

Received: 2008.10.19
Accepted: 2008.12.19
Published: 2008.12.22

Defensyny i katelicydyny jako naturalne antybiotyki peptydowe

Defensins and cathelicidins as natural peptide antibiotics

Danuta Witkowska, Arkadiusz Bartyś, Andrzej Gamian

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L.Hirszfelda
we Wrocławiu

Streszczenie

Defensyny i katelicydyny należące do peptydów antydrobnoustrojowych (PAD), nazywane są także naturalnymi antybiotykami. Występują one u Prokariota i Eukariota. Opisano je u bakterii, roślin, bezkręgowców, kręgowców, także ssaków, a wśród nich u człowieka. Znana jest sekwencja około 880 peptydów antydrobnoustrojowych, a klasyfikacja ich jest trudna i różnorodna. Są to oligo- i polipeptydy, które zabijają drobnoustroje lub hamują ich wzrost, działają bakterio-bójczo na bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie, neutralizują toksyny, działają antywirusowo. Spełniają wiele funkcji, stanowią pierwszą linię obrony u człowieka jako efekторы odporności nieswoistej, charakteryzują się szerokim zakresem działania, chronią przed patogenami i kontrolują naturalną florę, często działają synergistycznie. Wytwarzane przez różne komórki mogą stanowić ochronę przed mechanizmami oporności drobnoustrojów. Działają też chemotaktycznie na neutrofile i komórki T, aktywują komórki dendrytyczne. U człowieka defensyny występują w wielu komórkach i tkankach, są w neutrofilach i płytkach krwi, w komórkach nabłonkowych, w wątrobie, skórze oraz w spojówce oka. Niedobory defensyn czy katelicydyn u człowieka są jedną z przyczyn wystąpienia objawów chorobowych w przypadku alergii atopowych oraz w chorobie Kostmana. Wiele syntetyzowanych peptydów znajduje się w ostatniej fazie badań klinicznych w leczeniu różnych infekcji bakteryjnych. Defensyny i katelicydyny mogą być atrakcyjne także jako potencjalne adiuwanty lub nośniki szczepionek, w przemyśle spożywczym jako konserwanty. W pracy przedstawiono niektóre zagadnienia związane z występowaniem PAD w przyrodzie ze szczególnym uwzględnieniem defensyn i katelicydyn ssaków, ich klasyfikacji, struktury, różnorodnych funkcji oraz mechanizmów działania, a także ich zastosowania w leczeniu niektórych schorzeń.

Słowa kluczowe:

peptydy antydrobnoustrojowe • PAD • kationowe peptydy • defensyny • katelicydyny • naturalne antybiotyki • odporność wrodzona • chemotaksja • leukocyty • defensyny ssaków • defensyny człowieka • α - i β -defensyny

Summary

Defensins and cathelicidins belong to antimicrobial peptides (AMP), called also the natural antibiotics. They are found in Prokaryotes and Eukaryotes, also are synthesized in plants. These molecules were described in bacteria, invertebrates, vertebrates, also in mammals including humans. The amino-acids sequence is determined for about 880 antimicrobial peptides, and their classification is difficult and complex. These oligo- and polypeptides, are killing the microbes or inhibit their growth, are bactericidal to Gram-negative, Gram-positive bacteria, neutralizing toxins, demonstrated antiviral activity. AMP are multifunctional molecules, playing the first line of defense in human organism as effectors of unspecific immunity, with a broad spectrum of activity against pathogens, are characterized by controlling the physiological bacterial flora, often acting

synergistically, are produced in different cells as defense against mechanisms of microbial resistance. They are chemotactic to neutrophils and T cells, activate the dendritic cells. In human organism defensins are expressed in several cells and tissues, in neutrophils, platelets, epithelial cells, in liver, skin, eye conjunctiva. Deficiency of defensins or cathelicidins cause pathological symptoms in atopic allergies or in Kostman disease. Several synthetic peptides are currently at the final phases of clinical trials regarding treatment of various bacterial infections. Defensins or cathelicidins could be also efficient as adjuvants or carriers for vaccines, in dairy industry as preservatives. This work presents some problems concerning the occurrence of AMP, especially defensins and cathelicidins of mammals, their classification, structure, various functions and mechanisms of bactericidal activity, and also their use in treatment of some infectious diseases.

Key words: antimicrobial peptides • cationic peptides • defensins • cathelicidins • natural antibiotics • innate immunity • chemotaxis • leukocytes • α - and β -defensins

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=876126>

Word count: 4832

Tables: 4

Figures: 4

References: 111

Adres autorki: dr hab. Danuta Witkowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: witkows@iitd.pan.wroc.pl

1. WYSTĘPOWANIE PAD W PRZYRODZIE I ICH KLASYFIKACJA

Organizmy żywe w przyrodzie każdego dnia są narażone na działanie zarówno wielu niekorzystnych czynników środowiska, takich jak: zmiany temperatury czy pH, brak substancji odżywczych, jak i na zakażenia spowodowane przez patogenne drobnoustroje. Mimo to wielokomórkowe organizmy żywe żyją w przyrodzie w pełnej harmonii z otaczającymi je drobnoustrojami. W rogowce zwierząt nie ma śladów infekcji [45], a owady żyją swobodnie, chociaż nie mają ani limfocytów ani przeciwciał. Nasiona roślin zaopatrzone w działające antydrobnoustrojowo cząsteczki (defensyny: Rs-AFP1, Rs-AFP2 [17]) rozsiewają się w przyrodzie bez większych trudności [37,110]. Zwierzęta, człowiek i rośliny żyjąc wśród drobnoustrojów rozwinęły wiele skutecznych sposobów obrony. W ewolucji widoczna jest stała tendencja wielu organizmów żywych nie tylko do zachowania już istniejących mechanizmów obronnych, ale też do ich udoskonalania [14,109]. Należy zauważyć, że w pracach przeglądowych autorzy często skupiają się na przedstawieniu problemów związanych z odpowiedzią na pytanie dlaczego ludzie, zwierzęta czy rośliny chorują. W tej pracy natomiast chcielibyśmy przybliżyć problem dotyczący odpowiedzi na pytanie dlaczego ludzie, zwierzęta czy rośliny nie chorują stale. Próba odpowiedzi na to pytanie będzie przedstawienie roli niezwykle interesujących cząsteczek, naturalnie syntetyzowanych przez wiele organizmów żywych, w tym również przez człowieka, dzięki którym większość organizmów żywych pozostaje zdrowa. Te niewielkie cząsteczki są syntetyzowane według zasady jeden gen-jeden peptyd, tworzone są szybko z niewielkim nakładem energii gospodarza. Do tych szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie związków o szczególnych właściwościach zaliczamy między innymi wymienione w tytule pracy defensyny i katelicydyny [13,67,68,77]. Na użytek niniejszej pracy dla peptydów antydrobnoustrojowych wprowadzono jednoznaczny

skrót PAD. Skrót AMP (antimicrobial peptide) proponowany dla peptydów antydrobnoustrojowych jest niewłaściwy ze względu na powszechnie przyjęty taki skrót dla adenylomonofosforanu.

PAD są to różnorodne cząsteczki syntetyzowane zarówno przez organizmy należące do Prokariota jak i Eukariota [49,110]. Występują one u bakterii, bezkręgowców, kręgowców, ssaków, a wśród nich u naczelnych i u człowieka [19,59,96]. Są one również syntetyzowane przez rośliny [17]. Bakterie, które syntetyzują PAD, wykorzystują je w środowisku do współzawodnictwa z innymi bakteriami. Szczep bakterii *Escherichia coli*, który syntetyzuje mikrocynę 25 (bakteriocyna nazywana też kolicyną), wydzielając ją do środowiska, może powodować zmianę morfologii innych komórek nie tylko *E. coli*, lecz także pałeczek *Salmonella* czy *Shigella*, czyniąc je niezdolnymi do podziału [18,77]. Można zatem powiedzieć, że antydrobnoustrojowe peptydy należą do najstarszych mechanizmów obronnych organizmów wszystkich królestw [55,57,58,59,101]. Ze względu na miejsce występowania bywają również nazywane LAP (lingual antimicrobial peptides), jak defensyna wyizolowana po raz pierwszy z języka krowy, czy TAP (tracheal antimicrobial peptides), czyli antydrobnoustrojowymi peptydami izolowanymi z tchawicy [31]. Niejednokrotnie PAD nazywane są także naturalnymi antybiotykami lub antybiotykami peptydowymi [39,85]. Niektóre z nich, a głównie to defensyny, nazywane są także mikrochemokinami [71]. W czasie ewolucji nie tylko nie doszło do zagubienia genów kodujących PAD, lecz raczej do zwiększenia ich różnorodności. Ze względu na zróżnicowanie budowy antydrobnoustrojowych peptydów oraz różnorodność organizmów, w których występują, klasyfikacja PAD jest niezwykle trudna i bywa różnorodna. W literaturze znanych jest wiele podziałów tych peptydów [6,13,18], a różnorodność klasyfikacji jest uzależniona od tego jakie kryterium bierzemy jako cechę różni-

Tabela 1. Podział PAD wg Bomana [13]. Sekwencje aminokwasowe wybranych peptydów występujących u ssaków podano zgodnie z cytowanym piśmiennictwem [6,8,13,27,55,73,92,95,98]. W tabeli defensyny zaznaczone są na niebiesko, katelicydyny na czerwono

GRUPA PEPTYDÓW	NAZWA PEPTYDU	WYSTĘPOWANIE	SEKWENCJA
1. α-helikalne peptydy liniowe bez cystein	LL-37	człowiek	LLGDFFRKSK EKIGKEFKRI VQRIKDFLRN LVPRTES [13,95]
	mCRAMP	mysz	GLLRKGGKEKI GEKLKKIGQI KNFFQKLVPQ PE [13,95]
	VIP	świnia	HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN [13]
2. peptydy z trzema mostkami S-S	HNP-1	człowiek	ACYCRIPACI AGERRYGTCI YQGRLWAFCC [6,27,79]
	HNP-4	człowiek	VCSCRLVFCR RTELRVGNCL IGGVVSFTYCC TR [6,27,55,79]
	HD-6	człowiek	AFTCHCRRS- CYSTEYSYGT CTVMGIMHRF CCL [6,27,79,92]
	HBD-1	człowiek	DHYNCVSSGG QCLYSACPIF TKIQGT CYRG KAKCCK [6,8,55]
	HBD-2	człowiek	GIGDPVTCLK SGAI α HPVFC PRRYKQIGTC GLPGTKCCKKP [6,8,55]
	HBD-3	człowiek	IINTLQKYYC RVRGGRC α AVL SCLPKEEQIG K α STRGRKCC RRKK [6,8,55]
	RTD-1	rezus	$ \begin{array}{ccccccc} \text{G-F-C-R-C-L-C-R-R} & & & & & & \\ & & & & & & \\ \text{R-T-C-I-C-R-C-V-G} & & & & & & \end{array} $ [6,98]
3. bogate w prolinę i tryptofan bez cystein	PR-39	świnia	RRRPRPPYLP RPRPPFFFP RLPPRIPPGF PPRFPPRFP [6,13,95]
	indolicydyna	bydło	ILPWKWPWWP WRR [13]

cującą. Aktualnie znana jest sekwencja około 880 peptydów antydrobnoustrojowych [13,18]. Boman [13] biorąc pod uwagę sekwencję aminokwasową podzielił PAD na 3 zasadnicze grupy:

- 1) α-helikalne peptydy bez cystein, takie jak CRAMP myszy czy VIP świni,
- 2) peptydy z trzema mostkami disiarczkowymi, takie jak: HNP-1, HD-6 czy HBD-2 człowieka,
- 3) peptydy bogate w prolinę i tryptofan, takie jak PR-39 świni.

