

Magdalena Mizerska-Dudka<sup>1\*</sup>, Mariola Andrejko<sup>2</sup>, Martyna Kandefor-Szerszeń<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>2</sup>Zakład Immunologii Bezkęrgowców, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMCS

Wpłynęło w marcu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka peptydów przeciwdrobnoustrojowych. 3. Przeciwwirusowe peptydy kationowe. 3.1. Peptydy kationowe człowieka. 3.1.1. Defensyny. 3.1.2. Katelicyny. 3.1.3. Laktoferyna i jej pochodna laktoferycyna. 3.2. Peptydy kationowe owadów. 3.2.1. Melityna i cekropina A. 3.2.2. Alloferon 1 i 2. 3.2.3. Mirystylowany peptyd *Heliothis virescens*. 4. Mechanizmy przeciwwirusowego działania peptydów kationowych. 5. Podsumowanie

#### Antiviral cationic peptides in humans and insects

**Abstract:** Antimicrobial peptides (AMP's), sometimes called Host Defense Peptides (HDP's), synthesised by various kind of living organisms (animals, plants, bacteria) present broad range of activities. Antibacterial, antifungal, antiparasitic, antiviral, anticancer or even contraceptive activities of AMP's have been indicated. Important feature of these molecules is also immunomodulation, which enable synchronized function of immune system against infection or cancer cells. Properties and modes of action of AMP's make them potential therapeutic agents against viruses. Among human AMP's, antiviral activity was examined for defensins, LL-37 or lactoferrin/lactoferricin. Insects like other invertebrate organisms, are also good source of antiviral peptides, for example cecropin A, melittin, alloferon 1 and 2, myristoylated peptide of *Heliothis virescens*. These peptides inhibit binding of viruses to host cells, exert influence on viral envelope or host cells membranes. AMP's can also modulate expression of both viral or host genes essential for viral replication. Important features of antiviral peptides are the regulation of the synthesis of cytokines and their receptors, and modulation of immunocompetent cell activity or chemotactic activity, called in general immunomodulation.

1. Introduction. 2. Basic features of antimicrobial peptides. 3. Antiviral cationic peptides. 3.1. Cationic peptides in humans. 3.1.1. Defensins. 3.1.2. Cathelicidins. 3.1.3. Lactoferrin and its derivative – lactoferricin. 3.2. Cationic peptides from insects. 3.2.1. Melittin and cecropin A. 3.2.2. Alloferon 1 and 2. 3.2.3. Myristoylated peptide of *Heliothis virescens*. 4. Mechanisms of action of antiviral cationic peptides. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** AMP's człowieka, AMP's owadów, immunomodulacja, przeciwwirusowe peptydy kationowe, odporność wrodzona  
**Key words:** antiviral cationic peptides, human AMP's, immunomodulation; innate immunity, insect AMP's

## 1. Wstęp

Odkrycie przez A. Fleminga antybiotycznych właściwości pleśni kropidlaka *Penicillium notatum*, a następnie penicyliny i jej aktywności terapeutycznej przez H. Florey i B. Chain rozpoczęło złotą erę antybiotyków [25]. Jednak powszechne i często nieprawidłowe stosowanie leków spowodowało pojawianie się antybiotykooporności wśród mikroorganizmów. Obecnie można zaobserwować pewnego rodzaju wyścig pomiędzy naukowcami poszukującymi nowych, bardziej skutecznych antybiotyków, a mikroorganizmami rozwijającymi nowe mechanizmy antybiotykooporności. Dlatego zwrócono uwagę na związki przeciwdrobnoustrojowe, w tym peptydy kationowe, zaangażowane we wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej zarówno zwierząt (kręgowców i bezkręgowców), jak i roślin. Stwierdzono również, że bakterie, głównie Gram-dodatnie pałeczki fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*, są zdolne do wytwarzania przeciwdrobnoustrojowych peptydów – bakteriocyn (AMP's – Antimicrobial

Peptides) [33, 44, 49]. Badania dowiodły, że AMP's poza działaniem przeciwdrobnoustrojowym (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, Gram-ujemnym, grzybom), wykazują również działanie przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwpasożytnicze i/lub antykoncepcyjne [44, 48, 50]. Ważną cechą peptydów kationowych jest działanie immunomodulujące, warunkujące koordynację całego układu immunologicznego gospodarza, pozwalające na skuteczną eliminację czynników patogennych lub komórek nowotworowych. W celu podkreślenia tej funkcji, peptydy kationowe są również nazywane peptydami odpornościowymi (Host Defense Peptides – HDP) [17, 20, 27, 31]. Obecnie prowadzone są badania nad uzyskaniem syntetycznych i modyfikowanych pochodnych na bazie naturalnie występujących AMP's (LL-37), charakteryzujących się niewrażliwością na działanie proteaz, brakiem toksyczności, zdolnością do hamowania stanu zapalnego poprzez efektywniejsze wiązanie LPS (lipopolisacharydu) lub LTA (kwasu lipotejchojowego) oraz większą aktywnością przeciwdrobnoustrojową [37]. Ogromnym problemem w medycy-

\*Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMCS; ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. (081) 537 59 42; e-mail: mizeryjka@interia.pl

nie obok antybiotykooporności bakterii i grzybów jest dostępność związków przeciwwirusowych, skutecznych wobec zagrażających życiu wirusów, np. HIV (Human Immunodeficiency Virus), HBV (Hepatitis B Virus) i HCV (Hepatitis C Virus). Właściwości oraz mechanizm działania peptydów kationowych skłoniły wielu badaczy do poszukiwania tych związków wśród AMP's.

