KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 66 2017
Numer 4 (317)
Strony 563–574

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

AGNIESZKA ZDYBICKA-BARABAS, SYLWIA STĄCZEK, MAŁGORZATA CYTRYŃSKA

Zakład Immunobiologii
Instytut Biologii i Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: barabas@poczta.umcs.lublin.pl

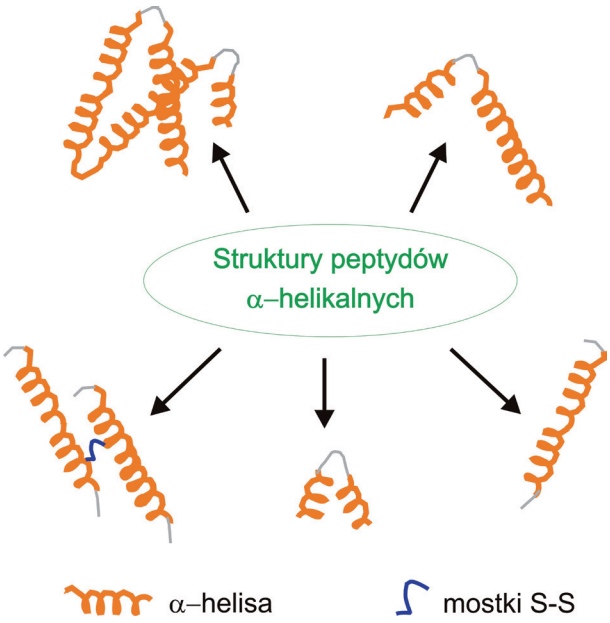
RÓŻNORODNOŚĆ PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH BEZKRĘGOWCÓW

WPROWADZENIE

Wszystkie żywe organizmy, niezależnie od środowiska, w którym żyją, narażone są na kontakt z wieloma drobnoustrojami. Z tego względu muszą dysponować mechanizmami pozwalającymi kontrolować, czy też zwalczać zagrażające im patogeny. Za eliminację patogenów i kontrolę mikroflory symbiotycznej u organizmów wielokomórkowych odpowiada układ odpornościowy, który u zwierząt bezkręgowych działa w oparciu o mechanizmy odporności wrodzonej, podczas gdy kręgowce dysponują ponadto mechanizmami odporności nabytej. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides, AMPs) są kluczowymi efektorami odporności wrodzonej. Wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciwpierwotniacze, a często przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Wiele z nich zaangażowanych jest w neutralizację endotoksyn patogenów oraz ma właściwości immunomodulacyjne, i stąd znane są również jako peptydy odpornościowe (ang. defense peptides, host defense peptides). Należy zaznaczyć, że peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wytwarzane są zarówno przez jednokomórkowe Prokaryota, jak i jednokomórkowe i wielokomórkowe Eukaryota. U organizmów jednokomórkowych ich rolą jest najczęściej ograniczanie wzrostu lub zwalczanie mikroorganizmów innych gatunków konkurujących o składniki odżywcze w tej samej niszy.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (PP) to relatywnie niewielkie cząsteczki (3-10 kDa) o właściwościach amfipatycznych. Większość opisanych PP ma charakter kationowy, warunkowany dużą zawartością reszt lizyny i argininy, choć znane są również anionowe peptydy odpornościowe. Biorąc pod uwagę sekwencję aminokwasów oraz strukturę przestrzenną cząsteczki, PP można sklasyfikować w trzech grupach: (i) peptydy liniowe, bez reszt cysteiny, (ii) peptydy o strukturze stabilizowanej przez mostki dwusiarczkowe, (iii) peptydy o dużej zawartości jednego z aminokwasów, zazwyczaj proliny, glicyny, histydyny lub tryptofanu. Przykłady peptydów liniowych, które przyjmują strukturę α-helisy przedstawia Ryc. 1. W zależności od liczby reszt cysteiny w cząsteczce, zaangażowanych w formowanie mostków dwusiarczkowych, wśród peptydów grupy (ii) można wyróżnić peptydy stabilizowane jednym, dwoma, trzema lub czterema mostkami dwusiarczkowymi. Najprostsze z tych peptydów przyjmują strukturę „szpilki do włosów" (ang. β-hairpin), a inne zawierają zarówno strukturę β-kartki, jak i α-helisy (Ryc. 2). Głównym miejscem działania PP jest błona komórkowa drobnoustrojów. W zależności od struktury peptydu oraz charakteru (składu) błony, oddziaływanie cząsteczek peptydów z błoną może prowadzić do utworzenia w niej kanałów czy agregatów, a nawet do jej destrukcji. W konsekwencji dochodzi do naruszenia prawidłowej struktury błony, zmian przepuszczalności i śmierci patogena. Cząsteczki peptydów mogą też przedostawać się do wnętrza komórki, gdzie poprzez oddziaływanie z kwasami nukleinowymi,

Słowa kluczowe: bezkręgowce, cekropiny, defensyny, odporność wrodzona, peptydy odpornościowe, peptydy przeciwdrobnoustrojowe

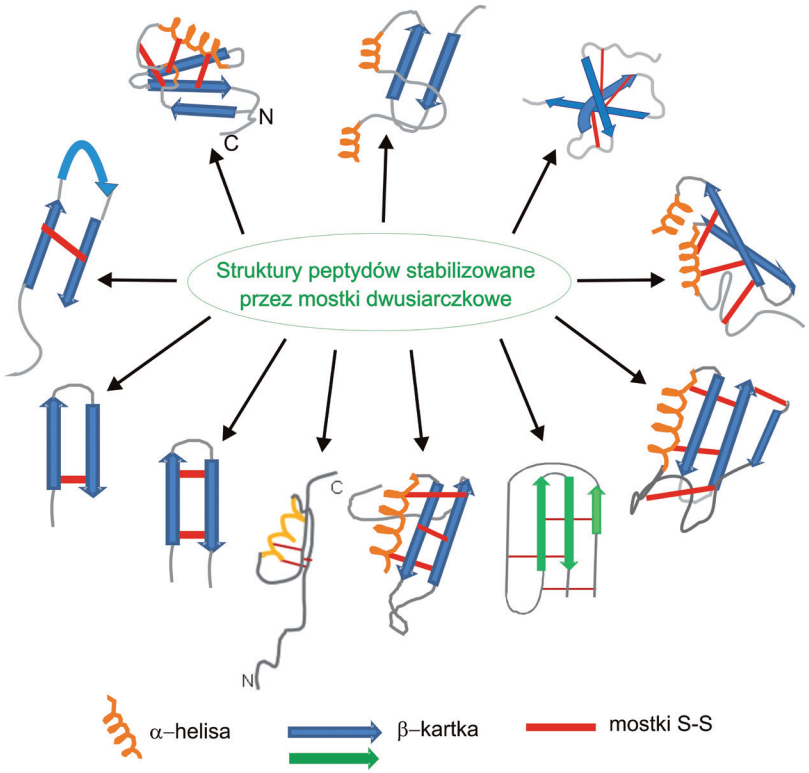


Ryc. 1. Organizacja przestrzenna cząsteczek peptydów liniowych zawierających strukturę α-helisy.

