

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV**

**KATIONTOVÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY JAKO**  
**POTENCIÁLNÍ LÉČIVA**

Diplomová práce

**Hradec Králové, 2014**

**Jaroslav Zach**

*Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. děkuji za její vstřícnost a ochotu, za cenné rady a pomoc, kterou mi poskytla při vzniku této práce.*

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.*

V Hradci Králové 20. 8. 2014

Jaroslav Zach

**Práce byla vypracována s podporou SVV 260 062**

## Obsah

1	Úvod a cíl práce .....	7
2	Historie.....	7
3	Klasifikace antimikrobních peptidů (AMPs) .....	8
3.1	Genem kódované peptidy produkované v ribosomech .....	8
4	Vlastnosti kationtových antimikrobiálních peptidů .....	9
5	Mechanismus účinku.....	9
5.1	Peptidy narušující membránu.....	11
5.1.1	Model sudové skruže ( <i>Barrel-stave model</i> ) .....	12
5.1.2	Model toroidního póru ( <i>Toroidal pore model</i> ).....	12
5.1.3	Kobercový model ( <i>Carpet model</i> ).....	12
5.1.4	Agregační model ( <i>Aggregate model</i> ).....	13
5.2	Peptidy nenarušující membránu .....	13
6	Kationtové antimikrobní peptidy produkované různými organismy .....	13
6.1	Kationtové antimikrobní peptidy produkované prokaryotními organismy .....	13
6.1.1	Kationtové peptidy produkované bakteriemi .....	13
6.1.2	Klasifikace bakteriocinů.....	14
6.2	Kationtové antimikrobní peptidy produkované eukaryotními organismy.....	16
6.2.1	Kationtové peptidy produkované prvoky .....	16
6.2.2	Kationtové peptidy produkované houbami .....	18
6.2.3	Kationtové peptidy produkované rostlinami .....	19
6.2.4	Kationtové peptidy produkované členovci.....	24
6.2.5	Kationtové peptidy produkované obratlovci .....	34
7	Praktické využití kationtových antimikrobních peptidů a výhled do budoucnosti .....	43
8	Zdroje .....	45

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Zach Jaroslav

Školitel: Doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Název diplomové práce: Kationtové antimikrobiální peptidy jako potenciální léčiva

S rychlým nárůstem výskytu bakteriálních kmenů rezistentních vůči mnoha třídám antimikrobních léčiv, je tu naléhavější potřeba vyvinout nové antimikrobiální léčebné postupy v boji s těmito patogeny. Antimikrobiální peptidy jsou malé, především kationtové peptidy, produkované v ribosomech, které narušují buněčné membrány. Přínos těchto peptidů v klinické praxi zahrnuje potenciál širokého spektra účinku, rychlou baktericidní aktivitu a nízký rozvoj rezistence. Tato práce se zaměřuje na historii, mechanismus účinku a druhy peptidů, které jsou produkovány různými organismy. Vzhledem k rozsáhlosti tématu se věnuje pouze kationtovým antimikrobiálním peptidům.

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Zach Jaroslav

Supervisor: Doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph. D.

Title of Diploma Thesis: Cationic antimicrobial peptides as potential drugs

With the rapid rise in the emergence of bacterial strains resistant to multiple classes of antimicrobial agents, there is an urgent need to develop novel antimicrobial therapies to combat these pathogens. Antimicrobial peptides (AMPs) are small, predominantly cationic ribosomally synthesized peptides, which permeabilize biological membranes. The assets of these peptides in clinical application include their potential for broad-spectrum activity, rapid bactericidal activity and low propensity for resistance development. This article is focused on history, mechanism of action and types of peptides that are produced by various organisms. Given the extensive topic only cationic antimicrobial peptides are discussed.

## **Seznam zkratek**

- ALFs – anti-lipoplysacharidové faktory
- AMK – aminokyselina
- AMP(s) – antimikrobiální peptid(y)
- CAP(s) – kationtový(é) antimikrobiální peptid(y)
- CM – cytoplazmatická membrána
- ET – extracelulární pasti (*Extracellular Traps*)
- G-negativní – Gram-negativní
- G-pozitivní – Gram-pozitivní
- HDPs – hostitelské obranné peptidy
- IGF-1 – insulínu-podobný růstový faktor-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*)
- IgG – imunoglobulin G
- IL-1B – interleukin 1B
- LAB – bakterie mléčného kvašení
- LPS – lipopolysacharidy
- LTA – kyselina lipoteichoová
- LTPs – lipid transfer proteiny
- MIC – minimální inhibiční koncentrace
- MRSA – methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
- PRP – prolin-arginin-prolin
- R&D – výzkum a vývoj (Research&Development)
- TGF- $\alpha$  – transformující růstový faktor- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$* )
- TNF- $\alpha$  – tumor nekrosis faktor- $\alpha$
- WAP(s) – syrovátkové kyselé protein(y) (*Whey Acidic Proteins*)

# 1 Úvod a cíl práce

V současnosti čelíme éře vzrůstající bakteriální rezistence v nemocničních zařízeních. Není tomu tak dávno, kdy zásoba konvenčních antibiotik stačila na vyléčení bakteriálních infekcí. V důsledku toho probíhá snaha rozpoznat a zdokonalit nové léčebné terapie, které napomáhají čelit současným a nově vznikajícím bakteriálním rezistencím. Ačkoliv se roky vylepšovaly varianty tradičních antibiotik, jež problémy s rezistencí sice řešily, ale nakonec se změnil mechanismus rezistence jako u původních sloučenin. Vývoj nových antibiotik zaostal. Z těch několika terapií, jež jsou zatím ve vývoji, se objevila kationtová antibiotika, původem přírodní, která mají určité šance na úspěch. Kationtové antimikrobní peptidy byly izolovány prakticky ze všech živých organismů, od jednoduchých bakterií až po složitější (zvířata, lidé, rostliny). Tato třída antibiotik poskytuje určitou naději při hledání nových terapeutických přístupů. Široké spektrum účinku, výhodné fyzikální vlastnosti a jejich evoluční úspěch z nich činí ideální kandidáty pro další léčebné aplikace<sup>1)</sup>.

Antimikrobiálních peptidů je velké množství a rozdělují se podle různých kritérií<sup>2-3)</sup>. Tato problematika ještě nebyla na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv zpracována a vzhledem k rozsáhlosti tématu se budu věnovat pouze kationtovým antibakteriálním polypeptidům. Základní rozdělení bude provedeno podle organismů, kterými jsou jednotlivé peptidy produkovány.

## 2 Historie

Historie AMPs začíná rokem 1939, kdy Dubos extrahoval antimikrobní směs z půdy kmene *Bacillus*. O rok později Hotchkiss a Dubos získali frakcionací této směsi sloučeninu gramicidin. Gramicidin byl toxický při intraperitoneálním podání, ale mohl být využit v léčbě kožních defektů. Tyrocidin, peptid objevený v roce 1941, účinkoval proti G-pozitivním a G-negativním bakteriím, avšak s hemolytickým účinkem k lidským červeným krvinkám<sup>4)</sup>. Dnes jsou gramicidin a tyrocidin řazeny mezi peptidová antibiotika produkováná složitými enzymovými reakcemi<sup>2)</sup> a neřadí se mezi kationtové antimikrobiální peptidy ve smyslu této práce.

Dalším získaným AMP byl purothionin z rostliny *Triticum aestivum* s účinkem proti plísním a některým patogenním bakteriím<sup>4,5)</sup>.

Prvními AMPs hub uvedenými v literatuře jsou sillucin a myceheiny produkové termofilními houbami rodu *Mucor*<sup>6,7)</sup>. Nejznámější fungální AMP – plektasin – je intenzivně studován od začátku 21. století<sup>8,9)</sup>.

Počátky výzkumu hmyzích AMPs spadají do konce 50. let 20. století<sup>10,11)</sup>, avšak za zásadní jsou považovány až práce Bomana a kol. ze 70. a 80. let<sup>12-17)</sup>.

Prvním AMP ze zvířat byl defensin izolovaný z králíčích leukocytů v roce 1956<sup>18)</sup>. Následoval bombinin – obranný peptid z kůže ropuch<sup>19,20)</sup>. Objev bombininu byl ve své době nedocenen

a teprve izolace magaininu v roce 1987 znamenala začátek systematického zkoumání AMPs obojživelníků<sup>21,22</sup>).

Již v 50. a 60. letech minulého století bylo známo, že leukocyty zabíjejí bakterie mechanismy nezávislými na kyslíku, což ukazuje, že se nejedná o reakce typické pro získanou imunitu, a že baktericidní účinky bílých krvinek jsou zprostředkovány, mimo jiné, i kationtovými peptidy<sup>23</sup>). První antimikrobiální sloučeniny nazývané lysosomální kationtové proteiny izolovali Zeya a Spitznagel<sup>24</sup>) v roce 1963. Název defensiny použili poprvé Selsted *et. al.* pro peptidy izolované z králíčích a lidských neutrofilů<sup>25,26</sup>) a později pak byly popsány další lidské obranné peptidy – kathericidiny a histatiny<sup>27,28</sup>).

Celkový počet dosud objevených nebo synteticky připravených peptidů není přesně znám, počty se v jednotlivých zdrojích liší. V každém případě se jejich počet odhaduje na několik tisíc. V databázi APD<sup>29</sup>) bylo v květnu 2014 zařazeno více než 2400 antimikrobních peptidů a proteinů.

### 3 Klasifikace antimikrobních peptidů (AMPs)

Pojem antimikrobní peptidy je nejednoznačný a lze pod něj zahrnout jakoukoli sloučeninu, která má charakter peptidu a působí proti mikroorganismům. Z biosyntetického hlediska rozdělujeme tyto látky do dvou základních skupin<sup>3,3</sup>).

- Genem kódované peptidy produkované v ribosomech
- Genem nekódované produkované složitými enzymovými reakcemi, z nichž některé se používají jako peptidová antibiotika např. gramicidin, bacitracin, kolistin a polymyxin B<sup>2,30</sup>).

Tato práce bude věnována pouze první skupině AMPs.

#### 3.1 Genem kódované peptidy produkované v ribosomech

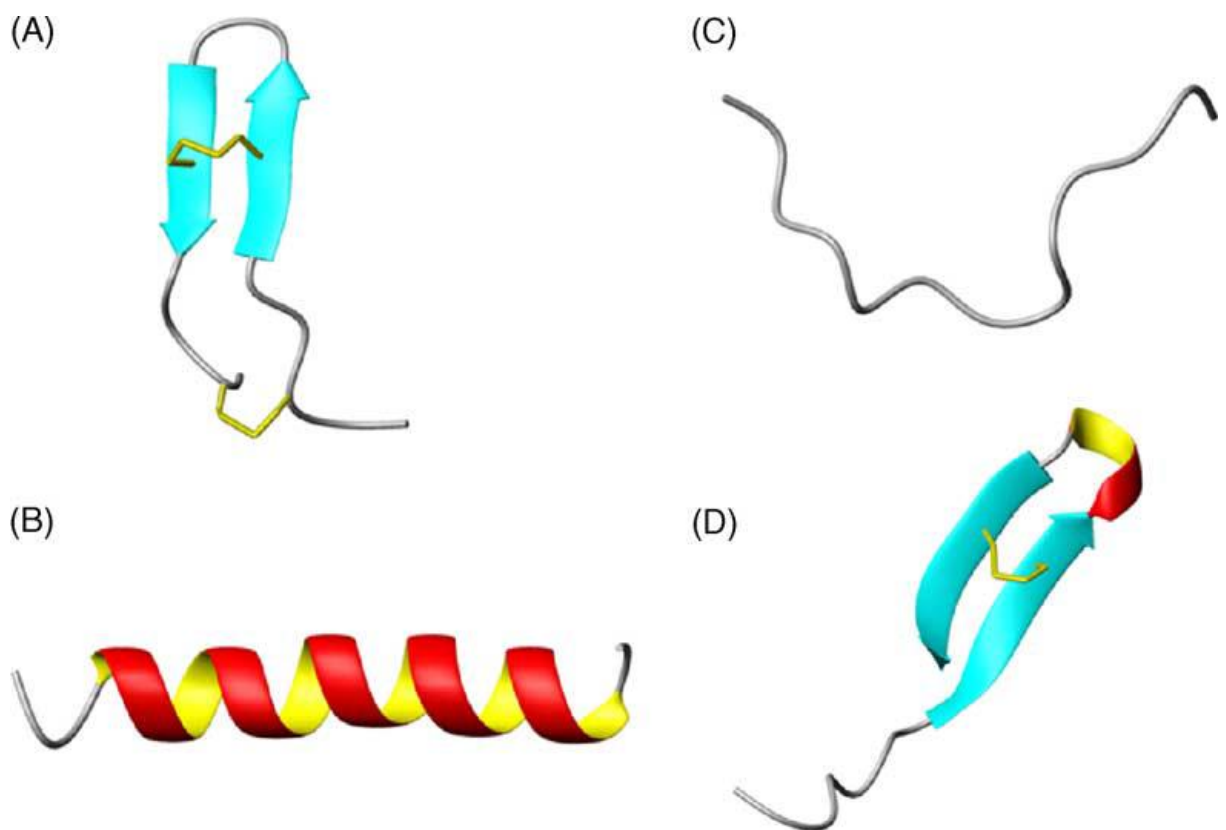
Většina prací věnovaných AMPs se zabývá pouze touto skupinou peptidů<sup>31-36</sup>). Tyto peptidy se vyznačují tím, že se kromě antimikrobního působení podílejí na modulaci imunitních systémů<sup>37-40</sup>) a bývají označovány i jinými názvy např. *host defense peptides* (HDPs)<sup>5,41-44</sup>), *alarmins*<sup>5</sup>) nebo *defensins*<sup>5</sup>). Název defensiny však není jednoznačný, protože se v širším slova smyslu používá jako synonymum pro AMPs<sup>5</sup>) a v užším významu pro označení pouze jedné specifické skupiny AMPs<sup>38,45-47</sup>).

Většina těchto peptidů je kladně nabitá a označují se proto jako kationtové antimikrobiální peptidy (CAPs)<sup>47-49</sup>). Samostatnou podskupinu tvoří CAPs bakterií, které jsou genově kódované a syntetizované v ribosomech, ale dochází u nich ještě k posttranslačním modifikacím<sup>19</sup>). Aniontové peptidy jsou prostudovány mnohem méně než peptidy kationtové. Byly nalezeny v dýchacích cestách, játrech, tenkém střevě savců a krevním séru a pro baktericidní účinek potřebují zinek jako kofaktor<sup>48</sup>).



## 4 Vlastnosti kationtových antimikrobiálních peptidů

Všechny CAP mají několik společných rysů, mezi něž patří velikost v rozmezí 12 – 100 AK<sup>51</sup>), kladný náboj od +2 do +11<sup>38</sup>), obsah hydrofobních reziduí přesahující padesát procent a nízký podíl neutrálních polárních a záporně nabitých AK<sup>2</sup>). Většina těchto peptidů je mobilizována krátce po infekci a rychle likvidují širokou škálu mikrobů. Dokáží rozlišit savčí buňky od bakteriálních, a to na základě složení bakteriální membrány, které chybí cholesterol (na rozdíl od hostitelských buněk), a bohatou na záporně nabitě fosfolipidy<sup>48,52</sup>). Tyto peptidy se obecně dělí do čtyř skupin:  $\alpha$ -helixy,  $\beta$ -skládané listy, peptidy s rozvolněnou strukturou, peptidy se strukturou smyčky (Obr. 1).



Obr. 1 Strukturní třídy antimikrobiálních peptidů

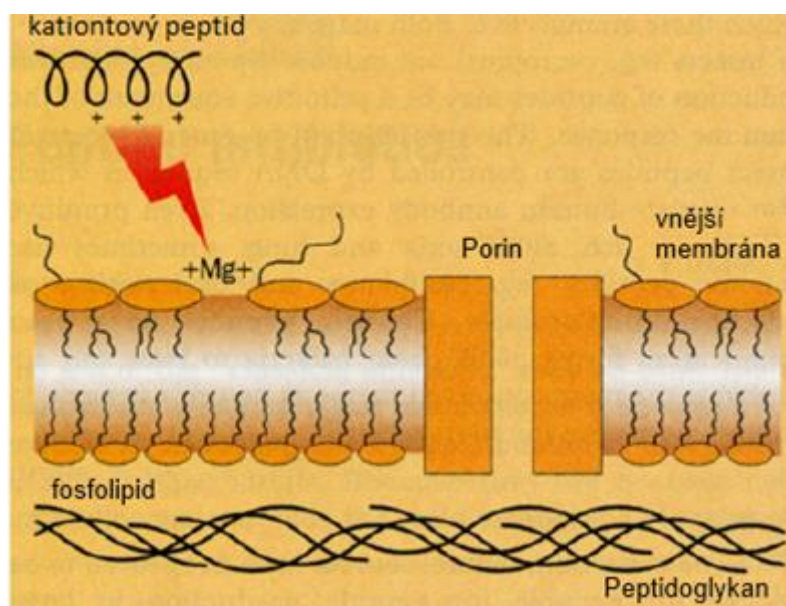
(A)  $\beta$ -list, tachyplesin I, (B)  $\alpha$ -helix, magainin 2, (C) rozvolněná struktura, indolicidin, (D) smyčka, thanatin. Žlutě jsou zvýrazněny disulfidické můstky. Převzato z Powers a Hancock 2003<sup>47</sup>).

## 5 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku CAPs je podroben intenzivnímu zkoumání a nové poznatky se zpřesňují<sup>1,4,48,51</sup>). Vědecké experimenty se zabývají interakcemi kationtových peptidů a modelových membránových systémů<sup>33,53</sup>). Další studie používají barviva citlivá na změnu membránového potenciálu nebo fluorescenčně značené peptidy<sup>32</sup>). U všech použitých metodik se prokázalo, že CAPs reagují s membránami a lze je rozčlenit na dvě skupiny: peptidy narušující

membránu a jiné. Mechanismus účinku a MIC se liší v závislosti na typu peptidu a bakterie<sup>48)</sup>. V současné době je mechanismus účinku nejlépe probádán u G-negativních bakterií. Nejprve dojde k interakci mezi kationtovým peptidem a aniontovou vrstvou lipidů ve vnější membráně. Je patrné, že kationtové peptidy mají vyšší afinitu k lipopolysacharidům (LPS) vnější membrány G-negativních bakterií než zde přítomné  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  ionty. Tyto ionty jsou peptidem vytlačeny od záporně nabitých LPS, což vede k destabilizaci vnější membrány. Potom se v narušené vnější membráně přechodně tvoří trhlinky, kterými pronikají další peptidy do periplazmatického prostoru procesem zvaným jako „vnesení do buňky podporované samotným peptidem“ (Obr. 2) a následně dorazí k cytoplazmatické membráně (CM)<sup>1,31,48,49)</sup>.

Rozrušení vnější membrány může také vést k podpoře průniku konvenčních antibiotik přes vnější membránu a zesílení jejich účinku u rezistentních kmenů. Antiendotoxinové vlastnosti CAPs se vysvětlují jejich vazbou na LPS (endotoxin)<sup>31)</sup>.

