלקת עטין אשר בודדו ממקרי שדה בפרות חלב בעדרים מסחריים בישראל. הפעילות נבדקה כנגד מספר זנים של א. קולי וסטאפילוקוקוס אוראוס מחוללי דלקת עטין אשר בודדו ממקרי שדה של דלקות עטין בפרות חלב בישראל. מהתוצאות של חלק זה של המחקר המסוכמות בטבלה 1, ניתן לראות כי ישנה פעילות אנטימיקרוביאלית רחבה וחזקה כנגד א קולי וסטאפילוקוקוס אוראוס לתערובת רנדומלית שמורכבת מדי לאוצין ודי ליזין באורך של 5 חומצות ועם שייר שומני (חומצה פלמיטית) בקצה האמיני. תערובות אלו הן דור חדש של הפפטידים מהסוג הזה שהראו יעילות גבוהה.

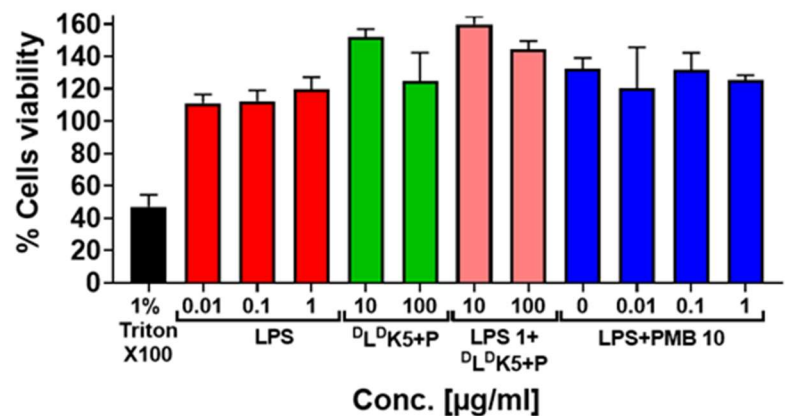
טבלה 1: סיכום ערכי ה MIC (ריכוז מינימלי הדרוש לעיכוב גידול החיידק; מ"ג/מ"ל) כנגד חיידקים שונים.

	FdK5+P	FK5+P	FK20	LK5+P	dLdK5+P	LK20	dLdK20
<i>E. coli P4</i>	25	50	50	12	12	50	25
<i>E. coli P4-NR</i>	25	50	50	12	12	12	12
<i>E. coli P4-NRΔgalE</i>					12		25
<i>E. coli P4-NRΔgalU</i>					12		25
MRSA					12		50
UTPEC 8_3B43				25	12	50	12
<i>E. coli BW25133 (keio)</i>					3		1.5
<i>E. coli JW0742 (ΔgalE)</i>					12		12
<i>E. coli JW1224 (ΔgalU)</i>					3		6

## 2.2 בדיקת רעילות ובטיחות של תערובות נבחרות

התערובות בעלות הפעילות האנטימיקרוביאלית הגבוהה (תערובות נבחרות כמו dLdK-P, dLdK20) נבחנו ללמוד את רעילותן בתאים וחיות מעבדה בשיטות מקובלות (מבחן MTT). מהתוצאות שלנו הראנו שתערובת בעל פעילות אנטימיקרוביאלית גבוהה לא הראתה סימני פגיעה טוקסית בתאים (איור 1).

איור 1: מבחני רעילות בשיטת MTT בשורת תאי בלוטת חלב.

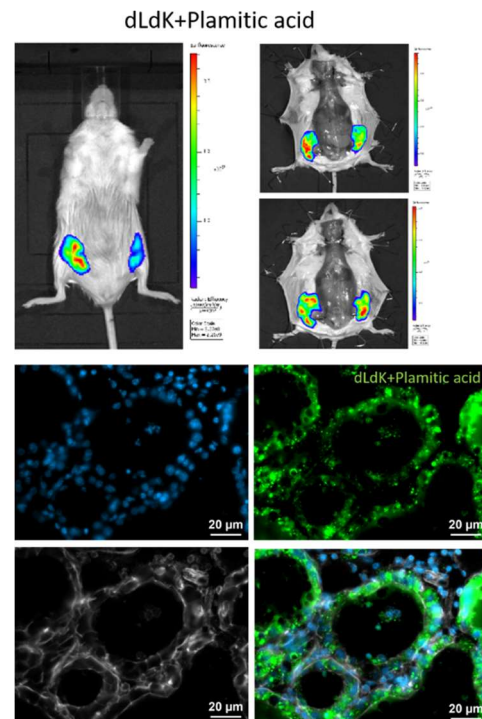


**Figure 1: Cytotoxicity study of LK5-P on EpH4/NF-κB cells.** Cells relative viability was measured by MTT colorimetric assay (600nm) after exposure to the different treatment. Cells viability was shown to be strongly decreased after treatment with triton 1% X100 (~47%) as opposed to LPS, DLDK5+P (10 and 100 μg/ml) and PMB (10 μg/ml) treatments

that increased the cells viability. Data represent the mean  $\pm$  SEM from an experiment repeated twice in duplicates.

**איור 1 : מבחני רעילות לפפטיד LK5-P בחשיפה לשורות תאים EpH4/NF- $\kappa$ B במבחן MTT.** הרעילות של הטיפולים השונים נמדדה בעזרת מבחן MTT (600 ננומטר) לאחר החשיפה. הוכח כי החיות של התאים ירדה מאוד לאחר טיפול בטריטון 1% X100 (~47%) כטיפול ב-LPS (10 ו-100 מיקרוגרם/מ"ל) ו-PMB (10 מיקרוגרם/מ"ל) שהגבירו את חיות התאים. הנתונים מייצגים את הממוצע + SEM מניסוי שחזר על עצמו פעמיים בכפילויות.

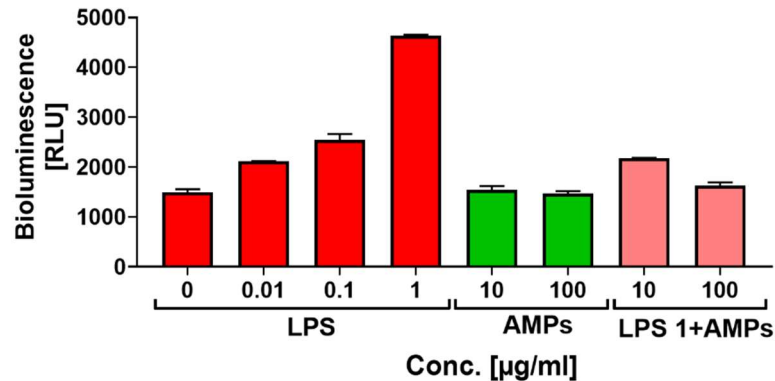
בעכברות מיניקות מזן BALB/C 7-10 ימים לאחר ההמלטה הוזרקה התערובת LK5-P (מסומן בסמן פלורסנטי) במתן תוך-עטני. נעשה שימוש במערכת WHOLE BODY IMAGING המאפשרת לעקוב אחר פיזור וספיגה של הפפטידים המסומנים והופעת סמנים לומיניסנטיים לתהליכי דלקת בבלוטות המוזרקות. המצאנו שהפפטידים נספגים ומתפזרים בצורה טובה בבלוטת החלב (איור 2 פאנל עליון), כמו כן לא נצפו סמני דלקת או סמנים קליניים אחרים בבלוטה או בעכברה. לאחר מכן בלוטות החלב נבדקו בעזרת מיקרוסקופיה פלורסנטית (איור 2 פאנל תחתון), ניתן לראות פיזור מצוין של הפפטידים המסומנים בבלוטת החלב כולל תוך תאית וזאת ללא שינויים במבנה התקין או נזק לתאי הבלוטה.