Podział PAD na 3 główne grupy wg Bomana [13] oraz wybrane przykłady peptydów w poszczególnych grupach wraz z podaną na podstawie piśmiennictwa sekwencją [8,29,92,96], ilustruje tabela 1.

Natomiast jeden z aktualnie funkcjonujących podziałów PAD, podany przez Brogdena [18], zamieszczono w tabeli 2 wraz z przykładami organizmów w jakich peptydy te występują.

Ogólnie biorąc, określenie peptyd antydrobnoustrojowy (PAD) dotyczy oligo- i polipeptydów, które zabijają drobnoustroje lub hamują ich wzrost. Peptydy te najczęściej zbudowane są z 15–50 aminokwasów, ale bywa również, że składają się ze 150–200 aminokwasów [19]. Jak wynika z tabeli 2 są wśród nich: 1) liniowe kationowe peptydy α-helikalne bez cysteiny np. cekropina owadów, CAP18 królika czy LL37 katelicydyna człowieka; 2) anionowe peptydy, takie jak dermicydyna człowieka; 3) kationowe peptydy bogate w swoiste aminokwasy np. bogata w proli-

Tabela 2. Podział PAD wg Brogden [13]. Przykłady PAD w poszczególnych grupach podano zgodnie z cytowanym piśmiennictwem [7,13,19,27,73,95]. W tabeli defensyny zaznaczone są na niebiesko, katelicydyny na czerwono, natomiast * przy nazwie peptydu oznacza PAD występujące u człowieka

GRUPA PEPTYDÓW	WYSTĘPOWANIE	NAZWA PEPTYDU
1. liniowe kationowe α-helikalne peptydy	owady	cekropina, andropina, mellityna, ceratotoksyna
	płazy	magainina, dermaseptyna, bombinina, brewinina, eskulentyny, buforyna II
	ryby	misguryna, pleurocydyna
	ssaki	owispiryna, CAP-18, LL-37*
2. anionowe peptydy	płazy	maksimina H5
	ssaki	małe peptydy bogate w kwas glutaminowy i asparaginowy, dermicydyna*
3. kationowe peptydy bogate w specyficzne aminokwasy	owady	abacyna (Pro), drozomycyna (Pro+Arg), apidacyna (Pro+Arg), hymenoptacyna (Gly), koleopterycyna (Gly), holotrycyna (Pro+Gly)
	ssaki	baktenecyna (Pro+Arg), PR-39 (Pro+Arg), profenina (Pro+Phe), indolicydyna (Trp), histatyny (Trp)
4. anionowe i kationowe peptydy z mostkami S-S	owady	defensyna A (3×S-S), drozomycyna (>3×S-S)
	skorupiaki	tachyplezyna (2×S-S)
	ssaki	brewinina (1×S-S), protegryna (2×S-S), defensyny HNP-1*, HNP-4*, kryptodyna*, NP-1, HBD-1*, DEF18, RTD-1 } (3×S-S)
5. anionowe i kationowe peptydy będące fragmentami większych białek	ssaki	- laktoferrycyna - kazocydyna I - fragmenty ludzkiej hemoglobiny, lizozymu

nę abacyna pszczoł; 4) anionowe i kationowe peptydy, zawierające cysteinę i mostki dwusiarczkowe, np. α - i β -defensyny człowieka oraz θ -defensyny rezusa; 5) anionowe i kationowe peptydy, będące fragmentami większych białek, takich jak laktoferrycyna z laktoferryiny czy kazocydyna z kazeiny. Do pierwszej z wymienionych grup należą małe peptydy (722–824 Da) obecne np. w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych człowieka, występujące w wysokich, milimolarnych stężeniach, często wymagające do działania cynku jako kofaktora [36]. Natomiast drugą grupę stanowi około 290 krótkich peptydów (poniżej 40 aminokwasów) bez cysteiny, których silniejsze działanie antybakteryjne jest wprost proporcjonalne do wzrostu zawartości struktury α -helisy [18]. Trzecia grupa to około 44 kationowych peptydów bogatych w niektóre aminokwasy, takie jak prolina, która może stanowić 40–57% takiego peptydu lub arginina (13–33%) czy też fenyloalanina (19%) [18]. Największą grupą są kationowe i anionowe peptydy zawierające cysteinę, w których występują mostki disiarczkowe (1–3 lub więcej) i jest takich peptydów prawie 380 [18]. Do tej grupy należą zarówno 16-aminokwasowa protegryna z dwoma mostkami disiarczkowymi izolowana

z leukocytów świni, jak i bardzo zróżnicowana rodzina defensyn obejmująca 55 różnych α -defensyn, wśród których są defensyny neutrofilu człowieka i kryptodyna z przewodu pokarmowego. Należy do tej grupy też około 90 β -defensyn ludzi i zwierząt z trzema mostkami disiarczkowymi oraz 54 defensyny owadów i 58 defensyn roślin [15,18,74]. Anionowe i kationowe peptydy będące fragmentami większych białek to piąta wg Brogdena [18] i najmniej liczna grupa peptydów antydróbnoustrojowej izolowanymi z odporności nie jest jeszcze do końca poznana.

PAD to wielofunkcyjne peptydy izolowane z odległych ewolucyjnie gatunków. Najbardziej znane z nich to przede wszystkim występujące u ssaków, w tym u naczelnych oraz u człowieka dwie główne rodziny: defensyny i katelicydyny [38,95,105,107]. Początki badań nad substancjami o aktywności antydróbnoustrojowej izolowanymi z wydzielin, krwi, leukocytów i tkanki limfatycznej, przypadają na lata 50–60 ub.w. Skames i Watson [90] otrzymali z wielojądrzastych leukocytów królika kwaśny ekstrakt, zawierający leukinę, substancję działającą bakterioobójczo na bakterie Gram-dodatnie. W tym samym czasie

GRUPA PEPTYDÓW	NAZWA PEPTYDU	WYSTĘPOWANIE U CZŁOWIEKA
Defensyny typu α	HNP-1 HNP-2 HNP-3	} granulocyty (śledziona, grasica, płuca)
	HNP-4	granulocyty
	HD-5 HD-6	} komórki Panetha jelita, układ rozrodczy
typu β	HBD-1 HBD-2	} skóra, płuca, tchawica, żołądek (komórki nabłonkowe),
	HBD-3	skóra, płuca, migdałki, tchawica
	HBD-4	jądra, jama żołądka
Katelicydyny	LL-37	granulocyty, płuca, skóra, jądra, żołądek, limfocyty
	hCAP-18	różne komórki nabłonkowe, komórki tuczne, subpopulacje monocytów i limfocytów

Tabela 3. Podział i występowanie defensyn i katelicydyn u człowieka [13,66,71]. W tabeli defensyny zaznaczone są na niebiesko, a katelicydyny na czerwono

Hirsch [47], stosując inną metodę ekstrakcji, wyizolował także z wielojądrazstych leukocytów królika – fagocytynę. Hirsch wspólnie z Cohnem [48] scharakteryzowali fagocytynę i stwierdzili, że działa ona bakteriobójczo nie tylko na bakterie Gram-dodatnie, ale również na Gram-ujemne. W latach 70 ub.w. pojawiła się ogólniejsza nazwa dla takich peptydów – peptydy kationowe (CAP). Nazwa ta stosowana była dla wielu działających bakteriobójczo peptydów, znajdujących w cytoplazmatycznych ziarnistościach leukocytów izolowanych również z innych ssaków. Wraz z rozwojem badań nad PAD i izolowaniem ich z najróżniejszych organizmów żywych, nazewnictwo ich zmieniało się. W 1985 r. pojawiła się w publikacjach nazwa defensyny, użyta do scharakteryzowania rodziny peptydów antydrobnoustrojowych z charakterystycznym pofałdowaniem łańcucha, przeważnie typu β i mostkami disiarczkowymi [41,87]. Ostatnie lata ubiegłego wieku i początek XXI w. charakteryzuje dynamiczny rozwój badań nad tymi unikalnymi cząsteczkami. Dotyczy on zarówno wyizolowania α - i β -defensyn [8,74,87] oraz cyklicznej θ -defensyny (teta-defensyny) [94,106], znalezienia pierwszej katelicydyny [3,30,57,108], jak i poznania sekwencji, mechanizmów działania i wielu funkcji tych cząsteczek [14,16,73,105].

2. PAD: DEFENSYNY I KATELICYDYNY SSAKÓW

Jak już wspomniano, dwie główne rodziny antydrobnoustrojowych peptydów u ssaków to defensyny i katelicydyny, które znaleziono u myszy, szczurów, świni, bydła i mały oraz u człowieka [13,16,18,56,88,95] (tabele 1,2). Bardzo interesująca defensyna ssaków występuje w ziarnistościach neutrofilii i monocytów rezusa, nazwana RTD-1. Jest to 18-aminokwasowy cykliczny peptyd, lektyna zawierająca 3 mostki disiarczkowe, w niskich stężeniach działająca bardzo silnie bakteriobójczo i przeciugrzybiczno [94].