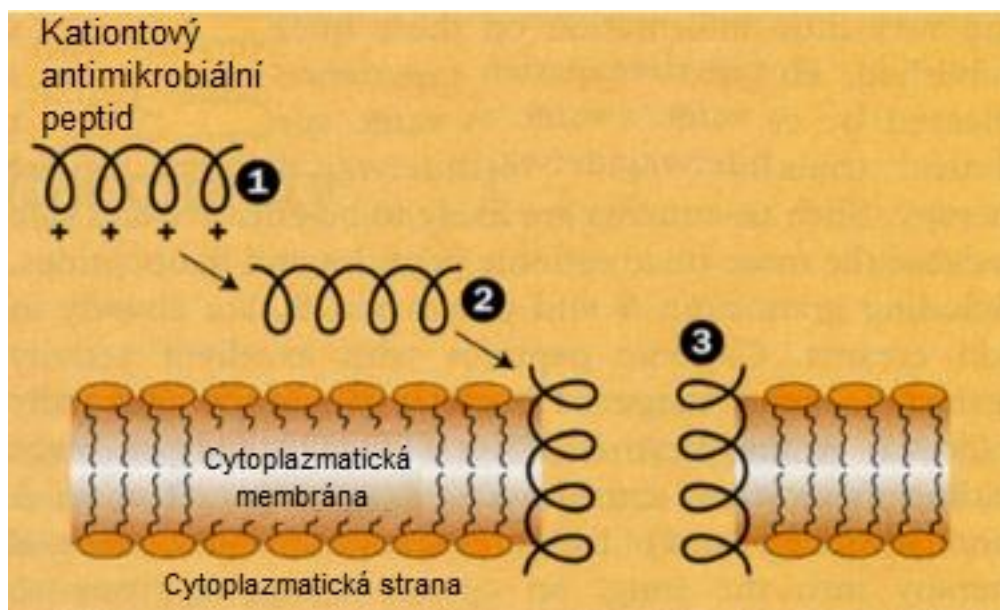


**Obr. 2: Proces zvaný jako vnesení do buňky podporované samotným peptidem přes vnější membrány G-negativních bakterií.**

Pozitivně nabitý peptid interaguje s negativně nabitým vazebným místem pro dvojmočné kationty na povrchu LPS, rozrušuje tato místa, což vede ke zvýšenému průniku CAP přes vnější membránu.

Upraveno podle Hancock 1997<sup>31)</sup>.

Peptidy potom interagují s vnější vrstvou CM (Obr. 3), což vede k usmrcení mikroorganismů nevratným poškozením membrány. Po dlouhou dobu byl zastáván názor, že tvorba pórů vede k úniku iontů a metabolitů, depolarizaci membrány a narušení dalších funkcí CM. Avšak novější práce dokazují, že samotné poškození membrány ke smrti mikrobů nestačí a CAP působí ještě dalšími mechanismy<sup>1,27,33,34,36,47,54)</sup>.

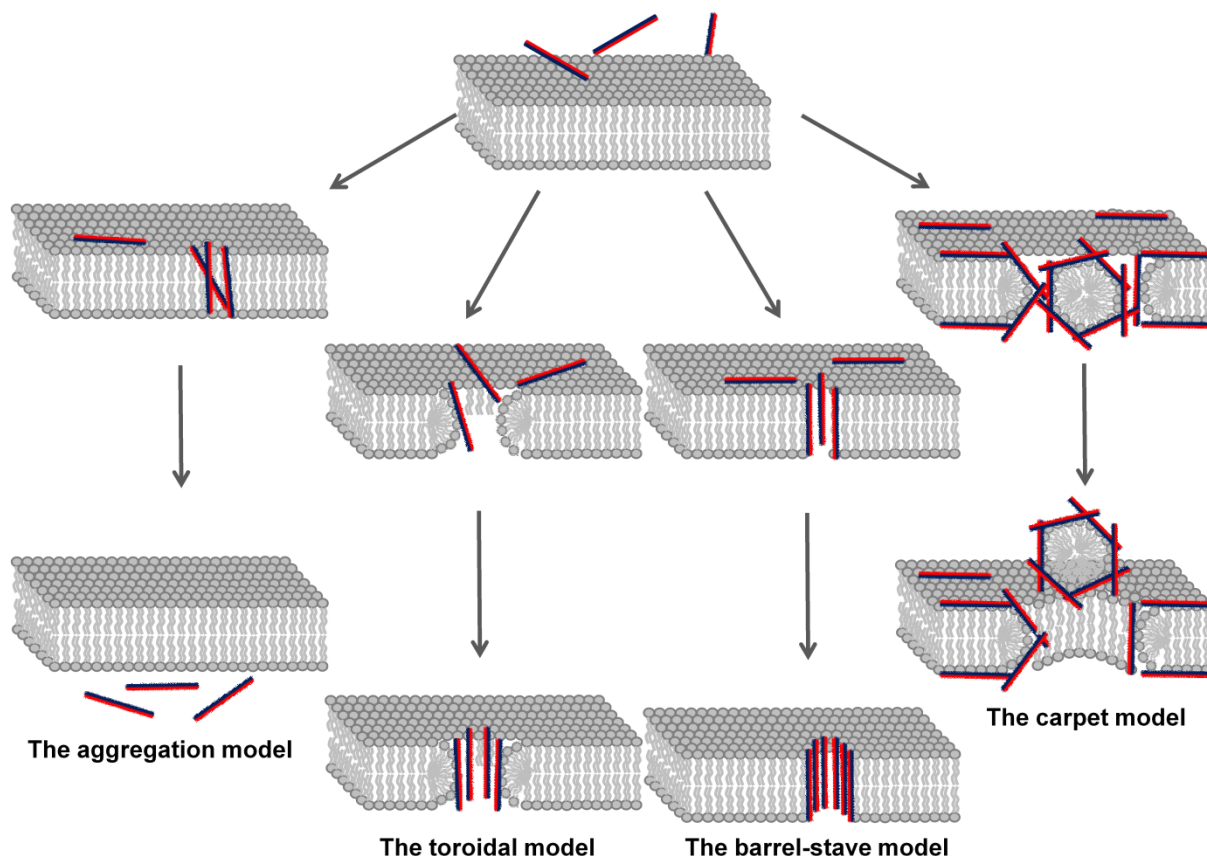


Obr. 3: **Mechanismus usmrcení bakterie pomocí kationtových peptidů**

Kladně nabité peptidy (1) se váží na vnější povrch záporně nabitých fosfolipidových dvojvrstev CM (2), což vede k ztenčení dvojvrstvy v místě vazby peptidu. Pod vlivem membránového potenciálu se peptidy vkládají do membrány a tvoří póry (3), což vede k úniku molekul a buněčné smrti. Upraveno podle Hancock 1997<sup>31</sup>).

## 5.1 Peptidy narušující membránu

Obecně platí, že většina CAP poškozuje membránu. Počátečním interakcím předchází vzájemné přiblížení podmíněné elektrostatickými silami a membránovým potenciálem. Při nízké koncentraci peptidu na lipidové dvojvrstvě jsou peptidy vázány rovnoběžně s povrchem membrány. Se zvyšováním poměru protein/lipid se molekuly peptidů orientují kolmo k membráně, zanořují se do lipidové dvojvrstvy a vytvářejí póry (tzv. I-state). I-state poměr peptid/lipid závisí jak na struktuře peptidu, tak na složení cílových lipidů. Na základě struktury a reaktivity bylo prezentováno několik modelů (Obr. 4)<sup>33,54,55</sup>.



Obr. 4 **Modely interakcí CAPs s fosfolipidovou dvojvrstvou.** Převzato z Cho 2012<sup>33)</sup>

Hydrofilní části peptidu jsou znázorněny červeně a hydrofobní části modře<sup>53)</sup>.

### 5.1.1 Model sudové skruže (*Barrel-stave model*)

Tento model je typický pro peptidy s  $\alpha$ -helikální strukturou. Peptidy se váží na CM v podobě monomerů a orientují se kolmo do lipidové dvojvrstvy, při čemž hydrofobní část se váže do centrální dutiny lipidové dvojvrstvy a polární zbytky tvoří vnitřní část póru. Jednotlivé monomery se uspořádají do tvaru připomínající *sud* (barrel). Součástí barelu jsou tzv. *tyčky* (stave), což jsou  $\alpha$ -helixy antimikrobních peptidů<sup>33,53)</sup>.

### 5.1.2 Model toroidního póru (*Toroidal pore model*)

Peptid se naváže na membránu a způsobí, že se lipidy CM svinou dovnitř a vznikne kanál vyztužený anionickými skupinami lipidů mezi vnější a vnitřní vrstvou CM, do kterého se kolmo vkládají peptidy. Na rozdíl od modelu sudové skruže peptidy zůstávají spojené s anionickými skupinami lipidů v celém procesu<sup>1,33,54)</sup>.

### 5.1.3 Kobercový model (*Carpet model*)

Peptidy se soustředí paralelně, prakticky na celém povrchu lipidové dvojvrstvy. Jsou elektrostaticky poutány k aniontovým částem fosfolipidů způsobem napodobujícím koberec. Předpokládá se, že vysoké koncentrace peptidů rozrušují dvojvrstvu podobně jako detergenty, což vede k tvorbě micel. Po dosažení kritických prahových koncentrací peptidy formují

přechodné toroidní póry, což usnadní průnik dalších peptidů do membrány. Nakonec se membrána rozpadá a tvoří micely v ohybu dvojvrstvy. Na rozdíl od modelu sudové skruže není kobercový model vázán na určitou strukturu peptidu<sup>33,34,53,55</sup>.

#### **5.1.4 Agregáčn  model (*Aggregate model*)**

V agregáčn m modelu se peptidy va z  s membránovými fosfolipidy a v chle uj  se do nich agregací do micelárních komplexů vody, AMPs a lipidů. Komplexy mohou tvořit kanály, kterými uniká buněčné obsah nebo se mohou spot nně rozpadat, t m pádem AMPs přejdou přes membránu a inhibují vnitrobuně n  pochody<sup>1,33</sup>.

Jak j z bylo uvedeno v yše, depolarizace membrány n n  s největší pravděpodobností jedin m letálním faktorem a cel y proces nebyl prozatím objasněn. Roste počet studií indikujících i jiné mechanismy, např inhibici tvorby DNA nebo indukci apoptózy<sup>33,47</sup>. D ležit  je skutečnost, že u inek peptidů narušujících membránu nastupuje během několika minut, ale v p r padě peptidů nenarušuj c ch membránu se u inek projev  až za delší dobu<sup>47</sup>.

## **5.2 Peptidy nenarušující membránu**

U těchto peptidů se předpokládá působení na cíle v cytosolu. Translokace přes membrány probíhá procesem micelárních agregátů. Toto narušení membrány je do asn  a ke zmně propustnosti nedochází<sup>47,48</sup>. P r klady peptidů působících především intracelulárními mechanismy lze nalézt v některých citovaných přehledech<sup>33,47,53</sup>.

## **6 Kationtov  antimikrobní peptidy produkovan  různými organismy**

### **6.1 Kationtov  antimikrobní peptidy produkovan  prokaryotními organismy**

#### **6.1.1 Kationtov  peptidy produkovan  bakteriemi**

**Bakteriociny** jsou ribosomální proteiny produkovan  drtivou většinou bakterií a archebakterií. Jsou u inn  proti jiným bakteriím stejných nebo odlišných rod . Využívají se jako ochrann  složky v potravinách nebo farmacii před bakteriální kontaminací<sup>56-59</sup>). Samotn  producenti jsou v  ci sv m peptidům imunní, protože paralelně vytvárajú imunitní proteiny. Mají společn  u zk  spektrum u inku a poměrně vysokou teplotn  a pH stabilitu. Z široké škály bakterií se podařilo ziskat množství bakteriocinů včetně jejich struktur. Dostupné databáze (BACTIBASE, BAGEL) obsahují informace především o G-pozitivních bakteriích, zejména bakteriích mlě n ho kvašení (LAB)<sup>58,60</sup>.

### 6.1.2 Klasifikace bakteriocinů

Celá skupina se rozděluje do dvou podskupin: bakteriociny produkované G-negativními bakteriemi a bakteriociny produkované G-pozitivními bakteriemi. Hlavním rozdílem mezi těmito podskupinami je počet genů zapojených do jejich biosyntézy. V případě G-pozitivních bakterií je tento počet vyšší než u G-negativních bakterií<sup>58)</sup>. V tabulkách I a II jsou uvedeny některé z bakteriocinů.

**Tabulka I. Základní charakteristika vybraných bakteriocinů G-negativních bakterií<sup>61)</sup>**

Třída	Bakteriocin	Producent	Spektrum účinku
Koliciny	kolicin B	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	kolicin U	<i>Shigella boydii</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	kolicin E2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	kolicin E8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	kolicin M	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Mikrociny	mikrocin B17	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	mikrocin J25	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	mikrocin H47	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	mikrocin E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>

**Tabulka II. Charakteristika bakteriocinů G-pozitivních bakterií (s výjimkou enterokocinů)<sup>59,61)</sup>**

Klasifikace	Bakteriocin	Producent	Spektrum účinku
<b>Třída I</b>	<i>Bakteriociny jsou posttranslačně modifikovány, lineární nebo globulární peptidy obsahující lanthionin, β-methylanthionin a dehydrované AMK</i>		
	nisin A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactic</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Staphylococcus, Micrococcus, Pediococcus, Clostridium, Bacillus</i> (rody)
	nisin U	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Lactobacillus lactis, Lactobacillus acidophilus</i>
	nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactic</i>	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Clostridium</i>
	mersacidin	<i>Bacillus</i> sp. Y85, 54720	---

	labyrinthopeptin A2	<i>Actinomadura</i> sp.	----
	subtilosin A*	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Shigella sonnei</i>
	mutacin B-Ny266	<i>Streptococcus mutans</i>	G-pozitivní bakterie
	salivaricin A	<i>Streptococcus salivarius</i>	G-pozitivní bakterie
<b>Třída II</b>	<i>Termostabilní, bez modifikace, bakteriociny neobsahující lanthionin, heterogenní skupina malých peptidů</i>		
<b>Třída IIa</b> (bakteriociny podobné pediocinu PA-1)	pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> (rody)
	karnobakteriocin X	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> C2	----
	laktokocin MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Listeria</i> (rody)
	mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenterioides</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Listeria</i> (rody)
	ubericin A	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Listeria</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
	leukocin A	<i>Leuconostoc gelidum</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i>
	kurvacin A	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> (rody)
<b>Třída IIb</b> (složené z dvou peptidů)	laktacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus faecalis</i>
	ABF-118	<i>Lactobacillus salivarius</i> , subsp. <i>salivarius</i> UCC118	----
	laktobin A	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.
	lactocin 705	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Streptococcus</i> (rody)

	plantaricin F	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus, Pediococcus</i> (rody)
<b>Třída IIc</b> (cyklický peptid)	karnocyklin A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	----
	karnobakteriocin A	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Carnobacterium</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
	uberolisín	<i>Streptococcus uberis</i> strain 42	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Listeria</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i>
	acidocin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Clostridium sporogenes</i>
<b>Třída IIId</b> (lineární, non-pediocinový typ, jeden peptid)	laktokocin A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>	----
	epidermicin NI01	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	----
<b>Třída III</b>	velké, termolabilní proteiny, M. h. >30 kDa		
	kaseicin 80	<i>Lactobacillus casei</i> B80	----
	helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
<b>Třída IV</b>	----		
	glykocin F	<i>Lactobacillus plantarum</i>	----

\*Karpiński a Szkaradkiewiczova<sup>61</sup> řadí subtilosin A do třídy IIc

## 6.2 Kationtové antimikrobní peptidy produkované eukaryotními organismy

### 6.2.1 Kationtové peptidy produkované prvoky

Améby jsou primitivní eukaryotické organismy, jež mají ve svých fagosomech celou řadu účinných antimikrobních molekul působících v součinnosti proti množení bakterií. Vesikuly *Entamoeba histolytica* obsahují soubor peptidů, které tvoří kompaktní  $\alpha$ -helixy spojené



disulfidickými můstky. Tyto polypeptidy, **amébapóry**, vykazují cytolytickou a antibakteriální aktivitu tím, že tvoří póry v membránách různého typu<sup>62</sup>.

Existují 3 izoformy (A, B, C) a všechny vykazují silnou antibakteriální aktivitu, primárně na G-pozitivní bakterie. Efektivní lýza cytoplastů (buňky bez buněčné stěny), poukázala, že CM je hlavním místem účinku amébapórů. Vnější membrána nedotčené G-negativní bakterie je příčinou vyšší odolnosti k amébapórům buď kvůli biochemickému složení, nebo z důvodu nízkého membránového potenciálu. Rovněž cytolyticky působí na lidské jaderné buňky<sup>63-65</sup>.

Sekvenování čistěných proteinů N-konce a další molekulární klonování objasnilo primární struktury všech tří amébapórů. Podle příslušných kódujících oblastí genů amébapórů jsou primární translační produkty vybaveny signálními peptidy, které umožňují výměnu amébapórů do vezikulárních kompartmentů. Srovnávací šetření u nepatogenní *E. dispar* zjistila, že obsahuje podobné peptidy, ale v podstatně nižších množstvích<sup>65</sup>.

Donedávna se zdálo, že amébapóry jsou nejvíc podobné defensinům savců a hmyzu. Za prvé, peptidy stabilizují 3 disulfidické můstky, při čemž konformace je omezena, ale rigidní struktury vedou k mimořádné odolnosti molekuly vůči teplu a proteasam; za druhé, zdá se, že mechanismus účinku tvoří póry v membráně bakterií. Za třetí, G-pozitivní bakterie jsou nejcitlivější k působení amébapórů. S ohledem na sekundární strukturu a polohu cysteinů se amébapóry výrazně liší od defensinů savců a hmyzu. Savcím defensinům vévodí struktura  $\beta$ -skládáního listu, zatímco u hmyzu jsou defensiny složeny z N-terminální smyčky,  $\alpha$ -helixu a dvou antiparalelních  $\beta$ -skládáních listů. Naproti tomu, všechny amébapóry jsou pouze  $\alpha$ -helixy nebo náhodné struktury, o čemž svědčí použitá spektroskopická metoda. Data získaná predikcí struktury naznačují, že se defensiny a malé toxiny shlukují do kompaktního ohybu<sup>62</sup>.

Strukturní a funkční analog, peptid NK-lysin, byl purifikován z prasečího intestina a lokalizován v NK a T buňkách. Podobnost mezi amébapóry a NK lysinem je taková, že se peptidy vyskytují v granulích produkujících buněk a mají jak antibakteriální, tak cytolytickou aktivitu, ale nezpůsobují lýzu červených krvinek. Shody párových sekvencí mezi amébapóry (A, B, C) a NK-lysinu se pohybuje v rozmezí několika desítek procent, a zejména shoda všech šesti cysteinových zbytků zůstává nezměněná<sup>62,65</sup>.

NK-lysin obsahuje daleko více kationických reziduí než kterákoli izoforma amébapóru, elektrostatické efekty jsou důležité pro obě peptidové skupiny v procesu vzniku vazby. Vypočtené rozdíly výsledného náboje mohou být méně kritické, když vezmeme v úvahu prostředí preferovaného místa účinku, tj. kyselé podmínky ve fagosomech a prostředí s pH neutrální až zásadité prasečí krve a intestinálních tkání. Bylo zjištěno, že amébapóry jsou vskutku neaktivnější při nízkém pH a přednostně se váží na negativně nabitě skupiny fosfolipidů<sup>62,65</sup>.

Sekvence podobné amébapórům se mohou získat z databází několika bezobratlých druhů, mohou být nalezeny v domnělých genových produktech platyhelminthů (*Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*), nemahelminthů (*Ceanorhabditis elegans*) a členovců (*Bombyx mori*)

cysteinový vzor typický pro amébabapóry a jiné saposinům podobné proteiny. Dokud tyto proteiny nejsou testovány na aktivitu, je vysoce spekulativní, považovat je za analogy/homology amébabapóru<sup>62</sup>.

### 6.2.2 Kationtové peptidy produkované houbami

Houby tvoří důležitou skupinu organismů, z nichž některé mají blahodárné účinky, zatímco jiné jsou patogenní. Některé z nich jsou bohaté na proteiny. Houby tvoří celou škálu proteinů se zajímavými biologickými účinky a hodně těchto proteinů má potenciál k využití.