## 2. Ogólna charakterystyka peptydów przeciwdrobnoustrojowych

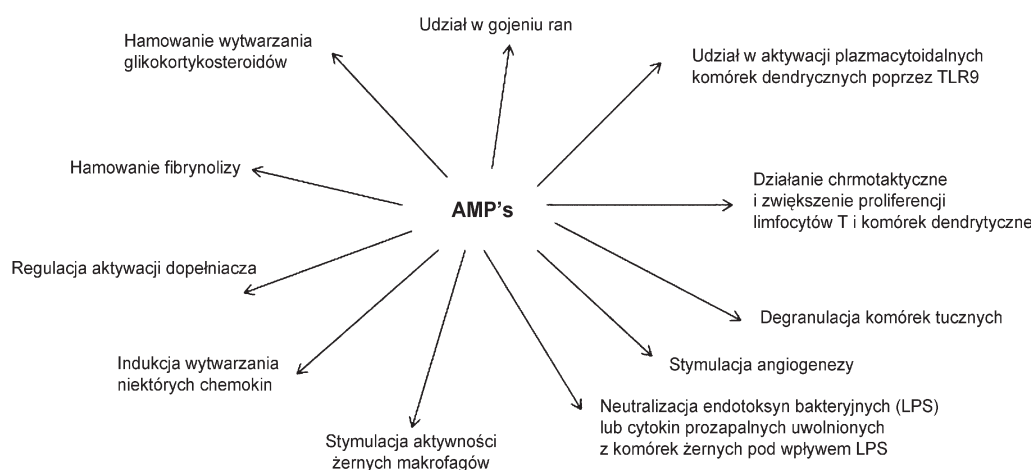
Na podstawie informacji umieszczonych w bazie danych Antimicrobial Peptides Database, do grudnia 2010, u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych opisano 1670 peptydów przeciwdrobnoustrojowych [24]. Do AMP's zaliczono peptydy zbudowane z 12–50 aminokwasów i posiadające masę cząsteczkową 3–10 kDa, rzadko powyżej 20 kDa, których cechą charakterystyczną jest obecność 2–9 ładunków dodatnich. Obecnie do przeciwdrobnoustrojowych i odpornościowych AMP's włączono także polipeptydy i białka o masie cząsteczkowej znacznie większej od klasycznych AMP's oraz peptydy o charakterze anionowym [39, 60]. Obecność dodatniego ładunku w cząsteczkach AMP's związana jest z brakiem lub niewielką ilością aminokwasów kwaśnych (Glu lub Asp) oraz dużą aminokwasów zasadowych (Arg, Lys, His). Aminokwasy hydrofobowe stanowią 30–50% składu aminokwasowego AMP's [20].

Na podstawie sekwencji aminokwasowej oraz struktury drugorzędowej, określonej za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (Nuclear Magnetic Resonance – NMR), AMP's można zaliczyć do następujących klas [44]:

- liniowych,  $\alpha$ -helikalnych peptydów;
- peptydów o strukturze stabilizowanej mostkami dwusiarczkowymi, zawierających w cząsteczce kombinację układu  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -kartki, trzy antyrów-

- nolegle ułożone struktury  $\beta$ -kartki lub strukturę szpilki do włosów zbudowaną z motywu  $\beta$ -kartki;
- peptydów zawierających znaczną ilość aminokwasu jednego typu, np. glicyny i/lub proliny;
- peptydów zawierających rzadkie, modyfikowane aminokwasy.

Podstawową właściwością peptydów przeciwdrobnoustrojowych, warunkującą zdolność niszczenia komórek drobnoustrojów i komórek nowotworowych jest posiadanie dodatniego ładunku oraz właściwości amfipatycznych. Dzięki temu peptydy kationowe wiążą się z ujemnie naładowaną powierzchnią komórki docelowej [23]. W przypadku komórek bakterii Gram-ujemnych AMP's oddziałują z LPS, a w przypadku Gram-dodatnich z kwasem teichojowym i peptydoglikanem (PG), wypierając jony dwuwartościowe. Umożliwia to wiązanie się z ujemnie naładowanymi lipidami, występującymi po zewnętrznej stronie błony komórkowej, tj. z fosfatydyloglicerolem, kardiolipiną, czy fosfatydyloseryną [21]. Peptydy kationowe wykazują również działanie przeciwnowotworowe, wiążąc się z ujemnie naładowanymi lipidami w błonie komórek nowotworowych [23]. Mechanizm działania peptydów kationowych polega na dezintegracji błony komórkowej, poprzez formowanie w niej kanałów, depolaryzację lub fragmentację, w efekcie prowadząc do śmierci komórki. Na podstawie sposobu oddziaływania peptydów z błoną komórkową oraz mechanizmu jej niszczenia wyróżniamy kilka modeli oddziaływania AMP's z błoną komórki docelowej: model „dywanowy”; „klepek beczki”; „porów toroidalnych” oraz model nawiązujący do działania detergentów [23]. Według modelu „dywanowego” peptydy układają się na powierzchni błony komórkowej, równoległe do jej płaszczyzny. Po osiągnięciu określonego stężenia progowego, wykazują właściwości podobne do detergentów, co prowadzi do powstawania w błonie porów i jej fragmentacji w wyniku formowania miceli. Natomiast model „klepek beczki” sugeruje, że peptydy