### 2.3 בדיקת פעילות נוגדת דלקת במערכת תאי בלוטת חלב

ערכנו בדיקת פעילות נוגדת דלקת לתערובות נבחרות שתוארו לעיל ע"י שימוש בקו תאים מבלוטת חלב מעכבר EPH-4 המבטאים גן מדווח לפעילות מערכת NF- $\kappa$ B. מצאנו שלתערובת LK5-P יש את היכולת לנטרל שפעול של תאי בלוטת חלב ע"י LPS שהופק מחיידקי אשריכיה קולי (איור 3). יש לציין שמדובר בממצא יחודי ובעל משמעות רבה שכן LPS מהווה גורם אלימות מרכזי של חיידקי אשריכיה קולי מחוללי דלקת עטין.

### איור 3: בדיקת פעילות נוגדת דלקת במערכת תאי בלוטת חלב

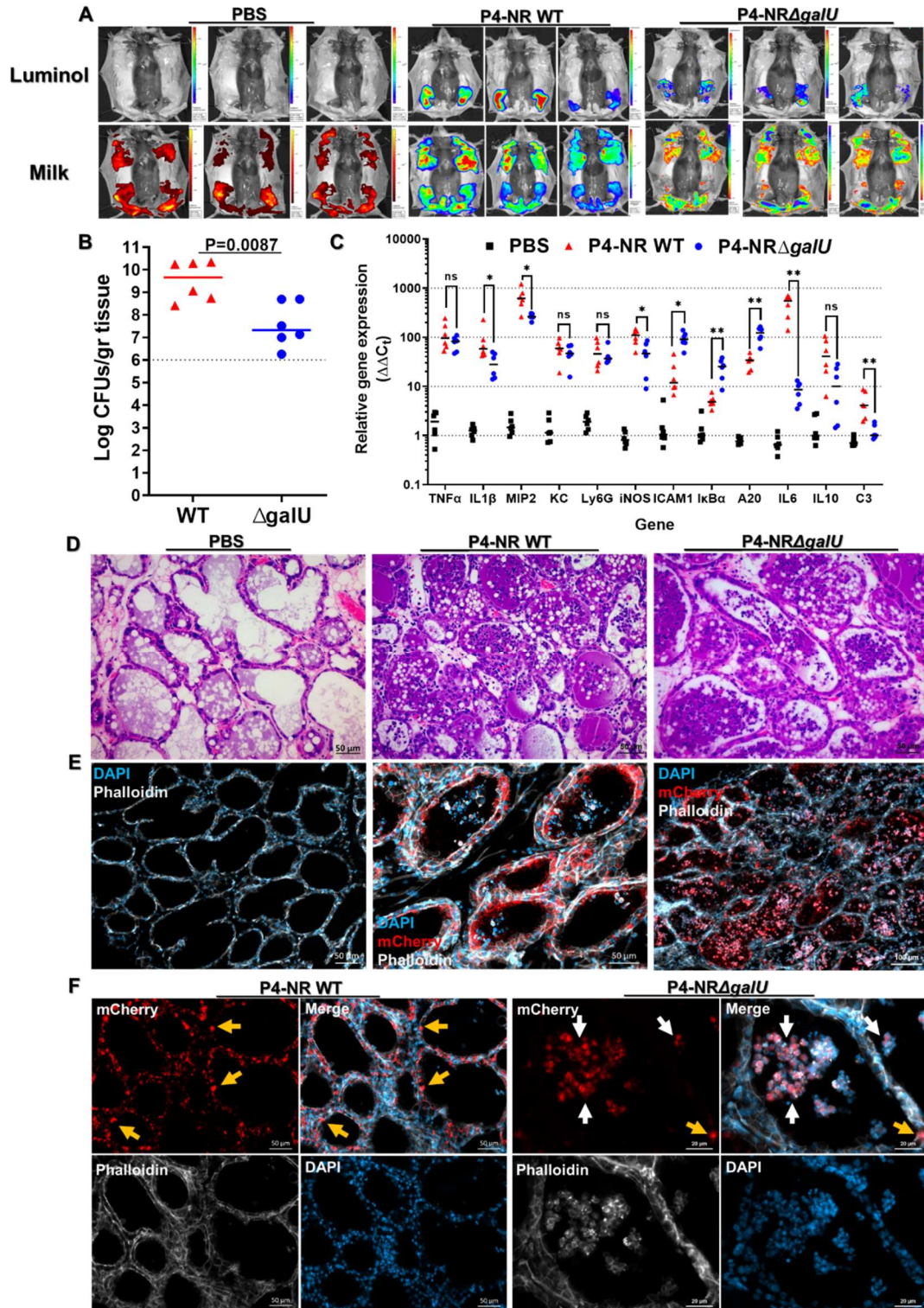


**Figure. 3. DLDK5+P AMPs mixture inhibits activation of NF- $\kappa$ B by LPS.** EpH4/NF- $\kappa$ B transduced cells activation at time point 90 minutes. Cells were shown to activate an inflammatory response in a dose response manner in the presence of LPS. The cells inflammatory response from LPS was abrogated in the presence of PMB (10  $\mu$ g/ml) and DL<sup>D</sup>K5+P AMPs mixture (10  $\mu$ g/ml and 100  $\mu$ g/ml). Data represent the mean  $\pm$  SEM from an experiment repeated twice in duplicates.

איור 3: הפפטיד DL<sup>D</sup>K5+P מעכב אקטיבציה של NF- $\kappa$ B בעזרת LPS. תאי EpH4/NF- $\kappa$ B דקות אחרי אקטיבציה. הודגם כי תאים מפעילים תגובה דלקתית באופן יחסי לריכוז LPS (עמודות אדומות). התגובה הדלקתית של התאים מ-LPS בוטלה בנוכחות של DLDK5+P (10 מיקרוגרם/מ"ל ו-100 מיקרוגרם/מ"ל) בעוד שפפטיד לבדו לא הפעיל את התאים. הנתונים מייצגים את הממוצע  $\pm$  SEM מניסוי שחזר על עצמו פעמיים בכפילויות.

#### 3.1 ביסוס מערכת מודל בדלקת עטין בעכברות מניקות

לאור ממצאי הניסויים במבחנה כפי שתארנו בדוח הקודם, ראינו שפעילות תערובות הפפטידים נפגעת בחלב כנגד הזן הפרוטוטיפי, כפי שדווח בספרות לגבי חומרים אנטימיקרוביאליים אחרים כמו טטרציקלינים שונים. לפיכך סרקנו תערובות פפטידים שונים וזנים שונים לפעילת אנטימיקרוביאלית בחלב בכדי לפענח את המנגנונים התורמים לפגיעה בפעילות האנטימיקרוביאלית בחלב ולתכנן פפטידים יעילים יותר בחלב.