Defensyny i katelicydyny ssaków wykazują silne właściwości bakteriobójcze. Z badań z użyciem skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej wynika, że niektóre z nich, takie jak katelicydyna królika CAP 18 czy owcy SMAP29 (przy stężeniu peptydu $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) zabijają bakterie np. *Pseudomonas aeruginosa* (10^8 cfu ml^{-1}) w ciągu 15–90 min [18,44]. W podobnych warunkach bakterie *E. coli* inkubowane z β -defensyną DEFB118 były zabijane w ciągu 15 min [18]. Peptydy te wytwarzane przez różne komórki często działają synergistycznie i immunomodulacyjnie, wpływając zarówno na odporność wrodzoną jak i nabytą wielu organizmów [11,77]. O znaczeniu tych peptydów u ssaków mogą świadczyć badania modelowe prowadzone na zwierzętach. Z badań tych wynika, że myszy transgeniczne, które wytwarzały defensynę HD-5 człowieka były bardziej odporne na infekcję pałeczkami *Salmonella* i nie było to związane z wytwarzaniem defensyny na wyższym poziomie niż charakterystycznym dla myszy [85]. Natomiast myszy bez matrylizyny, enzymu aktywującego wiele mysich defensyn, były bardziej wrażliwe na infekcje jelitowe. Myszy z upośledzonym wytwarzaniem katelicydyny CRAMP są wyjątkowo wrażliwe na infekcje skórne ziarniakami *Streptococcus* z grupy A [85].

U człowieka defensyny występują w wielu komórkach i tkankach, są w neutrofilach i płytkach krwi, w nabłonku układu oddechowego i moczowo-płciowego, w przewodzie pokarmowym, a także w wątrobie, skórze, oraz w spojówce oka [4,23,45,54,55,60,66,92,93]. Podział występujących u człowieka defensyn przedstawiono w tab. 3. U człowieka i naczelnnych występuje tylko jedna katelicydyna, która w postaci propeptydu znana jest jako hCAP-18, a po enzymatycznym uwolnieniu dojrzałego peptydu jest to LL-37 [46,107].

Na powierzchni ciała człowieka jest około 200 g bakterii. Skóra jest barierą chroniącą przed patogenami, a kon-

stytutownie wytwarzane w niej defensyny stanowią jej ochronę chemiczną. Defensyny u człowieka wydzielane są w łoju skórny (sebum) przez gruczoły łojowe i w ten sposób zabezpieczają skórę przed wysuszeniem spowodowanym działaniem wysokiej temperatury. Defensyny, takie jak HBD-2 czy HBD-3 i katelicydyna LL-37 są wytwarzane w wysokim stężeniu w miejscu infekcji lub urazu skóry, działają antibakteryjnie, chemotaktycznie i uczestniczą w działaniach naprawczych [60,67]. Niedobór defensyn w skórze może być przyczyną występowania trądzika (acne) [60,81].

W układzie trawiennym człowieka jest około 2 kg bakterii, w tym w okrężnicy jest ich $\sim 10^{14}$ drobnoustrojów/na g treści jelita [13,39]. Dla porównania warto przytoczyć dane, że bakterie dzielą się średnio co 20 min, podczas gdy limfocyty w najbardziej sprzyjających warunkach potrzebują na to 6–8 godzin [13]. Organizm gospodarza zatem aby przeżyć musi mieć obronę efektywną i szybszą niż wzrost patogenu. Wprawdzie większość bakterii w przewodzie pokarmowym człowieka to komensale, co jednak nie zmienia faktu, że układ trawienny człowieka narażony jest na potencjalne patogeny, które pojawiają się w nim z pożywieniem. Nabłonek śluzówki jelita cienkiego z ogromną ilością kosmków i krypt, to potencjalne miejsce wnikania drobnoustrojów patogennych. Komórki nabłonkowe jelita, takie jak enterocyty, komórki kubkowe i komórki nabłonkowe tworzące podstawę krypt Lieberkuhna nazywane komórkami Panetha, odgrywają ważną rolę w ochronie przed patogenami [9,10]. Komórki Panetha poprzez wydzielane defensyny uczestniczą nie tylko w ochronie komórek pnia krypt, lecz także w kontrolowaniu rodzaju i liczby bakterii komensalnych, a także w wykrywaniu patogenów oraz w odpowiedzi obronnej [16]. Defensyny są wytwarzane 100 razy szybciej niż immunoglobuliny [9], a ich synteza u człowieka rozpoczyna się już w 14–17 tygodniu życia płodu [61]. Obecność zaś katelicydyny LL-37 w płynie owodniowym oraz w skórze nowo narodzonego niemowlęcia działa ochronnie i stanowi wrodzoną barierę antydrobnoustrojową [13,62,71,91]. Defensyny syntetyzowane i wydzielane w dwunastnicy, jelicie czczym i jelicie krętym, współtworzą śluzówkową barierę ochronną przed zakażeniem drobnoustrojami, a stymulowane bakteriami lub ich produktami niszczą wnikające bakterie [27,28,73,75,76]. Wysoki poziom defensyn w komórkach Panetha jest wczesnym markerem ontogenezy krypt oraz bardzo przydatnym wskaźnikiem różnicowania linii komórek nabłonkowych jelita [75]. U niemowląt, niedojrzałość w syntetyzowaniu defensyn w jelitach, może powodować wzrost ich wrażliwości na infekcje spowodowane przez florę bakteryjną przewodu pokarmowego [61].

Defensyny u człowieka są wytwarzane w tkankach konstytutywnie [29]. Są one przechowywane (np. HNP1-4, HD5-6, HBD-1) lub wydzielane, mogą być także indukowane (HBD-2, LL-37) w odpowiedzi na kontakt z bakteriami lub ich produktami, takimi jak endotoksyna czy indukowanymi cytokinami (np. IL-1 β , IL-6, czy TNF- α) [11,24,57,58,70,83,111]. Defensyna HBD-3 występuje w mięśniu sercowym, w mięśniach szkieletowych i w łożysku [57,58]. Defensyny stanowią 15% białek neutrofili człowieka, a 50% białek ziaren azurofilnych i uczestniczą w niezależnym od tlenu zabijaniu sfagocytowanych drobnoustrojów. Katelicydyny są przede wszystkim syntetyzowane i przechowywane w ziarnistociach swoistych neutrofili, choć ludzką katelicydynę hCAP-18 znajduje się również w komórkach złuszczonego nabłonka, w nądrach i plazmie nasiennej, w płucach, a także w keratynocytach podczas stanów zapalnych skóry, w komórkach tucznych oraz subpopulacjach monocytów i limfocytów [30,88]. Defensyny zidentyfikowano ponadto w płynach biologicznych, takich jak mocz, płyny oskrzelowe, wydzieliny nosa, czy ślina [29,40]. Jak już wspomniano wcześniej, defensyny i katelicydyny, to cząsteczki efektorowe nieswoistej odporności inaczej nazywanej odpornością wrodzoną [36,38,46,66,110]. Peptydy te stanowią pierwszą linię obrony u człowieka i charakteryzują się szerokim zakresem działania, chronią przed patogenami oraz kontrolują naturalną florę, często działając synergistycznie [7]. Wytwarzane przez różne komórki mogą stanowić skuteczną ochronę przed mechanizmami oporności drobnoustrojów.

Wykazano, że niedobory defensyn czy katelicydyn u człowieka mogą być traktowane jako jedna z przyczyn wystąpienia objawów chorobowych, np. w przypadku alergii atopowych czy w chorobie Kostmana [13]. Choroba Kostmana to choroba genetyczna, zdiagnozowana u niemowląt, charakteryzująca się zahamowaniem dojrzewania promiencytów do mielocytów, jeśli jest nieleczona prowadzi do śmierci dziecka poniżej pierwszego roku życia. Pacjenci leczeni cierpią na nawracające infekcje, a w wieku dorosłym na choroby przyzębia. Okazało się, że pacjenci z chorobą Kostmana nie wytwarzają katelicydyny LL-37. Brak LL-37 w ślinie może być zatem odzwierciedleniem składu granulocytów i stanowić w przypadku tej choroby bardzo dobry wskaźnik diagnostyczny [13].

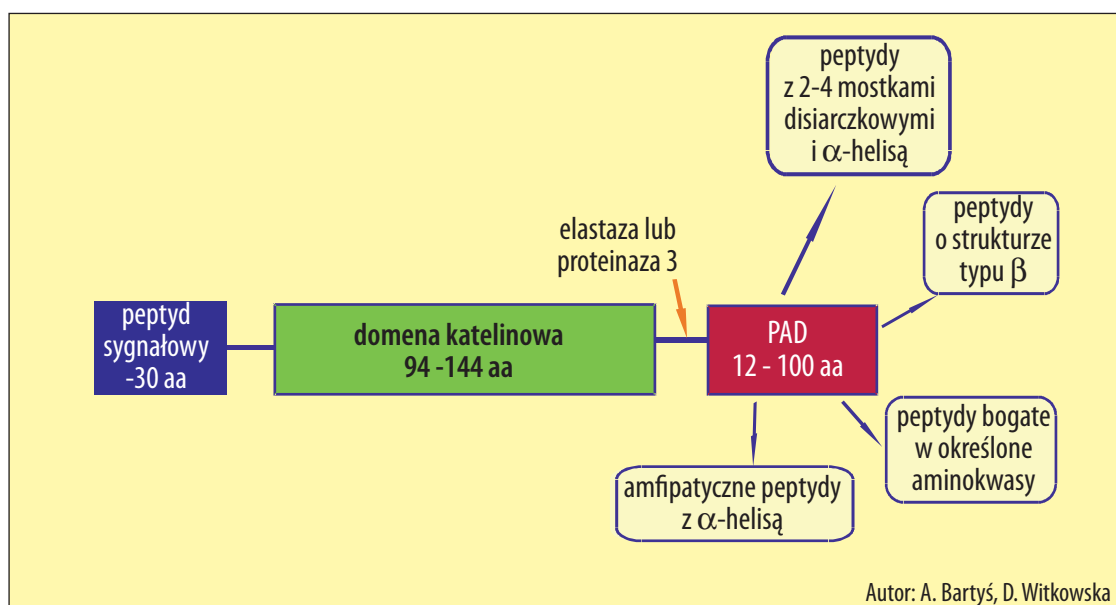
Stwierdzono także, że u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry upośledzona jest ekspresja katelicydyn i w związku z tym częste są u nich wtórne infekcje bakteryjne. Redukcja α -defensyn w komórkach Panetha ma związek przyczynowy z nieswoistym, chronicznym i długotrwałym owrzodzeniem przewodu pokarmowego, nazywanym chorobą Leśniowskiego-Crohna [99,100].