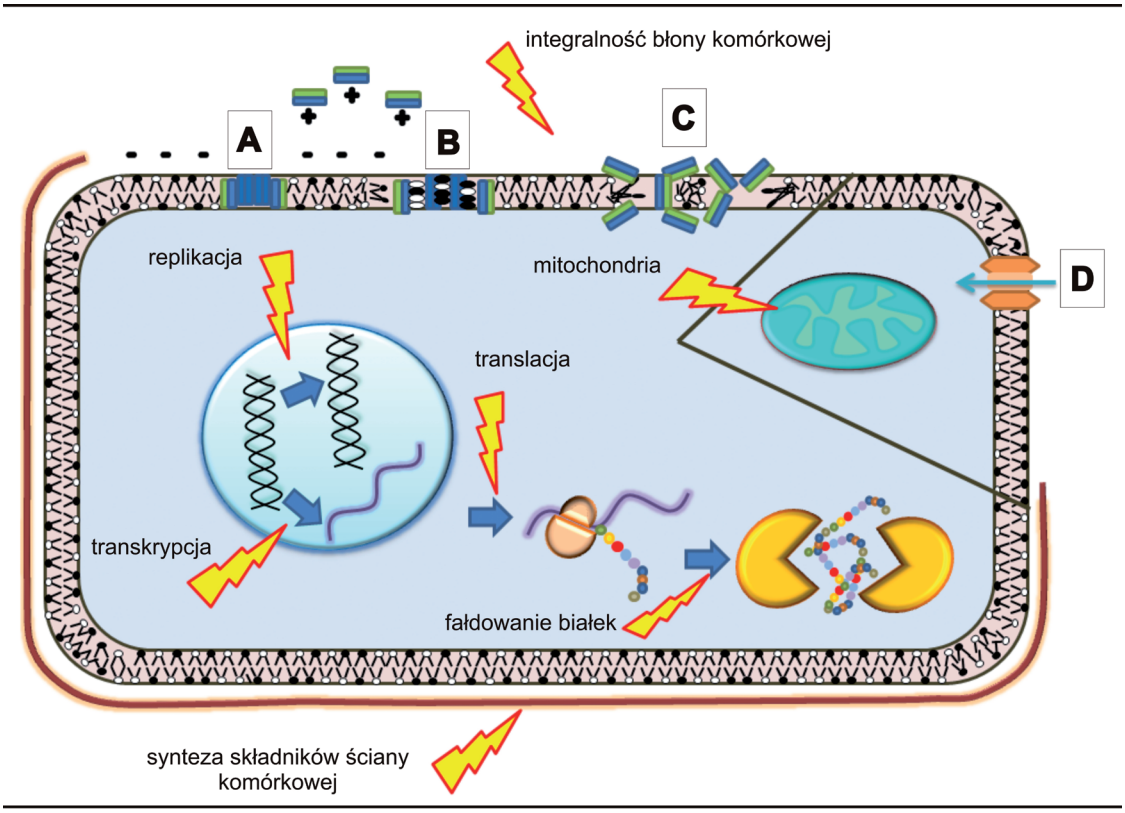
Strukturę α-helisy oraz mostki dwusiarczkowe zaznaczono, odpowiednio, kolorem pomarańczowym i niebieskim.

składnikami aparatu translacyjnego, białkami opiekuńczymi, a w przypadku patogenów eukariotycznych również z błonami mitochondriów, zaburzają prawidłowy przebieg podstawowych procesów życiowych, czego efektem jest śmierć komórki drobnoustroju (Ryc. 3). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów determinowana jest przede wszystkim obecnością domen amfipatycznych w cząsteczce, które umożliwiają oddziaływania hydrofobowe z błonami fosfolipidowymi. Charakter kationowy większości peptydów dodatkowo warunkuje silne oddziaływanie elektrostatyczne z powierzchnią oraz błoną komórki drobnoustroju, które w odróżnieniu od komórki gospodarza, są naładowane ujemnie. Dzięki temu PP cechuje selektywna toksyczność, czyli silne działanie na komórki drobnoustrojów, przy braku działania na komórki gospodarza w tym samym stężeniu (CYTRYŃSKA i ZDYBICKA-BARABAS 2015).

Bogactwo naturalnie występujących peptydów odpornościowych odzwierciedla baza danych dedykowana tego typu cząsteczkom (Antimicrobial Peptide Database, APD; aps.unmc.edu/AP/main.php; WANG i współaut. 2016). Baza ta aktualnie zawiera dane dotyczące 2849 peptydów przeciwdrobnoustrojowych różnego pochodzenia, z których 2134



Ryc. 2. Zróżnicowanie struktury przestrzennej cząsteczek peptydów przeciwdrobnoustrojowych stabilizowanych przez mostki dwusiarczkowe. Schematycznie przedstawiono przykłady organizacji przestrzennej peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. Zaznaczono strukturę α-helisy (pomarańczowy), β-kartki (niebieski), motyw ICK (inhibitor cystine knot; zielone strzałki) oraz mostki dwusiarczkowe (czerwony).



Ryc. 3. Mechanizmy działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Cząsteczki peptydów kationowych (+) oddziałują z ujemnie naładowaną (-) błoną komórkową bakterii dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym oraz hydrofobowym, efektem czego może być utworzenie w błonie kanałów typu „klepek beczki" (ang. barrel stave) (A), kanałów toroidalnych (B) lub destrukcja błony zgodnie z modelem dywanowym (C). Niekiedy peptydy ulegają translokacji do wnętrza komórki drobnoustroju przy udziale odpowiednich transporterów (D). Wewnątrz komórki peptydy mogą zaburzać kluczowe procesy: replikację, transkrypcję, translację, fałdowanie białek oraz syntezę składników ściany komórkowej. U drobnoustrojów eukariotycznych (wydzielony fragment komórki zawierający mitochondrium) mogą także uniemożliwiać prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, prowadząc do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu i spadku wewnątrzkomórkowego poziomu ATP i NADH.

opisano u zwierząt. Wśród peptydów zwierzęcych, ponad 570 cząsteczek to peptydy odpornościowe scharakteryzowane u bezkręgowców. Najwięcej spośród nich, 495, opisano u stawonogów (w tym 280 owadzich, 150 szczękoczułkowców, 52 skorupiaków) (dane z dnia 27 kwietnia 2017).