Rys. 1. Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w regulacji odpowiedzi immunologicznej ssaków na przykładzie defensyn i LL-37 [8, 18, 31]

wbudowują się w błonę komórkową prostopadle do jej płaszczyzny, ściśle przylegając do siebie w ten sposób, że ich hydrofilne regiony skierowane są do światła formowanego kanału, natomiast regiony hydrofobowe oddziałują z dwuwarstwą lipidową. Również model „porów toroidalnych” zakłada formowanie porów przez AMP's w błonie komórki docelowej, z tym że hydrofilne regiony peptydów asocjują z resztami fosfolipidowymi lipidów błony, natomiast regiony hydrofobowe z lipidami. W powstających porach błona komórkowa wyściela wnętrze porów [27]. Wykazano, że niektóre AMP's mogą prowadzić do śmierci komórki docelowej poprzez hamowanie syntezy białek, składników ściany komórkowej, hamowanie aktywności enzymów czy hamowanie syntezy DNA lub RNA [23, 27, 30, 39, 42].

Badania wykazały, że niektóre z peptydów przeciwdrobnoustrojowych charakteryzują się słabą aktywnością bakteriobójczą, a ich główną funkcją jest immunomodulacja, umożliwiającą zsynchronizowane działania całego układu odpornościowego, w celu zwalczania zakażenia lub eliminacji komórek nowotworowych. Aktywują one wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, regulują stan zapalny, stymulują gojenie ran i inicjują odporność nabytą [31].

### 3. Przeciwwirusowe peptydy kationowe

Większość obecnie znanych AMP's posiada aktywność przeciwbakteryjną i/lub przeciwgrzybową. Coraz większe zainteresowanie budzą jednak peptydy o działaniu przeciwwirusowym. Na podstawie bazy danych APD takie działania przypisuje się obecnie 103 AMP's. Wśród nich dużą grupę stanowią peptydy kationowe ssaków i owadów [24].

#### 3.1. Peptydy kationowe człowieka

##### 3.1.1. Defensyny

Ssacze defensyny są to nieglikozyłowane peptydy kationowe o masie cząsteczkowej 3,5–6 kDa, zróżnicowanej sekwencji aminokwasowej i konserwatywnych cysteinach tworzących mostki dwusiarczkowe stabilizujące strukturę cząsteczki. U człowieka wyróżniono dwie klasy defensyn:  $\alpha$ -defensyny i  $\beta$ -defensyny [14, 17].  $\alpha$ -defensyny posiadają mostki dwusiarczkowe utworzone pomiędzy cysteinami w pozycji 1 i 6, 2 i 4 oraz 3 i 5. Należą do nich HNP-1, 2, 3, 4 (Human Neutrophil Peptides) oraz HD5 i HD6 (Human Defensins). W  $\beta$ -defensynach mostki dwusiarczkowe są formowane pomiędzy cysternami w pozycji 1–5, 2–4 i 3–6. U człowieka zidentyfikowano sześć  $\beta$ -defensyn, hBD-1 do 6 (human  $\beta$  Defensins) [17]. Defensyny wytwarzane są w postaci nieaktywnych propeptydów, ulegających aktywacji na drodze proteolizy.  $\alpha$ -defensyny są syntetyzowane konstytutywnie i magazynowane w granulach neu-

trofilów, komórkach Paneth'a, wytwarzane są również przez monocyty/makrofagi i komórki NK. Natomiast  $\beta$ -defensyny są syntetyzowane po indukcji, np. LPS lub cytokinami (INF- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ ) przez keratynocyty i komórki nabłonkowe błon śluzowych układu oddechowego, pokarmowego, moczowego i rozrodczego [14, 31].

##### 3.1.2. Katelicydyny

Katelicydyny są peptydami powstającymi z białka prekursorowego, zawierającego na N-końcu wysoce konserwatywną sekwencję sygnałową i proregion podobny do katelin, inhibitorów katepsyny L [32]. U człowieka pojedynczy gen *camp* koduje nieaktywne białko prekursorowe o masie cząsteczkowej ok. 18 kDa, zwane hCAP-18. Cząsteczka białka prekursorowego jest stabilizowana dwoma mostkami dwusiarczkowymi. Białko prekursorowe jest magazynowane w granulach neutrofilów, NK i komórek tucznych. Również komórki nabłonkowe skóry, płuc, jelit, gruczołów mlecznych wytwarzają i uwalniają hCAP18. W surowicy krwi stwierdzono obecność hCAP18, związanego z lipoproteinami. W wyniku ograniczonej proteolizy z prekursorowego białka powstaje aktywny peptyd – LL-37. W jego uwalnianiu uczestniczy proteaza serynowa kalikreina (z keratynocytów) lub proteinaza 3 z neutrofilów. W przypadku LL-37 powstającego w skórze, peptyd ten może ulegać dalszej obróbce z udziałem m.in. proteaz wytwarzanych przez mikroflorę do pochodnych o różnorodnych funkcjach. Nazwa LL-37 dotyczy dojrzałego AMP's. Zbudowany jest z 37 aminokwasów, z czego dwa pierwsze to leucyny. Peptyd ten, bogaty w lizynę i argininę, należy do liniowych,  $\alpha$ -helikalnych AMP's [14, 17, 31, 32]. LL-37 został opisany jako peptyd przeciwbakteryjny, ale o małej aktywności. Dopiero wysokie stężenie peptydu lub obniżona siła jonowa środowiska i zawartość jonów dwuwartościowych, wpływa na wzrost aktywności przeciwbakteryjnej. Natomiast jego główną rolą jest udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz działanie przeciwzapalne [32].