**Plektasin** je defensin získaný z askomycety *Pseudopeziza nigrella*. Jde o peptid s 40 zbytky AK. Obsahuje v molekule cysteinem stabilizované  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -sheet (CS $\alpha\beta$ ) seskupení, které je charakteristické pro antimikrobiální peptidy rostlin i zvířat. Při testování *in vitro* a na infikovaných zvířatech byl plektasin silně účinný proti rezistentním G-pozitivním bakteriím jako jsou streptokoky. Analog plektasinu **NZ2114** byl účinný i vůči meticilin-rezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* (MRSA). V poslední době se ukazuje, že nejenom klasická antibiotika, ale i některé defensiny, inhibují tvorbu buněčné stěny interakcí s lipidem II. Plektasin neovlivňuje integritu membrány, protože nemá žádný vliv na membránový potenciál, ani na množství intracelulárního K<sup>+</sup> v buňkách vystavených MIC plektasinu. Místo toho, plektasin vyvolá nahromadění konečného solubilního prekursoru buněčné stěny UDP-MurNAc-pentapeptidu v cytoplazmě buňky, srovnatelné s klasickými inhibitory syntézy buněčné stěny. Proto léčba stafylokokových buněk plektasinem vede k upregulaci *cell wall stress stimulonu*, což je skupina 15 genů indukovaných reakcí na antibiotika zasahující buněčnou stěnu, jako jsou vankomycin a oxacilin. Tyto geny zahrnují dvou komponentový regulační systém *vraRS*, který se podílí na sledování napětí buněčné stěny. Navíc, všechny enzymové reakce podílející se na tvorbě buněčné stěny využívající lipid I nebo lipid II jako substrát byly blokovány plektasinem *in vitro*. NMR modeling komplexu plektasin-lipid II prokázal, že defensin interaguje s pyrofosfátovým zbytkem lipidu II přes vodíkový můstek (včetně zbytků F2, G3, C4 a C37) zatímco hydrofobní část peptidu se nachází na povrchu membrány<sup>66,67</sup>.

**Eurocin** je defensin izolovaný z houby *Eurotium amstelodami*. Tvoří jej 42 AK tvořících CS $\alpha\beta$  smyčku. Účinkuje na G-pozitivní bakterie, nikoliv na G-negativní patogeny. Váže na lipidové agregáty, ale primárně tvoří póry v buněčné stěně<sup>68</sup>.

V roce 2008 provedl Zhu<sup>69</sup> počítačovou studii zaměřenou na vývojové vztahy mezi defensiny tří eukaryotických říší (živočichů, hub a rostlin). Celkem identifikovali šest tříd defensinům podobných peptidů (*defensin-like peptides*), z nichž tři byly již dříve známé – AITDs (antibacterial ancient invertebrate-type defensins), CITDs (antibacterial classical insect-type defensins) a PITDs (antifungals plant/insect-type defensins). Peptidy použité v této studii jsou uvedeny v tabulce III. Získané poznatky mají význam nejen pro evoluční biologii, ale také pro vývoj těchto fungálních defensinů v terapeutika infekčních nemocí.

**Tabulka III. Příklady fungálních defensin-like peptidů<sup>69)</sup>**

Peptid	Producent
Plektasin	<i>Pseudoplectania nigrella</i>
Akasin	<i>Aspergillus clavatus</i>
Atesin-1	<i>Aspergillus terreus</i>
Atesin-2*	<i>A. terreus</i>
Anisin-1*	<i>Aspergillus nidulans</i>
Anisin-2	<i>A. nidulans</i>
Aflasin-2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Atesin-3	<i>A. terreus</i>
AklasinC	<i>A. clavatus</i>
Nefisin-2C	<i>Neosartorya fischeri</i>
AfusinC*	<i>A. fumigatus</i>
Nefisin-1C	<i>N. fischeri</i>
Cglosin-1C*	<i>Chaetomium globosum</i>
AorsinC*	<i>Aspergillus oryzae</i>
Aflasin-1C	<i>Aspergillus flavus</i>
AklasinN	<i>A. clavatus</i>
Nefisin-2N	<i>N. fischeri</i>
AfusinN*	<i>A. fumigatus</i>
Nefisin-1N	<i>N. fischeri</i>
Cglosin-1N*	<i>C. globosum</i>
AorsinN*	<i>A. oryzae</i>
Aflasin-1N	<i>A. flavus</i>
Cglosin-2	<i>C. globosum</i>
Aflasin-3	<i>A. flavus</i>
Rorsin-1	<i>Rhizopus oryzae</i>
Rorsin-2	<i>R. oryzae</i>
ADP2	<i>Amblyomma hebraeum</i>

\*Proteiny označené v GenBank databázi jako hypotetické

### 6.2.3 Kationtové peptidy produkované rostlinami

Rostliny jsou bohatým zdrojem různých biologicky účinných látek, včetně peptidů. Mezi ně patří fytohormony a induktory obranných reakcí. Mnoho rostlinných peptidů vykonává obranné funkce poskytující odolnost proti biotickým a abiotickým tlakům. Jedná se o antimikrobní a insekticidní peptidy, které zastavují růst a vývin patogenních hub, bakterií, hmyzích škůdců. Jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: **polypeptidy** s molekulární hmotností větší než 10 kDa a **peptidy** s molekulární hmotností menší než 10 kDa. Většina AMPs získaných z rostlin jsou obsahující hodnw cysteinu. Sudý počet cysteinových zbytků (2, 4, 6, 8 a 10) v molekule tvoří

disulfidické můstky a zajišťuje molekule vysokou stabilitu. Existuje několik skupin AMPs dle sekvenční homologie AK, cysteinového motivu a 3D struktury: defensiny, thioniny, lipid transfer proteiny, heveinový a knotinový typ proteinu a makrocyclické peptidy (cyklotidy). Nedávno popsaná skupina peptidů obsahuje čtyři cysteinová rezidua, označované jako 4 cysteinové peptidy<sup>70)</sup>

### ***Defensiny***

Defensiny patří mezi nejvíce studované peptidy rostlin. Byly nalezeny v semenech, listech, květech, hlízách a ovoci. Více než 300 typů defensinových sekvencí se našlo v genomu huseničky<sup>71)</sup> (*Arabidopsis*) bioinformatickými metodami. Rostlinné defensiny jsou krátké, pozitivně nabitě polypeptidy obsahují osm cysteinů (deset u defensinů obsažených v květech rostlin čeledi Solanaceae). Rostlinné defensiny, podobně jako defensiny hub, mají ve struktuře charakteristický CS $\alpha$  $\beta$  motiv<sup>70)</sup>.

Ukázalo se, že mají řadu biologických aktivit. Defensiny z ječmene a dalších obilovin inhibují translaci *in vitro*. Některé defensiny se chovají jako enzymové inhibitory např.  $\alpha$ -amylas a proteinas. Předpokládá se, že takové peptidy se podílejí se na obraně před hmyzími škůdci. Délka smyčky mezi  $\beta_2$  a  $\beta_3$  ovlivňuje schopnost inhibovat  $\alpha$ -amylasy hmyzu: defensiny s krátkými smyčkami nejsou schopné interagovat s aktivní částí enzymu. Studie defensinů schopných inhibovat proteinasy umožnila identifikaci základních AK zodpovědných za inhibici<sup>70)</sup>.

Většina studovaných defensinů má antifungální a baktericidní účinky. Peptidy ze semen ředkvičky **Rs-AFP-1** a **Rs-AFP-2** byly prvními defensiny s antifungální aktivitou. Rozdělují se do dvou skupin dle reakce na houby. Morfogenetické defensiny inhibují prodlužování hyf a rostoucí větvení, kdežto non-morfogenetické blokují jen růst hyf a nevedou k významnému morfologickému poškození<sup>70,72,73)</sup>.

Defensiny z kultivovaných obilovin nejsou významně aktivní proti plísním. A tudíž defensiny **Tk-AMPD1** a **Tk-AMPD6** z pšenice *Triticum kiharae* nebyly aktivní proti celé řadě fytopatogenních hub (*Altenaria consortiale*, *Botrytis cinerea*, *Helmithosporium sativum*, *Fusarium culmorum*, *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*) v koncentracích < 100 $\mu$ g/ml. Peptid Tk-AMPD1 měl nízkou aktivitu proti plísní *F. graminearum* a *F. verticillioides* při koncentraci < 30  $\mu$ g/ml. Peptid Tk-AMPD6 inhibuje pouze *F. verticillioides*. Oproti tomu defensiny z divoce rostoucí ježatky-kuří nohy<sup>71)</sup> (*Echinochloa crusgalli*) byly vysoce aktivní proti plísním. Hodnota IC<sub>50</sub> pro inhibici klíčení spór byla 15  $\mu$ g/ml pro *F. graminearum* a 8.5  $\mu$ g/ml pro *F. verticillioides*<sup>70)</sup>.

Některé defensiny mají i baktericidní účinky. Např. **Ct-AMP1** izolovaný z *Clitoria ternatea* je účinný proti *Bacillus subtilis*, defensiny bramborových hlíz a špenátu blokují *Pseudomonas solanacearum* a *Clavibacter michiganense* a defensin **TAD1** z pšenice ovlivňuje *Ps. cichorii*. Defensin Tk-AMPD1 z kukuřice *T. kiharae* inhibuje růst bakterie *Ps. syringae*<sup>70)</sup>.

Defensiny jsou syntetizovány jako prekurzory, které obsahují signální peptid a doménu zralého peptidu. Prekurzory defensinů z čeledi *Solanaceae* obsahují také C-terminální prodoménu. I když se jednotlivé defensiny liší ve struktuře jen minimálně, jejich aktivita je značně odlišná<sup>70)</sup>.

### **Thioniny**

Thioniny jsou malé, obvykle bazické peptidy bohaté na cystein, nalezené u jednoděložných i dvouděložných rostlin. Název thioniny se používá pro dvě odlišné skupiny rostlinných peptidů,  $\alpha/\beta$ -thioniny a  $\gamma$ -thioniny<sup>74)</sup>. Hlavní charakteristikou thioninů (s výjimkou krambinu) je jejich toxicita pro různé biologické systémy. Kromě účinku na mikroorganismy mají také cytotoxické účinky na různé typy buněk, mohou inhibovat proteosyntézu, snižovat účinnost enzymů (např.  $\alpha$ -glukuronidasy nebo ribonukleotidreduktasy) a interferovat se syntézou DNA. *In vivo* se patrně uplatňují v redoxních mechanismech. Thioniny v semenech slouží také jako zásobní proteiny obsahující síru<sup>75)</sup>.

$\alpha/\beta$ -thioniny se rozdělují do pěti skupin (I, II, III, IV, V). Thioniny typu I jsou přítomny v endospermu obilovin (Poaceae), jsou vysoce bazické, složené ze 45 AK, z nichž osm jsou cysteiny. Typ II se nachází v listech a ořechách parazitické rostliny *Pyrularia pubera* a listech ječmene (*Hordeum vulgare*). Jsou méně bazické než typ I (náboj +7 až +10) a tvoří je 46 – 47 AK. Oba typy, I a II, mají čtyři disulfidické můstky. Typ III se podařilo získat z listů a stonků jmelí. Tvoří jej 45 – 46 AK, obsahující tři konzervované disulfidické můstky, bazicita je podobná jako u předchozích typů. Typ IV tvoří 46 AK se třemi disulfidickými můstky a s neutrálním nábojem, izolovány ze semen brukve kýlnaté (*Brassica carinata*)<sup>76)</sup>. Typ V jsou zkrácené formy běžných thioninů nalezených v některých obilovinách jako je pšenice<sup>74)</sup>.

Všech pět typů  $\alpha/\beta$ -thioninů jsou vysoce homologní na úrovni AK;  $\gamma$ -thioniny mají mnohem více společného s membránově aktivními peptidy, defensiny, vyskytujícími se u rostlin a živočichů<sup>74)</sup>.

#### a) $\gamma$ -thioniny

Nejtypičtější z těchto peptidů jsou  $\gamma$ -purothionin,  $\gamma$ -hordothionin a *NaDI thionin*. Základní rozdíly ve struktuře jsou patrné, pokud je srovnáváme s  $\alpha$ -thioniny. Charakteristický motiv řetězce  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  je zaměněn za motiv  $\beta$ -smyčka- $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ . V tomto motivu, druhá část  $\beta$ -listu je v opačném směru ve srovnání s  $\alpha/\beta$ -thioniny, další prvek je vložen mezi první a druhou částí. Nicméně, první cystein je u obou druhů zachován a je nezbytný pro strukturální integritu. Svazuje terminální N a C dohromady. Toxiny mají některé společné rysy. Jsou bazické a stabilizované extenzivní sítí disulfidických můstků. Také se podílejí na interakci s membránou, i když  $\gamma$ -thioniny blokují několik enzymů<sup>74,75,77)</sup>.

b)  $\alpha/\beta$ -thioniny

Mezi typické představitele řadíme **krambin**. Dvě čisté formy krambinu mají v pozici 22 a 25 buď Pro/Leu, nebo Ser/Ile. Tři disulfidické můstky zaručují proteinu stabilitu a tepelnou integritu. V neutrálním pH nenesou krambin náboj a helixy mají hydrofobní charakter. I přes hydrofobní charakter, krambin je amfipatický se dvěma Arg zbytky, které tvoří žlábek mezi  $\beta$ -listem a  $\alpha$ -helixem, zatímco dva Asp zbytky jsou rozmístěny na druhé straně molekuly. Ve srovnání s dalšími zástupci skupiny je netoxický a nemá lytické vlastnosti<sup>74,75)</sup>

Ostatní zástupci této skupiny jsou na rozdíl od krambinu vysoce amfipatické, ale prakticky shodné s jeho strukturou. Struktura  $\alpha_1$ - a  $\beta$ -purothioninu je kompaktní s polárním povrchem tvořená ze dvouřetězcového  $\beta$ -listu a ze dvou antiparalelních helixů a C-terminální oblasti. Mezi  $\alpha$  a  $\beta$  segmenty se nachází žlábek. Ve středu žlábků je Tyr13 a jodace zbytku ruší toxicitu. Krystalová mřížka obsahuje několik rozpuštěných molekul. V blízkosti Ser2 a Tyr13 byla nalezena molekula glycerolu, v blízkosti Leu8 sekundární butanol nebo glycerol. Vrstvy sbalených purothioninů se nachází proti vrstvám  $\alpha$ -helixům<sup>74)</sup>.

Sekvence **viskotoxinů** je vysoce konzervativní: různé isoformy mají většinu sekvencí shodnou. Protein má strukturální motiv ve tvaru řeckého písmene  $\Gamma$ . V oblasti, kde byl nalezen glycerol u purothioninů, se nachází anorganický fosfát v asymetrické jednotce u obou molekul. Krystalické sbalení viskotoxinu A3 do vrstev je podobné jako u  $\alpha$ ,  $\beta$ -purothioninů. Hydrofobní asociace jsou posíleny hydrofilními vazbami v mřížce. Silná interakce na dvojné vazbě zahrnuje vazbu sulfátového aniontu vedoucí k pevnému sbalení čtyř molekul. Sulfát koordinuje molekuly takovým způsobem, že tvoří hydrofilní vrstvu. Je vázán na jednom zbytku ve fosfátové vazbě Tyr13, který je zodpovědný za toxicitu.

Ve struktuře  **$\beta$ -hordothioninu** se nachází nezávislý dimer v asymetrické jednotce. Dimer se podobá sbalení jako u purothioninu a krambinu. Uspořádání dimeru je podobné, toho helixu, s purothioniny, ale směr šroubovice je opačný. Znamená to, že vazebná místa se nachází na opačných stranách hordothioninu. Dimer hordothioninu je posílen o vazbu p-toluensulfátu. Pozice je obsazena analogicky sek-butanolem jako u  $\alpha$ -purothioninu. Molekula serinu je vázána analogicky na straně glycerolu vázaného u purothioninu, a fosfátu u viskotoxinu. Serinový glycerol a fosfát tvoří vodíkovou vazbu s OH skupinou Tyr13<sup>74)</sup>.

### ***Lipid transfer peptidy***

Peptidy tvořené 90 – 95 AK v různých tkáních jedno- a dvouděložných rostlin. Původně u špenátu, bazální části dělohy kukuřice, lepku ječmene. Sekvence AMK indukují, že 1/3 z nich je konzervována včetně osmi cysteinů. U bavlny se zjistilo, že má šest cysteinů. Dva chybějící cysteiny by odpovídaly dvěma různým variantám disulfidických vazeb dosud známých LTPs.

Protein má globulární strukturu, kterou tvoří svazek čtyř  $\alpha$ -helixů spojených flexibilními smyčkami s hydrofobní dutinou, jenž může pojmout různé lipidy<sup>72,75)</sup>.

Aktivita různých LTPs se liší mezi patogeny, což naznačuje, že mají určitou specifitu. Některé LTPs byly mnohem aktivnější než thioniny proti bakterii *Clavibacter michiganensis*, opak byl pravdou proti plísni *Fusarium solani*, což naznačuje, že se LTPs spolu s thioniny mohou doplňovat, pokud jsou současně přítomny v tkáních. Navíc, v případě bakterií byl pozorován synergismus, v případě plísní se jednalo o aktivitu pouze aditivní<sup>72,75</sup>).

#### ***Peptidy podobné heveinu a peptidy podobné knotinu***

AMPs heveinového typu jsou sjednoceny do jedné rodiny z důvodu strukturální homologie s heveinem, peptidem tvořeným 43 AMK, izolovaným z kaučukovníku *Hevea brasiliensis*. Patří do skupiny proteinů schopných vazby na chitin (polymer *N*-acetylglukosamin (GlcNac)) a souvisejících látek, jež obsahují GLcNac nebo *N*-acetylneuraminovou kyselinu (NeuNac). Tyto proteiny obsahují alespoň jednu chitinovou doménu složenou z 30 – 43 AMK a několika konzervativních AMK (několik cysteinů, glycinů, aromatických AMK), které vytváří chitin-vazebné místo. Kromě heveinu patří do této kategorie lektiny, některé chitinasy, proteiny indukované zraněním a heveinu podobné peptidy (*hevein-like peptides*). Heveinové peptidy tvoří rodinu jednodoménných peptidů, jejíž členové se liší počtem cysteinů, jež tvoří disulfidické můstky. Peptidy **Pn-AMP1** a **Pn-AMP2** izolované ze semen povíjnice<sup>71</sup> *Pharbitis nil* a **avesin** z ovsa mají 8 disulfidových můstků. Existují i peptidy se šesti disulfidickými můstky. Byly izolovány např. z různých druhů rodu *Amaranthus* nebo listů cukrové řepy. Ze semen nocenky zahradní<sup>71</sup> (*Mirabilis jalapa*) byly získány peptidy s 36 – 37 AMKami a šesti disulfidickými můstky, které vytvářejí knotinovou strukturu (*knottin-like peptides*)<sup>70,72</sup>.

Spektrum účinku zahrnuje vláknité houby a kvasinky. Zajímavá je skutečnost, že účinek těchto peptidů lze snížit kationty dvojmocných kovů, což svědčí o tom, že v mechanismu jejich účinku hraje roli interakce s membránami. Dva peptidy z amarantu (**Ac-AMP1**, **Ac-AMP2**) inhibují růst G<sup>+</sup>-bakterií, ačkoli nebyly aktivní vůči testovaným G<sup>-</sup>-bakteriím. WAMP-1a peptid ovlivňuje G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup>-bakterie. U Ee-CBP peptidu se zvýšila antifungální aktivita v přítomnosti endogenní chitinasy. Mechanismus účinku je špatně prostudován. Peptid Pn-AMP1 indukuje depolarizaci aktinu u kvasinek. Ovšem většina peptidů se váže na chitin, jak bylo řečeno dříve. Není ale známo, jaká je spojitost mezi aktivitou a účinkem na metabolismus chitinu v houbách<sup>70</sup>.