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą być kodowane przez niezależne geny, ale mogą też powstawać w wyniku ograniczonej proteolizy białek pełniących inne funkcje. Wiele PP syntetyzowanych jest w postaci cząsteczek prekursorowych. W przypadku zwierząt bezkręgowych synteza peptydów może zachodzić konstytutywnie i/lub być indukowana w odpowiedzi na zakażenie czy zranienie. Za lokalną syntezę PP odpowiadają komórki nabłonkowe, co zabezpiecza jamę ciała przed wtargnięciem drobnoustrojów, szczególnie w przypadku uszkodzenia ciągłości warstwy nabłonka. Źródłem PP są ponadto komórki płynów ustrojowych (hemocyty, celomocyty), w których peptydy są wytwarzane i przechowywane. Systemowa (uogólniona) odpowiedź na infekcję wymaga wzmożonej syntezy PP, która zachodzi m.in. w ciele tłuszczowym u owadów. Zsyntetyzowane cząsteczki peptydów wydzielane są z hemocytów i komórek ciała tłuszczowego do hemolimfy, gdzie pełnią swoje funkcje. U wielu bezkręgowców, m.in. przedstawicieli owadów, pająków czy skorpionów, PP stanowią istotne składniki jadów, w których odgrywają zazwyczaj podwójną rolę: przeciwdrobnoustrojową i paraliżującą ofiarę.

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE PARZYDEŁKOWCÓW (CNIDARIA)

Parzydełkowce reprezentują jedną z najwcześniejszych linii filogenetycznych zwierząt i stanowią siostrzany takson dla zwierząt dwubocznie symetrycznych (Bilateralia). Wśród nich, słodkowodne stułbie (*Hydra*) są wykorzystywane jako organizmy modelowe

w badaniach ewolucji odporności wrodzonej i oddziaływań patogen-gospodarz. U stułbi opisano trzy rodziny PP: hydramacyny, perikuliny i armininy. Hydramacyna-1 (ang. hydramacin-1) (m.cz. 7 kDa) oraz perikulina-1 (ang. periculin-1) (m.cz. 8,3 kDa) zawierają po 8 reszt cysteiny w cząsteczce, które potencjalnie mogą tworzyć mostki dwusiarczkowe. W części N-końcowej cząsteczki hydramacyny-1 wyróżnić można dwie krótkie α-helisy połączone długą elastyczną pętlą, natomiast część C-końcowa zawiera strukturę β-kartki utworzoną przez dwa antyrównoległe pasma. Peptyd ten działa jak „klej", powodując zlepianie komórek bakterii, które giną wykazując typowe cechy programowanej śmierci. Hydramacyna-1 ma m.in. silną aktywność wobec szczepów *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* i *K. pneumoniae* zdolnych do wytwarzania rozszerzonego spektrum β-laktamaz. W odróżnieniu od hydramacyny i perikulin, armininy (ang. arminins) nie zawierają reszt cysteiny. Arminina-1a jest aktywna wobec szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę oraz *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* opornych na wankomycynę. Uważa się, że rolą PP u stułbi jest przede wszystkim kontrolowanie zróżnicowania mikroflory stale związanej z danym gatunkiem gospodarza.

W mezogleju meduzy *Aurelia aurita* zidentyfikowano unikatowy 40-sto aminokwasowy peptyd nazwany aureliną (ang. aurelin) o aktywności przeciwbakteryjnej. Dojrzała cząsteczka aureliny zawiera 6 reszt cysteiny i wykazuje częściowe podobieństwo do defensyn. Innym peptydem, którego struktura stabilizowana jest trzema mostkami dwusiarczkowymi jest damikornina (ang. damicornin), wytwarzana przez koralowca *Pocillopora damicornis*. Ten 40-sto aminokwasowy, amidowany na C-końcu peptyd, wykazuje aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i grzybów strzępkowych *Fusarium oxysporum* (AUGUSTIN i BOSCH 2010, OTERO-GONZALEZ i współaut. 2010, BOSCH 2014, FALANGA i współaut. 2016).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE NICIENI (NEMATODA)

U nicieni zidentyfikowano co najmniej dwa rodzaje PP: peptydy α-helikalne (cekropiny) oraz peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami dwusiarczkowymi (defensyny). Cekropina P1 (ang. cecropin) glisty świńskiej *Ascaris suum* została opisana w 1989 r. jako peptyd wytwarzany przez jelito świni i mylnie zaliczona do peptydów przeciwdrobnoustrojowych ssaków. Obecnie wiadomo, że u *A. suum* pod wpływem zakażenia bakteryjnego dochodzi do indukcji syntezy prekursorów czterech cekropin P1-P4, z których powstają dojrzałe peptydy o długości 31 reszt aminokwasowych. Cekropiny *A. suum* wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Są aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*), bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Serratia marcescens*), a także drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*). Peptydy podobne do cekropiny P1 wykryto również u innych przedstawicieli nicieni: *Ascaris lumbricoides* i *Toxocara canis* (PILLAI i współaut. 2005).

Dobrze scharakteryzowanymi PP nicieni są defensyny, określane jako ASABFs, po raz pierwszy opisane u *A. suum* (ang. *Ascaris suum* antibacterial factors). Cząsteczki tych peptydów (z wyjątkiem jednego) zawierają 8 konserwatywnych reszt cysteiny tworzących cztery mostki dwusiarczkowe i są one strukturalnie bardzo podobne do defensyn mięczaków. Obecność czwartego mostka dwusiarczkowego prawdopodobnie warunkuje zwiększoną stabilność w środowisku o podwyższonej osmolarności. Peptydy te wykazują zdolność tworzenia porów w błonach, z czym związana jest ich wysoka aktywność, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich, oraz niższa wobec bakterii Gram-ujemnych i drożdży. Warto zaznaczyć, że defensynę podobną do ASABF opisano też u gąbki *Suberites domuncula* (TASSANAKAJON i współaut. 2015).