##### 3.1.3. Laktoferyna i jej pochodna laktoferycyna

Laktoferyna jest glikoproteiną o masie cząst. 80 kDa, wiążącą Fe<sup>3+</sup> i wytwarzaną przez neutrofile. W dużych ilościach występuje np. w mleku, ślinie, spermie, łzach oraz w wydzielinie śluzowo-surowiczej okrężnicy. Jej właściwości przeciwdrobnoustrojowe determinuje zdolność wiązania jonów żelaza [3]. Pochodną laktoferyny o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i immunomodulujących jest laktoferycyna. *In vivo* powstaje ona w przewodzie pokarmowym na drodze proteolitycznego odcięcia (z udziałem pepsyny) N-końca laktoferyny. Ludzka laktoferycyna, zbudowana z 49 aminokwasów jest stabilizowana przez dwa mostki dwusiarczkowe. Laktoferycyna ma właściwości amfipatyczne warunkujące jej właściwości przeciwdrobnoustrojowe [36].

### 3.2. Peptydy kationowe owadów

Zainteresowanie peptydami przeciwdrobnoustrojowymi bezkręgowców, a szczególnie owadów, rozpoczęło się w 1980 roku od izolacji cekropin z immunizowanych poczwarek *Hyalophora cecropia* [52]. Od tego momentu opisano wiele peptydów u różnych przedstawicieli tej gromady. U *Drosophila melanogaster*, najlepiej zbadanego gatunku owada stwierdzono obecność 20 genów kodujących 8 rodzin AMP's (większość występuje w postaci kilku izoform): andropin, attacyn, cekropin, defensyn, dipterycyn, drosomycyn, drosocyn, mecznikowin [26, 54]. W ostatnich latach opisano 12 peptydów otrzymanych z hemolimfy gąsienic *Galleria mellonella* immunizowanych żywymi komórkami bakterii Gram-ujemnej *E. coli* i/lub Gram-dodatniej *Micrococcus luteus*, tj. Gm peptyd bogaty w prolinę 1 i 2, Gm anionowy peptyd 1 i 2, defensyna *Galleria* (galiomycyna), Gm peptyd podobny do defensyn (gallerimycyna), Gm apolipoforycyna, Gm peptyd podobny do cekropiny D oraz 4 peptydy podobne do moricyny A1 *Bombyx mori* [7, 12].

Głównym miejscem syntezy AMP's owadów jest ciało tłuszczowe, a w mniejszym stopniu hemocyty i komórki nabłonkowe. Wydzielane do hemolimfy, współdziałają ze sobą oraz innymi czynnikami mechanizmów systemowej odpowiedzi immunologicznej. Z kolei wytwarzane przez nabłonki peptydy uczestniczą w lokalnych mechanizmach odpowiedzi immunologicznej [16, 22, 54]. Istnieją doniesienia o przeciwwirusowym działaniu niektórych peptydów kationowych owadów. Mechanizm działania przeciwwirusowego został zbadany m. in. dla melityny, cekropiny A, alloferonu 1 i 2 oraz mirystylowanego peptydu wyizolowanego z *Heliothis virescens* [58].

#### 3.2.1. Melityna i cekropina A

Melityna i cekropina A należą do klasy  $\alpha$ -helikalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych owadów. Cekropiny były pierwszymi peptydami opisanymi u zwierząt [52]. Zbudowane są z 29–42 aminokwasów i pozbawione cysteiny i metioniny [9]. Cechą charakterystyczną większości cekropin jest obecność tryptofanu jako pierwszego lub drugiego aminokwasu N-końca oraz obecność na C-końcu grupy amidowej. Liniowe,  $\alpha$ -helikalne AMP's wykazują przede wszystkim działanie bakteriobójcze w stosunku do Gram-ujemnych i w mniejszym stopniu do bakterii Gram-dodatnich [9]. Do cekropin należy również melityna, zbudowana z 26 aminokwasów, wyizolowana z jadu pszczoły *Apis mellifera*. Wykazuje ona toksyczne działanie wobec komórek ssaków (liza erytrocytów). Badania nad stworzeniem pochodnej owadzych peptydów cekropiny i melityny, mającej zastosowanie terapeutyczne i pozbawionej aktywności hemolitycznej zaowocowały uzyskaniem peptydu modelowego CEMA (cecropin-melittin hybrid peptide), który wykazywał właściwości

immunomodulujące. Między innymi hamował ekspresję genów indukowaną LPS poprzez blokowanie oddziaływań pomiędzy endotoksyną i surowiczym białkiem wiążącym LPS (LPS Binding Protein – LBP) [4, 21, 47].