**Fig. 4. Both smooth and rough *E. coli* P4-NR O15:H21H54 bacteria induce mastitis in BALB/c mice.** Mammary virulence of P4-NR/pKB4985 WT and P4-NR $\Delta$ galU/pKB4985 bacteria expressing mCherry fluorescent protein is demonstrated by murine mastitis model in lactating BALB/c mice challenged IMM with approximately  $\sim 10^4$  CFUs of bacteria compared to IMM injection of DPBS alone (Three mice/Six glands in each experiment). Mammary colonization by the bacteria is widespread (E), correlated with high bacterial loads in the mammary tissue (B) and correlated with reduction in milk production (A). Mammary



inflammation was indicated by elevation in relative expression levels of inflammatory modulators genes (C). Perfuse neutrophil recruitment to the mammary glands was indicated by IP injection of luminol 10 minutes before bioluminescence imaging (A) and quantified using RT-qPCR of the *Ly6G* gene (C). Neutrophils recruitment was also observed by histopathological analysis of mammary tissues (D and E). Mammary tissues were fixed 24 h post challenge and stained for H&E that analyzed by light microscopy (D) or for DNA (DAPI) and F-actin (Phalloidin-iFlour 647) that analyzed by fluorescent microscopy (E). Paraffin-embedded sections demonstrates massive neutrophil recruitment to mammary glands alveoli induced by P4-NR/pKB4985 bacteria and its mutant  $\Delta galU$  (D). Both bacteria expressing mCherry (red) was shown to greatly colonize the mammary glands (E). P4-NR/pKB4985 bacteria was shown to better internalize in MAECs and forming IBCs as opposed to its rough mutant  $\Delta galU$  which formed less IBCs and was more phagocytized by neutrophils (E and F). IBCs in MAECs is indicated by yellow arrows and phagocytized bacteria by neutrophils in white arrows. Each data point represents a single gland, and the horizontal bars indicate the median of the data (n=6 in each experiment). Statistical significance was determined by non-parametric Mann-Whitney two-independent-samples. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.001$

#### תמונה 4: חיידקי *E. coli* P4-NR O15:H21H54 smooth and rough השרו דלקת עטין במודל

**העכברות המניקות. חיידקי P4-NR/pKB4985 WT and P4-NR $\Delta galU$ /pKB4985** המבטאים חלבון פלורסנטי אדום הצליחו להשרות דלקת כאשר אולחו ישירות לעטין ב  $\sim 10^4$  CFUs לעומת הביקורת שהוזרק לה DPBS בכל ניסוי שלוש עכברות שש בלוטות סך הכל. החיידקים התפשטו בבלוטה (B) בהתאמה לירידה בכמות החלב בבלוטה (A). הדלקת בבלוטה הודגמה גם בביטוי גנים רלוונטיים למוסתי דלקת (C). גיוס נויטרופילים לבלוטות החלב סומן על ידי הזרקת IP של לומינול 10 דקות לפני הדמיית ביולומינסנציה (A) וכומת באמצעות RT-qPCR של הגן (C) *Ly6G*. גיוס נויטרופילים נצפה גם על ידי ניתוח היסטופתולוגי של רקמות החלב (D ו-E). רקמות החלב עברו פיקסציה 24 שעות לאחר האילוח והטיפול ונצבעו עבור H&E שנותחו על ידי מיקרוסקופיית אור (D) או עבור דנ"א (DAPI) ו-F-אקטין (Phalloidin-iFlour 647) במיקרוסקופיה פלואורסצנטית (E). גיוס מסיבי של נויטרופילים לנאדיות של בלוטות החלב המושרות על ידי חיידקי P4-NR/pKB4985 והמוטנט  $\Delta galU$  (D) mCherry (אדום) שנראו בכל בלוטות החלב (E). הודגם כי חיידקי P4-NR/pKB4985 חודרים ומשגשים טוב יותר ב-MAECs ויוצרים IBCs, בניגוד למוטנט  $\Delta galU$  שיצרה פחות IBCs והראה יותר גיוס של נויטרופילים (E ו-F). IBCs ב MAECs מסומן על ידי חיצים צהובים חיידקים phagocytized על ידי נויטרופילים בחצים לבנים. כל נקודת נתונים מייצגת בלוטה אחת, והפסים האופקיים מציינים את החציון של הנתונים (n=6 בכל ניסוי). המובהקות הסטטיסטית נקבעה על ידי מדגמים לא פרמטריים של מאן-וויטני דו-בלתי תלויים. \* $P < 0.001$  \*\* $P < 0.05$

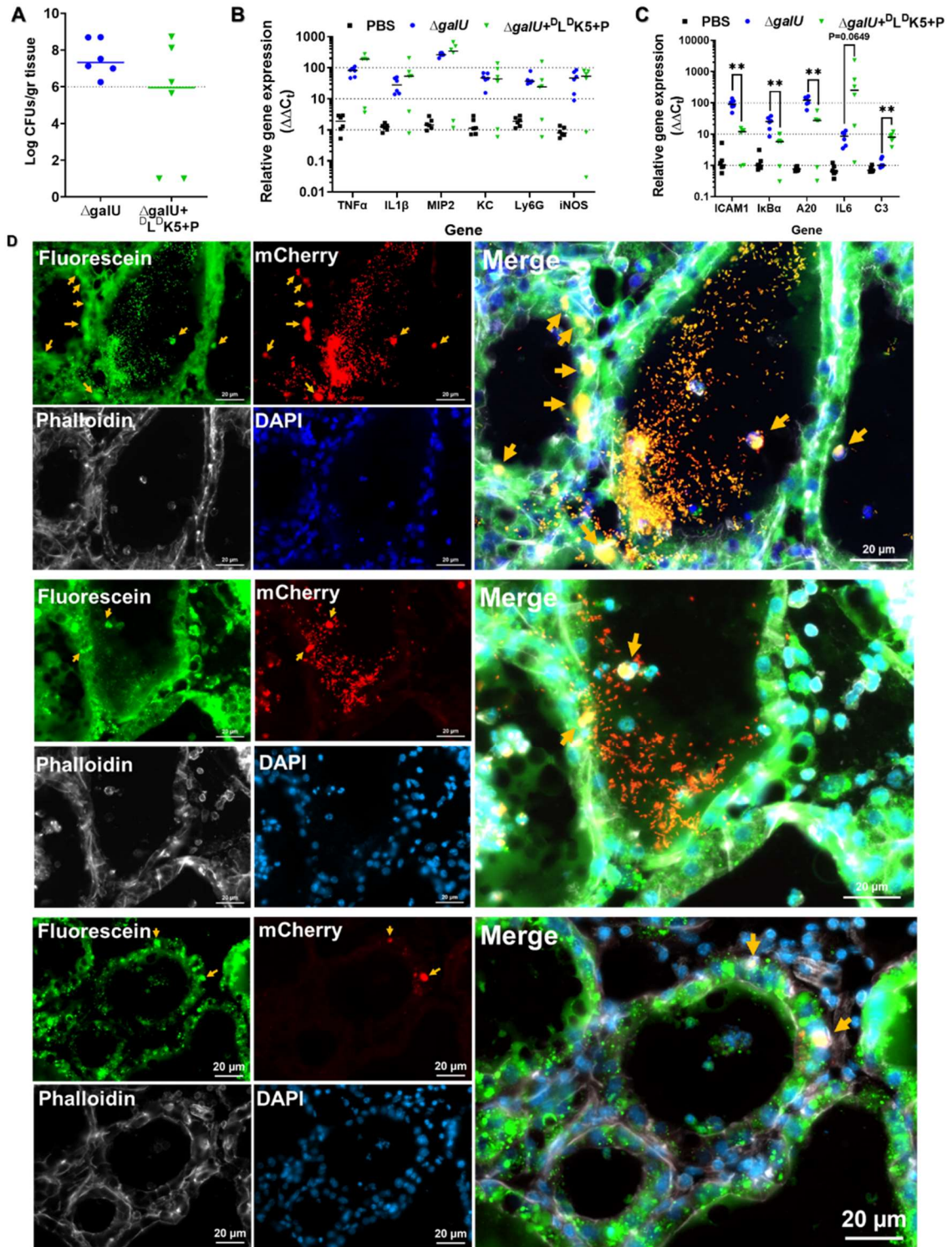
מניסויים אלו למדנו שתערובת הפפטידים DLDK5-P שמרה על פעילות אנטימיקרוביאלית בחלב כנגד הזן (P4-NR $\Delta galU$ ). להפתעתנו חלק מהתערובות איבדו את היעילות שנצפתה במדיום גידול לעומת חלב. אנו משערים שהשייר השומני שמצומד לתערובת הפפטידים הקצרים מסייעים לשמירת הפעילות בחלב שידוע כמדיום מורכב. לאור ממצאים אלו החלטנו להעמיד את מודל דלקת העטין בעכברות עם הזן הנבחר שהראה רגישות גבוהה לתערובת הפפטידים בחלב. לצורך זה נערכה הוקעה תוך עטינית דרך תעלת הפטמה בעכברות מניקות BALB/c כשבוע לאחר ההמלטה. בכל עכברה הוזרקו לבלוטות R4 ו-L4 הוזרקו  $\sim 10^4$  CFU/50ul בתמיסה פיזיולוגית. לאחר 24 שעות נערכה הדמייה בעזרת מכשיר (IVIS) לדימות תהליכי הדלקת והשיגשוג החיידקי בבלוטות (איור 1). לאחר מכן העכברות הוקרבו ובלוטות החלב