Nicień *Caenorhabditis elegans*, organizm modelowy szeroko wykorzystywany w badaniach naukowych, narażony jest na różne infekcje naskórka i jelita. Za zakażenia jelitowe odpowiedzialne są najczęściej spożywane bakterie, m.in. *S. marcescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Niektóre patogeny, np. *S. typhimurium*, *E. faecalis*, mogą stabilnie kolonizować jelito *C. elegans* i prowadzić do śmierci gospodarza. Wykazano, że u zainfekowanych osobników *C. elegans* aktywowane są reakcje odpowiedzi immunologicznej prowadzące m.in. do syntezy i uwalniania PP nazwanych cenoporami (ang. caenopores) oraz czynników przeciwbakteryjnych określanych jako ABF (ang. antibacterial factor). Charakterystyczną cechą cenoporów jest obecność w cząsteczce wiązki α-helis, stabilizowanej przez trzy unikatowe mostki dwusiarczkowe. Cenopory wykazują strukturalne i funkcjonalne podobieństwo do amebaporów (ang. amoebapores), membranolitycznych peptydów pierwotniaków, opisanych m.in. u *Entamoeba histolytica*. Cenopory ulegają ekspresji w jelicie, a ich aktywność bakteriobójcza opiera się na tworzeniu kanałów w błonie bakteryjnej, czego efektem są zmia-

ny przepuszczalności. Czynniki ABF są homologiczne do ASABFs, bogatych w cysteinę peptydów przeciwbakteryjnych *A. suum*. U *C. elegans* zidentyfikowano sześć peptydów ABF, których ekspresja lokalizuje się głównie w jelicie (KONG i współaut. 2016). Warto zaznaczyć, że u nicienia *C. remanei* zidentyfikowano rodzinę 15 genów dla przeciwgrzybowych peptydów podobnych do owadziej drosomycyny, nazwanych cremycynami (ang. cremycins). Peptydy te cechuje wysoki stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej i identyczna organizacja prekursora jak u drosomycyn. Cremycyna 5 wykazuje wysoką aktywność wobec *Aspergillus nidulans*, *Geotrichum candidum*, *Neurospora crassa* oraz *C. albicans* i *Candida tropicalis* (ZHU i GAO 2014).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE PIERŚCIENIC (ANNELIDA)

U przedstawicieli pierścienic opisano PP reprezentujące wszystkie trzy grupy peptydów. Przykładem peptydu α-helikalnego jest hedistyna (ang. hedistin) wyizolowana z celomocytów morskiego wieloszczeta *Nereis diversicolor*. Cząsteczka dojrzałego peptydu zbudowana jest z 22 reszt aminokwasowych, jest amidowana na C-końcu oraz zawiera bromotryptofan. Hedistyna jest aktywna wobec szerokiego spektrum bakterii, m.in. z rodzaju *Staphylococcus*. Z organizmu *Perinereis aibuhitensis* oczyszczono 51-aminokwasowy peptyd o bardzo ciekawej strukturze, nazwany perineryną (ang. perinerin). Cząsteczka perineryny zawiera trzy amfipatyczne α-helikalne regiony oraz 4 reszty cysteiny, które mogą tworzyć dwa mostki dwusiarczkowe. Z kolei z celomocytów innego morskiego wieloszczeta, *Arenicola marina*, wyizolowano dwa 21-aminokwasowe peptydy o strukturze typowej szpilki do włosów, stabilizowanej pojedynczym mostkiem dwusiarczkowym. Peptydy te są wysoce aktywne wobec *P. aeruginosa* i *S. aureus*. U dżdżownic *Lumbricus rubellus*, *Pheretima tschiliensis* i *P. guillelmi* opisano PP bogate w reszty proliny, nazywane lumbrycynami (ang. lumbricin). Reszty proliny w cząsteczkach tych peptydów stanowią ok. 15% (OTERO-GONZALEZ i współaut. 2010, LI i współaut. 2011). Dwa peptydy przeciwdrobnoustrojowe o unikatowej strukturze, teromacynę (ang. theromacin) i teromyzynę (ang. theromyzin), scharakteryzowano u pijawek *Theromyzon tessulatum*. Kationowa teromacyna w 75-cio aminokwasowej sekwencji zawiera 10 reszt cysteiny potencjalnie tworzących mostki dwusiarczkowe. Teromyzyna (86 reszt aminokwasów) jest anionowym peptydem liniowym zawierającym region bogaty w reszty histydyny na N-końcu cząsteczki. Oba peptydy syntetyzowane są głównie w dużych komórkach tłuszczowych, a wzrost ekspresji genów kodujących te peptydy notowano po spożyciu pokarmu i w odpowiedzi na zakażenie bakteriami (TASIEMSKI i współaut. 2004).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE STAWONOGÓW (ARTHROPODA)

PP OWADÓW (INSECTA)

Pierwszym opisanym owadzim peptydem przeciwdrobnoustrojowym była cekropina (ang. cecropin). Została wyizolowana w 1980 r. z hemolimfy immunizowanych poczwarek *Hyalophora cecropia*. Do tej pory cekropiny opisano u owadów należących do różnych rzędów, m.in. Coleoptera, Diptera, Lepidoptera. Cekropiny zawierają 31-42 reszty aminokwasów; noszą różne nazwy, np. sarkotoksyna-I (ang. sarcotoxin-I) z *Sarcophaga peregrina*, papiliocyna (ang. papiliocin) z *Papilio xuthus*, stomoksyna (ang. stomoxin) ze *Stomoxys calcitrans*, hinnawina (ang. hinnavin) z *Artogeia rapae*. Cekropiny wykazują szerokie spektrum działania bakterio- i grzybobójczego. Większość cekropin ma przyłączoną grupę amidową do końca karboksylowego, co zwiększa stabilność peptydu oraz ułatwia oddziaływanie z błonami fosfolipidowymi. Cząsteczki cekropin w środowisku hydrofobowym przyjmują strukturę α-helikalną. Cekropina A *H. cecropia* zbudowana jest z dwóch α-helis, z których jedną tworzą reszty aminokwasów 5-21, a drugą reszty 24-37, połączone regionem zawiasowym. Morycyny (ang. moricins), które jak dotąd zostały opisane jedynie u Lepidoptera, po raz pierwszy wyizolowano z hemolimfy immunizowanych gąsienic *Bombyx mori*. W odróżnieniu od cekropin, cząsteczka morycyny tworzy pojedynczą strukturę α-helisy, której amfipatyczny koniec aminowy i hydrofobowy koniec karboksylowy są kluczowe dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Morycyny wykazują aktywność bakteriobójczą, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich: *B. cereus, S. aureus, Streptococcus pyogenes*, ale również Gram-ujemnych *E. coli* (DAI i współaut. 2008, YI i współaut. 2014).