Natomiast u pacjentów ze zwłóknieniem torbielowatym, nazywanym też mukowiscydozą (CF-cystic fibrosis), u których występują infekcje układu oddechowego spowodowane najczęściej przez bakterie z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, stwierdzono redukcję aktywności defensyn i katelicydyn [4]. Obniżenie przeciwbakteryjnej aktywności wymienionych peptydów jest następstwem ich inaktywacji, spowodowanej wysokim stężeniem chlorku sodu występującym w otoczeniu nabłonka układu oddechowego chorych z CF [97].

Natomiast u pacjentów ze zwłóknieniem torbielowatym, nazywanym też mukowiscydozą (CF-cystic fibrosis), u których występują infekcje układu oddechowego spowodowane najczęściej przez bakterie z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, stwierdzono redukcję aktywności defensyn i katelicydyn [4]. Obniżenie przeciwbakteryjnej aktywności wymienionych peptydów jest następstwem ich inaktywacji, spowodowanej wysokim stężeniem chlorku sodu występującym w otoczeniu nabłonka układu oddechowego chorych z CF [97].

3. SYNTEZA, STRUKTURA I FUNKCJE DEFENSYN I KATELICYDYN

Peptydy antydrobnoustrojowe są syntetyzowane w postaci trzydomenowego propeptydu z N-końcową sekwencją sygnałową, fragmentem anionowym oraz C-końcową dojrzałą kationową defensyną. W wielu przypadkach propeptyd ma ładunek zrównoważony, co ważne jest dla pośladowania i chroni go przed interakcjami z membranami wewnątrz komórki. Geny odpowiedzialne za syntezę defensyn są wysokopolimorficzne. Ogólnie defensyny są kodowane przez geny kilkueksonowe, najczęściej dwueksonowe, z których pierwszy koduje hydrofobową sekwencję



Ryc. 1. Budowa prekursora katelicydyny

sygnałową, natomiast drugi ekson koduje motyw cysteinowy. Defensyny jelitowe człowieka i myszy są kodowane przez gen dwueksonowy. Geny kodujące defensyny neutrofilu człowieka, świnki morskiej i królika to trójeksonowe geny wielkości 3000 pz. Trzeci ekson genu koduje dojrzały peptyd, a dwa pierwsze eksyony kodują dwie pierwsze domeny propeptydu defensyn neutrofilu [77]. U człowieka znanych jest 8 genów kodujących defensyny, występujących w skupiskach i zlokalizowanych na chromosomie 8p23 [38,39,55]. Defensyny to ewolucyjnie stare składniki układu odpornościowego wielu gatunków.

Geny odpowiedzialne za syntezę katelicydyn to czteroeksonowe geny o wielkości około 2000 pz [13]. Wysokokonserwatywne eksyony 1, 2 i 3 genu katelicydyn kodują sekwencję sygnałową i domenę katelinową, natomiast zmienny czwarty ekson koduje dojrzały peptyd [67,77]. Katelicydyny podobnie jak defensyny są również syntetyzowane w postaci propeptydu, w skład którego wchodzi ~30-aminokwasowy peptyd sygnałowy, 94–144-aminokwasowa domena katelinowa oraz 12–100-aminokwasowy PAD (ryc. 1).

Katelicydyny w odróżnieniu od defensyn, są w postaci propeptydu przechowywane. Propeptyd nie ma właściwości bakteriobójczych [108].

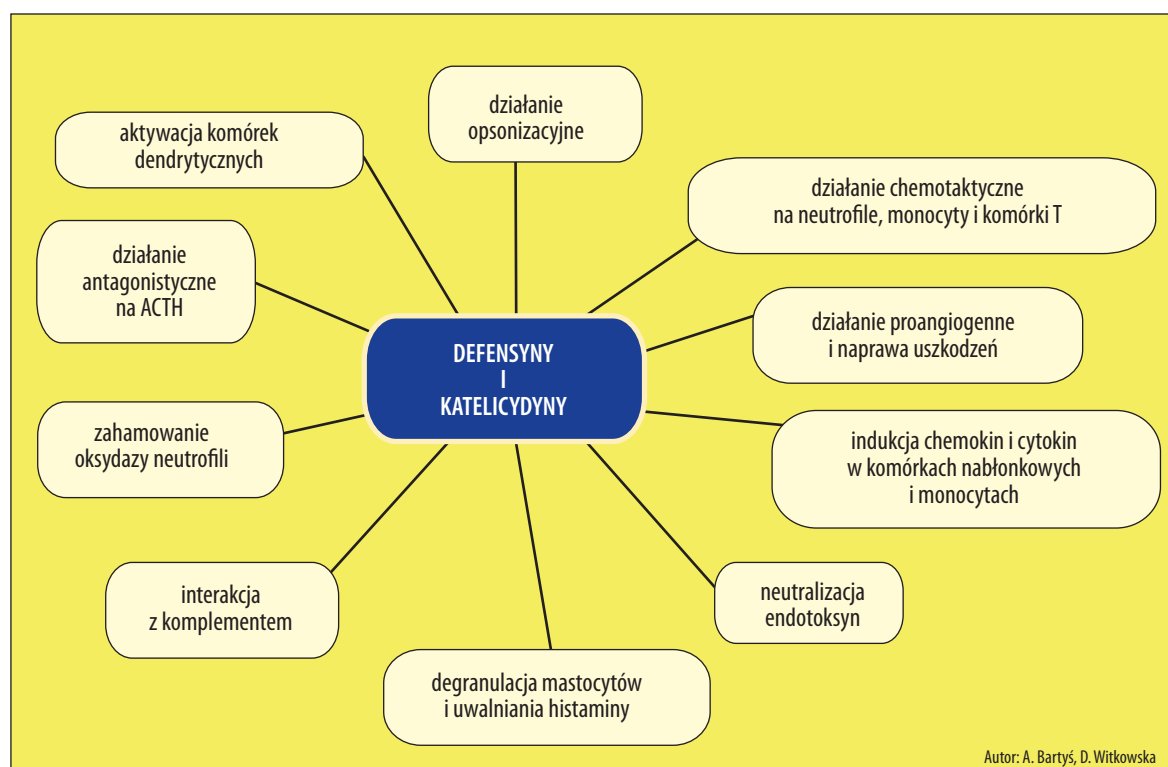
Dojrzałe peptydy o właściwościach antydrobnoustrojowych (PAD) uwalniane są z propeptydu dzięki działaniu enzymów, takich jak elastaza czy proteinaza 3. Peptydy, te mogą występować albo w postaci amfipatycznej α -helisy jak: LL-37 człowieka, CAP18 królika, mCRAMP myszy, SMAP29 owcy, RL-37 rezusa; albo jako peptydy z 2–4 mostkami disiarczkowymi i α -helisą, jak CAP11 świnki morskiej. Mogą one również charakteryzować się dużą ilością aminokwasów jednego typu, tak jak bogate w prolinę peptydy: PR-39, profenina 1 i profenina 2 występujące u świni, Bac5 i Bac7 wołu, czy też jako peptydy z pętlą stabilizowaną przez mostek disiarczkowy jak protegryny

świni [72,107]. Katelicydyny ssaków jest to duża grupa (>10) zróżnicowana pod względem struktury drugorzędowej. Jedynie w neutrofilach myszy (mCRAMP) i człowieka (hCAP18 – propeptyd i LL-37 – dojrzały peptyd, tabela 3) występuje tylko jedna katelicydyna [19].

Podział rodziny defensyn ssaków oparty na obecności określonej liczby cystein i mostków disiarczkowych wyróżnia 3 podrodziny defensyn: typu α , β i θ (tabela 1). Do defensyn typu α zaliczono peptydy neutrofilu człowieka: HNP-1, HNP-2, HNP-3 i HNP-4 oraz defensyny syntetyzowane w komórkach Panetha jelita człowieka, takie jak HD-5, HD-6 czy NP-1 myszy [102]. Są to peptydy z trzema mostkami S-S utworzonymi między cysteinami w pozycjach 1–6, 2–4 i 3–5 [91]. Druga podrodzina to defensyny typu β np. HBD-1, HBD-2, czy HBD-3 syntetyzowane u człowieka przez wiele komórek nabłonkowych i obecne w skórze, tchawicy, płucach, żołądku czy migdałkach. Te peptydy mają również 6 cystein, które tworzą mostki między cysteinami w pozycjach 1–5, 2–4 i 3–6. Trzecia z podrodzin to defensyny typu θ , jak wspomniana już w poprzednim rozdziale cykliczna defensyna RTD-1 (tabela 1) [20,94].

Defensyny i katelicydyny ssaków, w tym naczelnych i człowieka to peptydy różnej wielkości o szerokim zakresie działania [55,103,104,105] (ryc. 2). Peptydy te działają antybakteryjnie [33,84] na bakterie Gram-ujemne (*E. coli*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*) i Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*) [24,44,73], działają antywirusowo, szczególnie na wirusy osłonkowe (grypy, HIV) [22,98,105]. Defensyny wykazują nie tylko działanie antybakteryjne i przeciwwirusowe, ale także przeciwgrzybicze (*Candida albicans*) i przeciw pasożytnicze na pasożyty z rodzaju *Plasmodium* i *Leishmania* [26,29,82].