נחשפו לדימות נוספת ודוגמאות רקמה נלקחו לאנליזות מיקרוסקופיות היסטופתולוגיות ספירות חיידקים וביטוי גנים הקשורים בתהליך הדלקתי בעזרת Q-PCR (איור 1). לאור הממצאים נראה כי הוקעת תוך עטינית בזן הנבחר גרמה להתפתחות דלקת עטין בדומה לזן הפרוטוטיפי. שלב זה חשוב מאוד בביסוס מערכת מודל בחיה שתאפשר לנו ללמוד את השפעת התערובות הפטידים על התפתחות דלקת עטין.

### 3.2 איפיון פעילות תערובת הפטידים הרנדומליים במודל דלקת עטין בעכברות מניקות.

אחרי פיתוח מודל דלקת העטין בעכברות מניקות למדנו את ההשפעה של תערובת הפטידים  $DL^DK5+P$  לטפל בדלקת עטין בעכברות מניקות. שלוש עכברות מניקות BALB/c (שש בלוטות עטין) הוקעו דרך תעלת העטין ב  $E. coli$  P4-NR $\Delta$ galU/pKB4985 MPEC CFUs  $\sim 10^4$  שמבטאים חלבון פלורסנטי mCherry. העכברות טופלו בפטיד  $DL^DK5+P$  שצומד לפלורסאין, בריכוז של 1 מ"ג שלוש שעות אחרי ההוקעה. שיגשוג חיידקי, קולוניזציה בבלוטה, והוירולנטיות של החיידקים אופיינו 24 שעות לאחר הטיפול על ידי כימות העומס מיקרוביאלי בבלוטה (איור 1A), בעזרת RT-qPCR איפיינו מספר אינדיקטורים דלקתיים (איור C, 5B) ואנליזה היסטופתולוגית של רקמת העטין (איור 5D). בבלוטות שבוצעה בהן ההוקעה נמצא עומס מיקרוביאלי גבוה  $>10^6$  CFUs/g התגובה הדלקתית שאופייה על ידי כימות הביטוי של גנים כמו:  $IL1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $KC$ ,  $MIP2$ ,  $iNOS$ ,  $ICAM1$ ,  $IL6$ ,  $IL10$ ,

$A20$ ,  $IkB\alpha$  genes בנוסף עקבנו אחר המצאות של נוטרופילים בחללי החלב ברקמת העטין שנצפה על ידי הביטוי היחסי של הגן  $Ly6G$  וגם על ידי האנליזה ההיסתופתולוגית של רקמת העטין. בטיפול בפטיד  $DL^DK5+P$  נראה שהעומס המיקרוביאלי בשתי בלוטות מתוך השש (2/6) היה אפסי (איור 4A). נצפתה עלייה משמעותית בתגובה הדלקתית בארבע מתוך שש הבלוטות שטופלו כפי שנראה בביטוי היחסי של גנים שונים (איור 2B). מעניין מאוד היה לראות כי רמות הביטוי של הגנים  $ICAM1$ ,  $A20$  ו  $IkB\alpha$  ירדו משמעותית בבלוטות המטופלות. בנוסף הביטוי היחסי של הגנים  $IL6$  ו  $C3$  עלו משמעותית ביחס לביקורת בבלוטות המטופלות (איור 2C). בעזרת מיקרוסקופ פלורסנטי צפינו שתערובת הפטידים שסומנה בפלורסאין חדרה לתאי האפיתל של בלוטת העטין ונקשרה ל F-actin, בלי להשפיע על המורפולוגיה של התאים. בנוסף ראינו שתערובת הפטיד נקשרת לחיידקי P4-NR $\Delta$ galU בבלוטה (איור 2D).



**Figure 5:  $D^1L^1K5+P$  has dual mechanisms of action in BALB/c mice mastitis model.** The ability of  $D^1L^1K5+P$  to treat mastitis was tested in the established BALB/c mice mastitis model. Three lactating BALB/c mice (Six glands) were challenged IMM with approximately  $\sim 10^4$  CFUs of MPEC *E. coli* P4-NR $\Delta galU$ /pKB4985 bacteria expressing mCherry fluorescent protein and treated IMM with 1 mg  $D^1L^1K5+P$  AMPs mixture in 100  $\mu$ l DPBS 3hr post challenge. (A) Reduction of bacterial load within mammary glands after  $D^1L^1K5+P$  treatment. (B and C) Expression levels of inflammatory

modulators genes. Mammary tissues were fixed 24 h post challenge, stained for DNA (DAPI) and F-actin (Phalloidin-iFlour 647), and analyzed by fluorescent microscopy (D). Cryosections demonstrates  $^{\Delta}L^{\Delta}K5+P$  conjugated to Fluorescein fluorophore (green) interactions in the mammary gland with MAECs and bacteria.  $^{\Delta}L^{\Delta}K5+P$  was shown to penetrate the MAECs and interact with their F-actin, however without affecting the cells morphology.  $^{\Delta}L^{\Delta}K5+P$  was also shown to co-localize with extracellular and intracellular MPEC P4-NR $\Delta galU$  bacteria expressing mCherry (red) within the mammary glands. IBCs in MAECs is indicated by yellow arrows and phagocytized bacteria by neutrophils in white arrows. Each data point represents a single gland, and the horizontal bars indicate the median of the data (n=6 in each experiment). Statistical significance was determined by non-parametric Mann-Whitney two-independent-samples. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.001$