Defensyny (ang. defensins) są szczególną grupą peptydów odpornościowych, ponieważ występują u różnych organizmów bezkręgowych, kręgowców i roślin. W cząsteczkach defensyn stawonogów, podobnie do defensyn grzybów i roślin, występuje charakterystyczny motyw α-helisy i β-kartki stabilizowany cysteiną (ang. cysteine-stabilized αβ motif;

CSαβ). Cząsteczki defensyn stawonogów zawierają 6 reszt cystein, w odróżnieniu od mięczaków, u których może występować 6 lub 8 reszt cysteiny. W defensynach stawonogów mostki dwusiarczkowe tworzone są przez reszty cystein według wzoru C1-C4, C2-C5, C3-C6. U owadów defensyny stanowią bardzo dużą grupę peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Opisano je m.in. u przedstawicieli Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera i Odonata. Geny defensyn ulegają ekspresji głównie w ciele tłuszczowym owadów, ale u hematofagów (owady krwiopijne), np. *S. calcitrans* czy *Anopheles gambiae*, również w jelicie środkowym. Pierwsze owadzie defensyny: sapecynę (ang. sapecin) oraz defensyny A i B otrzymano, odpowiednio, z linii komórkowej *S. peregrina* (Diptera) oraz z hemolimfy immunizowanych larw *Phormia terranovae* (Diptera). Defensyny owadów zawierają 34-51 reszt aminokwasów (3-6 kDa). Liczba aminokwasów tworzących α-helisę i dwie β-kartki jest wysoce zachowana we wszystkich znanych owadzich defensynach, natomiast długość pętli na N-końcu jest zmienna. U starszych ewolucyjnie owadów takich, jak ważki (*Aeshna*), pętla defensyny jest krótsza w porównaniu do defensyn Coleoptera czy Hemiptera (DIMARCQ i współaut. 1998, OTVOS 2000). Defensyny A (3,8 kDa) i B (3,84 kDa) *Chironomus plumosus* (Diptera) mają strukturę przestrzenną podobną do defensyn *P. terranovae*, ale ich pętle N-końcowe są krótsze o 4 reszty aminokwasowe, co jest interesujące ze względu na fakt, że takie krótkie pętle cechują defensyny gatunków ewolucyjnie odległych od Diptera (ważki, skorpiony, małże) (LAUTH i współaut. 1998). Sekwencje owadzich defensyn u przedstawicieli tego samego rzędu wykazują wysoki stopień homologii, czego nie stwierdza się porównując peptydy między różnymi rzędami. Defensyny zmieniają przepuszczalność błony cytoplazmatycznej bakterii Gram-dodatnich tworząc w niej kanały, natomiast zazwyczaj nie wykazują aktywności wobec bakterii Gram--ujemnych (BULET i współaut. 2004, TORRES i KUCHEL 2004, GAO i ZHU 2014). Defensyna A *P. terranovae* tworzy oligomery w błonie bakteryjnej, co prowadzi do jej uszkodzenia, częściowej depolaryzacji, utraty jonów K^+ z komórki, spadku poziomu cytoplazmatycznego adenozynotrójfosforanu (ATP) i zahamowania procesów oddechowych (COCIANCICH i współaut. 1993a).

Pierwszą defensynę Lepidoptera, nazwaną galiomycyną (ang. galiomycin), oczyszczono z hemolimfy immunizowanych gąsienic *Galleria mellonella.* Galiomycyna zbudowana jest z 43 reszt aminokwasów (m.cz. 4,7 kDa). Działa na grzyby strzępkowe i drożdże, ale nie ma aktywności przeciwbakteryjnej. Druga defensyna *G. mellonella* - peptyd podobny do galiomycyny (ang. *Galleria* defensin-like peptide) - zawiera 44 reszty aminokwasów (m.cz. 4,9 kDa), a jej sekwencja w stosunku do galiomycyny różni się dwiema resztami aminokwasowymi. Te różnice mają istotne znaczenie, gdyż peptyd ten ma wyższą aktywność przeciwgrzybową oraz, dodatkowo, aktywność przeciwbakteryjną wobec niektórych bakterii Gram-dodatnich (LEE i współaut. 2004, CYTRYŃSKA i współaut. 2007).

Defensyny zidentyfikowano u 91 gatunków należących do 27 rodzajów mrówkowatych (Hymenoptera) z różnych kontynentów. Defensyna *Formica aquilonia* zawiera 40 reszt aminokwasów. Dodatnio naładowane reszty aminokwasów w pozycjach 60 i 73 (numeracja wg cząsteczki prekursora) są zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni cząsteczki, co odgrywa ważną rolę w aktywności peptydu. Reszta aminokwasowa w pozycji 60 znajduje się w N-końcowej pętli poprzedzającej konserwatywny dla defensyn motyw CSαβ. Poziom aktywności i specyficzność przeciwdrobnoustrojowa defensyn mrówek zależy właśnie od sekwencji tej pętli. Zmiany w tym regionie w cząsteczkach defensyn różnych mrówek są prawdopodobnie związane z adaptacją do patogenów pojawiających się w ich środowisku oraz interakcjami patogen-gospodarz (VILJAKAINEN i PAMILO 2008). Podobną zależność stwierdzono w cząsteczce przeciwgrzybowej termicyny (ang. termicin) termitów *Pseudocanthotermes spiniger* (DA SILVA i współaut. 2003).

Warto wspomnieć, że mleczko pszczele *Apis mellifera* zawiera rojalizynę (ang. royalisin) (51 reszt aminokwasów, m.cz. 5,5 kDa), peptyd o działaniu bakterio- i grzybobójczym. Rojalizyna jest typowym peptydem bogatym w cysteinę z 3 mostkami dwusiarczkowymi oraz unikatową amfipatyczną α-helisą i grupą amidową na C-końcu cząsteczki. Działanie przeciwdrobnoustrojowe rojalizyny odgrywa ważną rolę, ponieważ mleczko pszczele, wydzielane przez gruczoły gardzielowe, jest pokarmem, którym młode pszczoły karmicielki karmią larwy przez pierwsze trzy dni ich rozwoju oraz matkę pszczelą przez całe jej życie (BÍLIKOVA i współaut. 2015).

Omawiając peptydy zawierające w cząsteczce motyw CSαβ należy wspomnieć o peptydach wybitnie przeciwgrzybowych. Pierwszym opisanym indukowalnym peptydem przeciwgrzybowym owadów była drosomycyna (ang. drosomycin) *Drosophila melanogaster* (Diptera). Peptyd ten, zbudowany z 44 reszt aminokwasów, zawiera w cząsteczce 8 reszt cysteiny, które tworzą 4 mostki dwusiarczkowe. W strukturze przestrzennej wyróżnić można region α-helikalny i β-kartki.