W badaniach przeprowadzanych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* stwierdzono, że peptydy te działają chemotaktycznie na neutrofile i komórki T, aktywują komórki dendrytyczne,



Ryc. 2. Różnorodność funkcji defensyn i katelicydyn ssaków

powodują degranulację mastocytów i uwalnianie histaminy, hamują oksydazę neutrofilii, a także uczestniczą w naprawie uszkodzeń i działają proangiogenne [1,2,12,32]. Ponadto działają opsonizacyjnie na bakterie oraz biorą udział w interakcji z komplementem, działają również cytotoksycznie [3,13,55,107]. Stwierdzono także, że peptydy te neutralizują endotoksynę (LPS, lipopolisacharyd) uwalnianą podczas lizy komórki bakterii [5,21,35] oraz neutralizują toksynę *Bacillus anthracis* [53]. Badania mechanizmu neutralizacji endotoksyny za pomocą syntetycznych peptydów, takich jak NK-lizyna i katelicydyny (CAP18 i CAP11) przeprowadzone zarówno *in vitro* jak i na modelach ze zwierzętami doświadczalnymi, pozwalają sądzić, że peptydy te blokują wiązanie LPS do komórek CD14+ hamują wytwarzanie cytokin przez te komórki i w związku z tym mogą być w przyszłości wykorzystane do leczenia pacjentów z posocznicią [5,64]. Zastosowanie syntetycznej granulizyny do neutralizacji LPS bakterii Gram-ujemnych potwierdza możliwość użycia tego peptydu do leczenia wstrząsu septycznego [21]. Defensyny wykazują ponadto działanie immunomodulatorowe na układ odpornościowy [11,75,103]. Niektóre z nich hamują syntezę DNA lub syntezę białek gospodarza, mogą regulować ekspresję genów kinaz i regulatorów cyklu komórkowego, a także wykazują działanie antynowotworowe [26,50].

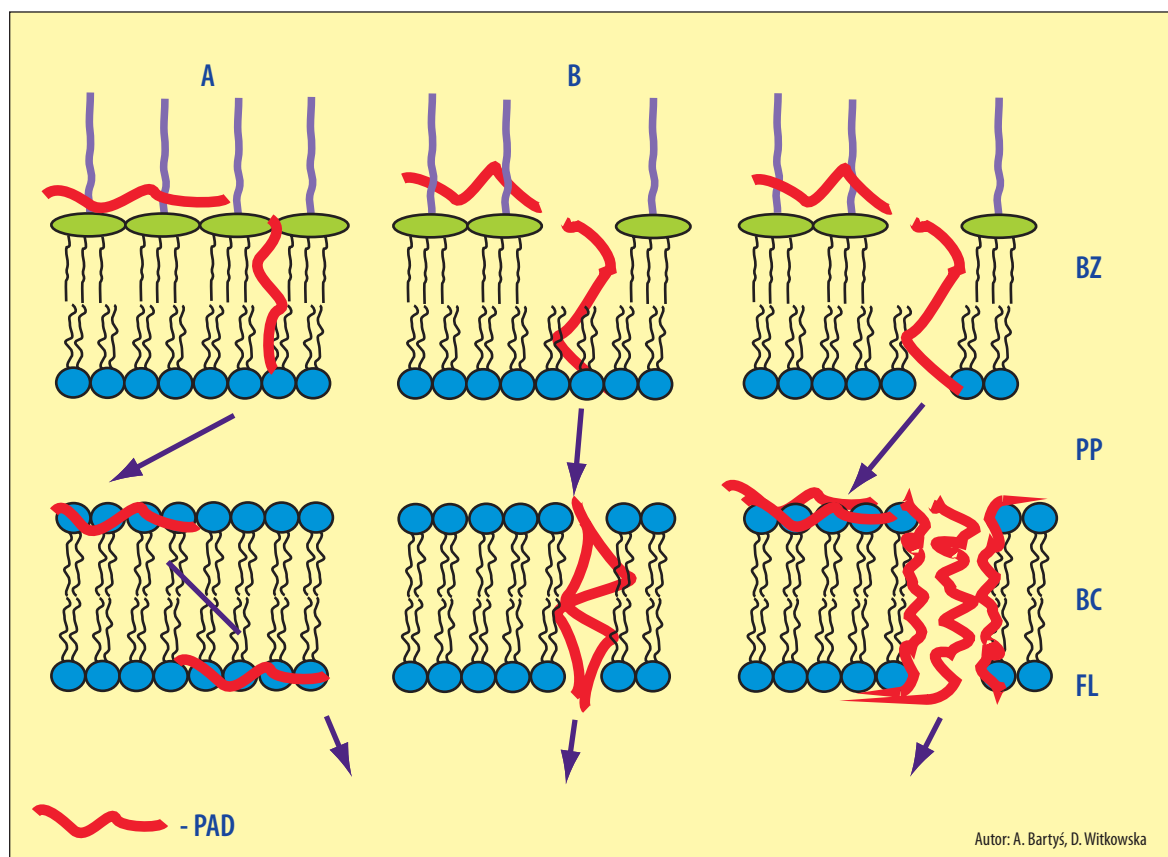
Jak już wspomniano wcześniej peptydy te wpływają zarówno na odporność wrodzoną jak i nabytą wielu organizmów [11,78]. Rola ich w odporności wrodzonej polega na zabijaniu drobnoustrojów, głównie poprzez destabilizację ich błony komórkowej i wskutek synergistycznego działania między indywidualnym peptydem i innymi czynnikami gospodarza, takimi jak np. lizozym [44]. Ponadto, niektóre peptydy wchodzi w interakcję z komórkami go-

spodarza, stymulując wzrost ekspresji produktów swoistych genów, wliczając w to swoiste chemokiny, receptory chemokin, integryny i czynniki transkrypcyjne. W ten sposób peptydy te pełnią funkcje efektorowe [32,44]. Defensyny mają również wpływ na odporność nabytą przez wzmacnianie swoistej odpowiedzi przeciwciał i zapoczątkowanie dojrzewania komórek dendrytycznych [104]. Interferencja ze szlakami sygnałowymi receptorów typu Toll oraz stymulacja ekspresji cząsteczek adhezyjnych i cytokin muszą być brane pod uwagę w procesie przygotowywania nowych leków opartych na naturalnych strukturach PAD.

Defensyny mogą także być szkodliwe [69]. W przypadku zakażenia śluzówki żołądka pacjentów przez *Helicobacter pylori* to defensyna HBD-2 może działać jako mediator prozapalny i razem z komórkami dendrytycznymi uczestniczyć w przekazywaniu sygnału z powierzchni śluzówki do błony podstawnej, głównego miejsca uszkodzenia śluzówki żołądka [69]. Mechanizm, za pomocą którego defensyny wpływają na zwiększoną infiltrację komórek nabłonka przez komórki dendrytyczne, nie jest dokładnie poznany. Uważa się, że swoistość migracji komórek dendrytycznych jest kontrolowana przez interakcję defensyn ze swoistymi receptorami. Takim receptorem β -defensyn jest receptor chemokin CCR6 [50,63]. W związku z tym, że wykazano podwyższony poziom defensyny α -6 w surowicy pacjentów z rakiem okrężnicy, sugeruje się, że defensyna ta może być uważana za marker diagnostyczny tego schorzenia [65].

4. MECHANIZM DZIAŁANIA DEFENSYN I KATELICYDYN

Ogólna zasada mechanizmu antydrobnoustrojowego działania defensyn i katelicydyn, podobnie jak innych PAD,

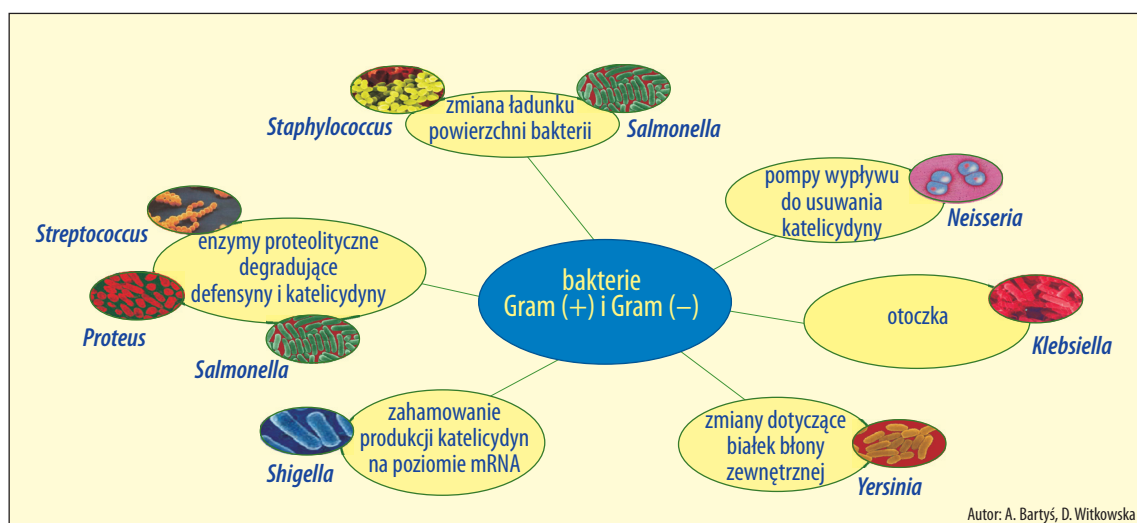


Ryc. 3. Sposoby działania PAD na osłonę bakterii Gram-ujemnych. Użyte skróty: LPS – lipopolisacharyd, BZ – błona zewnętrzna, PP – przestrzeń peryplazmatyczna, BC – błona cytoplazmatyczna, FL – fosfolipid, PAD – peptyd antydrobnoustrojowy

nazywanych czasem „litycznymi peptydami”, polega na dezintegracji (uszkadzaniu i wytwarzaniu kanałów) osłony komórkowej drobnoustrojów, wobec których peptydy te są aktywne [78,110]. Defensyny i katelicydyny, tak jak pozostałe PAD, nie działają na błonę komórkową gospodarza. Większość błon komórkowych drobnoustrojów jest zbudowana z fosfolipidów kwaśnych, podczas gdy większość PAD to kationowe peptydy. Oddziaływania elektrostatyczne kationowych peptydów i ujemnie naładowanych lipidów błony komórkowej drobnoustroju, umożliwiają ściśle, równoległe przyleganie peptydów i zakotwiczenie się ich w błonie komórkowej drobnoustroju lub neutralizację ładunku błony. Kolejno następuje zmiana struktury drugo- i trzeciorzędowej peptydu, który zmienia swoją orientację na prostopadłą i wbudowując się w dwuwarstwę lipidową tworzy transmembranowe pory. W przypadku bakterii Gram-ujemnych peptyd może przemieszczać się przez błonę zewnętrzną, a po przejściu warstwy peptydoglikanu przenikać przez błonę cytoplazmatyczną do cytoplazmy komórki bakteryjnej (ryc. 3A).