**תמונה 5:** לפפטיד הרנדומלי מסוג  $^{\Delta}L^{\Delta}K5+P$  יש פעילות כפולה במודל של דלקת עטין בעכברות מניקות BALB/c. יכולת הפפטיד לעכב דלקת עטין נלמדה במודל שהוקם ובוסס במעבדה של פרופ' נחום שפיגל. שלוש עכברות מניקות (שש בלוטות עטין) אולחו ישירות לעטין ב  $10^4$  CFUs of MPEC *E. coli* P4-NR $\Delta galU/pKB4985$  mCherry וטופלו ב 1 מ"ג של פפטיד  $^{\Delta}L^{\Delta}K5+P$  מומס ב 100 מיקרוליטר DPBS שלוש שעות אחרי האילוח. (A) הפחתת עומס חיידקים בבלוטות החלב לאחר טיפול DLDK5+P. (ב' ו-ג') רמות ביטוי של גנים מווסתים דלקתיים. רקמות החלב עברה פיקסציה 24 שעות לאחר האתגר, נצבעו לדנ"א בעזרת (DAPI) ו-F-אקטין (Phalloidin-iFlour 647), ונותחו בעזרת מיקרוסקופיה פלואורסצנטית (D). חתכים שנלקחו מהרקמה הראו DLDK5+P מסומן בירוק בבלוטת החלב עם MAECs וחיידקים. הודגם כי הפפטיד DLDK5+P חודר לתאי-MAECs ונקשר ל-F-אקטין, אולם מבלי להשפיע על המורפולוגיה של התאים. כמו כן, הודגם כי הפפטיד DLDK5+P משתלב עם חיידקי MPEC P4-NR $\Delta galU$  חוץ-תאיים ותוך-תאיים המבטאים mCherry (אדום) בתוך בלוטות החלב. IBCs ב MAECs מסומן על ידי חיצים צהובים חיידקים phagocytized על ידי נויטרופילים בחצים לבנים. כל נקודת נתונים מייצגת בלוטה אחת, והפסים האופקיים מציינים את החציון של הנתונים (n=6 בכל ניסוי). המובהקות הסטטיסטית נקבעה על ידי מדגמים לא פרמטריים של מאן-וויטני דו-בלתי תלויים. \* $P < 0.001$  \*\* $P < 0.05$

## דין

במחקר הנוכחי ביססנו מודל חדש של דלקת עטין עם זן שונה של חיידק א. קולי אשר הראנו שתערובת הפפטידים פוגעת בו ביעילות רבה בחלב. לאחר שביססנו את המודל של דלקת עטין בעכברות מניקות עם זן זה והראנו על ידי מספר מבחנים שהתקבלה דלקת כמעט דומה לזן האי. קולי שהשתמשנו בו עד היום. בהתבסס על פירסומים קודמים [15] הראנו לראשונה כי זן MPEC כגון galU $\Delta$  הוא זן וירולנטי בעכברות עם פעילות נמוכה של מערכת החיסונים המשלים כמו ב BALB/c. במעבדתו של פרופ' שפיגל הציעו בעבר כי תאי אפיתל החלב ככל הנראה רגישים יותר להפעלה בתגובה לזני MPEC, מה שעשוי להסביר חיסול מוקדם יותר ויכולת נמוכה יותר לחיות בבלוטת החלב של MPEC P4-NR $\Delta galU$  בהשוואה לזן WT (Salamon et al., 2020). עלייה בפגוציטוזה וחיסול על ידי מקרופאגים ונויטרופילים של החיידקים ה rough כבר דווח בספרות בעבר [16-19]. היכולת של פפטידים אנטימיקרוביאליים להגן מבפני זיהום הראה שיוסות התגובה של המערכת החיסונית הוא אסטרטגיה נוספת לפיתוח פפטידים אנטימיקרוביאליים [20]. מצד אחד הפפטידים האנטימיקרוביאליים יכולים להרוג בצורה ישירה חיידקים שעלולים לגרום לזיהום אך הפפטידים האלו יכולים גם לווסת ולשנות את המערכת החיסונית של המאכסן על ידי השפעה של ביטוי

גנים שונים שמשרים חלוקה מוגברת של תאי מערכת החיסון ו chemotaxis לטיפול בזיהום והורדת הדלקת. [21]

לאור התוצאות האלו, מספר פפטידים אנטימיקרוביאליים נחקרו ביכולת שלהם לשמש כטיפול לדלקות עטין. פפטידים אנטימיקרוביאליים שבודדו מ: עגל כמו cathelicidins, LL-37, אנושי, Esculentin 1–21 מצפרדע, plectasin-derived (NZ2114 and MP110), thionin Thi2.1 מצמחים, [22-29] מבין הפפטידים שנבחנו לטיפול בדלקות עטין, חלקם הראו יעילות מוגבלת והמשך מחקר נדרש לשפר את פעילותם משום שעד היום לא פותח טיפול אשר מתבסס על פפטיד אנטימיקרוביאלי לטיפול בדלקות עטין. במחקר הנוכחי למדנו לראשונה את היעילות של הפפטידים האנטימיקרוביאליים הרנדומליים שפותחו במעבדתו של פרופ' צבי חיוקה לטיפול בדלקות עטין. תערובות פפטידים אלו הראו יעילות גבוה מאוד במבחנה ובמודלים של עכברים כנגד מגוון רחב מאוד של חיידקים. היתרון המרכזי בשימוש בתערובות הפפטידים האלו הם: 1. קלות הסינתזה וייצור בכמויות גדולות במחירים נמוכים מאוד בהשוואה לפפטיד עם רצף מסוים שדורש ניקוי ב HPLC. 2. לאחרונה דיווחנו כי השימוש בתערובות פפטידים מאט מאוד את קצב פיתוח העמידות של החיידקים כנגד התערובות הללו וזה יתרון משמעותי מאוד לחומר אנטימיקרוביאלי חדש. במחקר הנוכחי למדנו לעומק על הפעילות של תערובות הפפטידים בבלוטת העטין לפני ולאחר הוקעה. למדנו כי בחלק מהבלוטות היתה ירידה משמעותית בעומס מיקרוביאלי וגם בביטוי של מספר גנים המקושרים להתפתחות דלקת בבלוטת העטין. בגלל שהירידה בעומס לא היתה בכל הבלוטות המטופלות יש צורך במחקר המשך. בעתיד נצטרך ללמוד משטרי טיפול שונים על מנת למקסם את הפעילות של תערובת הפפטידים בבלוטת עטין לקבל פעילות גבוה יותר בהמשך. התוצאות שהתקבלו במחקר הנוכחי הן מעניינות מאוד וחדשניות בתחום ומעידות על הפוטנציאל הרב הטמון בשימוש בתערובות האלו לטיפול בזיהומים שונים בעכברים ואולי בעתיד גם בבני אדם.

## **Materials and methods**

### **1. Synthesis of AMPs mixtures**

AMPs mixtures were synthesized in SPE polypropylene single-Fritted tubes (Altech), on Rink amid resin (0.6 mmol/g substitution, 0.1 mmol scale) (Chem Impex International Incorporated, USA), using microwave irradiation (MARS: CEM, USA). Coupling reactions were conducted with binary combinations of Fmoc-protected amino acids (Chem Impex, USA) according to Hayouka *et al.* Stock solution containing L\|D-leucine (L) and L\|D-lysine (K) protected amino acids in 1:1 molar ratio of each amino acid was freshly prepared for each coupling step. Prior to coupling, an aliquot containing 2 equivalents from each amino

acid (0.2 mmol) of the amino acid mix was activated with 4 equivalents (0.4 mmol) of *N,N,N',N'*-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uranium hexafluorophosphate (HBTU) and 8 equivalents (0.8 mmol) of *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) in dimethylformamide (DMF). The activated amino acids solution was then added to the solid-phase synthesis resin, and the reaction mixture was heated to 70°C in a MARS VI multimode microwave (2-minute ramp to 70°C, 4-minute hold at 70°C) with stirring. Fmoc deprotection was achieved by adding 20% piperidine in DMF and heating the solution to 80°C in the microwave (2-minute ramp to 80°C, 3-minute hold at 80°C) with stirring. After each coupling/deprotection cycle, the resin was washed 3 times with DMF (20 coupling steps for LK20 AMPs mixture and 5 coupling steps for LK5+P AMPs mixture).