Zarówno sekwencja, jak i struktura drosomocyny wykazują podobieństwo do przeciwgrzybowych defensyn roślinnych. Drosomycyna silnie hamuje wzrost grzybów strzępkowych i prowadzi do lizy komórek wrażliwych grzybów *Botrytis cinerea* i *Neurospora crassa* (FEHLBAUM i współaut. 1994, ZHANG i ZHU 2009). Peptydy przeciwgrzybowe podobne do drosomycyny opisano u przedstawicieli Lepidoptera, np. heliomycyna (ang. heliomycin) *Heliothis virescens*, gallerimycyna (ang. gallerimycin) *G. mellonella* (LAMBERTY i współaut. 1999, SCHUMANN i współaut. 2003). Warto zaznaczyć, że ekspresję mRNA peptydu homologicznego do drosomycyny, nazwanego defensyną podobną do drosomycyny (ang. drosomycin-like defensin, DLD), stwierdzono w ludzkiej skórze (SIMON i współaut. 2008).

Większość znanych peptydów bogatych w reszty proliny to peptydy owadzie, opisane u przedstawicieli rzędów Diptera (drosocyna i miecznikowiny), Hemiptera (pyrrokorycyna, metalnikowiny), Hymenoptera (apidecyny, abecyny, formecyny), Lepidoptera (lebocyny, heliocyny). Peptydy te zbudowane są z 15-39 reszt aminokwasowych, wśród których reszty proliny, zorganizowane w powtarzające się motywy Pro-Arg-Pro lub Arg-Pro, stanowią zazwyczaj 25-44%. Zawierają dwie domeny w cząsteczce: jedną wysoce konserwatywną, warunkującą aktywność przeciwdrobnoustrojową, oraz drugą, która jest bardziej zmienna i nadaje specyficzność. Peptydy krótkołańcuchowe (do 20 reszt aminokwasów) wykazują wyższą aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, podczas gdy długołańcuchowe (powyżej 20 reszt aminokwasów) wobec bakterii Gram-dodatnich i grzybów. Należy zaznaczyć, że wiele peptydów bogatych w prolinę działa wewnątrzkomórkowo, oddziałując m.in. ze składnikami aparatu translacyjnego i białkami opiekuńczymi w komórkach patogenów. Porównanie sekwencji aminokwasowej peptydów oraz struktury genów tych peptydów u bezkręgowców i kręgowców wskazuje na brak pokrewieństwa ewolucyjnego. Obecność podobnych motywów zawierających reszty proliny i argininy jest raczej wynikiem ewolucji konwergentnej, prowadzącej do podobnego mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowego. Znane są również owadzie PP bogate w reszty glicyny. Scharakteryzowano je u przedstawicieli rzędów Coleoptera (koleopterycyna, holotrycyna 2 i 3, tenecyna 3, akaloleptyna A), Diptera (dipterycyna, attacyny, sarkotoksyna II), Hemiptera (hemipterycyna), Hymenoptera (hymenoptecyny), Lepidoptera (attacyny, gloweryny). Większość PP bogatych w reszty glicyny wykazuje wysoką specyficzność wobec określonych bakterii Gram-ujemnych. Attacyna *H. cecropia* hamuje syntezę błony zewnętrznej *E. coli*, podczas gdy glowerynа *Manduca sexta* wiąże się do składników ściany komórkowej bakterii: kwasów lipotejchojowych, peptydoglikanu i lipopolisacharydu (SCOCCHI i współaut. 2011, MYLONAKIS i współaut. 2016).

PP PAJĘCZAKÓW (ARACHNIDA)

Kleszcze (Ixodida) są wektorami przenoszącymi chorobotwórcze bakterie z rodzaju *Borrelia,* pierwotniaki z rodzaju *Babesia* czy wirusy. Ze względu na to, że organizm kleszcza jest zarówno rezerwuarem, jak i nosicielem różnych patogenów, których źródłem może być spożywana krew ssaków czy ptaków, wyposażony jest w skuteczny system obronny. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe obecne są w gruczołach ślinowych i jelicie środkowym, skąd mogą być inokulowane do organizmu żywiciela podczas pobierania krwi, co zapobiega przeniesieniu drobnoustrojów do organizmu kleszcza. Wytwarzane są też w hemocytach, z których wydzielane są do hemolimfy i okolicznych tkanek. PP kleszczy reprezentują głównie grupę defensyn. Wykazują duże podobieństwo strukturalne do cząsteczek modulujących potencjał błonowy komórek, podobnie jak neurotoksyny skorpionów, safaratoksyna (ang. safaratoxin) węży czy γ-tioniny roślin. Defensyny kleszczy wywołują depolaryzację błony drobnoustrojów. Działają głównie na bakterie Gram-dodatnie (*B. cereus*, *E. faecalis*), niektóre są aktywne wobec bakterii Gram-ujemnych *E. coli,* drożdży *Pichia pastoris* i pierwotniaków. Defensyna *Haemaphysalis longiconis*, longicyna (ang. longicin), hamuje rozwój *Babesia equi* i *B. microti.* U kleszcza *Ixodes ricinus* scharakteryzowano aż 8 defensyn (TONK i współaut. 2014). W jelicie środkowym *I. persulcatus* zidentyfikowano persulkatusynę (ang. persulcatusin), peptyd zbudowany z 38 reszt aminokwasów, zawierający 6 reszt cysteiny tworzących 3 mostki dwusiarczkowe. Persulkatusyna wykazuje aktywność głównie przeciwko *S. aureus*, co prawdopodobnie zapobiega rozwojowi zakażenia w wyniku pobrania krwi zawierającej tę bakterię. Peptyd ten ma również silne właściwości immunomodulujące w stosunku do żywiciela, wywołując lokalny odczyn zapalny w skórze oraz hemolizę komórek krwi. Może to ułatwiać przedostawanie się patogenów, których rezerwuarem jest kleszcz. Peptydy o wysokim stopniu podobieństwa do persulkatusyny *I. persulcatus* zidentyfikowano u innych gatunków kleszczy: *I. ricinus*, *H. longicornis*, *O. moubata* (MIYOSHI i współaut. 2016).