#### ***4 cysteinové peptidy***

Peptidy s motivem C<sup>1</sup>XXXC<sup>2</sup>X<sub>n</sub>C<sup>3</sup>XXXC<sup>4</sup>, kde X je AMK, n počet AK-zbytků od 10 do 15. Do nedávna byl jedinným zástupcem tohoto strukturního typu peptid **MBP-1** z kukuřice. Později bylo zjištěno, že jsou v rostlinné říši poměrně hojné a byly nalezeny v pšenici, ježatce a badilu. Strukturu peptidu ježatky tvoří α-helikální vlásenka, zpevněná dvěma disulfidickými můstky na nestálých terminálních N a C koncích. Stejná struktura je typická pro inhibitor trypsinu, získaný z pohanky a *Veronica hederifolia*. Peptidy **MiAMP2** (a, b, c, d) se stejným motivem byly

nalezeny v oříšcích exotických rostlin jako je *Macadamia*. Tyto peptidy se tvoří v procesu skladování z globulinu 7S-vilicinu. Prekurzory těchto peptidů z pšenice mají v zásadě odlišnou strukturu. Jejich modulární strukturu tvoří pět nebo sedm homologních peptidů, které se liší v biologické aktivitě<sup>70</sup>). Ze semen *Impatiens balsamina* byla získána skupina peptidů s 20 aminokyselinovými zbytky (**Ib-AMPs**). Tyto peptidy inhibují růst hub a G-pozitivních bakterií. Výše zmíněný MBP-1 je účinný i proti G-negativním bakteriím<sup>72</sup>).

### ***12 cysteinové peptidy***

Snakin 1(St-SN1) byl nedávno získán z bramborových hlíz. Je tvořený 63 AMK, účinkuje proti houbám, G<sup>+</sup>-pozitivním i G<sup>-</sup>-bakteriím při koncentraci < 10μM. Je schopen agregovat bakterie a nemá žádný vliv na umělé lipidové membrány<sup>72</sup>).

## **6.2.4 Kationtové peptidy produkované členovci**

### ***Peptidy produkované hmyzem***

Z velkého počtu antimikrobních peptidů bylo přinejmenším 50 % objeveno u bezobratlých, především u hmyzu. O počátcích výzkumu hmyzích AMPs bylo již pojednáno v kapitole 2. Na základě sekvenčních a strukturních vlastností mohou být tyto peptidy rozčleněny do několika tříd<sup>78,79</sup>).

#### **I. Peptidy bohaté na cystein**

- a) peptidy s CSαβ strukturou – tzn. hmyzí defensiny a drosomycin
- b) peptidy tvořící β struktury podobné vlásence – thanatin

#### a) Peptidy s CSαβ (cysteine-stabilized) smyčkou

První hmyzí **defensiny** byly izolovány z buněčných kultur mouchy *Sarcophaga peregrina* a z napadených larev černé masařky *Phormia terranova*. Peptidová homologa byla získána také ze štírů a měkkýšů. Hmyzí defensiny jsou kationtové peptidy složené z 34 – 46 zbytků. U včely a čmeláka peptid tvoří 51 zbytků. Pro všechny peptidy je charakteristický motiv šesti cysteinů, z nichž všechny se podílejí na intramolekulárních disulfidických vazbách. Poloha disulfidických můstků byla určena a naznačuje totožné cysteinové dvojice: C1–C4, C2–C5, C3–C6. Hmyzí defensiny jsou účinné vůči G-pozitivním bakteriím a jen několik druhů G-negativních bakterií, kvasinek a hub vykazuje citlivost. **Phormia defensin A** okamžitě narušuje propustnost membrány G-pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, což vede ke ztrátě plazmatického K<sup>+</sup>, parciální depolarizaci vnitřní membrány, poklesu ATP a konečně k inhibici respirace. Pokusy na obřích liposomech podporují hypotézu, že *Phormia* defensin zasahuje membránu tvorbou kanálů. *Sarcophaga* defensin, **sapecin A**, širokospektrý baktericidní peptid s vysokou afinitou ke kardiolipinu, hlavní složce kyselých fosfolipidů G-pozitivních bakterií<sup>78,80</sup>).



Prvním inducibilním antifungálním peptidem izolovaným z hmyzu je **drosomycin**. Dosud byl popsán pouze u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Drosomycin je peptid tvořený 44 zbytky obsahující osm cysteinů zapojených do čtyř disulfidických můstků. Při srovnání s defensiny hmyzu jsou patrné podstatné rozdíly:

- další  $\beta$ -list tvořený rozšířenou N-terminální sekvencí
- čtvrtý disulfidický můstek spojuje terminální C s terminálním N
- kratší N terminální smyčka,
- $\alpha$ -helix je delší o jednu otočku.

Zdá se, že má velmi kompaktní strukturu, která předurčuje jeho odolnost proti protease. Drosomycin vykazuje aktivitu vůči vláknitým houbám. Vysoké koncentrace peptidu (10  $\mu$ M a více, dle kmenu) inhibuje klíčení spor, zatímco nižší koncentrace blokuje růst abnormálních hyf. Peptid způsobuje částečnou lýzu, o čemž svědčí přítomnost extrudovaného cytoplazmatického materiálu, při čemž pH ani teplo nemají vliv na aktivitu<sup>78,80</sup>.

#### b) Peptidy tvořící $\beta$ struktury podobné vlásence

Zástupcem této skupiny je **thanatin**, peptid izolovaný z *Podisus maculiventris* z řádu polokřídlí. Peptid zaujímá dvouvláknový  $\beta$ -list, stabilizovaný intramolekulárním disulfidickým můstkem, vymezující oblast rozšířenou o flexibilní N-terminální část. Centrální část molekuly je hydrofobní, vnější části (smyčka a N-terminální část) jsou bohaté na hydrofilní rezidua. Pro antibakteriální účinek jsou nezbytné:

- C-terminální smyčka
- C-terminální zbytek tvoří tři zbytky
- N-terminální část tvořena převážně hydrofobními zbytky a
- tři další N-terminální zbytky jsou nezbytné pro antifungální aktivitu, ale ne pro aktivitu antibakteriální<sup>78</sup>.

Thanatin má široké spektrum aktivity zahrnující G-pozitivní a negativní bakterie, vláknité plísňe, kvasinky a je bez toxicity na červené krvinky. Je evidentní, že aktivita tohoto peptidu je závislá velikosti LPS, součást vnější membrány G-negativních bakterií. Pokud se sníží velikost LPS, zlepšuje se dosažitelnost interních cílů. Thanatin se jeví jako dobrý kandidát pro vývoj nových látek, protože je netoxický proti eukaryotickým buňkám, ničí bakterie včetně těch, které představují multirezistentní fenotypy, mají různé mechanismy účinku<sup>81</sup>.

## II. Peptidy bohaté na prolin/glycin

Tyto kationtové peptidy jsou tvořené 15 – 39 AMK a jsou klasifikovány do dvou podrodin. Samostatnou skupinu tvoří peptidy post-translačně glykosylované:

- a) nesubstituované krátké peptidy
- b) nesubstituované dlouhé peptidy
- c) *O*-glykosylované peptidy<sup>78)</sup>.

Izolovány byly z včel a vos (abecin, apideciny), z mravenců (formeciny), z *D. melanogaster* (drosociny a mečnikoviny), z bource morušového *Bombyx mori*, z můry *Trichoplusia ni* (lebeciny) a štěnice (pyrrhokoricin, metalnikoviny). Mechanismus účinku využívá stereoselektivní transport, při vyšších koncentracích i neselektivní, přes membránový protein SbmA a intracelulární působení. Jediný známý intracelulární cíl je bakteriální chaperon DnaK, kde mohou inhibovat ATPasovou aktivitu, správné uspořádání proteinů nebo oba dohromady<sup>78,79)</sup>.

### a) Nesubstituované krátké peptidy

**Apideciny** jsou největší skupinou dosud popsaných peptidů bohatých na prolin. Jejich struktura má dvě části. Jedna část je u všech forem stejná a zodpovídá za všeobecnou antibakteriální aktivitu, složením variabilní části je dáno antibakteriální spektrum. Z hemolymfy včel (*Apis mellifera*) infikovaných bakteriemi byly izolovány tři isoformy apidecinů – HbIa, HbIb and HbII. Později bylo izolováno 13 dalších apidecinů z jiného hmyzu (čmeláci, cikády, parazitické vosy aj.)<sup>82)</sup>.

**Metalnikoviny** byly izolovány z kněžice trávovzené<sup>71)</sup> (*Palomena prasina*) a příbuzného druhu *P. maculiventris*. Jsou tvořeny 15 – 17 zbytků AMK včetně pěti zbytků prolinu metalnikovinu I nebo metalnikovinu II se čtyřmi prolinovými zbytky. Primární struktura se liší hlavně na terminálním C. Dipeptid Arg/Lys-Pro a dva první zbytky C-termálního oktapeptidu jsou také u metalnikovinů zastoupeny<sup>78)</sup>.

### b) Nesubstituované dlouhé peptidy

**Abeciny** byly nalezeny u včel a čmeláků. Z čmeláka se podařilo izolovat zatím nejdelší antibakteriální peptid s 39 AMK<sup>78,83)</sup>.

**Mečnikoviny** jsou podobně jako drosomycin produkovány octomilkou. Podařilo se získat dvě formy, které se liší pouze jedinou AMK (histidin/arginin v poloze 3). Skládají se z 26 AMK, z nichž sedm jsou proliny. Obsahují triplet Pro-Arg-Pro, který je charakteristický pro všechny uvedené prolinem bohaté peptidy (s výjimkou abecinu A). Abeciny a mečnikoviny jsou si velmi podobné i v C-terminální části<sup>78,84)</sup>. Pro své antifungální vlastnosti jsou mečnikoviny a další hmyzí peptidy s antifungální aktivitou studovány jako prostředky pro ochranu rostlin<sup>85)</sup>.

### c) O-glykosylované peptidy

Prototypem této skupiny je **drosocin**, tvořený 19 AMK. Obsahuje šest prolinů a čtyři argininy začleněné do tří repetitivních tripletů Pro-Arg-Pro. Peptid nese threoninový zbytek, posttranslačně modifikovaný, na 11. pozici. Threoninový zbytek je *O-glykosylován* disacharidem složeným z *N*-acetylgalaktosaminu a galaktosy. Terminální galaktosa je spojena s *N*-acetylgalaktosaminem, který je přímo spojen přes anomerní C k hydroxylové skupině threoninu<sup>78,84,86</sup>.

**Pyrrhokoricin** byl získán z ruměnice pospolné<sup>71</sup>) (*Pyrrhocoris apterus*). Je tvořen 20 zbytky a vykazuje sekvenční podobnost s drosocinem a metalnikovinem<sup>78,87,88</sup>.

**Lebociny** jsou peptidy tvořené 32 AMK (25 % prolin), které jsou *O-glykosylované* na threoninu. Byly izolovány z bource morušového<sup>71</sup>) (*Bombyx mori*)<sup>89</sup>). **Isoformy 1 a 2** liší v molekule cukru. **Lebocin 3** se liší od izoformy 2 záměnou prolinu v poloze 16 leucinem. Na rozdíl od ostatních peptidů této třídy neobsahují žádný triplet Pro-Arg-Pro<sup>78</sup>). Dalšími peptidy tohoto typu jsou např. Leb-B a Leb-C získané z housenek lišaje<sup>71</sup>) *Manduca sexta* infikovaných různými bakteriálními kmeny<sup>90</sup>).

**Formeciny** izolovány z buldočího mravence *Myrmecia gulosa*. Jsou tvořeny 16 AMK, z toho 5 proliny. Primární struktura se liší na dvou stranách: **formecin 1** má v poloze 8 asparagin a v poloze 13 histidin, zatímco **formecin 2** má v poloze 8 threonin a v poloze 13 tyrosin. *O-glykosylace* je na threoninu v poloze 11 jako u drosocinu. Formeciny jsou *O-glykosylovány* monosacharidem *N*-acetylgalaktosaminem, zatímco drosocin je glykosylován disacharidem galaktosa-*N*-acetylgalaktosamin<sup>78</sup>). Formecin I je používán jako modelová sloučenina pro studium vlivu glykosylace na biologickou aktivitu<sup>91</sup>).

**Gloveriny** jsou peptidy bohaté na glycin. Obsahují 18 % glycinu. Izolovány z hemolymfy martináče<sup>71</sup>) *Hyalophora gloveri* a černopásky bavlníkové<sup>71</sup>) (*Helicoverpa armigera*). Jsou účinné proti G-negativním bakteriím, ale nepůsobí proti G-pozitivním bakteriím, kvasinkám, savčím buněčným liniím a pestiviru. Gloveriny mohou působit tak, že inhibují syntézu proteinů vnější stěny, což vede ke zvýšení permeability bakteriální buněčné stěny<sup>78</sup>). Kromě zmíněných druhů jsou gloveriny produkovány i jinými druhy hmyzu<sup>92,93</sup>).

### III. Lineární a amfipatické $\alpha$ -helikální peptidy

Mezi nejbohatší skupiny lineárních AMPs u hmyzu patří cekropiny, sarkotoxiny, hyfancin, enbocin, spodopsin, jakož i peptidy související s cekropiny. Hmyzí  $\alpha$ -helikální peptidy jsou složeny z 29 – 42 zbytků AMK, jsou lineární a bez cysteinu. **Cekropiny** byly první izolované zvířecí indukibilní AMPs a plně popsány<sup>16,94,95</sup>). Peptidy podobné cekropinům jsou produkovány hmyzem z fylogeneticky vyšších řádů Lepidoptera a Diptera. Na rozdíl od cekropinů Dvojkřídých, např. **cekropin IA**, známý také jako sarkotoxin IA, **cekropin A**, mají cekropiny z řádu Motýli, např. **cekropin B** a **cekropin D**<sup>94,95</sup>) variabilnější primární strukturu. Pro

hmyzí cekropiny je charakteristická přítomnost tryptofanu v poloze 1 nebo 2 a amidovaný terminální C. Bohužel, ani jednu z těchto unikátních struktur se nepodařilo nalézt u cekropinů komára rodu *Aedes aegypti*. Cekropin z komára *Anopheles gambiae* postrádá tryptofan, zatímco terminální C je amidován. Cekropin D z *Bombyx mori* postrádá tryptofan N-terminální části. Cekropin komára rodu *Anopheles*, bez tryptofanu, je účinnější proti kvasinkám, G-bakteriím než cekropin A octomilky, u něhož se tryptofan nachází v pozici 2. Kombinace zvýšeného počtu pozitivních nábojů a absence tryptofanů mohou mít vliv na antimikrobní aktivitu. Amidované cekropiny jsou efektivnější než neamidované. Hmyzí  $\alpha$ -helikální AMPs účinkují především na bakterie a vůči G-negativním bakteriím jsou účinnější než vůči G-pozitivním kmenům. Nemají hemolytickou aktivitu v koncentracích používaných pro testování antibakteriální účinnosti. Cekropiny a peptidy podobné cekropinům mohou ovlivnit růst vláknitých hub (včetně lidských a rostlinných patogenů, tj. *Aspergillus* spp. a *Fusarium* spp., a kvasinek. Stomoxyn má trypanolytickou aktivitu<sup>79</sup>).

### ***Peptidy produkované korýši***

Z hlediska struktury můžeme AMPs z korýšů definovat jako malé kationické amfipatické molekuly, které jsou kódovány jedním genem, podobně jako u jiných organismů. Tato definice se bohužel rozšířila i na méně známé AMPs, anionické peptidy, multifunkční proteiny, které jsou primárně zapojeny do dalších funkcí v buňce a protein-derivovaných fragmentů vykazují antimikrobní aktivitu. Rosa a Barracco<sup>96</sup>) rozdělují peptidy produkované korýši do čtyř hlavních skupin.

#### **I. Lineární $\alpha$ -helikální AMPs s jednou doménou a peptidy obohacené o další AK**

##### **a) Peptidy bohaté na prolin/arginin**

Prvním peptidem charakterizovaným u korýšů byl kationtový peptid izolovaný z hemocytů kraba pobřežního<sup>71</sup>) (*Carcinus maenas*). Peptid obsahuje tři repeticce prolin-arginin-prolin, které se obvykle nacházejí i v hmyzích CAPs. Podobnost AMK s bakteneceinem-7 (katelidicin z neutrofilů skotu), je tento AMP známý jako **Bac-like peptid**. Podobně jako AMP skotu účinkuje proti G-pozitivním a G<sup>-</sup>-bakteriím. Vysokou sekvenční podobnost sdílí také s PRP doménou peptidů bohatých na prolin/arginin – peneidinů, které se vyskytují výhradně u garnáta. Není zřejmé, jestli první popsáný AMP u korýšů obsahuje jen doménu PRP nebo další nepopsané domény. Teprve hlubší studium potvrdí nebo vyvrátí, jestli zda patří do skupiny peneidinů nebo je reprezentantem samostatné skupiny jednodoménových peptidů<sup>96,97</sup>).

**Kallinektin** je peptid izolovaný z hemocytů kraba modrého (*Callinectes sapidus*). Na rozdíl od peptidu typu Bac, částečně charakterizovaná N-terminální sekvence nevykazuje žádnou podobnost s dosud známými peptidy. Testován byl pouze na kmenech *Escherichia coli* D31,

informace o struktuře a spektru účinku chybí. Opět není jisté, jestli se jedná o peptid s jedinou doménou<sup>96,98-100</sup>.

**Astacidin-2** je peptid izolovaný z hemocytů sladkovodního raka signálního<sup>71</sup> (*Pacifastacus leniusculus*)<sup>101</sup>. Obsahuje 14 AMK a má silnou aktivitu vůči G-pozitivním, G-negativním bakteriím a pseudomonádám. Syntetizován jako prepropeptid a pak jsou zpracovány terminální N a C. V roce 2009 byl izolován homolog astacidinu-2 z raka červeného<sup>71</sup> (*Procambarus clarkii*) **Astacidin-1** je AMP, který vzniká proteolytickým štěpením C-konce hemocyaninu raka signálního. Podobně jako jiné AMPs obsahuje i domény s  $\beta$ -sheet uspořádáním. Je účinný jak proti G-pozitivním, tak G-negativním bakteriím<sup>96,100</sup>.

#### b) Peptidy bohaté na glycin

AMPs bohaté na glycin se podařilo izolovat nejen z hmyzu, ale také korýšů. První peptidem tohoto typu izolovaným z korýšů byl **armadillidin** izolovaný z hemocytů svinky obecné<sup>71</sup> (*Armadillidium vulgare*). Je to lineární kationtový peptid s vysokým obsahem glycinu (asi 47 %). Působí proti G-pozitivní bakterii *Bacillus megaterium*, proti jiným mikroorganismům nemohl být testován, protože byl izolován v malé množství. Zralý peptid je na terminálním C amidován a zakončen pětkrát opakovaným motivem GGGFH(R/S)<sup>102</sup>.

#### c) Homarin

**Homarin** je krátký lineární peptid izolovaný z hemocytů humra amerického (*Homarus americanus*). Má  $\alpha$ -helikální strukturu, ale neobsahuje ve větším množství žádnou AMK.

Složení AMK je podobné temporinům. Temporiny jsou malé amfipatické  $\alpha$ -helixy z kůže obojživelníků, které vykazují aktivitu proti G-pozitivním bakteriím. Naproti tomu, dvě syntetické varianty homarinů prokázaly, že jsou efektivní proti bakterii rodu *Vibrio sp.* izolovaných intestinálního traktu humra a také vykazují protozoacidní aktivitu u kraba a humra<sup>96, 100,103</sup>.

## II. Peptidy s jedinou doménou obsahující cysteiny spojené do disulfidických vazeb

Pro tuto skupinu AMPs je typická přítomnost dvojice cysteinů schopná vytvořit intramolekulární disulfidické můstky. Počet cysteinových zbytků (obvykle 2 – 12) a jejich vazby vedou k tvorbě cyklických nebo otevřených cyklicky stabilizovaných peptidů. Tato skupina AMPs zahrnuje thanatin (obsahuje 2 cysteinové zbytky), tachyplesiny (4 Cys), gomesin (4 Cys), protegriny (4 Cys) a defensiny (6 Cys)<sup>96,104</sup>. Tyto AMPs jsou produkovány i výše a dále uvedenými organismy. V této části bude věnována pozornost pouze CAPs produkovaných korýši.