Upon completion of the 5-mer AMPs mixture (LK5+P) synthesis, addition of 5(6)-Carboxyfluorescein (ACROS ORGANICS) and palmitic fatty acid were conjugated using coupling of **Fmoc-Lys-(Mtt)-OH (Sigma, Israel)** to the N-terminus of the peptides. Firstly, the Mtt group was removed from the side chain by incubating the protected peptides in 50 ml tube with 1% TFA in DCM for 10 minutes with shaking, thus allowing selective removal in the presence of other side-chain protecting groups, which require up to 95% TFA for removal. Next, the TFA was washed from the Fmoc-protected amino acid in the filter tubes and then 5(6)-Carboxyfluorescein fluorophore was coupled overnight by amino acid coupling as described above with 4 equivalents (0.4 mmol) of the fluorophore. Secondly, the palmitic acid was conjugated by Fmoc deprotection as described above and then coupling overnight the palmitic acid the same as amino acid coupling with 4 equivalents (0.4 mmol) of the palmitic acid.

Next, the peptide mixtures were cleaved from the resin by three hours incubation with stirring, in a solution containing 95% (v/v) trifluoroacetic acid, 2.5% (v/v) water, and 2.5% (v/v) triisopropylsilane. The peptide mixture was then precipitated from the trifluoroacetic acid (TFA) solution by the addition of cold ether and harvested by centrifugation. Ether was removed, and the pellet was dried under a nitrogen stream, frozen in liquid nitrogen, and lyophilized. The AMPs mixtures were then analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to evaluate the AMPs mixtures desired range of molecular weight.

## **2. Assessment of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values**

To determine the antimicrobial activity of the AMPs mixtures MIC and MBC values were measured for the strains described in Table 1. Bacteria were grown on Luria Bertani broth (LB, Difco) agar plates at 37°C for 24 h after which one isolated bacteria colony was transferred to 10 ml LB medium for overnight growth at 37°C with shaking at 110 rpm. AMPs mixtures were added to the upper wells and serial 2-fold diluted in 96 well plate.

For MIC in LB medium, the bacterial cultures were diluted 1:100 in LB to approximately  $\sim 10^6$  CFUs/ml and added to each well. The plates were then incubated at 37°C and bacterial growth was determined by measuring the O.D at 600nm using SpectraMax i3 multiple detection microplate reader (Molecular Devices, CA USA). The MIC values determined as the lowest concentrations of the peptide mixtures that show complete inhibition of bacterial growth by O.D readings.

For MIC in bovine raw milk, fresh raw milk was aseptically collected from a healthy cow from the Volcani Center and seeded on blood and MacConkey agar plates for microbiology assessment. The bacterial cultures were diluted 1:1000 in the fresh milk to approximately  $\sim 10^5$  CFUs/ml and added to each well. The plates were then incubated at 37°C for 24 h and bacterial growth was determined by serial 10-fold dilutions on LB agar plates. MIC values were determined as the average obtained from three independent experiments, with three replicates per strain/concentration combination in each experiment. For determination of MBC values in milk 5  $\mu$ l were taken from each well and plated on LB agar plates in triplicates. The MBC values were determined as the average lowest concentration of AMPs that rendered no bacterial growth.

## **3. Growth curves**

Bacteria were grown on Luria Bertani broth (LB, Difco) agar plates at 37°C for 24 h after which one isolated bacteria colony was transferred to 10 ml LB medium for overnight growth at 37°C with shaking at 110 rpm. Bacteria were then diluted 1:100 in LB to approximately  $\sim 10^6$  CFUs/ml, incubated in LB media at 37°C 360 minutes and measured for their growth every 20 minutes by O.D readings (600nm) using SpectraMax i3 multiple detection microplate reader.

#### 4. **Bacterial strains and plasmids**

Bacterial strains used in this project are described in Table 1. All strains were cryopreserved in 20% glycerol at -80<sup>0</sup> C until further processing. Bacteria were transformed with plasmid pKB4985 which is based on pACYC184 constitutively expressing mCherry (low levels) and include chloramphenicol resistance gene. Construction of P4-NR $\Delta galU$  and P4-NR $\Delta galE$  mutants were obtained by Israel Nisan in Shpigel *et al.* lab by P1<sub>vir</sub> bacteriophage transduction from BW25113 (Keio Collection strain background).

**Table 1 - Bacterial strains and plasmids**

Name in text	Description	Origin
P4-NR	Mastitis associated <i>E. coli</i> strain P4-NR wild-type (serotype O15:H21H54)	Isolated from the milk of experimentally infected dairy cow (Leimbach et al., 2017)
P4-NR $\Delta galE$	Mastitis associated <i>E. coli</i> strain P4-NR $\Delta galE$ (serotype O15:H21H54)	Obtained by P1 <sub>vir</sub> bacteriophage transduction from BW25113 (Keio Collection strain background) and also include kanamycin resistance gene (Baba et al., 2006)
P4-NR $\Delta galU$	Mastitis associated <i>E. coli</i> strain P4-NR $\Delta galU$ (serotype O15:H21H54)	Obtained by P1 <sub>vir</sub> bacteriophage transduction from BW25113 (Keio Collection strain background) and also include kanamycin resistance gene (Baba et al., 2006)



pKB4985	mCherry low copy number plasmid	Plasmid based on pACYC184 constitutively expressing mCherry (low levels) and also include chloramphenicol resistance gene (Mills et al., 2013)(Schlosser-Silverman et al., 2000)
---------	---------------------------------	--

## **5. Acriflavine agglutination test**

The acriflavine agglutination test (AAT) was used to distinguish between smooth and rough strains (Glynn and Priest, 1970). Approximately 10 µl of 1 mg/ml aqueous solution of acriflavine (Sigma, Israel) was mixed with 10 µl of bacterial cell suspension ( $\sim 10^{10}$  cells/ml) on glass slides. The absence of agglutination indicates a smooth culture while agglutination was clearly visible with rough bacteria strains.

## **6. Preparation of NF-κB luminescence reporter system**

EpH4 cells were transduced with NF-κB reporter vector to express luciferase gene controlled by NF-κB response element using lentivirus technology (Salamon et al., 2020).

To create lentiviral NF-κB reporter vector, a target plasmid (transfer vector) was constructed to express luminescence reporter in mouse mammary epithelial cell line (EpH4) derived from BALB/c mice (ATCC CRL-3209). HEK239T cells (ATCC CRL-3216) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) media (Biological Industries), supplemented with 10% FBS (Biological Industries) 1% Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (Biological Industries) 1% L-glutamine solution (Biological Industries) 0.1 mM Non-essential Amino acids (Sigma) 0.5 mg/ml G418 (Sigma) and 0.1 mM sodium pyruvate. A day before the transfection the HEK293T were plated in a 15 cm culture dish after which a plasmid mix of 20 µg of DNA containing the plasmids p65-human GFP,RRE,VSVG and REV (2:2:1:4 respectively, all from Michel White lab, Manchester) was suspended in solution containing 150 mM NaCl (J.T Baker) for 10 minutes, in room temperature. Then an equal volume of 7 mM Polyethyleneimine (PEI) solution (Sigma) was added to the plasmid mix and incubated for 10 minutes prior to dripping on the HEK293T cells. Next, the cells were incubated overnight at 37°, 5% CO<sub>2</sub>. The following day the solution was replaced with

fresh media containing 2% FBS and the cells were incubated for an additional 48 hours. Then, media was removed and passed through a 0.4  $\mu\text{m}$  sieve and ultracentrifuged (21,000 rpm, 4°, 2 hours). The viral pellet was suspended in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) and frozen in -80°.