#### 3.2.2. Alloferon 1 i 2

Alloferon 1 i 2 zostały wyizolowane z hemolimfy gąsienic plujki pospolitej, *Calliphora vicina*, immunizowanych martwymi komórkami bakterii Gram-ujemnej *E. coli* i Gram-dodatniej *M. luteus*. Zbudowane są odpowiednio z 13 i 12 aminokwasów. Alloferon 2 odpowiada skróconej, N-końcowej formie alloferonu 1. Nie wiadomo czy alloferon 2 powstaje na drodze proteolizy alloferonu 1, czy obie formy są kodowane przez dwa różne geny [11]. Nazwa alloferon nawiązuje do funkcjonalnego podobieństwa (pobudzanie komórek cytotoksycznych) pomiędzy tymi peptydami a interferonem (-feron) i izolacji z organizmu bezkręgowca (allo-) [48].

#### 3.2.3. Mirystylowany peptyd *Heliothis virescens*

N-mirystylowany peptyd, o m. cząsteczkowej 916 Da został wyizolowany z hemolimfy gąsienic *H. virescens*. Zbudowany jest z 6 aminokwasów, a na N-końcu ma przyłączoną resztę nasyconego, 14-węglowego mirystylowego kwasu tłuszczowego. Natomiast na C-końcu cząsteczki występuje histydyna z przyłączonymi dwoma grupami metylowymi, co nadaje cząsteczce dodatni ładunek. Niewielka masa cząsteczkowa, obecność dodatniego ładunku oraz kwasu tłuszczowego warunkuje prawdopodobnie wewnątrzkomórkowe, przeciwwirusowe działanie peptydu [41]. Peptyd ten został wyizolowany ze zmelanizowanej hemolimfy, istnieje więc prawdopodobieństwo, że jest on metabolitem powstającym podczas syntezy melanin. Obserwowana w badaniach aktywność przeciwwirusowa hemolimfy *H. virescens* wobec 6 wirusów DNA i RNA, związana z obecnością profenoolooksydazy i melanizacją, zależała właśnie od tego peptydu [40, 43].

### 4. Mechanizmy przeciwwirusowego działania peptydów kationowych

Przeciwwirusowe działanie, głównie przeciwko otoczkowym wirusom DNA i RNA, wykazują przedstawiciele wszystkich czterech klas AMP's [27]. Wyróżniono następujące mechanizmy przeciwwirusowego działania AMP's:

1. Blokowanie adhezji wirusa do powierzchni komórki wrażliwej.
2. Oddziaływanie z otoczką wirusową lub błoną komórki docelowej.
3. Modulowanie ekspresji genów wirusowych/interferencja z replikacją wirusa.
4. Regulowanie/modulowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza.



ad.1. Stwierdzono, że proteoglikany (anionowe związki występujące na powierzchni komórek i w macierzy zewnątrzkomórkowej), a w szczególności siarczan heparanu biorą udział w adhezji niektórych wirusów do powierzchni komórki [51]. W związku z tym, obdarzone dodatnim ładunkiem peptydy kationowe na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych i kompetycji, mogą blokować wiązanie wirusów do powierzchni komórki docelowej. Stwierdzono, że  $\alpha$ -defensyny, laktoferyna/laktoferycyna oraz peptyd LL-37 wiążą się do proteoglikanów, hamując adhezję wirusów do komórki [2, 36, 45]. Laktoferyna i jej pochodna laktoferycyna są aktywne zarówno w stosunku do wirusów otoczkowych, HSV-1 i -2 (Herpes Simplex Virus-1 i -2), HIV (Human Immunodeficiency Virus), HCV (Hepatitis C Virus), jak i pozbawionych otoczki, tj. HPV (Human Papillomavirus). Oba peptydy hamują zakażenie komórek wrażliwych na wczesnych etapach infekcji, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z wirusem lub wiązanie do komórkowych receptorów wirusa, tj. siarczanu heparanu [1, 36]. Stwierdzono, że laktoferyna może efektywnie zapobiegać zakażeniom HCV poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami (E1 i E2) otoczki wirusowej. Natomiast działanie przeciwko HBV polega na bezpośrednim oddziaływaniu laktoferyny na komórki wrażliwe na wirusa [55].

ad.2. Przeprowadzone badania dowiodły, że przeciwwirusowa aktywność peptydów kationowych może wynikać z ich oddziaływania na błonę komórki docelowej lub też na otoczkę wirusową. Niektóre z peptydów w sposób bezpośredni inaktywują wirusy, zapobiegając zakażeniom na etapach poprzedzających adhezję i wnikanie wirusa do komórki wrażliwej. Prawdopodobny mechanizm takiego działania peptydów polega na niszczeniu otoczek wirusowych w sposób analogiczny do niszczenia błony komórek bakteryjnych [29]. Taki mechanizm działania przypisuje się  $\alpha$ -defensynie człowieka, HNP-1, która jest aktywna wobec HSV-1 i HSV-2, jak również w stosunku do VSV (Vesicular Stomatitis Virus), wirusa grypy i CMV (Cytomegalovirus). Należy jednak zauważyć, że peptyd ten wykazuje różny stopień aktywności wobec wymienionych wirusów, co może wynikać z różnej budowy otoczek lipidowych wirusów [13, 29]. Przeciwwirusowe działanie HNP-1 stwierdzono również wobec wirusa HIV. W dawkach nietoksycznych i fizjologicznych oraz przy braku surowicy (np. na powierzchni błon śluzowych), peptyd ten w sposób bezpośredni działa na cząstki wirusa HIV, znosząc ich zakaźność [10, 34]. HNP1-3 mogą również funkcjonować jako lektyny, które wiążąc krzyżowo glikoproteinę gp120 HIV i CD4 komórki docelowej, zapobiegają zakażeniu na etapie adhezji i wnikania wirusa [58, 29]. Podobnie wiązanie krzyżowe hemaglutyniny wirusa grypy przez defensynę, HBD3 hamuje fuzję otoczki wirusa z błoną endosomów komórki gospodarza [29]. Natomiast  $\beta$ -defensyny 2 i 3

stymulują internalizację koreceptora CXCR4, niezbędnego do zakażenia przez wirus HIV komórek immunokompetentnych [15].