Hemolimfa skorpionów, m.in. *Leiurus quinquestriatus* i *Androctonus australis*, zawiera również peptydy podobne do defensyn, wy-

stępujące w niej konstytutywnie. Pierwszą defensynę skorpiona wyizolowano z hemolimfy północno-afrykańskiego *L. quinquestriatus*. Peptyd ten zbudowany jest z 38 reszt aminokwasów (m.cz. 4,3 kDa), z charakterystycznymi 6 resztami cysteiny. Wykazuje dużą homologię do defensyn ważek (Odonata) i jest aktywny wobec bakterii Gram-dodatnich *M. luteus,* ale nie Gram-ujemnych *E. coli* (COCIANCICH i współaut. 1993b).

PP SKORUPIAKÓW (CRUSTACEA)

U skorupiaków najlepiej opisane zostały dwa rodzaje PP, peneidyny (ang. penaeidins) i krustyny (ang. crustins), których cząsteczki stabilizowane są mostkami dwusiarczkowymi. Peneidyny krewetek *Litopenaeus vannamei*, to zasadowe peptydy o m. cz. 5–7 kDa, zawierające dwie domeny: N-końcową bogatą w prolinę (ang. proline-rich domain, PRD) i C-terminalną bogatą w cysteinę (ang. cysteine-rich domain, CRD). Domena PRD ma strukturę nieuporządkowaną w przeciwieństwie do CRD, która jest wysoce uporządkowana i zawiera α-helisę stabilizowaną mostkami dwusiarczkowymi (CUTHBERTSON i współaut. 2008). Dla aktywności przeciwbakteryjnej peneidyn ważna jest amidacja C-końca cząsteczki; brak tej modyfikacji obniża dwukrotnie ich aktywność przeciwbakteryjną, natomiast nie ma wpływu na aktywność przeciwgrzybową. Peneidyny wykazują również zdolność wiązania z chityną (BACHÈRE i współaut. 2004, FREDRICK i RAVICHANDRAN 2012). Ze względu na dużą zawartość reszt proliny (15–30%) oraz obecność motywów Pro-Arg-Pro i Arg-Pro w N-końcowej części cząsteczki, peneidiny stanowią również szczególny przykład peptydów bogatych w prolinę. Podobną organizację cząsteczki, zawierającej w regionie N-końcowym domenę bogatą w motywy Pro-Arg-Pro, a w C-końcowym domenę stabilizowaną przez mostki dwusiarczkowe, opisano w arasynach (ang. arasins) kraba *Hyas araneus* i kallinektynie (ang. callinectin) kraba *Callinectes sapidus* (SCOCCHI i współaut. 2011, OTERO-GONZALEZ i współaut. 2010).

Krustyny to kationowe peptydy lub polipeptydy przeciwbakteryjne (m.cz. 7–14 kDa), powszechnie występujące u Decapoda. Krustyny ulegają ekspresji w hemocytach skorupiaków, z których wydzielane są na drodze egzocytozy, a u większości krewetek wytwarzane są konstytutywnie. Na C-końcu cząsteczki krustyny zawierają charakterystyczną domenę kwaśnego białka serwatki (ang. whey acidic protein domain, WAP) z 4 mostkami dwusiarczkowymi. Domena WAP zbudowana jest z 50 reszt aminokwasów, wśród których jest 8 reszt cysteiny w ściśle określonych pozycjach łańcucha. Pierwszą krustynę, nazwaną karcyniną (ang. carcinin), opisano u kraba brzegowego *Carcinus maenas*. Peptyd ten działa na bakterie Gram-dodatnie, ale nie Gram-ujemne (FREDRICK i RAVICHANDRAN 2012, SMITH i współaut. 2008).

Analiza sekwencji aminokwasowej krustyn krewetek wykazała obecność w cząsteczkach 12 reszt cysteiny, z których 8 zaangażowanych jest w tworzenie mostków dwusiarczkowych w domenie WAP. Położenie reszt cystein w domenie, a także reszty kwasu asparaginowego i lizyny, jest wysoce konserwatywne. Na podstawie różnic w organizacji domeny WAP, krustyny krewetek można podzielić na 3 typy (I–III). U krewetki tygrysiej *Penaeus monodon* krustyna typu II występuje w 5 izoformach o różnej sekwencji i długości. Peptyd ten ulega ekspresji głównie w hemocytach, ale również w skrzelach i jelicie. Co ciekawe, izoforma 5 występuje w epipoditach odnóży i oczach, a jej ekspresja jest indukowana przez szok cieplny i stres hiperosmotyczny. Wydaje się, że krustyny pośredniczą w odpowiedzi na różnego rodzaju warunki stresowe, ale też działają bezpośrednio w odpowiedzi immunologicznej, jako cząsteczki efektorowe o aktywności przeciwbakteryjnej (TASSANAKAJON i współaut. 2011).

PP STARORAKÓW (MEROSTOMATA)

Małe i duże granule hemocytów skrzypłoczy *Tachypleus tridentatus* i *Limulus polyphemus* zawierają szereg PP, których struktura stabilizowana jest mostkami dwusiarczkowymi. Należą do nich tachyplesyny (ang. tachyplesins), tachystatyny (ang. tachystatins), polifemusyny (ang. polyphemusins). Tachyplesyny i polifemusyny zawierają dwa mostki dwusiarczkowe w cząsteczkach, podczas gdy w strukturze tachystatyn wyróżnić można motyw węzła ICK (ang. inhibitor cystine knot), utrzymywany przez trzy mostki dwusiarczkowe. Peptydy te wykazują aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną, w tym wobec *Bonomia ostreae* i *Perkinsus marinus*, bakterii patogennych dla małży. Tachystatyny specyficznie wiążą się do chityny, co ma duże znaczenie dla ich aktywności przeciwgrzybowej (OTERO-GONZALEZ i współaut. 2010).

W hemocytach *T. tridentatus* zidentyfikowano również PP określane jako duże defensyny (ang. big defensins), które działają na bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne i grzyby. Cząsteczka dużej defensyny (79 reszt aminokwasów) przyjmuje strukturę, na którą składają się unikatowa, silnie hydrofobowa domena tworzona przez dwie krótkie α-helisy na N-końcu oraz zasadowa struktura 3 antyrównoległych β-kartek stabilizowanych przez 3 mostki dwusiarczkowe na

C-końcu. Peptyd o pełnej długości wykazuje zdolność do oddziaływania z lipopolisacharydem. W wyniku ograniczonej proteolizy cząsteczki dużej defensyny powstają dwa peptydy o różnych aktywnościach: N-końcowy działający na bakterie Gram-dodatnie i C-końcowy aktywny wobec bakterii Gram-ujemnych (TASSANAKAJON i współaut. 2015).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE MIĘCZAKÓW (MOLLUSCA)

PP opisane dotąd u przedstawicieli mięczaków reprezentują głównie peptydy stabilizowane mostkami dwusiarczkowymi typu defensyn. W zależności od liczby reszt cysteiny w cząsteczce, u mięczaków wyróżnić można dwa rodzaje defensyn: (i) zawierające 6 reszt cysteiny, co upodabnia je do defensyn stawonogów, (ii) zawierające 8 reszt cysteiny, podobne do ASABFs nicieni (TASSANAKAJON i współaut. 2015).