To transduce EpH4 cells with the NF- $\kappa$ B reporter vector, cells were cultured in DMEM media supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) Pen-strep, and 1% (v/v), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer 1M (all purchased from Biological Industries) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. A day before the transfection, 10<sup>5</sup> EpH4 cells were plated in 6-well plate. On the next day, the cells were supplemented with 20  $\mu\text{l}$  of lentiviral particles and Hexadimethrine bromide (Polybrene) and incubated for 72 hours at 37° with 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation, media was removed, and viral particles were washed through repeated rinsing with DPBS. When the EpH4 cells, now relabeled as EpH4/NF- $\kappa$ B transduced cells, reached confluence, they were centrifuged, re-suspended in supplemented DMEM, and plated in 10 cm culture dishes. Stable transduction was determined following incubation of the cells with serial dilution of LPS (from *E. coli* serotype O55:B5, Sigma, Rehovot, Israel) by quantifying the cells bioluminescence signals in the presence of 150  $\mu\text{g/ml}$  D-luciferin (GoldBio) using SpectraMax i3 multiple detection microplate reader. For preservation, cells were centrifuged and resuspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) Pen-strep, and 1% (v/v) HEPES buffer 1M media with 10% sterile dimethyl sulphoxide (DMSO) and cooled for 30 minutes at -20°C before deep freezing at -80°C.

After I had validated that the EpH4 cells were successfully transduced with the lentivirus NF- $\kappa$ B reporter vector, EpH4/NF- $\kappa$ B transduced cells were monocultured were cultured in supplemented DMEM at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> at equal density in 96-well plate (~10<sup>5</sup> in each well). After 24 hours, the cells were incubated for 2 h with different concentrations of LPS (0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ ), Polymyxin B (PMB) (Sigma) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and AMPs mixture <sup>D</sup>L<sup>D</sup>K5+P (10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Once membranal TLR is being activated, NF- $\kappa$ B proteins translocate into the nucleus, where they promote the expression of luciferase

enzyme. When luciferin is added and cleaved by the luciferase enzyme, a strong luminescent reaction occurs and is quantified using SpectraMax i3 multiple detection microplate reader

### **Cells viability**

Cells viability was determined using MTT colorimetric assay (Sigma). This method is based on the reduction of the tetrazolium salt, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) into a crystalline blue formazan product by the cellular oxidoreductases of viable cells. The resultant formazan crystal formation is proportional to the number of viable cells. Following 2 h incubation with the different treatments in the NF- $\kappa$ B luminescence reporter assay, EpH4/NF- $\kappa$ B transduced cells were washed to remove test compounds and were then incubated with 100  $\mu$ l of MTT solution (0.5 mg/ml) in supplemented DMEM without phenol red at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 1.5 h. Then 100  $\mu$ l of DMSO was added to all the wells and the plate was then incubated for 10 min at 37 °C in dark conditions with shaking at 110 rpm. The absorbance was read at 600nm using SpectraMax i3 multiple detection microplate reader and cell viability was normalized against the untreated samples in the experiment.

### **7. Murine mastitis model**

Twelve- to fourteen-week-old female BALB/c mice were used in this project (Harlan, Israel). All mice were maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions and handled under protocols approved by the Hebrew University Animal Care Committee, according to international guidelines. IACUC approvals were obtained prospectively (Ethics Committee for Animal Experimentation, Hebrew University of Jerusalem; MD-18-15523-3). Bacterial intramammary challenge was performed 7–10 days post-partum. The pups were removed 1h before bacterial inoculation of mammary gland. Mice were anesthetized (1.5 - 2.5% isoflurane in O<sub>2</sub>) and then challenged and/or treated by intramammary (IMM) infusion through the teat canal both in L4 (on the left) and R4 (on the right) abdominal mammary glands (the fourth pair found from head to tail). Injections conducted under a binocular using 30  $\mu$ l insulin syringes with a 33-gauge blunt needle. Mice were sacrificed 24 hours post

challenge and mammary tissues were trisected for histology, total RNA extraction and total bacterial counts.

## **8. Preparation of bacteria challenge dose**

Bacterial strains used in this project are described in Table 1. All strains were grown on Luria Bertani (LB, Difco) agar plates at 37°C for 24 h after which one isolated bacteria colony was transferred to 10 ml of LB broth for overnight growth at 37°C with shaking at 110 rpm. To select for mutant strains or carriage of plasmids, growth medium was supplemented with kanamycin (50 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml). Pre-cultured bacteria were diluted 1:100 with fresh LB broth and grew to log phase for 3h at 37° C with shaking at 110 rpm. Next, culture was centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm and bacteria were washed twice with sterile PBS. Bacteria were resuspended in sterile PBS and inoculum, approximately  $\sim 10^4$  CFUs in 50 µl of sterile PBS, was prepared and kept on ice till the IMM challenge. Challenge was quantified and confirmed by plating the inoculum as serial 10-fold dilutions on LB agar plates. AAT was used for further validating the challenge of smooth or rough bacteria.

## **9. Bioluminescence and fluorescence Imaging**

In vivo imaging of IMM challenged mice was performed 24 hours after infection. Mice were injected intraperitoneally with 200 mg/kg luminol (Santa Cruz Biotechnology, TX USA) 10 minutes before bioluminescence imaging of neutrophil recruitment. The mice were anesthetized (1.5 - 2.5% isoflurane in O<sub>2</sub>) and a whole-body image was acquired using IVIS Lumina Series III (PerkinElmer Inc., MA USA) with excitation/emission filters blocked/open for luminescence (luminol), 560/620 for mCherry fluorescence and 460/520 for milk autofluorescence. Next, the mice were sacrificed, the mammary glands were exposed, and imaging was repeated as described above. Living Image Software version 4.4 (Caliper LifeSciences, MA, USA) was used to display each image as a false-color photon-count image superimposed on a grayscale anatomic image. ROI were drawn around each individual mammary gland and counts in the ROI detected by CCD camera digitizer

were converted to physical units of radiance in photons/s/cm<sup>2</sup>/steradian per  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

## **10. Histopathological analysis and microscopy**

Samples for histopathological analysis were fixed in neutral buffered 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4 °C, paraffin-embedded and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For fluorescence staining samples were fixed in neutral buffered 2.5% PFA overnight at 4 °C, incubated with 30% sucrose in PBS at 4 °C for another 3 days and frozen in optimal cutting temperature compound (OCT). Cryosections were then stained with solution of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phalloidin-iFlour 647 (Abcam) to visualize filamentous actin (F-actin) and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, Israel) to visualize nuclear DNA in a solution containing 79.5% (v/v) PBS, 20% (v/v) donkey serum and 0.5% (v/v) triton X100. Then they were mounted overnight and then imaged with M1 Imager Axio epifluorescence microscope using an MRm Axio camera (Zeiss) and processed in the Zen software. Filters excitation (Ex) and emission (Em) were applied as follows: for DAPI Ex: 335-383nm Em: 420-470nm, for Fluorescein Ex: 450-490nm Em: 500-550nm for mCherry, Ex: 538-562nm Em: 570-640nm, for phalloidin-iFlour 647 Ex: 625-655nm Em: 665-715nm.