ad.3. Niektóre peptydy kationowe, np. LL-37 i laktoferycyna mogą wnikać poprzez błonę komórkową lub błonę jądrową, odpowiednio do cytoplazmy lub jądra komórkowego [32]. Dzięki temu mogą regulować aktywność szlaków sygnałowych oraz wpływać na ekspresję genów zarówno komórkowych, jak i wirusowych. Stwierdzono, że AMP's modulują aktywność, proliferację i różnicowanie komórek immunologicznie kompetentnych, zaangażowanych w zwalczanie zakażeń wirusowych [6, 28, 56]. Mechanizm działania HNP-1 przeciwko HIV, w obecności surowicy lub po zakażeniu komórek wrażliwych CD4<sup>+</sup>, polega na hamowaniu aktywności komórkowej kinazy PKC, niezbędnej do replikacji wirusa. HNP-1 hamuje replikację wirusa na etapie odwrotnej transkrypcji i integracji genomu do materiału genetycznego gospodarza [10]. Owadzie peptydy kationowe, melityna i cekropina A, wykazują działanie przeciwko HIV, poprzez hamowanie ekspresji genów wirusa (genu gag) i hamowanie aktywności sekwencji LTR wirusa. Melityna może również regulować transdukcję sygnałów, poprzez aktywację fosfolipazy A<sub>2</sub> lub obniżenie aktywności kalmoduliny i PKC. Prowadzi do zmiany aktywności czynników zaangażowanych w transkrypcję HIV, np. NF- $\kappa$ B, AP-1 lub NFAT lub do indukcji inhibitorów transkrypcji, podobnych do tych indukowanych interferonem [56]. Cekropina A zapobiega również namnażaniu wirusa Junin i innych gatunków arenawirusów przez zahamowanie syntezy białek wirusa. Cekropina A powoduje zmiany w ekspresji i rozmieszczeniu białka G1 wirusa Junin. Zaburzenia w transporcie i insercji tego białka do błony komórkowej gospodarza, zapobiega powstawaniu cząstek wirusowych, ponieważ w przypadku arenawirusów są one uwalniane z zakażonej komórki poprzez pączkowanie błony komórkowej [35]. Również przeciwwirusowe działanie mirystylowanego peptydu *H. virescens* opiera się na zaburzeniu morfogenezy i/lub pączkowania wirusów. Niektóre wirusy wykorzystują mirystylowane białka w celu przyłączenia się do błony komórkowej od strony cytoplazmatycznej, co inicjuje składanie cząstek wirusa i/lub pączkowanie z błony komórkowej. Owadzi peptyd kationowy na zasadzie kompetycji z białkami wirusowymi, hamuje formowanie zakaźnych cząstek wirusa. *In vitro* peptyd ten wykazuje działanie przeciwko HIV i HSV-1. Działanie przeciwko HIV może być uwarunkowane blokowaniem wiązania białka Gag do błony komórkowej, ponieważ posiada ono resztę kwasu mirystylowego na N-końcu, niezbędną do wiązania białka do cytoplazmatycznej warstwy błony komórkowej [41]. Stwierdzono, że ludzka laktoferyna może być pochłaniana przez niektóre typy komórek, np. monocyty oraz wykazuje zdolność wiązania do DNA. Dodatkowo na N-końcu posiada 4 arginy,

które mogą stanowić sygnał transportu do jądra komórkowego. Istnieje więc możliwość, że laktoferyna/laktoferycyna funkcjonują jako peptydy przeciwwirusowe o aktywności czynników transkrypcyjnych indukujących odpowiedź immunologiczną gospodarza [1]. Peptyd LL-37 może być zaangażowany w różnicowanie komórek dendrytycznych. Pod jego wpływem mieloidalne komórki dendrytyczne (Dendritic Cells – DC's) wykazują zwiększoną zdolność do endocytozy i fagocytozy, co prawdopodobnie jest wynikiem wzrostu ekspresji  $\alpha_2$ -integrzyn i receptorów CR3 i CR4. Takie zmiany w prekursorach DC's, zwiększają ich zdolność do prezentacji antygenów, a tym samym do indukcji nabytych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej [5, 36].