Badania nad interakcjami PAD z błonami komórkowymi w przypadku pojedynczych peptydów wskazują na znaczną heterogenność oddziaływań [26,44]. Obecnie uważa się, że istnieje kilka mechanizmów przenikania peptydów przez błonę cytoplazmatyczną [18,38, 39,42,101]. Jeden z nich to mechanizm „klepek beczki” (barrel stave), który polega na gromadzeniu się peptydów na kształt klepek beczki, wówczas niepolarne części wyścielają lipidy błony,

podczas gdy hydrofilowa wewnętrzna powierzchnia tworzy szczeliny (ryc. 3B) [18]. Inny mechanizm to łączenie się kanałów – peptydy po połączeniu się z błoną cytoplazmatyczną tworzą skupiska, a następnie wytwarzają w niej szczeliny, wnikając tym samym do wnętrza komórki [101]. W wyniku kumulacji peptydów w błonie tworzą się struktury bardzo różnorodnie opisywane jako kanały, tratwy lub łaty peptydów. Natomiast w mechanizmie „dywanowym” (ryc. 3C) peptydy nie wbudowują się w błonę, lecz ustawione równoległe do błony komórkowej drobnoustroju pokrywają ściśle jej powierzchnię wywierając nacisk, w wyniku którego następuje załamanie się konstrukcji i wyciekanie składników cytoplazmy [38,39]. Trzy mechanizmy działania wywołują podobny efekt. Na skutek wytworzenia kanałów następuje uszkodzenie błony i jej dezintegracja oraz depolaryzacja, powodujące nieodwracalne zmiany, a w dalszej konsekwencji śmierć drobnoustroju. Działanie defensyn i katelicydyn na komórki bakterii polega przede wszystkim na uszkodzeniu błony cytoplazmatycznej drobnoustroju. Należy nadmienić, że defensyny i katelicydyny poza mechanizmami działania związanymi z błonami, mogą także aktywować czynniki zewnątrzkomórkowe: autolizyny fosfolipazy A2. Katelicydyny PR-39, PR-26 i indolicydyna mają wpływ na syntezę białek drobnoustroju i indukują degradację niektórych białek koniecznych do replikacji DNA patogenu [18]. Defensyny HNP-1, HNP-2 mogą redukować DNA, RNA i syntezę białek, a HNP-1 hamuje także syntezę peryplazmatycznej β -galaktozydazy [18,26].



Autor: A. Bartyś, D. Witkowska

Ryc. 4. Sposoby uzyskiwania przez bakterie oporności na defensyny i katelicydyny

5. MECHANIZMY OPORNOŚCI BAKTERII NA DEFENSYNY I KATELICYDYNY

Należy zauważyć, że bakteriom nie jest łatwo zmienić strukturę czy skład ich błony by „obronić się” przed antybakteryjnym peptydem, w odróżnieniu od mechanizmów obronnych organizmów wielokomórkowych [109]. Jest to tym trudniejsze, że różnorodność PAD syntetyzowanych w przyrodzie przez wiele odległych ewolucyjnie organizmów, może stanowić skuteczną ochronę przed mechanizmami oporności drobnoustrojów. W związku z tym u bakterii istnieją różne strategie ograniczające nie tylko wiązanie się defensyn i katelicydyn do ich powierzchni, jak i wbudowywanie się tych peptydów w osłonę komórki bakterii, a także zmiany przepuszczalności błony bakterii mają stanowić ochronę bakterii przed peptydami antydrobnoustrojowymi [43,80].

Jednym z potencjalnych mechanizmów obrony bakterii przed peptydami antydrobnoustrojowymi, jest modyfikacja zazwyczaj anionowych składników ściany komórkowej na cząsteczki kationowe. Efektem tej modyfikacji będzie zmiana ładunku netto ściany komórkowej bakterii oraz obniżenie atrakcyjności takiej ściany komórkowej dla peptydów antydrobnoustrojowych, co stwierdzono w przypadku szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* czy *Salmonella* [67,80]. Zmiana ładunku ściany bakterii Gram-ujemnych i związana z tym oporność na katelicydyny, może zachodzić także w wyniku acylacji lipidu A lipopolisacharydu lub przez redukcję płynności błony zewnętrznej skutkiem wzrostu oddziaływań hydrofobowych między wzrastającą liczbą acylowanych cząsteczek lipidu A [18,34]. Natomiast w przypadku niektórych szczepów *Klebsiella pneumoniae* otoczka polisacharydowa chroni bakterie przed działaniem defensyn HNP-1 czy HBD-1, podczas gdy bezotoczkowe mutanty są wrażliwe na działanie tych peptydów. U bakterii *Yersinia enterocolitica* wzrost oporności na PAD wiąże się ze zmianami dotyczącymi wytwarzania białek błony zewnętrznej i oporność ta jest skorelowana z obecnością plazmidu (70kb) [18]. W przypadku bakterii Gram-dodatnich, np. *Staphylococcus aureus*, taka zmiana ładunku netto ściany komórkowej bakterii może być związana z wbudowaniem D-alaniny do kwasów lipoteicho-

jowych lub L-lizyny do fosfatydyloglicerolu [34,57,58,80]. *Staphylococcus aureus* wytwarza ponadto stafylokinazy (serynowe proteinyazy), które indukują najpierw uwalnianie α -defensyn z leukocytów wielojądrzastych, a potem kolejno następuje wiązanie stafylokinaz z α -defensynami i tworzenie kompleksów. Biologiczną konsekwencją tej interakcji jest zupełna neutralizacja bakteriobójczego działania α -defensyn [52]. Można zatem stwierdzić, że wytwarzanie stafylokinaz jest sposobem gronkowca złocistego na obronę przed defensynami. Szczepy *Staphylococcus aureus* wytwarzające znaczne ilości aureolizyny są mniej wrażliwe na działanie katelicydyny LL-37, niż szczepy tego samego gatunku bakterii bez tej metaloproteinazy [52]. Natomiast bakterie *Neisseria gonorrhoeae* wykorzystują pompy transportowe (wyrzutowe) do usuwania katelicydyn i w ten sposób unikają gromadzenia się peptydów [67,89]. Niektóre bakterie, takie jak *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* czy *Streptococcus pyogenes* zawierają proteazy, które mają zdolność degradacji ludzkiej katelicydyny LL-37 [86]. Pozakomórkowe proteazy uwalniane przez *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* i *Enterococcus faecalis* degradują u człowieka proteoglikany macierzy zewnątrzkomórkowej i uwalniają polianionową cząsteczkę siarczanu dermatanu, która ma zdolność hamowania aktywności defensyn [57,58]. Natomiast niektóre szczepy *Streptococcus pyogenes* wydzielają białko hamujące działanie komplementu SIC, które ma zdolność wiązania się do LL-37 i blokowania antybakteryjnego działania katelicydyny [18,86]. W celu uniknięcia antybakteryjnego działania katelicydyn patogenne szczepy *Shigella* wykorzystują unikalną strategię polegającą na obniżeniu na poziomie mRNA wytwarzania LL-37 w komórkach nabłonkowych okrężnicy [51,67]. Sposoby uzyskiwania przez bakterie oporności na defensyny i katelicydyny schematycznie przedstawione są na ryc. 4.

Bakteryjne mechanizmy neutralizacji defensyn i innych endogennych peptydów kształtowały się od milionów lat, dlatego nie jest niczym szczególnym zjawisko pojawiania się po upływie dłuższego czasu oporności na jeden czy więcej takich peptydów w niektórych grupach bakterii [55,79]. W ciągu kilku lat stosowania jako leku np. penicyliny bardzo znacznie wzrosła liczba szczepów bakterii

Tabela 4. Defensyny i katelicydyny jako leki, aktualne badania kliniczne wg [25,101]

NAZWA PEPTYDU	FIRMA FARMACEUTYCZNA	CEL I STATUS BADAŃ KLINICZNYCH
Pexiganan (MSI-78)	Genaera, USA	leczenie infekcji w przypadku „stopy cukrzycowej”, stosowanie miejscowe, III
MBI-594AN MBI-226	Micrologic Biotech., Kanada Micrologic Biotech., Kanada	trądzik, stosowanie miejscowe, II infekcje spowodowane użyciem cewnika, III
Neuprex	Xoma Corp., USA	meningokokowe zapalenie opon, III
P-113 (analog histatyny)	Demegen, USA	grzybica jamy ustnej, zapalenie śluzówki, II
Daptomycin Heliomycin	Cubist Pharmaceut., USA Entomed, Francja	sepsa, III, zapalenie wsierdza bakteriami Gram (+), leczenie antybakteryjne, badania przedkliniczne
Enfuvirtide (T-20)	Durham, USA	anty-HIV, III-zakończony
Isegran (IB-36, protegryna)	Intrabiotics, USA	zapalenie śluzówki, stosowany doustnie, II, infekcje płuc w przypadku mukowiscydozy, inhalacje, II

opornych na ten antybiotyk. Zakładając, że poziom produkcji penicyliny na naszej planecie zanim zaczęto stosować ją jako lek, był bardzo niski, można powiedzieć, że mutacja oporności na penicylinę pojawiła się stosunkowo szybko. Porównując z tym szybkość pojawiania się szczepów opornych na obecne w przyrodzie od milionów lat peptydy anty-drobnoustrojowe, można zauważyć, że oporność bakterii na te peptydy pojawia się jednak powoli [109].