#### a) Defensiny

U korýšů se podařilo identifikovat defensiny u langusty japonské<sup>71</sup> (*Panulirus japonicus*). U tohoto druhu se podařilo zjistit dvě izoformy PD1 a PD2 v různých tkáních, včetně hemocytů,

srdce, žaber, hepatopankreatu, reakcí využívající reverzní transkriptasu (RT-PCR). Obě izoformy mají N-terminální signální peptid a C-terminální doménu typu defensinu. Zatím nebylo stanoveno spektrum účinku<sup>96,105</sup>). Nedávno byla podrobněji popsána struktura peptidů langusty karibské<sup>71</sup>) (*Panulirus argus*) a bylo zjištěno, že se strukturálně podobají  $\beta$ -defensinům obratlovců<sup>106</sup>).

b) Anti-lipolysacharidové faktory

Anti-lipopolysacharidové faktory (ALFs) byly purifikovány z amébovců ostrorepa amerického<sup>71</sup>) (*Limulus polyphemus*) a ostrorepa východoasijského<sup>71</sup>) (*Tachypleus tridentatus*). První z nich byl označen LALF, druhý TALF. ALFs byly považovány za silné inhibitory hemokoagulace zprostředkované LPS. Pro doplnění, anti-LPS faktory vykazují silnou aktivitu proti R-typům G-negativních bakterií jako je *Salmonella minnesota* R595, a tudíž působí jako multifunkční proteiny. LALF a TALF jsou velké kationtové peptidy tvořené přibližně 100 AMKami, jež obsahují dva konzervované cysteiny, a hydrofobní terminální N. Shluk kladně nabitých zbytků se rozprostírá mezi dvěma cysteiny, které tvoří smyčku, která je definována jako LPS-vazebná doména. Anti-LPS faktory jsou uloženy ve velkých granulích amébovců, ačkoliv žádná signální sekvence nebyla rozpoznána v sekvenci cDNA<sup>96</sup>). Geny pro expresi ALFs byly nalezeny i u garnátů<sup>107,108</sup>).

ALFs jsou studovány jako endotoxin-neutralizující sloučeniny pro prevenci a zmírnění septického šoku u pacientů se závažnou bakteriemií a pravděpodobně mají i další farmakologické účinky na savčí imunitní buňky, např. modulují expresi cytokinů z lidských leukocytů, inhibují tvorbu nitrátu v LPS-aktivovaných myších makrofázích a aktivují uvolňování interferonů z lidských mononukleárních buněk<sup>100</sup>).

### **III. Multi-doménové nebo chimerické AMPs**

Antimikrobní molekuly s nejméně dvěma odlišnými doménami tvoří významnou skupinu AMPs u korýšů. Každá doména může vykazovat specifické vlastnosti jedno-doménových peptidů, jako jsou PRP peptidy nebo peptidy bohaté na cystein. Kromě korýšů se vyskytují u hmyzu a pavoukovců. V některých případech je chimerické složení nezbytné pro vytvoření kationciv a amfipaticity. Kationtová doména může být vázána do elektrostatických interakcí s negativně nabitou buněčnou stěnou, hydrofobní doména je zodpovědná za destabilizaci membrány. Přítomnost takového rozdílného uspořádání může také zajistit multifunkční nebo synergické vlastnosti doplňující antimikrobní účinek<sup>96,100</sup>).

#### a) Peneidiny

Peneidiny jsou nejlépe prostudovanou skupinou korýších AMPs a jsou patrně produkovány všemi druhy čeledi Penaeidae. Poprvé byly izolovány z hemolymfy pacifické bílé krevety *Litopenaeus vannamei*<sup>109</sup>). Jsou to chimerické kationtové peptidy složené ze 42 – 63 AMK. Mají nestrukturovanou N-terminální PRP doménu a terminální C obsahující šest cysteinů, zapojených do tří disulfidických můstků. N-terminální doména sdílí sekvenční podobnost s PRP peptidy, zejména s krabími Bac-typy. Naopak, C-terminální doména bohatá na cystein neodpovídá žádnému jinému cysteinovému motivu popsanému u cysteinových AMPs. Mají jak antimikrobní, tak antifungální účinnost<sup>96,109,110</sup>).

Kromě antimikrobních vlastností jsou schopné vázat se na chitin. Chitin-vazebný motiv je součástí cysteinové domény, kdežto PRP doména se podílí na antimikrobní aktivitě. Chitin-vazebný motiv může mít i další funkce, jako je například schopnost vázat se na krunyř krevety a podílet se na hojení ran nebo na línání<sup>111</sup>).

#### b) Krustiny

Jsou to multi-doménové kationtové AMPs obsahující doménu charakteristickou pro tzv. syrovátkové proteiny (WAP, whey acidic protein) na terminálním C. WAPs je obecná rodina proteinů, které jsou obsaženy v mléku různých živočichů. Ke pro ně typická přítomnost dvou WAP domén, které obsahují z osmi konzervovaných cysteinů v uspořádání, které tvoří jedno čtyřdisulfidické jádro (4DSC). Kromě WAPs obsažených v mléce, je známa celá řada „nemléčných“ WAPs. Tyto proteiny mají jednu i více WAP domén, inhibují proteasy a regulují růst a diferenciaci tkání<sup>96,100,112,113</sup>).

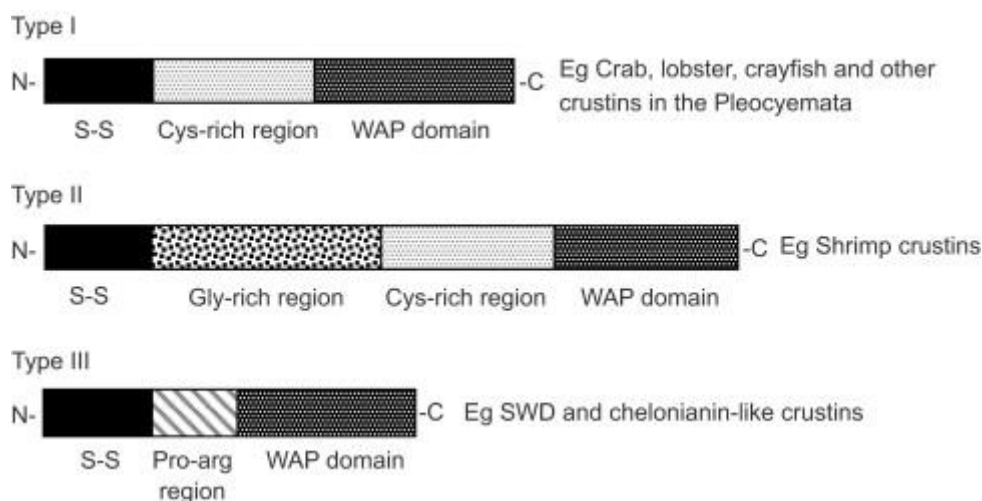
První krustin se specifickou aktivitou proti G-pozitivním mořským nebo soli-tolerantním bakteriím se podařilo identifikovat z granulárních hemocytů kraba pobřežního *C. maenas*. Tento protein byl později nazván **karcinin**<sup>96,100,112</sup>). Termín *krustin* byl navržen, aby vysvětlil transkripty nalezené u dvou druhů krevet s výraznou shodou sekvencí s krabím proteinem, známým jako karcinin<sup>114</sup>).

Všechny dosud známé krustiny mají vedoucí (signální) sekvenci na N-konci a WAP doménu na C-konci. Na základě struktury se dělí do tří skupin: I, II, III.

Typ I tvoří peptidy nejvíce podobné karcininu s proměnlivou délkou cysteinové části mezi vedoucí sekvencí a WAP doménou. Tento typ se vyskytuje hlavně u krabů, humrů a raků/langust.

Typ II je charakterizován přítomností části bohaté na glycin mezi signální sekvencí a cysteinovou částí a je typický pro krevety.

Typ III má krátký PRP úsek mezi vedoucí sekvencí a samotnou WAP, ale neobsahuje cysteinovou doménu charakteristickou pro typ I a II. Struktury jednotlivých typů krustinů jsou znázorněny v Obrázku 5. Peptidy Typu III známy také jako jednosyrovátkové proteiny (SWD), chelonianinový typ nebo antileukoproteasový typ proteinu<sup>96,112,115</sup>).



Obr. 5 Schématické znázornění uspořádání domén tří hlavních typů krustinů produkovaných desetinožci.

Převzato z Smith *et al.* 2008<sup>112)</sup>. S-S = signální sekvence

Všechny skupiny krustinů jsou aktivní hlavně proti G-pozitivním bakteriím. Mezi citlivé bakterie patří kmeny *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Bacillus*. Krustin typu II z tygří krevety *P. monodon* (krustin typ Pm) vykazuje silnou aktivitu současně proti G-pozitivním i G-negativním bakteriím, včetně oportunní *Vibrio harveyi*. Je zřejmé, že antimikrobní aktivita souvisí s terciární 4DSC strukturou (pevně omezena třemi disulfidickými můstky a obsahuje malý  $\alpha$ -helix). Přesný mechanismus antimikrobního působení krustinů není znám<sup>96,100,112)</sup>. Další studium účinků AMPs koryšů by mohlo výrazně omezit ztráty při jejich chovu<sup>116)</sup>.

### c) Hyastatin

Hyastatin je nový multi-doménový antibakteriální peptid, který se podařilo získat z hemocytů z malého kraba pavoučího (*Hyas araneus*). Kationtovou molekulu tvoří velký polypeptid, jenž tvoří pozoruhodná na glycin bohatá N-terminální doména, krátký PRP úsek, terminální C se šesti cysteiny. Glycinová doména obsahuje 27 % glycinu, je podobná krustinu typu II. Naproti tomu, PRP a cysteinové domény jsou srovnatelné s peneidinými. Uspořádání šesti cysteinových zbytků u hyastatinu je identické se všemi skupinami peneidinů. Navíc, hyastatin má schopnost vázat se na chitin, jak je popsáno u peneidinů<sup>96,100,117)</sup>.

Hyastatin se testoval na omezeném počtu mikroorganismů a vykázal široké spektrum aktivity. Je schopen inhibovat růst kvasinek: *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*, G-pozitivní bakterie: *Corynebacterium glutamicum*, G-negativní bakterie: *E. Coli*. Antimikrobní aktivita souvisí s cysteinovou doménou, tím se liší od peneidinů a krustinů, které mají omezenou aktivitu ke G-pozitivním bakteriím. Aktivita hyastatinu souvisí s cysteinovou doménou spíše než PRP



doména, jak se předpokládá u peneidů. Vazba na chitin je spojena s N-terminální oblastí (PRP a glycinové domény) místo cysteinové domény jako u peneidinů<sup>96,100,117</sup>.

#### d) Arasiny

Podobně jako hyastatin, jsou arasiny jsou kationtové chimerické peptidy izolované z hemocytů *H. araneus*. Tvoří je vedoucí sekvence 25 AMK následovaná N-terminální částí tvořenou především PRP a terminálním C obsahující čtyři cysteiny zapojených do dvou disulfidických vazeb. N-terminální PRP motiv se podobný baktenečinu-7, metalnikowinu-1 a PRP AMPs korýšů, jako typ Bac a astacidin 2. Čtyři cysteiny jsou uspořádány podobně jako protegriny u obratlovců. **Arasin-1** obsahuje 37 AMK. Podobně jako hyastatin, byl testován pouze proti několika kmenům a vykazuje aktivitu současně G-pozitivním (*C. glutamicum*) a G-negativním bakteriím (*Listonella anguillarum*, *E. coli*) *in vitro*. **Arasin 2** se podařilo identifikovat sekvenováním cDNA knihovny hemocytů. Spektrum nebylo prozatím určeno<sup>96,118</sup>). Nedávno bylo zjištěno, že farmakofor arasinu-1 leží v PRP části N-konce a fragment obsahující AMK 1–23 je stejně účinný jako arasin-1. Arasin-1 a jeho aktivní fragment byly netoxické pro erythrocyty a vázaly chitin. Hodnocení antibakteriální fragmentu 1–23 ukázalo, že v minimální inhibiční koncentraci (MIC) není baktericidní a nenarušuje membrány. Avšak v koncentraci 56× vyšší než MIC je baktericidní a narušuje membrány. Autoři se domnívají, že fragment 1–23 arasinu-1 působí dvěma mechanismy. Ve vysokých koncentracích narušuje membránu a v nižších koncentracích působí jiným mechanismem (interakce s intramolekulárními strukturami<sup>119</sup>). Studovány byly také arasinům-podobné peptidy bahenního kraba *Scylla paramamosain*<sup>120</sup>.

#### **IV. Nekonvenční AMPs: multifunkční proteiny a fragmenty proteinů s antibakteriálními vlastnostmi**

Tato poslední skupina AMPs je složena z multifunkčních proteinů, které vykonávají primárně další funkce a fragmenty proteinů s antibakteriální aktivitou generovaných zpracováním velkých proteinů. Peptidy mají důležité molekulové prvky nalezené u klasických AMPs, tj. náboj, hydrofobicita anebo amfipaticita, a byly získány z mnoha rozdílných druhů obratlovců a bezobratlých. Patří sem celé proteiny, například histony, ribosomální proteiny, proteiny mateřského mléka, peptidové fragmenty odvozených z velkých proteinů bez antibakteriálních vlastností, třeba hemoglobin, laktoferin, hemocyanin. U korýšů bylo zjištěno, že antimikrobní vlastnosti mají histony, histonové fragmenty a peptidy odvozené od hemocyaninu<sup>96</sup>.

#### a) Histony a derivované fragmenty

Histony jsou hlavní složky chromatinu, které se přímo podílejí na sbalení DNA a regulace genové exprese. Jsou to kationtové proteiny vysoce konzervované ve všech eukaryotických buňkách, které mohou být také zapojeny do antimikrobní obrany. Antimikrobní aktivita byla

zaznamenána u odlišných typů histonů (H1, H2A, H2B, H3 a H4) u mnoha druhů obratlovců a bezobratlých, Vysoký obsah kationických zbytků a amfipatická sekundární struktura mohou být zodpovědné za antibakteriální vlastnosti. Skutečnost, že histony mají antimikrobní vlastnosti, je známo už více než 50 let. Jejich působení ve prospěch hostitele nebylo objasněno a tomuto objevu nebyla věnována větší pozornost<sup>96,100</sup>.

Histony a fragmenty histonů s antimikrobní aktivitou byly nedávno zjištěny u krevety *L. vannamei*. Biochemickými postupy se podařilo detekovat vysoké hladiny čtyř jádrových histonů (H2A, H2B, H3 a H4) v hemocytech. Jak úplná délka histonu, tak i N-terminální fragment byly silně aktivní proti *M. luteus* a dvěma kmenům *Bacillus*. Podobně, i chromatografické frakce obsahující H2B/H4 histony inhibují *M. luteus*. Navíc, u H1-derivovaného peptidu z krevety bylo zjištěno, že je aktivní vůči *M. luteus*<sup>1211</sup>.

Tajwanští vědci zjistili, že krevety *L. vannamei* vytvářejí extracelulární pasti (*extracellular traps*, ET) složené z DNA, histonů a cytoplazmatických antimikrobních proteinů, jejichž tvorba byla dosud popsána pouze imunitních buněk obratlovců. Stimulace krevetích forbol-myristát-acetátem, lipopolysaccharidy a živou *Escherichia coli* vedla ke vzniku charakteristických ET vláken složených z hostitelské DNA. Při stimulaci *E. coli* byla tato vlákna asociována s histony. U *E. coli* zachycených těmito vlákny docházelo k částečné permeabilizaci membrány<sup>122</sup>.

Antibakteriálním histonem je také protein MrHis produkovaný sladkovodní krevetou *Macrobrachium rosenbergii*. Patří nadrodiny histonů H2A, aktivní část leží na N-konci<sup>123</sup>.

## 6.2.5 Kationtové peptidy produkované obratlovcí

### *Kationtové antimikrobní peptidy u ryb*

Na rozdíl od výše popsaných živočichů jsou u ryb popsány základní prvky získané imunity, avšak AMPs zůstávají nejdůležitější zbraní jejich ochrany proti patogenům. Podrobný seznam AMPs produkovaných rybami lze nalézt v práci Rajanbabu a Chena<sup>124</sup>. Níže uvádím pouze některé z nich.

**Epinecidin-1** je typ kationtového peptidu izolovaného z kanice mangrového<sup>71</sup> (*Epinephelus coioides*). Vykazuje antibakteriální srovnatelnou aktivitu proti G-pozitivní a G-negativním bakteriím a *Trichomonas vaginalis*. Tvoří jej 21 AKelin, neobsahuje disulfické můstky a podobá se pleurocidinu (23 – 47 AMK). Syntetické deriváty epinecidinu-1 interagují se záporně nabitými fosfolipidy membrán bakterií a tím narušují jejich funkci. Epinecidin má také protinádorové účinky<sup>125</sup>.

**Hepcidin** je znám především jako peptid regulující transport železa<sup>126</sup>. Rybí hepcidiny vykazují antimikrobiální aktivitu *in vitro* a jejich exprese v rybích játrech je indukována LPS. Hepcidiny tilapie *Oreochromis mossambicus* (TH1–5, TH2–2 a TH2–3) mají 4 disulfidové můstky a obsahují velké úseky s  $\beta$ -sheet uspořádáním. Navzájem se liší polohou AKelin

nesoucích náboj na N- konci zralého peptidu. Syntetický peptid TH1–5 byl aktivní proti G<sup>+</sup>-bakteriím (*L. monocytogenes*, *E. faecium* a *S. aureus*), peptid TH2–3 proti G<sup>-</sup>-bakteriím (*V. damsela* a *V. vulnificus*) a peptid TH2–2 byl neúčinný<sup>127</sup>). Jak epinecidin-1, tak hepcidin TH1–5 mají anrivitovou účinnost<sup>128</sup>).

**JF2** je hepcidin izolovaný z platýse *Paralichthys olivaceus*, vykazuje aktivitu proti *E. coli*, *S. aureus*, *Lactococcus garviae*, nikoliv proti *Edwardstella tarda*<sup>129</sup>).

**Histon H2A**, acetylovaný na N-konci, byl izolován z kožního sekretu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a byla u něj zjištěna aktivita proti G<sup>+</sup>-bakteriím *Aerococcus viridans*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* or *Planococcus citreus*. Na G<sup>-</sup>-bakterie působil jen slabě a vůči *Saccharomyces cerevisie* měl Mic srovnatelnou s MIC proti *B. subtilis*. Nemá hemolytickou aktivitu proti erytrocytům pstruha při  $c < 0,3\mu\text{M}$ . protein je citlivý na sůl. Rekonstrukce proteinu v planární lipidové dvojvrstvě silně rozrušuje membránu, ale netvoří stabilní iontové kanály. Primární účinek pravděpodobně nezahrnuje tvorbu kanálů<sup>130</sup>). Dalšími peptidy nalezenými kožním sekteru pstruha jsou **oncorhyncin-II** z pstruha duhového a **HSDF** (fragment histonu H-1 s 26 AKelinami) z lososa kisuče<sup>71</sup>) (*Oncorhynchus kisutch*)<sup>131,132</sup>).

**Pleurocidin** je amfipatický helikální antimikrobní peptid z platýse amerického (*Pleuronectes americanus*). Skládá se z 25 AMK. Vykazuje antibakteriální aktivitu proti G-negativním a G-pozitivním bakteriím. Působí tvorbu pórů v membránách.  $\alpha$ -Helicita se zdá být pro účinek důležitější než hydrofobicita. Navíc je tu sekvenční podobnost s dermaseptiny a ceratatoxiny<sup>133</sup>).

### ***Kationtové antimikrobní peptidy u obojživelníků***

Izolace **magaininu** v roce 1987 znamenala zásadní mezník v studiu AMPs<sup>21</sup>). Magainin se podařilo identifikovat v kůži žáby *Xenopus laevis*. Jedná se o amidovaný amfipatický helix tvořený 23 AMK. Je vysoce bazický s výsledným nábojem +4 při pH 7. Vykazuje fungicidní, antibakteriální a tumoricidní účinky. Má hodně společných znaků s dalšími peptidovými antibiotiky např. cekropiny, bombolitiny, mastoparany a melittinem<sup>134</sup>).