ad. 4. Immunomodulująca funkcja peptydów kationowych polega na regulacji syntezy czynników odpowiedzi immunologicznej, np. cytokin i chemokin oraz ich receptorów, modulowaniu aktywności komórek immunokompetentnych oraz działaniu chemotaktycznym. Jest ona bardzo ważna w zwalczaniu zakażeń, ponieważ niektóre AMP's w fizjologicznych warunkach (stężenie, obecność jonów czy surowicy) nie wykazują bezpośredniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej [29]. Do takich peptydów należy LL-37 [5]. Badania dowiodły, że peptyd ten zwiększa ekspresję IL-8, MCP-1 i MCP-3 oraz receptorów CXCR-4, CCR2 i IL-8R, jak również sekrecję IL-8. Immunomodulująca funkcja LL-37 związana jest z aktywacją kinaz MAP, ERK1/2 i p38 w monocytach krwi obwodowej i komórkach linii komórkowej nabłonka oskrzeli [6, 46]. Natomiast HNP-1 i HNP-2 w makrofagach zwiększają ekspresję CC-chemokin (MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ ), które na zasadzie kompetycji o receptor (CCR5), uniemożliwiają wnikanie wirusa HIV do komórki docelowej [19]. Właściwości immunomodulujące posiadają także alloferony 1 i 2. *In vitro* syntetyczny odpowiednik tych peptydów stymuluje naturalną cytotoxyczność komórek NK. Natomiast *in vivo* po podaniu myszom obserwowano indukcję syntezy INF [11]. Jedną z funkcji kationowych peptydów, która również odgrywa istotną rolę w zwalczaniu zakażeń wirusowych jest działanie chemotaktyczne wobec leukocytów. Ludzka  $\alpha$ -defensyna 1 i 2 wykazuje zdolność przyciągania limfocytów T i monocytów, natomiast  $\beta$ -defensyny 1 i 3 funkcjonują jako chemoatraktanty wobec niedojrzałych komórek dendrytycznych oraz limfocytów T pamięci poprzez oddziaływanie z CCR6 [53, 59]. Również peptyd LL-37 wykazuje zdolność do przyciągania komórek immunologicznie kompetentnych (monocyty, limfocyty T, neutrofile oraz komórki tuczne) do miejsca zakażenia [18, 38].

## 5. Podsumowanie

Naturalnie występujące przeciwdrobnoustrojowe kationowe peptydy, charakteryzujące się różnorodnymi właściwościami biologicznymi, stanowią atrakcyjne

źródło związków o znaczeniu terapeutycznym. Pozyskiwane na ich bazie syntetyczne pochodne mogą okazać się skuteczne w zwalczaniu zakażeń wirusowych oraz wywołanych patogennymi mikroorganizmami i pasożytami. Obiecujące może być również stosowanie konwencjonalnych metod leczenia (np. antybiotykoterapia) w połączeniu z AMP's. Tak skonstruowane terapie mogą okazać się skuteczne między innymi ze względu na różnorodne mechanizmy działania peptydów kationowych i obecnie stosowanych terapeutyków.

## Piśmiennictwo

- Andersen J.H., Jøensen H., Sandvik K., Gutteberg T.J.: Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.* **74**, 262–271 (2004)
- Andersen J.H., Osbakk S.A., Vorland L.H., Traavik T., Guttenberg T.J.: Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res.* **51**, 141–149 (2001)
- Baker E.N., Baker H.M.: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2531–2539 (2005)
- Boman H.G., Wade D., Boman I.A., Wahlin B., Merrifield R.B.: Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett.* **259**, 103–106 (1989)
- Bowdish D.M.E., Davidson D.J., Lau Y.E., Lee K., Scott M.G., Hancock R.E.W.: Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 451–459 (2005)
- Bowdish D.M.E., Davidson D.J., Speert D.P., Hancock R.E.W.: The human cationic peptide LL-37 induces activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol.* **172**, 3758–3765 (2004)
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D.: The discovery and analysis of a diverged family of novel anti-fungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 201–212 (2008)
- Bucki R., Leszczyńska K., Namiot A., Sokołowski W.: Cathelicidin LL-37: A Multitask antimicrobial peptide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **58**, 15–25 (2010)
- Bulet P., Stöcklin R.: Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.* **12**, 3–11 (2005)
- Chang T.L., Vargas J. Jr., DelPortillo A., Klotman M.E.: Dual role of  $\alpha$ -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. *J. Clin. Immunol.* **115**, 765–773 (2005)
- Chernys S., Kim., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., Platonov V.G., Bulet P.: Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12628–12632 (2002)
- Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Suder P., Jakubowicz T.: Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, **28**, 533–546 (2007)
- Daher K.A., Selsted M.E., Lehrer R.I.: Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* **60**, 1068–1074 (1986)
- De Smet K., Contreras R.: Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins, histatins. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1337–1347 (2005)