## **11. Bacterial counts**

For challenge assays, mammary tissues were weighed and homogenized on ice in 1 mL sterile PBS immediately after removal. For the treatment assay with <sup>D</sup>L<sup>D</sup>K5+P AMPs mixture tissues were weighed and homogenized on ice in 20 mL sterile PBS immediately after removal to avoid Ex vivo effects on bacterial counts. For total bacterial counts, gland homogenates were plated as serial 10-fold dilutions on selective and non-selective LB agar plates (supplemented with and without chloramphenicol (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for the WT strain and with addition of kanamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for the rough strain) and then incubated overnight at 37 °C to determine CFUs/g counts. AAT was also used for further validating the smooth and rough bacteria strains.

## **12. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

Total RNA was isolated from mammary tissue using the GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma, Rehovot, Israel) combined with on-Column DNase I Digestion Set (Sigma). Reverse transcription was performed using qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) and cDNA was used for subsequent real-time PCR reactions. RT-qPCR was conducted on a StepOne Plus PCR instrument (Applied Biosystems) using the FAST qPCR Universal Master Mix (Kappa Biosystems, Boston, MA, USA). PCR primers used in this project are listed in Supplementary Table 1. All PCR primers were designed in our lab and validated. All reactions were performed in triplicates and the gene expression levels for each amplicon were calculated using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001) and normalized against 3 housekeeping genes (Eef1a1, PTMA, UBC). Melting curve analysis was performed on each primer set to confirm amplification of a single product.

## **13. Statistics**

Median bacterial loads and genes relative expression were calculated at 24 h post challenge. Experimental groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney two-independent-samples test. Values were first subjected to a square root transformation, the values did not follow a normal distribution, and therefore, non-parametric statistics was used. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.) and a P value of 0.05 or less was considered significant.

## פירוט:

1. Bar D, Tauer LW, Bennett G, Gonzalez RN, Hertl JA, Schukken YH, Schulte HF, Welcome FL, Grohn YT: The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *J Dairy Sci* **2008**, 91(6):2205-2214.
2. Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H: Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *The Veterinary quarterly* **2007**, 29(1):18-31.
3. Diamond, G, Beckloff N, Weinberg A and Kisich KO. **2009**. *Curr. Pharm. Design* 15, 2377-2392.
4. Ferre R, Badosa E, Feliu L, Planas M, Montesinos E and Bardaji E. **2006**. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3302-3308.
5. Haney EF, Hancock RE. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*. **2013**,100(6):572-83.
6. Hayouka Z, Chakraborty S, Liu R, Boersma MD, Weisblum B and Gellman SH. **2013**. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 11748-11751.
7. Topman S, Bochnick Tamir H, Burdman S and Hayouka Z. Random peptide mixture as crop protection agents. *Microbial biotechnology*, **2018**.
8. Hayouka Z, Bella A , Stern T, Ray S, Jiang H, Grovenor CRM , Ryadnov MG. Binary encoding of random peptide sequences for selective and differential antimicrobial mechanisms. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2017**, 56, 8099-8103.
9. Stern T, Zelinger E, Hayouka Z. Random peptide mixtures inhibit and eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Chem Commun (Camb)*. **2016**, 52(44):7102-5.
10. Gonen E, Vallon-Eberhard A, Elazar S, Harmelin A, Brenner O, Rosenshine I, Jung S, Shpigel NY: Toll-like receptor 4 is needed to restrict the invasion of *Escherichia coli* P4 into mammary gland epithelial cells in a murine model of acute mastitis. *Cellular microbiology* **2007**, 9(12):2826-2838.
11. Mintz M, Mintz D, Ilia-Ezra R, Shpigel NY: Pam3CSK4/TLR2 signaling elicits neutrophil recruitment and restricts invasion of *Escherichia coli* P4 into mammary gland epithelial cells in a murine mastitis model. *Vet Immunol Immunopathol* **2013**, 152(1-2):168-175.
12. Nissim-Eliraz E, Nir E, Shoval I, Marsiano N, Nissan I, Shemesh H, Nagy N, Goldstein AM, Gutnick M, Rosenshine I et al: T3SS-dependent microvascular thrombosis and ischemic enteritis in human gut xenografts infected with nteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **2017**.
13. Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY: Neutrophil recruitment in endotoxin-induced murine mastitis is strictly dependent on mammary alveolar macrophages. *Vet Res* **2010**, 41(1):10.
14. Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY: Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res* 2010, 41(4):53.
15. Salamon, H., Nissim-Eliraz, E., Ardonai, O., Nissan, I., & Shpigel, N. Y. The role of O-polysaccharide chain and complement resistance of *Escherichia coli* in mammary virulence. *Veterinary research*, **2020**, 51(1), 77.
16. Russo, T. A., Davidson, B. A., Topolnycky, D. M., Olson, R., Morrill, S. A., Knight, P. R., 3rd, & Murphy, P. M. Human neutrophil chemotaxis is modulated by capsule and O antigen from an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and immunity*, **2003**, 71(11), 6435–6445.
17. Eder, K., Vizler, C., Kusz, E., Karcagi, I., Glavinas, H., Balogh, G. E., Vigh, L., Duda, E., & Gyorfy, Z. The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, **2009**, 389(1), 46–51.

18. Saldías, M. S., Ortega, X., & Valvano, M. A. Burkholderia cenocepacia O antigen lipopolysaccharide prevents phagocytosis by macrophages and adhesion to epithelial cells. *Journal of medical microbiology*, **2009**, 58(Pt 12), 1542–1548.
19. Pieterse, E., Rother, N., Yanginlar, C., Hilbrands, L. B., & van der Vlag, J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in immunology*, **2016**, 7, 484.
20. Haney, E. F., & Hancock, R. E. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*, **2013**, 100(6), 572–583.
21. Brandenburg, K., Heinbockel, L., Correa, W., & Lohner, K. Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. *Biochimica et biophysica acta*, **2016**, 1858(5), 971–979.
22. Zhang, J. X., Zhang, S. F., Wang, T. D., Guo, X. J., & Hu, R. L. Mammary gland expression of antibacterial peptide genes to inhibit bacterial pathogens causing mastitis. *Journal of dairy science*, **2007**, 90(11), 5218–5225.
23. Islas-Rodriguez, A. E., Marcellini, L., Orioni, B., Barra, D., Stella, L., & Mangoni, M. L. Esculentin 1-21: a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, **2009**, 15(9), 607–614.
24. Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Mazzilli, M., D'Este, F., Tossi, A., & Zanetti, M. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infection and immunity*, **2010**, 78(4), 1781–1788.
25. Cubeddu, T., Cacciotto, C., Pisanu, S., Tedde, V., Alberti, A., Pittau, M., Dore, S., Cannas, A., Uzzau, S., Rocca, S., & Addis, M. F. Cathelicidin production and release by mammary epithelial cells during infectious mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **2017**, 189, 66–70.
26. Li, L., Wang, L., Gao, Y., Wang, J., & Zhao, X. Effective Antimicrobial Activity of Plectasin-Derived Antimicrobial Peptides against *Staphylococcus aureus* Infection in Mammary Glands. *Frontiers in microbiology*, **2017**, 8, 2386.
27. Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. *International immunopharmacology*, **2018**, 57, 47–54.
28. Wang, X., Teng, D., Wang, X., Hao, Y., Chen, H., Mao, R., & Wang, J. Internalization, distribution, and activity of peptide H2 against the intracellular multidrug-resistant bovine mastitis-causing bacterium *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, **2019**, 9(1), 7968.
29. Cavalcante, P. A., Knight, C. G., Tan, Y. L., Monteiro, A., Barkema, H. W., & Cobo, E. R. Cathelicidins Mitigate *Staphylococcus aureus* Mastitis and Reduce Bacterial Invasion in Murine Mammary Epithelium. *Infection and immunity*, **2020**, 88(7), e00230-20.