**Buforin I** je peptid tvořený 39 AMK, poprvé izolovaný z žaludku asijské ropuchy *Bufo bufo gargarizans*. **Buforin II** obsahuje 21 AMK, je derivovaný z buforinu I a vykazuje mnohem silnější antibakteriální aktivitu než buforin I. Oba peptidy mají sekvenci identickou s N-koncem histonu H2A. Po translokaci do buněk interagují přímo s nukleovými kyselinami, bez membránové permeabilizace<sup>135</sup>).

Dalšími obrannými peptidy žab jsou **brevininy**. Původně byly izolované z kůže žáby *Rana brevipoda porsa*. Jsou složeny z 24 AMK. G-pozitivní i G-negativní bakterie a různé kmeny patogenních hub jsou citlivé na brevininy<sup>136</sup>). Žáby a ropuchy produkují velké množství antimikrobiálních peptidů. Podrobnosti o jejich strukturní rozmanitosti a výskytu je možno nalézt v přehledu publikovaném v roce 2011<sup>137</sup>).

### ***Kationtové antimikrobní peptidy u plazů***

Hadí jedy obsahují velké množství nejrůznějších proteinů a peptidů, včetně AMPs. Jednou z nově studovaných skupin hadích peptidů jsou wapriny (peptidy podobné výše zmíněným WAPs). Prvním známým zástupcem je **nawaprin** izolovaný z jedu kobry *Naja nigricoli*. Dalším zástupcem je **omwaprin** z jedu taipana menšího<sup>71)</sup> (*Oxyuranus microlepidotus*). Má 50 AMK, vykazuje selektivní a na dávce závislou aktivitu proti G-pozitivním bakteriím. Svou antibakteriální aktivitu ztrácí po redukci a alkylyci cysteinových můstků, nebo po delecii šesti N-terminálních AMK, z nichž čtyři jsou pozitivně nabitý. Omwaprin patří mezi peptidy narušující membránu. Důležité je, že omwaprin postrádá hemolytickou aktivitu u lidských erytrocytů<sup>138,139)</sup>.

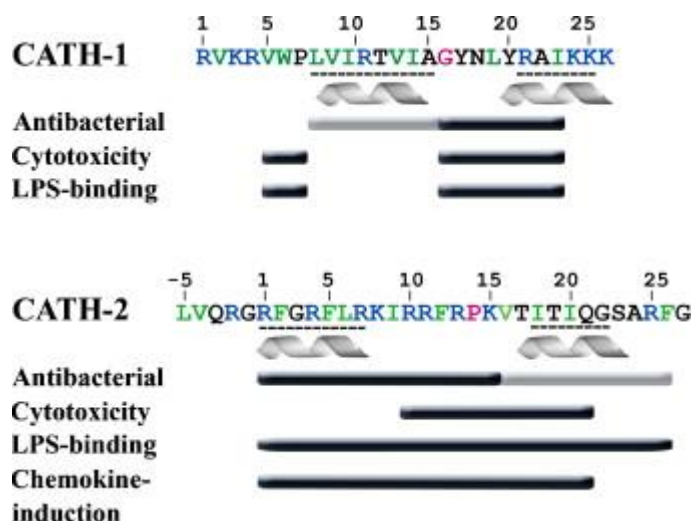
Kromě specifických HDPs produkují plazi i AMPs produkované také jinými organismy. Příkladem může být **kathelcidin-BF** izolovaný z jedu jedu bungara kroužkovaného<sup>71)</sup> (*Bungarus fasciatus*). Podobně jako u ostatních kathelcidinů, prekursor nese typ kathelinové domény na terminálním N a zralý kathelcidin-BF na C konci, ale má atypický fragment kyseliny vložený mezi doménou a terminálním C. Tvoří jej 30 AMK včetně 12 bazických zbytků (9 lysinů a 2 argininů), 5 fenylalaninů a jeden zbytek kyseliny glutamové. Je to peptid bohatý na lysin a fenylalanin. Zvláště aktivní je proti G-negativním bakteriím, dále G-pozitivním bakteriím *Bacillus* spp. a klinickému izolátu *Salmonella typhi*. Má také antifungální účinky<sup>140)</sup>. Peptidy  $\beta$ -defensinového typu byly nalezeny v ještěrkách<sup>141,142)</sup>.

### ***Kationtové antimikrobní peptidy u ptáků***

Ptáci produkují hlavně defensiny a kathelcidiny. Poznatky o ptačích AMPs se prohloubily po objasnění genomu kuřat<sup>143)</sup> a zpřesňuje se i nomenklatura těchto peptidů<sup>144)</sup>. Z defensinů jsou pro ptáky typické  $\beta$ -defensiny, dosud jich bylo nalezeno 25<sup>44)</sup>. Pro  $\beta$ -defensiny kuřat se používal název **galliciny**. Později se tyto peptidy začaly označovat jako **avian beta-defensins** (AvBD). Podobné peptidy byly nalezeny i u krocánů, pštrosů, tučňáků a holubů<sup>144)</sup>. Jsou účinné proti G-pozitivním, G-negativním bakteriím a houbám<sup>145)</sup>. Pro defensiny obsažené v ptačích vejcích byl navržen termín **ovodefensiny**. Do této skupiny patří **galliny** ze slepičích vajec, **meleagrín** z vajec krocana divokého<sup>71)</sup> (*Meleagris gallopavo*), **cygnin**, který je obsažen v lysozymu labutě černé<sup>71)</sup> (*Cygnus atratus*) a proteiny **BSP-1** a **BSP-2** z vajec divoké kachny<sup>71)</sup> (*Anas platyrhynchos*)<sup>146)</sup>.

Další skupinu ptačích AMPs tvoří kathelcidiny. V současnosti jsou známy čtyři kathelcidiny kura bankivského<sup>71)</sup> (*Gallus gallus*): **CATH-1** – kathelcidin-1 (známý také jako fowlicidin-1), **CATH-2** – *chicken myeloid antimicrobial peptide 27* (fowlicidin-2), **CATH-3** – fowlicidin-3 a **CATH-B1** – kathelcidin-B1. Podobné peptidy byly nalezeny u bažanta obecného<sup>71)</sup> (*Phasianus colchicus*). Jsou to  $\alpha$ -helikální peptidy exprimované v různých tkáních; kathelcidin-B1 je jediný epiteliální kathelcidin. Tvoří se výhradně v epitelu kloakální bursy, která je důležitou součástí

ptačího imunitního systému. Kromě antimikrobních účinků mají ptačí cathelicidiny i další aktivity<sup>147,149</sup>). Biologické účinky CATH-1 a CATH-2 jsou ilustrovány v Obrázku 6.



Obr. 6: Důležité části CATH-1 a CATH-2 zodpovědné za jejich biologické účinky

Kladně nabité AMK jsou vyznačeny modře, hydrofobní AMK zeleně. Růžové G označuje glycin a růžové P odpovídá prolinu. Helikální segmenty jsou podtrženy. Černé čáry označují sekvence, které jsou velmi důležité pro danou aktivitu, šedé čáry odpovídají sekvencím méně důležitým pro daný účinek.

Převzato z van Dijk 2011<sup>147</sup>).

Kromě defensinů a cathelicidinů patří mezi ptačí peptidy také *liver-expressed antimicrobial peptide 2* – **LEAP-2** izolovaný původně z lidské krve. Jeho ortology byly nalezeny také u jiných primátů, myši, skotu, prasat a slepic<sup>150</sup>). Geny pro LEAP-2 různých druhů jsou podobné, ale ne zcela totožné. Gen pro slepičí LEAP-2 (cLEAP-2) leží na 13 chromosomu a kóduje pre-pro-peptid se 77 aminokyslimani. Sekretovaný peptid má 53 AMK a je proteolyticky štěpen na zralý peptid se 40 AMK a dvěma difulfidovými můstky. Propeptid je biologicky málo aktivní, zralý peptid narušuje vnější membránu některých *Salmonella* spp.; byl účinný i proti některým streptokokům a není toxický pro savčí erytrocyty<sup>150,151</sup>).

## ***Peptidy přítomné u savců***

Pro savce jsou typické tři skupiny kationických antimikrobiálních peptidů: kathelicidiny, defensiny a histatiny (u člověka) nebo jim podobné peptidy u jiných druhů<sup>27,28,30</sup>.

### **I. Kathelicidiny**

Kathelicidiny jsou malé, kationické, amfipatické antimikrobní peptidy nalezené u lidí, chovných zvířat a u některých druhů ryb, plazů a ptáků. Bývají proteolyticky aktivovány a jsou nezbytnou součástí přirozené imunity. Vykazují široké spektrum účinku aktivity proti plísním, virům a bakteriím<sup>147,152</sup>. Jsou charakterizovány vysoce stálou signální sekvencí na N-konci (29 – 30 AMK), střední částí (99 – 114 AMK), která se podobá kathelinu (kathelin = inhibitor kathepsinu L izolovaný z prasečích leukocytů), ale C-terminální doména (12 – 100 AMK) vykazuje určitou heterogenitu a odpovídá zralému peptiduzralý peptidu. C-koncová AMK je ve formě amidu<sup>152-155</sup>.

Kathelicidiny se společným proregionem (kathelin doména) byly poprvé identifikovány u savců v kostní dřeni myeloidních buněk. Jsou uloženy v sekrečních granulích neutrofilů, makrofágů a mohou být uvolněny extracelulárně ihned po aktivaci leukocytů. Dělí se několika do skupin dle sekvence AMK<sup>152-155</sup>. Počet kathelicidinů se u různých organismů liší – člověk, opice makak rhesus<sup>71</sup> (*Macaca mulatta*), myš, potkan a morče mají pouze jeden kathelicidinový gen, zatímco prase, ovce a skot a koně jich mají více<sup>147</sup>.

Ze zvířecích kathelicidinů lze jako příklad uvést **RL-37** (AMP makaka rhesus), **mCRAMP** (myšší *Cathelin-Related Antimicrobial Peptide*), **rCRAMP** (potkaní *Cathelin-Related Antimicrobial Peptide*), **CAP11** (morčecí kathelicidin), **eCATH-1 – eCATH-3** (koňské kathelicidiny), **PR39** (prasečí kathelicidin), **BMAP27** a jeho homology (bovinní myeloidní AMPs) a **LL37** (lidský kathelicin)<sup>152</sup>. Nejlépe jsou prostudovány kathelicidiny  $\alpha$ -helikální C-terminální částí<sup>153</sup>.

Myšší **mCRAMP** je podobný lidskému LL-37. Je účinný proti G-pozitivním i G-negativním bakteriím a má i antifungální účinky<sup>152,155</sup>.

Prasečí **PR39** je peptid obsahující hodně prolinu a argininu. Původně byl izolován z tenkého střeva prasete a později nalezen v neutrofilech. Do buněk vstupuje aniž by porušoval membránu a bakterie zabíjí inhibicí bakteriální mRNA translaci a syntézy DNA. Hraje roli v hojení ran, indukuje angiogenezi, ovlivňuje chemotaxi neutrofilů inhibuje fagocytární NADPH-oxidasu<sup>152,153</sup>. PR-39 byl také využit v léčbě post-ischemické mikrovaskulární dysfunkce<sup>152,155</sup>.

Kromě PR39 produkují prasata i jiné kathelicidiny. **Protegriny** (PG-1 až PG-5) jsou malé kathelicidiny s 16 – 18 AMK. Mají dva disulfidické můstky a  $\beta$ -hairpin uspořádání, takže jsou podobné defensinům. Byly nalezeny v prasečích leukocytech a kostní dřeni. V koncentraci 1 – 5  $\mu$ g/ml jsou účinné především proti G-negativním bakteriím, houbám a některým virům. Na rozdíl od jiných kathelicidinů nebo defensinů není jejich aktivita inhibována výrazným zvýšením

koncentrace soli.<sup>152</sup>). **Profenin-1** má 79 AMK (z toho 42 prolinů a 15 fenylalaninů). **Profenin-2** s 97 AMK se tvoří v nezralých myeloidních buňkách. Při testech *in vitro* byla oba peptidy účinnější proti G-negativní *E. coli* než G-pozitivní *Listeria monocytogenes*<sup>152</sup>).

Lidský **LL-37** vzniká proteolýzou prekurzorového proteinu hCAP-18 a bývá proto označován také jako **LL-37/hCAP-18**. Písmena LL označují dva leuciny v N-terminálním konci. Písmena LL označují dva leuciny v N-terminálním konci. LL-37 neobsahuje cystein a má lineární strukturu, v hydrofilním prostředí zaujímá náhodnou konformaci a v hydrofobním prostředí tvoří  $\alpha$ -helix<sup>27</sup>). LL-37/hCAP-18 byl původně izolován z myelocytů a metamyelocytů a lokalizován ve specifických granulích neutrofilů. Zralý peptid se tvoří v neutrofilech, monocytech, NK-buňkách, T- a B-buňkách, epiteliálních buňkách varlete, GIT a respiračního traktu. Exprese LL 37/hCAP-18 bývá zvýšena některými prozánětlivými mediátory, např. IL-6. I keratinocyty mohou indukovat LL-37<sup>27,155,156</sup>). LL-37 je aktivní proti G-pozitivním a G-negativním bakteriím v mikromolárních koncentracích. Aktivita LL-37 v roztocích je závislá na pH a složení elektrolytů. Cytotoxické koncentrace LL-37 pro savčí buňky jsou třikrát vyšší než koncentrace potřebná k eliminaci bakterií. LL-37 je vázán s apolipoproteinem-A1, který inhibuje antibakteriální a cytotoxické vlastnosti peptidu<sup>155,156</sup>). Kromě antimikrobiální aktivity LL-37 váže a neutralizuje LPS, chrání před endotoxickým šokem, indukuje degranulaci žírných buněk, mění transkripci v makrofázích a má protinádorové účinky<sup>27,154-156</sup>). Produkce LL-37 v makrofázích je stimulována vitaminem D<sup>152</sup>).

## II. Defensiny

Z výše uvedených faktů je zřejmé, že defensiny jsou peptidy vyskytující se nejen v živočišné říši, ale také v rostlinách. Dle strukturního motivu se dělí na:

- a)  $\alpha$ -defensiny
- b)  $\beta$ -defensiny
- c)  $\theta$ -defensiny.

Jednotlivé skupiny se liší délkou řetězce, umístěním difulfidových můstků, strukturou svých prekurzorů a místem, kde se tvoří<sup>26,157</sup>). Zralé defensiny jsou krátké polypeptidové sekvence (18 – 45 AMK), mají tři intramolekulární disulfidové můstky, postrádají glykosyl nebo acyl v postranním řetězci, terciární struktury, ve kterých převažují  $\beta$ -listy tvořící smyčku<sup>38</sup>). Patří mezi argininem bohaté peptidy a jsou alkalické<sup>26</sup>). Poprvé byly izolovány z neutrofilů<sup>25,38</sup>). Jarczak a kol.<sup>26</sup>) uvádí počet AMK od 16 do 50. Defensiny mají široké antimikrobní spektrum zahrnující bakterie, houby a obalené viry, ale při fyziologických koncentracích  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  nebo  $\text{Ca}^+$  se jejich účinnost snižuje<sup>38,157</sup>).

a)  $\alpha$ -defensiny

$\alpha$ -Defensiny obsahují 29 – 35 AMK, mají disulfidické můstky mezi Cys1 a Cys6, Cys2 a Cys4, a Cys3 a Cys5<sup>1</sup>). Jsou skladovány jako propeptidy (v Panethových buňkách) nebo jako zralé defensiny (v neutrofilech)<sup>38</sup>). Od roku 1966, kdy byly izolovány první  $\alpha$ -defensiny z králičích neutrofilů, bylo identifikováno asi 50 genů kódujících  $\alpha$ -defensiny u různých živočišných druhů (primáti, hlodavci, koně). Většina z nich ale nebyla dostatečně charakterizována<sup>157</sup>). Podrobnější údaje jsou známy pouze o lidských a myšských  $\alpha$ -defensinech. Čtyři z nich jsou exprimovány v neutrofilech a byly původně označeny jako *human neutrophil peptides* HNP-1 až HNP-4<sup>27,38</sup>). V současnosti se používají názvy **DEFA-1**, **DEFA-2**, **DEFA-3** a **DEFA-4**<sup>26,158</sup>). Další dva (HP-5 a HP-6<sup>27,38</sup>) nebo **DEFA-5** a **DEFA-6**<sup>26,157</sup>) se tvoří v Panethových buňkách trávicího traktu a označují se jako *enteric defensins*<sup>157,158</sup>). Sekrece  $\alpha$ -defensinů byla prokázána také v epitelu trachey a v tekutině cyst v čelisti. U zdravých lidí se nacházejí ve slinách, dásních, jazyku a dalších tkáních ústní dutiny, ale ne ve zdravých zubech. Tvoří se i při zánětech jako je gingivitis a periodontitis. Jsou syntetizovány dřív, než dochází ke zrání a diferenciaci neutrofilů<sup>26</sup>).

DEFA-1 a DEFA-3 mají 30 AMK a jediný rozdíl mezi nimi je v první N-terminální sekvenci AMK. Pokud odstraníme první N-terminální sekvenci z DEFA 1 nebo DEFA 3, vytvoří se DEFA-2. DEFA-4 tvoří 35 AMK s 32% homologií s dalšími třemi neutrofilními defensiny.

Inhibiční efekt DEFA-1 až DEFA-4 defensinů proti HSV-1, HSV-2 (*herpes simplex virus*) a cytomegaloviru (CMV) byl demonstrován *in vitro*. Aktivita DEFA-1 proti bakteriím jako je *Mycobacterium avium*, *M. aviculare*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes* a *E. coli* byla prokázána. Zvýšené koncentrace DEFA-1, DEFA-2 a DEFA-3 byly nalezeny cerviko-vaginálním výplachem získaného od pacientek s vaginitidou a cervikálním zánětem. Lidské defensiny se testovaly také jako možné biomarkery *bronchitis obliterans* (syndromu u pacientů po transplantaci plic). Humánní neutrofilní defensiny 1–3 vykazují dále chemotaktickou aktivitu v monocytech. Zvýšené exprese DEFA-3 a DEFA-4 byly zjištěny u benigní orální dysplazie<sup>25,26,157</sup>).

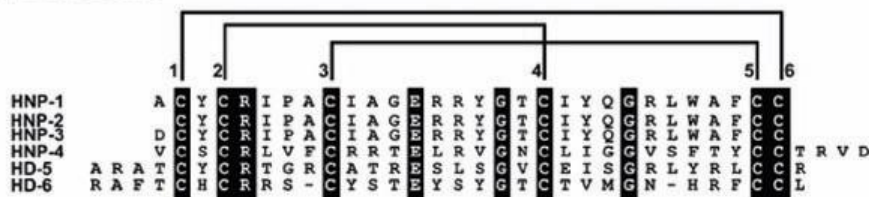
Exprese DEFA-5 byla potvrzena ve vagině, cervikální mukose, vejcovodu a v epitelu několika orgánů trávicího systému v odpovědi na zánět. DEFA 5 účinkuje proti *E. coli*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, ale DEFA 6 nikoliv<sup>159</sup>).

b)  $\beta$ -defensiny

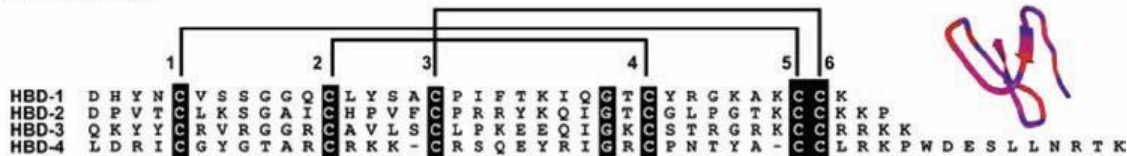
$\beta$ -Defensiny tvoří 36 – 42<sup>38</sup>) AMK zbytků (Jarczak a kol.<sup>26</sup>) uvádí 38 – 50 AMK). Můstky spojují Cys1 a Cys5, Cys2 a Cys4, a Cys3 a Cys6, terciární struktura je podobná  $\alpha$ -defensinům (Obr. 7)<sup>27,38</sup>).