15. Feng Z., Dubyak G.R., Lederman M.M., Weinberg A.: Cutting edge: human  $\beta$ -defensin 3 – a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J. Immunol.* **177**, 782–786 (2006)
16. Ferrandon D., Jung A.C., Criqui M., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A.: A drosopmycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.* **17**, 1217–1227 (1998)
17. Guani-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S.O., Terán L.M.: Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* **135**, 1–11 (2010)
18. Gudmundsson G.H., Agerberth B.: Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol. Methods*, **232**, 45–54 (1999)
19. Guo Ch.-J., Tan N., Song L., Douglas S.D., Ho W.-Z.: Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines. *AIDS*, **18**, 1217–1228 (2004)
20. Hancock R.E.W., Brown K.L., Mookherjee N.: Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, **211**, 315–322 (2006)
21. Hancock R.E.W., Scott M.G.: The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8856–8861 (2000)
22. Hetru C., Hoffman D., Bulet P.: Antimicrobial peptides from insects (w) Molecular mechanisms of immune responses in insects, red. Brey P.T., Hultmark D., Chapman and Hall, London, 1998, s.40
23. Hoskin D.W., Ramamoorthy A.: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochem. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1778**, 357–375 (2008)
24. <http://aps.unmc.edu/AP/about.php> (22 grudnia 2010)
25. <http://nobelprizes.com/nobel/nobel.html> (22 grudnia 2010)
26. Irving P., Troxler L., Hetru C.: Is innate enough? The innate immune response in *Drosophila*. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 557–570 (2004)
27. Jenssen H., Hamil P., Hancock R.E.W.: Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491–511 (2006)
28. Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A.: Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Lett.* **451**, 235–237 (1999)
29. Klotman M.E., Chang T.L.: Defensins in innate antiviral immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 447–456 (2006)
30. Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condi B.A., Hoffmann R., Otvos L.Jr.: The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**, 3016–3026 (2001)
31. Lai Y., Gallo R.L.: AMPed upon immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**, 131–141 (2009)
32. Lau Y., Rozek A., Scott M.G., Goosney D.L., Davidson D.J., Hancock R.E.W.: Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 583–591 (2005)
33. Lüders T., Birkemo G.A., Fimland G., Nissen-Meyer J.N., Nes I.F.: Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1797–1799 (2003)
34. Mackiewicz C.A., Yuan J., Tran P., Diaz L., Mack E., Selsted M.E., Levy J.A.:  $\alpha$ -defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS*, **17**, F23–F32 (2003)
35. Mantanic V.A.A., Castilla V.: Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **23**, 382–389 (2004)
36. Mistry N., Drobni P., Näslund J., Sunkari V.G., Jenssen H., Evander M.: The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferrin. *Antiviral Res.* **75**, 258–265 (2007)
37. Nell M.J., Tjabringa G.S., Wafelman A.R., Verrijck R., Hiemstra P.S., Driffhout J.W., Grote J.J.: Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides*, **27**, 649–660 (2006)
38. Niyonsaba F., Iwabuchi K., Someya A., Hirata M., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I.: A cathelicidin family of human antimicrobial peptide LL-37 induces Mast cell chemotaxis. *Immunology*, **106**, 20–26 (2002)
39. Otvos L.Jr.: The short proline-rich antimicrobial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1138–1150 (2002)
40. Ourth D.D., Renis H.E.: Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* hemolymph against DNA i RNA viruses *in vitro*. *Comp. Biochem. Phys. B – Comp. Biochem.* **105**, 719–723 (1993)
41. Ourth D.D.: Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 *in vitro* by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. *Biochem. Biophys. Research. Comm.* **320**, 190–196 (2004)
42. Patrzykat A., Friedrich C.L., Zhang L., Mendoza V., Hancock R.E.W.: Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 605–614 (2002)
43. Popham H.J.R., Shelby K.S., Brandt S.L., Coudron T.A.: Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **85**, 255–261 (2004)
44. Reddy K.V.R., Yedery R.D., Aranha C.: Antimicrobial peptides: premises and promises. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, **24**, 536–547 (2004)
45. Schmidtchen A., Frick I.-M., Anderson E., Tapper H., Björck L.: Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* **46**, 157–168 (2002)
46. Scott M.G., Davidson D.J., Gold M.R., Bowdish D., Hancock R.E.W.: The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* **169**, 3883–3891 (2002)
47. Sitaram N., Nagaraj R.: Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochem. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1462**, 29–54 (1999)
48. Słocińska M., Marciniak P., Rosinski G.: Insects antiviral and anticancer peptides: new leads for the future? *Protein Pept. Lett.* **15**, 578–585 (2008)
49. Słowska A., Klimuszko D.: Bakteriocynty probiotycznych pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Mikrobiol.* **40**, 87–96 (2010)
50. Smolarczyk R., Cichoń T., Szala St.: Peptydy – nowa klasa leków przeciwnowotworowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* **63**, 360–368 (2009)
51. Spillman D.: Heparan sulphate: anchor for viral intruders? *Biochimie*, **83**, 811–817 (2001)
52. Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G.: Sequence and specificity of two antimicrobial proteins in insect immunity. *Nature*, **292**, 246–248 (1981)
53. Territo M.C., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.: Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**, 2017–2020 (1989)
54. Uvell H., Engström Y.: A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet.* **23**, 342–349 (2007)

55. Valenti P, Antonini G.: Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2576–2587 (2005)
56. Wachinger M., Brack-Werner R. i wsp.: Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* **79**, 731–740 (1998) (praca jest dziełem 10 autorów)
57. Wang G., Watson K.M., Peterkofsky A., Buckheit R.W. Jr.: Identification of novel Human Immunodeficiency Virus type 1-inhibitory peptides based on the antimicrobial peptide database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1343–1346 (2010)
58. Wang W., Owen S.M., Rudolph D.L., Cole A.M., Hong T., Waring A.J., Lal R.B., Lehrer R.I.: Activity of  $\alpha$ -defensins and  $\theta$ -defensins against primary isolates of HIV-1. *J. Immunol.* **173**, 515–520 (2004)
59. Yang D., Oppenheim J.J. i wsp.:  $\beta$ -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T Cell CCR6. *Sci.* **286**, 525–528 (1999) (praca jest dziełem 11 autorów)
60. Yuan N.Y., Bayer A.S., Xiong Y.Q., Yeaman M.R.: Advances in antimicrobial peptide immunology. *Biopolymers*, **84**, 435–458 (2006)