6. PEPTYDY ANTUDROBNOUSTROJOWE JAKO LEKI

Jak już wspomniano, wymienione w tytule pracy wielofunkcyjne peptydy, występujące u ssaków i wielu innych odległych ewolucyjnie gatunków, stanowią pierwszą linię obrony. Te cząsteczki efektorowe odporności nieswoistej o szerokim zakresie działania, chroniące przed patogenami i kontrolujące naturalną florę, często działają synergistycznie, a wytwarzane przez różne komórki mogą stanowić ochronę przed mechanizmami oporności drobnoustrojów. Defensyny i katelicydyny, podobnie jak inne PAD charakteryzuje wiele atrakcyjnych cech, takich jak niska masa cząsteczkowa, szeroki zakres działania, oporność na proteolizę, ograniczona ze względu na swoistość działania immunogenność oraz to, że większość z nich to peptydy ogólnoustrojowe. Zakładając, że peptydy te są powszechnie obecne w przyrodzie od milionów lat i oporność na PAD wśród szczepów bakterii pojawia się bardzo wolno

[19], można przypuszczać, że PAD mają cechy idealnego leku, który nie tylko zabija bakterie, ale także neutralizuje uwalnianą przez bakterie endotoksynę [21]. Warto podkreślić, że badanie procesów życiowych daje szczególną możliwość wykorzystania naturalnych wzorców jako leki [109]. Należy także dodać, że w dobie szerokiego stosowania antybiotyków, kiedy bardzo szybko wzrasta liczba opornych na nie szczepów bakterii, istnieje realna potrzeba zastosowania nowych leków, jakimi mogą być PAD. Chemiczna synteza peptydów lub zastosowanie metod rekombinacyjnych umożliwia uzyskanie takich leków. Należy opracować odpowiednią formułę podania leku, by skutecznie dotarł do komórki docelowej, ponieważ naturalne peptydy anty-drobnoustrojowe często mogą pełnić swoją funkcję dzięki wewnątrzleukocytarnemu czy wewnątrz nabłonkowemu umiejscowieniu. Komórki te są przyciągane do miejsca zakażenia lub bakterie stymulują ekspresję PAD. Natomiast chemicznie syntetyzowana cząsteczka takiego samego peptydu podana np. dożylnie, musiałaby rozprzestrzeniać się przez zdrowe tkanki do miejsca zakażenia i wtedy jej łańdunek mógłby spowalniać przenikanie do zakażonych tkanek. Stąd ważne jest dalsze doskonalenie tych „naturalnych antybiotyków” zarówno pod względem sposobu ich użycia jak i sposobu podawania [26,101].

Na uwagę zasługuje możliwość zastosowania omawianych peptydów w częstych zakażeniach górnych dróg oddecho-

wych, na które zapada rocznie np. w USA około 2 mln ludzi, a koszty leczenia sięgają 4,5 miliarda dolarów [7,19]. Tego rodzaju zakażenia są też najczęstszymi infekcjami szpitalnymi, stanowiąc duże zagrożenie dla hospitalizowanych pacjentów [19]. Jak już wcześniej wspomniano, zastosowanie syntetycznej granulizyny do neutralizacji LPS bakterii Gram-ujemnych stwarza również możliwość jej użycia do leczenia wstrząsu septycznego [21]. Wiele firm farmaceutycznych prowadzi badania nad zastosowaniem peptydów antydrobnoustrojowych w terapii niektórych schorzeń. Wiele syntetyzowanych peptydów jest w ostatniej fazie badań klinicznych w leczeniu owrzodzeń w przypadku „stopy cukrzycowej” (MSI-78, Cytalex), w zapaleniu śluzówki jamy ustnej, w meningokokowym zapaleniu opon mózgowych, a także są stosowane w przypadku zakażeń związanych z użyciem cewnika (MBI-226), w leczeniu poważnych zakażeń trądzikowych (MBI-594 AN) oraz w naprawie zniszczonych komórek nabłonkowych w rozległych oparzeniach (Isenagan, protegryna należąca do katelicyn) (tabela 4). Na szczególną uwagę zasługuje lek o nazwie Enfuvirtide (Fuzeon, T20), dla którego badania kliniczne są już zakończone i stosowany jest do leczenia pacjentów z HIV [25,101] (tabela 4).

Biragyn [11] oraz Bowdish i wsp. [16] sugerują, że defensyny ze względu na szczególne właściwości biologiczne (immunomodulatorowe, zdolność wzmacniania właściwości immunologicznych) mogą być atrakcyjne nie tylko jako leki, lecz także jako potencjalne adiuwanty lub nośniki do szczepionek. Ze względu na swoje właściwości peptydy te mogą znaleźć zastosowanie także w hodowli roślin (np. tytoń transgeniczny z cekropinami, magaininami czy dermaseptynami oporny na *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*), w hodowli zwierząt (ryby z PAD odporne na infekcje). Bakteriocyny, wytwarzane przez bakterie mlekowe (lactacin, ambicin) już znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym jako konserwanty [77]. Inną dobrze znaną w przemyśle spożywczym bakteriocyną jest nizyna, należąca do grupy antybiotyków [77]. Uważa się, że przyszłość peptydów antydrobnoustrojowych to transfer genów i produkcja na dużą skalę oraz identyfikacja selektywnych induktorów [77]. Jednak, zanim peptydy – defensyny i katelicyny znajdą się na półkach aptek jako leki ogólnodostępne, należy rozwiązać jeszcze niektóre problemy z nimi związane, takie jak stabilność peptydów, wzajemne oddziaływania, efektywność działania czy koszty produkcji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aarbiou J., Ertmann M., van Wetering S., van Noort P., Rook D., Rabe K.F., Litvinov S.V., van Krieken J.H., de Boer W.I., Hiemstra P.S.: Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation *in vitro*. *J. Leuc. Biol.*, 2002; 72: 167–174
- [2] Aarbiou J., Verhoosel R.M., van Wetering S., de Boer W.I., van Krieken J.H., Litvinov S.V., Rabe K.F., Hiemstra P.S.: Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression *in vitro*. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 2004; 30: 193–201
- [3] Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H.: The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 2000; 96: 3086–3093
- [4] Agerberth B., Grunewald J., Castanos-Velez E., Olsson B., Jornvall H., Wigzell H., Eklund A., Gudmundsson G.H.: Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 160: 283–290
- [5] Andra J., Gutschmann T., Garidel P., Brandenburg K.: Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin. Res.*, 2006; 12: 261–277
- [6] Bals R.: Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.*, 2001; 1: 141
- [7] Bals R., Hiemstra P.S.: Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.*, 2004; 23: 327–333
- [8] Bauer F., Schweimer K., Kluver E., Conejo-Garcia J.R., Forssmann W.G., Rosch P., Adermann K., Sticht H.: Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.*, 2001; 10: 2470–2479
- [9] Bevins C.L.: The Paneth cell and innate immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2004; 20: 572–580
- [10] Bevins C.L., Martin-Porter E., Ganz T.: Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 1999; 45: 911–915
- [11] Biragyn A.: Defensins-non-antibiotic use for vaccine development. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005; 6: 53–60
- [12] Biragyn A., Ruffini P.A., Leifer C.A., Klyushnenkova E., Shakhov A., Chertov O., Shirakawa A.K., Farber J.M., Segal D.M., Oppenheim J.J., Kwak L.W.: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science*, 2002; 298: 1025–1029
- [13] Boman H.G.: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.*, 2003; 254: 197–215
- [14] Borregaard N., Elsbach P., Ganz T., Garred P., Svegaard A.: Innate immunity: from plants to humans. *Immunol. Today*, 2000; 21: 68–70
- [15] Borregaard N., Lollike K., Kjeldsen L., Sengelov H., Bastholm L., Nielsen M.H., Bainton D.F.: Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.*, 1993; 51: 187–198
- [16] Bowdish D.M., Davidson D.J., Hancock R.E.: A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005; 6: 35–51
- [17] Broekaert W.F., Terras F.R., Cammue B.P., Osborn R.W.: Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, 1995; 108: 1353–1358
- [18] Brogden K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 3: 238–250
- [19] Bulet P., Stocklin R., Menin L.: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, 2004; 198: 169–184
- [20] Campopiano D.J., Clarke D.J., Polfer N.C., Barran P.E., Langley R.J., Govan J.R., Maxwell A., Dorin J.R.: Structure activity relationships in defensin dimers. A novel link between β -defensin tertiary structure and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 48671–48679
- [21] Chen X., Howe J., Andra J., Rossle M., Richter W., da Silva A.P., Krensky A.M., Clayberger C., Brandenburg K.: Biophysical analysis of interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1768: 2421–2431
- [22] Chong K.T., Xiang L., Wang X., Jun E.L., Xi L., Schweinfurth J.M.: High level expression of epithelial β -defensins (hBD-1, 2, and 3) in papillomavirus induced lesions. *Vir. J.*, 2006; 3: 75
- [23] Chromek M., Slamova Z., Bergman P., Kovacs L., Podracka L., Ehren I., Hokfelt T., Gudmundsson G.H., Gallo R.L., Agerberth B., Brauner A.: The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat. Med.*, 2006; 12: 636–641
- [24] Claeyss S., de Belder T., Holtappels G., Gevaert P., Verhasselt B., van Cauwenberge P., Bachert C.: Human β -defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy*, 2003; 58: 748–753
- [25] ClinicalTrials.gov – a service of the U.S. NIH. <http://clinicaltrials.gov> (15.10.2008)
- [26] Cudic M., Otvos L.Jr.: Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets*, 2002; 3: 101–106
- [27] Cunliffe R.N.: α -defensins in the gastrointestinal tract. *Mol. Immunol.*, 2003; 40: 463–467
- [28] Cunliffe R.N., Rose F.R., Keyte J., Abberley L., Chan W.C., Mahida Y.R.: Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and metaplastic Paneth cells in colon in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2001; 48: 176–185
- [29] Dale B.A., Krisanaprakornkit S.: Defensins antimicrobial peptides in the oral cavity. *J. Oral Pathol. Med.*, 2001; 30: 321–327