## $\alpha$ -Defensins



## $\beta$ -Defensins



Obr. 7 Schematické znázornění  $\alpha$ -defensinů a  $\beta$ -defensinů.

Cysteiny v disulfidových můstcích jsou vyznačeny černými rámečky. Terciární struktury barevně.

Upraveno podle Pasupuleti 2012<sup>38)</sup>

První lidský  $\beta$ -defensin HBD-1 (syn. **DEBF-1**) byl izolován z hemofiltrátu dialyzovaných pacientů. Tvoří se v epitelu, který přichází do kontaktu s okolím nebo s mikrobiální flórou (v plicích, mléčné žláze, slinných žlázách, ledvinách, pankreatu a prostatě)<sup>27)</sup>. Výrazná tvorba DEBF-1 epitelu v mléčné žláze (koncentrace v mléce je 1 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) naznačuje, že chrání mléčnou žlázu proti zánětu a přispívá k ochraně novorozence před patogeny<sup>26)</sup>. DEBF-1 působí hlavně na G-negativní bakterie a kmeny *Candida*, ale nemá žádnou anti-HSV aktivitu. DEFB-1 také stimuluje diferenciaci keranocytů, buněk zapojených do produkce keratinu. To znamená, že poskytuje ochrannou bariéru zdravým tkáním proti patogenům a napomáhá procesu hojení. Nechybí chemotaktická aktivita vůči buňkám imunitního systému<sup>26)</sup>. Syntéza DEFB-1 je indukována mikroorganismy a cytokiny, včetně IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ <sup>26,160)</sup>.

**DEBF 2** (lidský  $\beta$ -defensin 2) byl poprvé nalezen v psoriatické kůži, tvoří se v epitelu orgánů zmíněných u DEBF-1, leukocytech a kostní dřeni<sup>27)</sup>. Složením aminokyselin je podobný některým zvířecím  $\beta$ -defensinům. Je aktivní proti G-negativním bakteriím, kvasinkám, HIV, proti HSV nikoliv. Aktivitu DEFB-1 a DEBF-2 inhibuje NaCl, i když efekt závisí na koncentraci soli a peptidů. Defensiny si zachovávají aktivitu za předpokladu, že koncentrace peptidů je dostatečně vysoká. DEBF-2 působí synergicky s dalšími složkami imunitního systému<sup>Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.</sup>. Zvýšení hladiny DEBF-2 byla zjištěna u pacientů s dráždivým tračníkem a aktivní ulcerativní kolitidou. Na rozdíl od pacientů s ulcerativní kolitidou měli pacienti s Crohnovou chorobou hladiny DEBF-2 nižší. K dalším účinkům DEBF-2 patří protinádorové vlastnosti a schopnost stimulovat zrání osteoblastů<sup>26)</sup>.

**DEFB-3** byl poprvé izolován z šupinek kůže postižené lupénkou a klonován v keranocytech. Má široké antimikrobní spektrum. Je baktericidní vůči G-negativním bakteriím a kvasince

*Candida albicans*, vankomycin rezistentním streptokokům, stafylokokům a enterokokům. Silná exprese tohoto defensinu vyvolaná prozánětlivými cytokiny byla zjištěna v keratinocytech, tonsilách, nižší exprese indikována v epitelu dýchacích cest, urogenitálního a trávicího systému a v dalších orgánech. DEFB-3 lze pravděpodobně použít v léčbě periodontitis a kandidózy<sup>26</sup>). *In vitro* studie naznačila, že exprese DEFB-3 keratinocytech je indukována růstovými faktory IGF-1 a TGF- $\alpha$ <sup>81</sup>). Papilomavirové infekce zvyšují exprese DEFB 1, DEBF-2 a DEBF-3, zatímco  $\alpha$ -defensiny zůstávají beze změny, což znamená, že  $\beta$ -defensiny hrají důležitou roli přirozené a adaptivní imunity proti HPV<sup>162</sup>).

**DEFB 4** (lidský  $\beta$ -defensin 4) je jenom málo podobný předcházejícím  $\beta$ -defensinům, ale vykazuje 100% shodu s  $\beta$ -defensin 4 šimpanze a je téměř identický s  $\beta$ -defensin 4 gorily, paviána a gibbona. Gen tohoto defensinu kóduje prepropeptid složený 72 AMK. U lidí byla zjištěna vysoká exprese DEBF-4 v žaludku, varlatech, zatímco nejnižší exprese byly zjištěny v neutrofilech, epitelu plic, ledvin, dělohy a štítné žlázy<sup>26</sup>).

Výzkum DNA poodhalil existenci dalších  $\beta$ -defensinů. Geny pro **DEFB-5 – DEBF-9** jsou lokalizované na stejném chromosomu jako geny výše zmíněných DEBF. Geny **DEBF 10 – DEFB-29** leží na jiných chromosomech a geny **DEFB-30 a DEFB-31** se nepodařilo přesně určit. Geny pro DEBF-5 a DEBF-6 byly klonovány a bylo zjištěno, že jsou výrazně exprimovány v lidských nadvarlatech. Později byly geny pro tyto peptidy vneseny do *E. coli* a rekombinací peptidy vykazaly aktivitu proti *E. coli*, nikoliv proti *S. aureus*<sup>Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.,27</sup>).

### c) $\theta$ -defensiny

**DEFT** ( $\theta$ -defensiny) jsou vývojově nejmladší a jako jediné mají cirkulární strukturu. Poprvé byly identifikovány v neutrofilech a monocytech opice makaka. Tři  $\theta$ -defensiny: **RTD-1** (*Rhesus theta defensin 1*), **RTD-2** a **RTD-3** byly identifikovány také v leukocytech. Isoformy těchto peptidů se dále objevují u paviána – 4 v kostní dřeni a 5 v leukocytech periferní krve<sup>26</sup>). DEFT jsou produkovány jako výsledek post-translačního spojení dvou nonapeptidů odvozených ze 76 AMK prekurzorů typu defensinů. Antimikrobní účinek není redukován v přítomnosti soli a vysokých koncentrací dvojmocných kationtů. Ostatní primáti člověk, šimpanz, gorila jsou nositeli theta pseudogenů<sup>Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.</sup>. **Retrocykliny** – umělá humanizovaná cirkulární analoga  $\theta$ -defensinů se vyznačují širokým spektrem účinku, blokují některé kroky herpesviróvé infekce a inhibují virus chřipky, inaktivují letální toxin antrax a *in vitro* ničí kmeny *Bacillus anthracis* a blokují obalem zprostředkované (*Env-mediated*) fúzi HIV-1 a jeho vstup do buňky<sup>26,163</sup>).

### III. Histatiny

**Histatiny** jsou skupina peptidů bohatá na histidin v délce 7 – 38 AMK. Poprvé byly popsány v roce 1970 jako proteiny zvyšující glykolytickou aktivitu mikroorganismů. Později bylo

zjištěno, že mají baktericidní a fungicidní účinky. Jsou konstitutivně exprimovány příušními a submandibulárními slinnými žlázami u lidí a vyšších primátů, např. makaků, s širokým spektrem účinku. Existují tři typy genově-kódovaných peptidů, které podstupují rozklad proteasami na konečné produkty, celkem 12 odlišných typů histatinů, z nichž **His-1**, **His-3** a **His-5** jsou prominentní. Mechanismus účinku se nesoustřeďuje jen na membránovou permeabilizaci, ale i na mitochondrie nebo mitochondriální protein FOF1 ATPasu, čímž vyvolává eflux ATP resultující v depleci intracelulárního ATP a nakonec smrt. Stejně jako většina AMPs, histatiny mají i jiné než antibakteriální vlastnosti, např. inhibice hemaglutinace, shlukování a neutralizace LPS, vazby na tannin a hojení ran<sup>27,38</sup>). Nejvyšší antimikrobní účinnost má His-5. V současné době je studován především jako potenciální léčivo ústní kandidózy<sup>164-165</sup>).

## 7 Praktické využití kationtových antimikrobních peptidů a výhled do budoucnosti

Hlavní motivací pro vývoj peptidů jsou jejich rozmanité možnosti využití. Mohou být efektivně využity samostatně, v kombinaci s dosud známými antibiotiky nebo jako imunomodulátory. Hlavně ty nejúčinnější peptidy mají neobvykle široké spektrum aktivity, a ačkoliv účinek těchto peptidů není tak silný jako u konvenčních antibiotik, jejich hlavní předností je jejich efekt na multirezistentní kmeny. Ačkoliv interakce s CM je zjevná a některé peptidy mají schopnost perforovat membrány již při jejich minimální koncentraci (MIC), u některých peptidů byl prokázán přechod přes CM a následný efekt na intracelulární procesy, včetně syntézy makromolekul, dělení buňky, nebo stimulace autolýzy. Minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace jsou si často podobné, což naznačuje, že peptidy mají především baktericidní účinek. Kromě toho na antibakteriální peptidy nevzniká rezistence tak často jako na klasická antibiotika, a tudíž se testují proti meticilin-rezistentním stafylokokům a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*. Bohužel, existují i mikroorganismy, které jsou přirozeně rezistentní např. *Bulkholderia*, *Proteus*, *Serratia* spp<sup>66</sup>).

Počátečním bodem pro vývoj nových antibakteriálních peptidů je jejich izolace z přírodních zdrojů a následná modifikace jejich struktury. Výzkumem se zabývá např. firma Micrologix (www.migenix.com), v minulosti, dnes již zaniklé, Magainin Pharmaceuticals a IntraBiotics. Prvním z těchto peptidů byl pexiganan (MSI-78), syntetická 22 aminokyselinová variace magainu-2 nebo IB 367 odvozený z prasečího protegrinu. Vývoj těchto preparátů byl zastaven, jelikož se nepodařilo dosáhnout patřičné účinnosti nebo byl preparát příliš toxický. Jedním z preparátů, který prokázal svou účinnost ve fázi III, je MX-226 odvozený z peptidu na bázi indolicidinu. MX-226 byl vyvinut pro prevenci kontaminace žilních katétrů a prokázal 49% pokles infekcí a stejně tak 21% pokles kolonizace katétrů. Další preparát MX594AN na bázi

indolicidinu (Migenix) určený na léčbu mírného až středního akné byl rovněž úspěšný. Pexiganan v podobě krému se využívá k léčbě impetiga<sup>66)</sup> nebo Iseganan ve formě solutia na léčbu orální mucositis<sup>167)</sup>. AMPs byly v roce 2013 ve stadiu klinických zkoušek nebo preklinickém vývoji jsou uvedeny v tabulce IV<sup>168)</sup>.

**Tabulka IV. R&D of AMPs in the year 2013<sup>168)</sup>**

Produkt	Popis	Indikace	Fáze	Společnost
Magainin/pexiganan acetate	22 AMK, lineární, izolovaný z kůže africké žaby <i>Xenopus laevis</i>	diabetická noha	3	Dipexium Pharma (New York)/ MacroChem/Genaera
Omiganan	syntetický CAP odvozený od indolicidinu	rosacea	2	BioWest Therapeutics/Maruho (Vancouver)
OP-145	syntetický, 24 AMK, odvozený od LL-37, váže se na LPS nebo LTA	chronická infekce středního ucha	2	OctoPlus (Leiden, Holandsko)
Novexatin	cyklický AMP 1093 Da	fungální infekce nehtů	1/2	NovaBiotics (Aberdeen, UK)
Lytixar (LTX-109)	syntetický, degradující membránu	nosní kolonie MRSA	1/2	Lytix Biopharma (Oslo)
NVB302	lantibiotikum třídy B	<i>Clostridium difficile</i>	1	Novacta (Welwyn, UK)
MU1140	lantibioticum	G-pozitivní bakterie (MRSA, <i>C. difficile</i> )	preklinická	Oragenics (Tampa, Florida)
Arenicin	21 AMK, bohatý na arginin a hydrofobní AMK	multirezistentní G-pozitivní bakterie	preklinická	Adenium Biotech (Kodaň)
Avidocin a purocin	modifikovaný bakteriocin R-typu z <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	úzkospektré antibiotikum pro lidské zdraví a bezpečnost potravin	preklinická	AvidBiotics (San Francisco)
IMX924	syntetický, 5 AMK, regulátor vrozené imunity	infekce G-negativními a G-pozitivními bakteriemi (zlepšuje přežití a redukuje tkáňové poškození)	preklinická	Iminex (Coquitlam, Kanada)

## 8 Zdroje

1. HALE, D. F. J.; HANCOCK, R. W. E. Alternative mechanism of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2007**, *5*, 951–959.
2. HANCOCK, R. W. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317–1323.
3. The Antimicrobial Peptide Database: Classification of Antimicrobial Peptides. [database online]. © 2003–2014, Department of Pathology & Microbiology, University of Nebraska Medical Center. [cit. 2014-04-14].  
Dostupné z: <http://aps.unmc.edu/AP/class.php>
4. BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1543–1575.
5. NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132*, 887–895.
6. BRADLEY, W. A.; SOMKUTI, G. A. The primary structure of sillucin, an antimicrobial peptide from *Mucor pusillus*. *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 81–83.
7. SOMKUTI, G. A.; GREENBERG, R. Antimicrobial peptides of thermophilic *Mucor* fungi. *Dev. Ind. Microbiol. Ser.* **1978**, *20*, 661–671.
8. MYGIND, P. H.; FISCHER, R. L.; SCHNORR, K. M.; HANSEN, M. T.; SÖNKSEN, C. P.; LUDVIGSEN, S.; RAVENTÓS, D.; BUSKOV, S.; CHRISTENSEN, B.; DE MARIA, L.; TABOUREAU, O.; YAVER, D.; ELVIG-JØRGENSEN, S. G.; SØRENSEN, M. V.; CHRISTENSEN, B. E.; KJÆRULFF, S.; FRIMODT-MOLLER, N.; LEHRER R. I.; ZASLOFF, M.; KRISTENSEN, H-H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a syprophytic fungus. *Nature* **2005**, *437*, 975–980.
9. ZHU, S.; GAO, B.; HARVEY, P. J.; CRAIK, D. J. Dermatophytic defensin with antiinfective potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 8495–8500.
10. BRIGGS, J. D. Humoral immunity in lepidopterous larvae. *J. Exp. Zool.* **1958**, *138*, 155–188.
11. STEPHENS, J. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. *Can. J. Microbiol.* **1959**, *5*, 203–228.
12. BOMAN, H. G.; NILSSON, I., RASMUSON B. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* **1972**, *237*, 232–235.
13. BOMAN, H. G.; NILSSON-FAYE, I.; PAUL, K.; RASMUSON, T. JR. Insect immunity I.: Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.* **1974**, *10*, 136–145.
14. FAYE, I.; PYE, T.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G.; BOMAN, I. A. Insect immunity II.: Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect. Immun.* **1975**, *12*, 1426–1438.

15. PYE A. E.; BOMAN, H. G. Insect immunity III.: Purification and partial characterization of immune protein P5 from *Hyalophora cecropia* pupae. *Infect. Immun.* **1977**, *17*, 408–414.
16. STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insects. *Nature* **1981**, *292*, 246–248.
17. HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; ANDERSSON, K., STEINER, H.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. G. Insect immunity: Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **1983**, *2*, 571–576.
18. HIRSCH, J. G. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **1956**, *103*, 589–611.
19. KISS, G.; MICHL, H. Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon* **1962**, *1*, 33–34.
20. MICHL, H.; BACHMAYER, H. Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. (2. Mitt.). *Monatsh. Chem.* **1963**, *94*, 814–818.
21. ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987, *84*, 5549–5553.
22. BAI, B.; HOU, X.; WANG, L.; GE, L.; LUO, Y.; MA, C.; MEI, Z.; DUAN, J.; CHEN, T.; SHAW, C. Feleucins: Novel bombinin precursor-encoded nonapeptide amides from the skin secretion of *Bombina variegata*. *BioMed. Res. Int.* 2014. Article ID 671362, 8 pp; Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/671362/>
23. PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. *Antimicrobial peptides*, 1st. ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, GE, 2013.
24. ZEYA, H. I.; SPITZNAGEL, J. K. Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: Separation and identification. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1963**, *142*, 1085–1087.
25. GANZ, T.; SELSTED, M. E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S. S. L.; DAHER, K.; BAINTON, D. F., LEHRER, R. I. Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 1427–1435.
26. JARCZAK, J.; KOŚCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; STRZAŁKOWSKA, N.; JOŹWIK, A.; HORBAŃCZUK, J.; JOZEF KRZYŻEWSKI, J.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. Defensins: Natural component of innate immunity. *Hum. Immunol.* **2013**, *74*, 1069–1079.
27. DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: Defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1337–1347.
28. STEINSTRÄESSER, L.; KRANEBURG, U.; SAMMY AL-BENNA, F. J. Host defence peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology* **2011**, *216*, 322–333.

29. The Antimicrobial Peptide Database: Classification of Antimicrobial Peptides. [database online]. © 2003–2014, Department of Pathology & Microbiology, University of Nebraska Medical Center. [cit. 2014-07-04].  
Dostupné z: <http://aps.unmc.edu/AP/about.php>
30. WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence* **2010**, *1*, 440–464.
31. HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. *Lancet* **1997**, *349*, 418–422.
32. FRIEDRICH, C. L.; MOYLES, D.; BEVERIDGE, T. J.; HANCOCK, R. W. E. Antimicrobial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2086–2092.
33. CHO, J.; HWANG, I.-S.; CHOI, H.; HWANG, J. H. The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 1457–1466. “
34. SHAI, Y.; OREN, Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides.
35. MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. W. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 468–472.
36. BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 169–184.
37. JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. W. E. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491–511.
38. PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 143–171.
39. REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 536–547.
40. NEUBAUEROVÁ, T.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T.; KOUTEK, B. Kationické antimikrobiální peptidy. *Chem. Listy* **2009**, *103*, 460–468.
41. NIJNIK, A.; HANCOCK, R. E. W. Host defence peptides: Antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.* **2009**, *2*, e1. Dostupné z: <http://www.eht-journal.net/index.php/ehj/article/view/7078>
42. MANGONI, L. M. Host-defense peptides: From biology to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2157–2159.
43. YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2161–2176.
44. CUPERUS, T.; COORENS, M.; VAN DIJK, A.; HAAGSMAN, HENK P. Avian host defense peptides. *Dev. Comp. Immunol.* **2013**, *41*, 352–369.

45. YAMAGUCHI, Y.; OUCHI, Y. Antimicrobial peptide defensin: Identification of novel isoforms and characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2012**, *88*, 152–166.
46. SELSTED, M. E.; OUELLETTE, A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 551–557.
47. POWERS, S. J.-P.; HANCOCK, E. W. R. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **2003**, *24*, 1681–1691.
48. DOLEŽÍLKOVÁ, I.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a reaktivitou. *Chem. Listy* **2011**, *105*, 346–355.
49. HANCOCK, R. E. W., LEHRER, R. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **1998**, *2*, 82–88.
50. JACK, W. R.; JUNG, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 310–317.
51. LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 6566–6596.
52. ZASLOFF, M.; Antimicrobial Peptides of multicellular organism. *Nature* **2002**, *415*, 389–395.
53. BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250.
54. YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *54*, 27–55.
55. OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **1998**, *47*, 451–463.
56. DOBSON, A.; COTTER, D. P.; ROSS, P. R.; Hill, C. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 1–6.
57. NISHIE, M.; NAGAO, J.-I.; SONOMOTO, K. Antimicrobial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.*, **2012**, *17*, 1–16.
58. BILKOVÁ, A.; KIŇOVÁ SEPOVÁ, H.; BILKA, F.; BALÁŽOVÁ, A. Bakteriocíny produkované baktériami mliečného kvasenia. *Čes. slov. Farm.* **2011**; *60*, 65–72.
59. YANG, S. CH.; LIN, CH. H.; SUNG, T. C.; FANG, J.-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, Article 241, 1–8.  
Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2014.00241/abstract>
60. DESRIAC, F.; DEFER, D.; BOURGOUGNON, N.; BRILLET, B.; LE CHAVALIER, P.; FLEURY, Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1153–1177.



61. KARPIŃSKI, M. T.; SZKARADKIEWICZ, K. A. Characteric of bacteriocines and their applications. *Pol. J. Microbiol.* **2013**, *62*, 223–235.
62. LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa – effector molecules of the primitive phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **1998**, *23*, 267–279.
63. LEIPPE, M.; ANDRÄ, J.; NICKEL, R.; TANNICH, E.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmatic granules of *Entamoeba histolytica*: Isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmatic membranes. *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 895–904.
64. BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target death cell induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 3615–3621.
65. LEIPPE, M. Amoebapores. *Parasitol. Today* **1997**, *13*, 178–173.
66. SCHMITZ, J.; HOLZGRABE, U. Plectasin – ein neues Peptidantibiotikum mit hohem therapeutischen Potential. *Pharm. Unserer Zeit* **2010**, *39*, 336–337.
67. WILMES, M.; CAMMUE, B. P. A; SAHL, H.-G., THEVISSSEN, K. Antibiotic activities of host defense peptides: More to it than lipid bilayer perturbation. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1350–1358.
68. OEEMIG, J. S.; LYNNGGAARD, C.; KNUDSEN, D. H.; HANSEN, F. T.; NØRGAARD, K. D.; SCHNEIDER, T.; VAD, B. S.; SANDVANG, D. H.; NIELSEN, L. A.; NEVE, S.; KRISTENSEN, H. H.; SAHL, H. G.; OTZEN, D. E.; WIMMER R. Eurocin, a new fungal defensin: Lipid binding, and its mode of action. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 42361–42372.
69. ZHU, S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha\beta$  defensins. *Mol. Immunol.* **2007**, *45*, 828–838.
70. EGOROV, T. A.; ODINTSOVA, I. T. Defense peptides of plant immunity. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2011**, *38*, 7–17.
71. BioLib: Mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů. [online]. © 1999–2014, BioLib, [cit. 2014-07-10]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/main/>
72. GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRÍGUEZ-PALENZUÉLA, P. Plant defense peptides. *Biopolymers* **1998**, *47*, 479–491.
73. STOTZ, U. H.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins: Defense, development and application. *Plant Signaling Behav.* **2009**, *4*, 1010–1012.
74. STEC, B. Plant Thionins-structural perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1370–1385.
75. CASTRO, M. S.; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 11–16.
76. Příroda.cz. [časopis online], ISSN 1801-2787. © 2004–2014, Příroda.cz, [cit. 2014-07-10]. Dostupné z: <http://www.priroda.cz/slovník.php?detail=51561>

77. PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant  $\gamma$ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of multi-functional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 2239–2253.
78. BULET P.; HETRU, C.; DIMARQ J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects: Structure nad function. *Dev. Comp. Immunol.* **1999**, *23*, 329–344.
79. BULET, P.; STÖCKLIN, R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 3–11.
80. DIMARCQ, J. L.; BULET, P.; HETRU, CH.; HOFFMANN, J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* **1998**, *47*, 465–477.
81. PAGÈS, J.-M.; DIMARCQ, J.-L.; QUENIN, S.; HETRU, C. Thanatin activity on multigrug resistant clinical isolates of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *22*, 265–269.
82. LI, W.-F.; MA, G.-X.; ZHOU, X.-X. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **2006**, *27*, 2350–2359.
83. CASTEELS, P.; AMPE, C.; RIVIERE, L.; VAN DAMME, J.; ELICONE, C.; FLEMING, M.; TEMPTS, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 381–386.
84. IMLER, J. L.; BULET, P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: Structures, activities and a gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* **2005**, *86*, 1–21.
85. RAHNAMAEIAN, M.; LANGEN, G.; IMANI, J.; KHALIFA, W.; ALTINCICEK, B.; VON WETTSTEIN, D.; KOGEL, K.-H.; VILCINSKAS, A. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 4105–4114.
86. BULET, P.; DIMARQ, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J. A. A Novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries and *O*-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* **1993**, *217*, 897–903.
87. COCIANCICH, S.; DUPONT, A.; HEGY, G.; LANOT, R.; HOLDER, F.; BULET, P. Novel inducible antibacterial peptides from hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.* **1994**, *300*, 567–575.
88. BENCIVENGO, A.-M.; CUDIC, M.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L. Jr. The efficacy of the bacterial peptide, pyrrhocoricin, is finely regulated by its amino acid residues and active domains. *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 201–209.
89. HARA, S.; YAMAKAWA, M. A novel antimicrobial peptide family isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *Biochem. J.* **1995**, *310*, 651–656.
90. RAO, X.-J.; XU, X.-X.; YU, X.-Q. Functional analysis of two lebocin-related proteins from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *42*, 231–239.
91. TALAT, S.; THIRUVIKRAMAN, M.; KUMARI, S.; KAUR, K. J. Glycosylated analogs of formaecin I and drosocin exhibit differential pattern of antibacterial activity. *Glycoconj. J.* **2011**, *28*, 537–555.

92. XU, X.-X.; ZHONG, X.; YI, H.-Y.; YU, X.-Q. *Manduca sexta* gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *38*, 275–284.
93. Yi, H.-Y.; Deng, X.-J.; Yang, W.-Y.; Zhou, C.-Z.; Cao, Y.; Yu, X.-Q. Gloverins of the silkworm *Bombyx mori*: Structural and binding properties and activities. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *43*, 612–625.
94. HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICHT, H.; KAPUR, R.; BOMAN, H. G. Insect Immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *127*, 207–217.
95. QU, X.-M.; STEINER, H.; ENGSTRÖM, Å.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. G. Insect Immunity: Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antherea pernyi*. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *127*, 219–224.
96. ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Surviv. J.* **2010**, *7*, 262–284.
97. SCHNAPP, D.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J. Purification and characterization of proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 532–539.
98. KHOO, L.; ROBINETTE, D. W.; NOGA, E. J. Callinectin, an antimicrobial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar. Biotechnol.* **1999**, *1*, 44–51.
99. NOGA, E. J.; STONE, K. L.; WOOD, A.; GORDON, W. L.; ROBINETTE, D. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from blue crab. *Dev. Comp. Immunol.* **2011**, *35*, 409–415.
100. SMITH, V. J.; DESBOIS, A. P.; DYRYNDA, E. A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1213–1262.
101. JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, S. Y.; KIM, Y.-A.; ANDRÉ, T.; SÖDERHÄLL, I. Antimicrobial peptides in haemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31*, 441–455.
102. HERBINIERE, J.; BRAQUART-VARNIER, C.; GREVE, P.; STRUB, J. M.; FRERE, J.; VAN DORSSELAER, A. Armadillidin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide directed against Gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare*. *Dev. Comp. Immunol.* **2005**, *29*, 489–499.
103. BATTISON, A. L.; SUMMERFIELD, R.; PATRZYKAT, A. Isolation and characterization of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2008**, 181–187.

104. TOSSI, A.; SANDRI, L. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 743–761
105. PISUTTHARACHAI, D.; YASUIKE, M.; AONO, H.; YANO, Y.; MURAKAMI, K.; KONDO, H. Characterization of two isoforms of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* defensin cDNA. *Dev. Comp. Immunol.* **2009**, *33*, 434–438.
106. MONTERO-ALEJO, V.; ACOSTA-ALBA, J.; PERDOMO-MORALES, R.; PERERA, E.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, E. W.; ESTRADA, M. P.; PORTO-VERDECIA, M. Defensin like peptide from *Panulirus argus* relates structurally with beta defensin from vertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* **2012**, *33*, 872–879.
107. GROSS, P. S.; BARLETT, T. C.; BROWDY, C. L.; CHAPMAN, R. W.; WARR, G. W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopankreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* **2001**, *25*, 565–577.
108. SOMBOONWIWAT, K.; MARCOS, M.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; AUMELAS, A.; ROMESTAD, B.; GUEGUEN, Y.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **2005**, *29*, 841–851.
109. YANG, Y.; PONCET, J.; GARNIER, J.; ZATYLNÝ, C.; BACHÈRE, E.; AUMELAS, A. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 36859–36867.
110. DESTOUMIEUX, D.; MUNOZ, M.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1260–1271.
111. DESTOUMIEUX, D.; MUNOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell. Sci.* **2000**, *113*, 461–469.
112. SMITH, V., J.; FERNANDES, J. M. O.; KEMP, G. D.; HAUTON, C. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, *32*, 758–772.
113. RANGANATHAN, S.; SIMPSON, K. J.; SHAW, D. C.; NICHOLAS, K. R. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J. Mol. Graph.* **1999**, *17*, 106–113, 134–136.
114. BARLETT, T. C.; CUTHBERSON, B. J.; SHEPARD, E. F.; CHAPMAN, R. W.; GROSS, P. S.; WARR, G. W. Crustins, homologues of an 11.5-kDA antibacterial peptide, from two

- species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 2002, 4, 278–293.
115. DU, Z. Q.; LI, X. C.; WANG, Y. H.; ZHAO, X. F.; WANG, X. J. A single WAP domain (SWD) containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* **2010**, 28, 134–142.
116. ZHAO, X. F.; WANG, J. X. The antimicrobial peptides of immune response of shrimp. *Invertebrate Surviv. J.* 2008, 5, 162–179.
117. SPERSTAD, S. V.; HAUG, T.; VASSKOG, T.; STENSVAG, K. Hyastatin, glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Mol. Immunol.* **2009**, 46, 2604–2612.
118. STENSVÅG, K.; HAUG, T.; SPERSTAD, S. V.; REKDAL, Ø.; INDREVOLL, B.; STYRVOLD, O. B. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev. Comp. Immunol.* **2008**, 32, 275–285.
119. PAULSEN, V. S.; BLENCHE, H.-M.; BENINCASA, M.; HAUG, T.; EKSTEEN, J. J.; STYRVOLD, O. B.; SCOCCHI, M.; STENSVÅG, K. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1 – and mode of action studies of N-terminal, proline-rich region. *PLoS One* 2013, 8, e53326. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0053326&representation=PDF>.
120. IMJONGJIRAK, C.; AMPARYUP, P.; TASSANAKAJON, A. Two novel antimicrobial peptides, arasin-like *Sp* and *GRPSp*, from the mud crab *Scylla paramamosian*, exhibit the activity against some crustaceans pathogenic bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 2011, 30, 706–712.
121. PATAT, S. A.; CARNEGIE, R. B.; KINGSBURY, C.; GROSS, P. S.; CHAPMAN, R.; SCHEY, K. L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 4825–4833.
122. NG, T. H.; Chang, S.-H.; Wu, M.-S.; Wang, H.-C. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **2013**, 41, 644–651.
123. AROCKIARAJ, J.; GNANAM, A. J.; KUMARESAN, V.; PALANISAMY, R.; BHATT, P.; THIRUMALAI, M. K.; ROY, A.; PASUPULETI, M.; KASI, M. An unconventional antimicrobial protein histone from fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Analysis of immune properties. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, 35, 1511–1522.
124. RAJANBABU, V.; CHEN, J.-Y. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* **2011**, 32, 415–420.
125. CHEN, J.-Y.; LIN, W.-J.; WU, J.-L.; HER, G. M.; HUI, C.-F. Epinecidin-1 peptide induces apoptosis which enhances antitumor effects in human leukemia U937 cells. *Peptides* **2009**, 30, 2365–2373.

126. GANZ, T.; NEMETH, E. Hecpudin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1823, 1434–1443.
127. HUANG, P.-H.; CHEN, J.-Y.; KUO, CH.-M. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: Analysis of their expressions and biological functions. *Mol. Immunol.* **2007**, 44, 1922–1934.
128. WANG, Y.-D.; KUNG, C.-W.; CHEN, J.-Y. Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1–5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides* **2010**, 31, 1026–1033.
129. HIRONO, I.; HWANG, J.-Y.; ONO, Y.; KUROBE T.; OHIRA, Y.; NOZAKI, R.; AOKI, T. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS J.* **2005**, 272, 5257–5264.
130. FERNANDES, J. M. O.; KEMP, G. D.; MOLLE, G. M.; SMITH V. J. Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. J.* **2002**, 368, 611–620.
131. FERNANDES, J. M. O.; MOLLE, G. M.; KEMP, G. D.; SMITH V. J. Isolation and characterization of oncorhyncin II, a histone H-1 derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* **2004**, 28, 127–138.
132. FERNANDES, J. M. O.; SMITH V. J. A novel antimicrobial function for ribosomal peptide from rainbow trout skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 296, 167–171.
133. YOSHIDA, K.; MUKAI, Y.; T. NIIDOME, C.; TAKASHI, Y.; TOKUNAGA, T.; HATAKEYAMA, T.; AOYAGI, H. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *J. Peptide. Res.* **2001**, 57, 119–126.
134. GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, STANLEY J. Two dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23 residue magainin antibiotic peptide is an helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol solution. *J. Biomol. NMR* **1997**, 2, 127–135.
135. CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. CH. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1788, 1564–1569.
136. CHEN, T. B.; LI, L.; ZHOU, M.; RAO, P. F.; WALKER, B.; SHAW, C. Amphibian skin peptides and their corresponding cDNAs from single lyophilized secretion sample: Identification of novel brevinins from three species of Chinese frogs. *Peptides* **2006**, 27, 42–48.
137. CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2011**, 68, 2303–2315.
138. TORRES, A. M.; WONG, H. Y.; GESAI, M.; MOOCHHALA S.; KUCHEL, P. W. KINI, R. M. Identification of a novel family of proteins in snake venoms: purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 40097–40104.

139. NAIR, D. G.; FRY, B. G.; ALLENWOOD, P.; KUMAR, PRAKASH P.; KINI, R. M. Antimicrobial activity of omwaprin, new member of the wamprin family of snake venom proteins. *Biochem. J.* **2007**, 402, 93–104.
140. WANG, Y.; HONG, J.; LIU, X.; YANG, H.; LIU, R.; WU, J.; WANG, A.; LIN, D.; LAI, R. Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS One* **2008**, 9, e3217. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003217&representation=PDF>
141. DALLA VALLE, L.; BENATO, F.; MAISRO, S.; QUINZANI, S.; ALIBARDI, L. Bioinformatics and molecular characterization of beta-defensin-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, 36, 222–229.
142. ALIBARDI, L.; CELEGHIN, A.; DALLA VALLE, L. Wounding in lizard results in release of beta-defensins at the wound site and formation of an antimicrobial barrier. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, 36, 557–565.
143. HIGGS, R.; LYNN, D. J.; GAINES, S.; McMAHON, J.; TIERNEY, J.; JAMES, T.; LLOYD, A. T.; MULCAHY, G.; O'FARRELY, C. The synthetic form of novel chicken  $\beta$ -defensins identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. *Immunogenetics* **2005**, 57, 90–98.
144. LYNN, D. J.; HIGGS, R.; LLOYD, A. T.; O'FARRELY, C.; HERVÉ-GRÉPINET, V.; NYS, Y.; BRINKMAN, F. S.; YU, P.-L.; SOULIER, A.; KAISER, P.; ZHANG, G.; LEHRER, R. I. Avian beta-defensins nomenclature: A community proposed update. *Immunol. Lett.* **2007**, 15, 86–89.
145. VAN DIJK, A.; VELDHUIZEN, E. J. A.; HAAGSMAN, H. P. Avian defensins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2008**, 124, 1–18.
146. GONG, D.; WILSON, P. W.; BAIN, M. M.; McDADE, K.; KALINA, J.; HERVÉ-GRÉPINET, V.; NYS, Y.; DUNN, I. C. Gallin: An antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication. *BMC Immunology* 2010, 11. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/11/12>
147. VAN DIJK, A.; MOLHOEK, E. M.; BIKKER, F. J.; YU, P.-L.; VELDHUIZEN, E. J. A., HAAGSMAN, H. P. Avian cathelicidins: Paradigm for the development of anti-infectives. *Vet. Microbiol.* **2011**, 153, 27–36.
148. GOITSUKA, R.; CHEN, C. H.; BENYON, L.; ASANO, Y.; KITAMURA, D.; COOPER, M. D. Chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104, 15063–15068.

149. VELDHUIZEN, E. J. A.; BROUWER, E. C.; SCHEIDER, V. A. F.; FLUIT., A. C. Chicken cathelicidins display antimicrobial activity against multiresistant bacteria without inducing strong resistance. *PLoS One* **2013**, *8*, e61946. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0061964&representation=PDF>
150. MICHAILIDIS, G. Expression of chicken LEAP-2 in the reproductive organs and embryos and in response to *Salmonella enterica* infection. *Vet. Res. Commun.* **2010**, *34*, 459–471.
151. TOWNES, C. L.; MICHAILIDIS, G.; HALL, J. The interaction of the antimicrobial peptide cLEAP-2 and the bacterial membrane. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387*, 500–503.
152. KOŚCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; JARCZAK, J.; STRZALKOWSKA, N.; JÓŹWIK, A.; HORBAŃCZUK, J.; KRZYZEWSKI, J.; ZWIERZCHOWSKI, L.; BAGNICKA, E. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 10957–10970
153. ZANETTI, M.; GENNARO, R.; ROMEO, D. Cathelicidins: A novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **1995**, *374*, 1–5.
154. ZANETTI, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukocyt. Biol.* **2004**, *75*, 39–48.
155. BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins: A family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 711–720.
156. BUCKI, R.; LESZCZYŃSKA, K.; NAMIOT, A.; SOKOLOWSKI, W. Cathelicidin LL-37: A multitask antimicrobial peptide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2010**, *58*, 15–25.
157. GANZ, T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 710–720.
158. LISITSYN, N. A.; BUKUROVA, Y. A.; NIKITINA, I. G.; KRASNOV, G. S.; SYKULEV, Y.; BERESTEN, S. F. Enteric alpha defensins in norm and pathology. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2012**, *11*, 1–6.  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268740/pdf/1476-0711-11-1.pdf>
159. MALLOW, E. B.; HARRIS, A.; SALZMAN, N.; RUSSEL, J. P.; DeBERARDINIS, R. J.; RUCHELLI, E.; BEVINS, CH. L. Human enteric defensins. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4038–4045.
160. LIU, L.; ROBERTS, A. A.; GANZ, T. By IL-1 signalling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 575–580.
161. SØRENSEN, O. E.; COWLAND, J. B.; THEILGAARD-MÖNCH, K.; LIU, L.; GANZ, T.; BORREGAARD, N. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides



- in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 5583–5589.
162. CHONG, K. T.; XIANG, L.; WANG, X.; JUN, E. J.; XI, L. F.; SCHWEINFURTH, J. M. High level expression of human epithelial  $\beta$ -defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Viol. J.* **2006**, *3*, 75. Dostupné z: <http://www.virologyj.com/content/3/1/75>
163. GALLO, S. A.; WANG, W.; RAWAT, S. S.; JUNG, G.; WARING, A. J.; COLE, A. J.; LU, H.; YAN, X.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J.; JIANG, S.; LEHRER, R. I.; BLUMENTHAL, R.  $\theta$ -Defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18787–18792.
164. KONOPKA, K.; DOROČKA-BOBKOWSKA, B.; GEBREMEDHIN, S.; DÜZGÜNEŞ N. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie van Leeuwenhoek* **2010**, *97*, 413–417.
165. TATI, S.; JANG, W. S.; LI, R.; KUMAR, R.; PURI, S.; EDGERTON, M. Histatin 5 resistance of *Candida glabrata* can be reversed by insertion of *Candida albicans* polyamine transporter-encoding genes *DUR3* and *DUR31*. *PLoS One* **2013**, *8*, e61480. Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0061480&representation=PDF>
166. ANDRÈS, E.; DIMARQ, J. L. Cationic antimicrobial peptides: Update of clinical development. *Int J. Intern. Med.* **2004**, *255*, 519–520.
167. ANDRÈS, E.; DIMARQ, J. L. Clinical development of antimicrobial peptides. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 448–452.
168. FOX, J. L. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature Biotechnol.* **2013**, *31*, 379–383.