- [30] De Smet K., Contreras R.: Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.*, 2005; 18: 1337–1347
- [31] Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W.L., Bevins C.L.: Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 3952–3956
- [32] Durr M., Peschel A.: Chemokines meet defensins: the merging concept of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 6515–6517
- [33] Eriksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I.: Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 269–275
- [34] Fedtke I., Gotz F., Peschel A.: Bacterial evasion of innate host defenses—the *Staphylococcus aureus* lesson. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2004; 294: 189–194
- [35] Fukuoka S., Howe J., Andra J., Gutschmann T., Rossle M., Brandenburg K.: Physico-chemical and biophysical study of the interaction of hexa- and heptaacyl lipid A from *Erwinia carotovora* with magainin 2-derived antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 2051–2057
- [36] Gallo R.L., Nizet V.: Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2003; 3: 402–409
- [37] Ganz T.: Immunology. Versatile defensins. *Science*, 2002; 298: 977–979
- [38] Ganz T.: Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3: 710–720
- [39] Ganz T.: Microbiology: Gut defence. *Nature*, 2003; 422: 478–479
- [40] Ganz T.: Antimicrobial polypeptides. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 75: 34–38
- [41] Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I.: Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1985; 76: 1427–1435
- [42] Gidalevitz D., Ishitsuka Y., Muresan A.S., Kononov O., Waring A.J., Lehrer R.I., Lee K.Y.: Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 6302–6307
- [43] Groisman E.A., Parra-Lopez C., Salcedo M., Lipps C.J., Heffron F.: Resistance to host peptides is necessary for *Salmonella virulence*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 11939–11943
- [44] Hancock R.E., Rozek A.: Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002; 206: 143–149
- [45] Hattenbach L.O., Gumbel H., Kippenberger S.: Identification of beta-defensins in human conjunctiva. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998; 42: 3332
- [46] Hiemstra P.S.: Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006; 34: 276–278
- [47] Hirsch J.G.: Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 1956; 103: 589–611
- [48] Hirsch J.G., Cohn Z.A.: Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.*, 1960; 112: 1005–1014
- [49] Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999; 284: 1313–1318
- [50] Hubert P., Herman L., Maillard C., Caberg J.H., Nikkels A., Pierard G., Foidart J.M., Noel A., Boniver J., Delvenne P.: Defensins induce recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed *in vitro* and transplanted *in vivo*. *The FASEB J.*, 2007; 21: 2765–2775
- [51] Islam D., Bandholtz L., Nilsson J., Wigzell H., Christensson B., Agerberth B., Gudmundsson G.: Downregulation of bactericidal peptides in enteric infection: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.*, 2001; 7: 180–195
- [52] Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol.*, 2004; 172: 1169–1176
- [53] Kim C., Gajendran N., Mittrucker H.W., Weiward M., Song Y.H., Hurwitz R., Wilmanns M., Fischer G., Kaufmann S.H.: Human α -defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4830–4835
- [54] Lehmann J., Retz M., Harder J., Krams M., Kellner U., Hartmann J., Hohgräve K., Raffenberg U., Gerber M., Loch T., Weichert-Jacobsen K., Stöckle M.: Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect. Dis.*, 2002; 2: 20
- [55] Lehrer R.I.: Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004; 2: 727–738
- [56] Lehrer R.I., Ganz T.: Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999; 11: 23–27
- [57] Lehrer R.I., Ganz T.: Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.*, 2002; 9: 18–22
- [58] Lehrer R.I., Ganz T.: Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002; 14: 96–102
- [59] Lehrer R.I., Lichtenstein A.K., Ganz T.: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993; 11: 105–128
- [60] Liu A.Y., Destoumieux D., Wong A.V., Park C.H., Valore E.V., Liu L., Ganz T.: Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 2002; 118: 275–281
- [61] Mallow E.B., Harris A., Salzman N., Russell J.P., DeBerardinis R.J., Ruchelli E., Bevins C.L.: Human enteric defensins. Gene structure and development expression. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 4038–4045
- [62] Marchini G., Lindow S., Brismar H., Stabi B., Berggren V., Ulfgren A.K., Lonne-Rahm S., Agerberth B., Gudmundsson G.H.: The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br. J. Dermatol.*, 2002; 147: 1127–1134
- [63] Markeeva N., Lysovskiy I., Zhuravel E., Soldatkina M., Lyzogubov V., Usenko V., Potapov V., Pogrebnoy P.: Involvement of human beta-defensin-2 in proliferation of transformed cells of human cervix. *Exp. Oncol.*, 2005; 27: 308–313
- [64] Nagaoka I., Hirota S., Niyonsaba F., Hirata M., Adachi Y., Tamura H., Heumann D.: Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14+ cells. *J. Immunol.*, 2001; 167: 3329–3338
- [65] Nam M.J., Kee M.K., Kuick R., Hanash S.M.: Identification of defensin α -6 as a potential biomarker colon adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 8260–8265
- [66] Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 524–529
- [67] Nizet V., Gallo R.L.: Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2003; 35: 670–676
- [68] Nizet V., Ohtake T., Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., Dorschner R.A., Pestonjamas V., Piraino J., Huttner K., Gallo R.L.: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, 2001; 414: 454–457
- [69] Ohara T., Morishita T., Suzuki H., Masaoka T., Nagata H., Hibi T.: Pathophysiological role of human β -defensin 2 in gastric mucosa. *Intern. J. Mol. Med.*, 2004; 14: 1023–1027
- [70] O’Neil D.A., Cole S.P., Martin-Porter E., Housley M.P., Liu L., Ganz T., Kagnoff M.F.: Regulation of human β -defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 5413–5415
- [71] Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D.: Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003; 62: ii17–ii21
- [72] Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y.: Structure and organization of the human antibacterial peptide LL-37 in phospholipids membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.*, 1999; 341: 501–513
- [73] Ouellette A.J.: Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2004; 18: 405–419
- [74] Ouellette A.J., Hsieh M.M., Nosek M.T., Cano-Gauci D.F., Huttner K.M., Buick R.N., Selsted M.E.: Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptidin isoforms. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 5040–5047
- [75] Ouellette A.J., Selsted M.E.: Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.*, 1996; 10: 1280–1289
- [76] Pacova H., Kucera T., Astl J., Martinek J.: Detection of beta-defensins and NOS in healthy and pathological nasal mucosa. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, 2004; 148: 239–240

- [77] Papagianni M.: Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 2003; 21: 465–499
- [78] Patrzykat A., Douglas S.E.: Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection. *Protein Pept. Lett.*, 2005; 12: 19–25
- [79] Perron G.G., Zasloff M., Bell G.: Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. R. Sci.*, 2006; 273: 251–256
- [80] Peschel A., Collins L.V.: *Staphylococcal* resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* 2001; 22: 1651–1659
- [81] Philippott M.P.: Defensins and acne. *Mol. Immunol.*, 2003; 40: 457–462
- [82] Raj P.A., Antonyraj K.J., Karunakaran T.: Large-scale synthesis and functional elements for antimicrobial activity of defensins. *Biochem. J.*, 2000; 347: 633–641
- [83] Raqib R., Sarker P., Bergman P., Ara G., Lindh M., Sack D.A., Nasirul Islam K.M., Gudmundsson G.H., Andersson J., Agerberth B.: Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 9178–9183
- [84] Rosenberger C.M., Gallo R., Finlay B.B.: Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2422–2427
- [85] Salzman N.H., Ghosh D., Huttner K.M., Paterson Y., Bevins C.L.: Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, 2003; 422: 522–526
- [86] Schmidtchen A., Frick I.M., Andersson E., Tapper H., Björck L.: Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.*, 2002; 46: 157–168
- [87] Selsted M.E., Harwig S.S., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R.I.: Primary structures of three neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.*, 1985; 76: 1436–1439
- [88] Serensen O.E.: The human cathelicidin hCAP-18. *Dan. Med. Bull.*, 2005; 52: 1–10
- [89] Shafer W.M., Qu X., Waring A.J., Lehrer R.I.: Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 1829–1833
- [90] Skarnes R.C., Watson D.W.: Characterization of leukin: an antibacterial factor from leucocytes active against Gram-positive pathogens. *J. Exp. Med.*, 1956; 104: 829–845
- [91] Starner T.D., Agerberth B., Gudmundsson G.H., McCray P.B.Jr: Expression and activity of β -defensins and LL-37 in the developing human lung. *J. Immunol.*, 2005; 174: 1608–1615
- [92] Szyk A., Wu Z., Tucker K., Yang D. Lu W., Lubkowski J.: Crystal structure of human α -defensin HNP4, HD5, and HD6. *Protein Sci.*, 2006; 15: 2749–2760
- [93] Tang Y.Q., Yeaman M.R., Selsted M.E.: Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 6524–6533
- [94] Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E.: A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leucocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* 1999; 286: 498–502
- [95] Tomasinsig L., Zanetti M.: The cathelicidins – structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005; 6: 23–34
- [96] Uzzell T., Stolzenberg E.D., Shinnar A.E., Zasloff M.: Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*, 2003; 24: 1655–1667
- [97] van Wetering S., Sterk P.J., Rabe K.F., Hiemstra P.S.: Defensins: key players or bystander in infection, injury, and repair in the lung. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999; 104: 1131–1138
- [98] Wang W., Owen S.M., Rudolph D.L., Cole A.M., Hong T., Waring A.J., Lal R.B., Lehrer R.I.: Activity of α - and θ -defensins against primary isolates of HIV-1. *J. Immunol.*, 2004; 173: 515–520
- [99] Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schwab M., Linzmeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins C.L.: Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 18129–18134
- [100] Wehkamp J., Schmid M., Fellermann K., Stange E.F.: Defensins deficiency, intestinal microbes, and clinical phenotypes of Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 77: 460–465
- [101] Wiechula B., Tustanowski J.P., Martirosian G.: Peptydy antydrobnoustrojowe. *Wiad. Lek.*, 2006; 59: 542–547
- [102] Wilson C.L., Ouellette A.J., Satchell D.P., Ayabe T., Lopez-Boado Y.S., Stratman J.L., Hultgren S.J., Matrisian L.M., Parks W.C.: Regulation of intestinal α -defensin activation by metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*, 1999; 286: 113–117
- [103] Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J., Oppenheim J.J.: Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 181–215
- [104] Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J.: Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.*, 2002; 23: 291–296
- [105] Yang D., Chertov O., Oppenheim J.J.: Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.*, 2001; 69: 691–697
- [106] Yasin B., Wang W., Pang M., Cheshenko N., Hong T., Waring A.J., Herold B.C., Wagar E.A., Lehrer R.I.: θ defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.*, 2004; 78: 5147–5156
- [107] Zanetti M.: The role cathelicidins in innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2005; 7: 179–196
- [108] Zanetti M., Gennaro R., Romeo D.: Cathelicidins: a novel protein family with common proregion and variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.*, 1995; 374: 1–5
- [109] Zasloff M.: Reconstructing one of nature's designs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000; 7: 236–238
- [110] Zasloff M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002; 415: 389–395
- [111] Zasloff M.: Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 8913–8914

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.