W skrzelach ostryżycy amerykańskiej *Crassostrea virginica* obecny jest 38-mio aminokwasowy peptyd zawierający 6 reszt cysteiny (m.cz. 4,26 kDa). Sekwencja tego peptydu jest podobna do defensyn małży *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* i stawonogów. Ma wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich (*Lactococcus lactis*, *S. aureus*), działa również na bakterie Gram-ujemne (*E. coli*, *Vibrio parahemolyticus*) (SEO i współaut. 2005).

Defensyny zawierające 8 reszt cysteiny zostały opisane u omułka *M. edulis*, *M. galloprovincialis* i ostrygi *Crassostrea gigas*. W cząsteczkach tych peptydów wyróżnić można motyw CSαβ stabilizowany czterema mostkami dwusiarczkowymi. Przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową defensynę, nazwaną mytiliną (ang. mytilin), wyizolowano z hemolimfy *M. edulis*. Cząsteczka peptydu zawiera 34 reszty aminokwasów, spośród których 8 to reszty cysteiny. W cząsteczce tej defensyny widoczna jest centralnie położona α-helisa, rozciągnięta pętla na N-końcu i antyrównoległe β-kartki na C-końcu (CHARLET i współaut. 1996; TASSANAKAJON i współaut. 2015).

U mięczaków, np. małża *Mercenaria mercenaria* i ostrygi *C. gigas*, opisano również tzw. duże defensyny. Peptydy te u ostryg zlokalizowano w hemocytach. Pierwszą dużą defensynę mięczaków scharakteryzowano u przegrzebka zatokowego *Argopecten irradians* (ang. *Ai* big defensin, *Ai*BD). *Ai*BD wykazuje homologię do dużych defensyn skrzypłocza *T. tridentatus* i lancetnika *Branchiostoma belcheri tsingtaunese*. Organizacja mostków dwusiarczkowych w *Ai*BD przypomina położenie mostków w dużych defensynach skrzypłoczy (C1-C5, C2-C4, C3-C6) oraz β-defensynach neutrofili wołowych, ale różni się zdecydowanie od położenia mostków dwusiarczkowych w defensynach bezkręgowców z motywem CSαβ (C1-C4, C2-C5, C3-C6) (ZHAO i współaut. 2007, PERRIGAULT i współaut. 2009, ROSA i współaut. 2011).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE SZKARŁUPNI (ECHINODERMATA)

Wszystkie znane gatunki szkarłupni to organizmy morskie, zasiedlające różne siedliska, od stref pływów do głębin morskich. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe szkarłupni są bardzo zróżnicowane; wśród nich można wyróżnić peptydy stabilizowane mostkami dwusiarczkowymi, peptydy α-helikalne, a także nietypowe peptydy dimeryczne oraz modyfikowane przez brominację. PP scharakteryzowano m.in. u jeżowców *Strongylocentrotus droebachiensis*, *S. purpuratus* i strzykwy *Holothuria tubulosa*. Pierwszymi w pełni zsekwencjonowanymi genami kodującymi PP u szkarłupni były geny dla strongilocyn (ang. strongylocins), ulegające ekspresji w celomocytach *S. droebachiensis*. Rodzina ta obejmuje dwie strongilocyny *S. droebachiensis* oraz dwa homologiczne do nich peptydy *S. purpuratus*. Struktura cząsteczek strongilocyn jest stabilizowana trzema mostkami dwusiarczkowymi. Peptydy te wykazują aktywność przeciwbakteryjną, m.in. wobec *Listonella anguillarum*, patogena ryb morskich. Centrocyny 1 i 2 (ang. centrocins) to wyjątkowe heterodimeryczne peptydy przeciwdrobnoustrojowe zidentyfikowane w celomocytach *S. droebachiensis*. W cząsteczce centrocyny (centrocyna 1-4,5 kDa, centrocyna 2-4,4 kDa) wyróżnić można łańcuch ciężki (30 reszt aminokwasów) i lekki (12 reszt aminokwasów), które połączone są pojedynczym mostkiem dwusiarczkowym. Aktywność przeciwbakteryjna warunkowana jest przez łańcuch ciężki, natomiast łańcuch lekki prawdopodobnie stabilizuje cząsteczkę i obniża podatność na degradację proteolityczną. Należy tu zaznaczyć, że strongilocyna 2 *S. droebachiensis* oraz obie centrocyny zawierają reszty bromotryptofanu, co zwiększa ich odporność na działanie enzymów proteolitycznych. Z kolei u *H. tubulosa* opisano holoturoidyny 1 i 2 (ang. holothuroidins), które najprawdopodobniej przyjmują strukturę amfipatycznej α-helisy. Warto zauważyć, że peptydy te hamują tworzenie biofilmu przez *S. aureus*, *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* (LI i współaut. 2015, FALANGA i współaut. 2016).

PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE OSŁONIC (TUNICATA)

U tych morskich bezkręgowców opisano peptydy α-helikalne bogate w określone aminokwasy, dimeryczne i brominowane. Żachwy (Ascidiacea), których przedstawicielem jest *Styela clava*, przechowują w hemocytach peptydy α-helikalne nazwane klawaninami (ang. clavanin). Jest to rodzina czterech, 23-aminokwasowych, amfipatycznych peptydów bogatych w glicynę i histydynę, z amidowanym końcem karboksylowym. Klawaniny A i D wykazują podobieństwo w wielkości, strukturze pierwszorzędowej oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej do magaininy, α-helikalnego peptydu afrykańskiej żaby *Xenopus laevis*. Działanie klawanin opiera się na oddziaływaniu z błonami oraz białkami błonowymi odpowiedzialnymi za utrzymywanie gradientu jonowego i jest zależne od pH (VAN KAN i współaut. 2002). Do arsenału peptydów α-helikalnych *S. clava* należy również klawaspiryna (ang. clavaspirin), 23-aminokwasowy peptyd bogaty w reszty histydyny. Innymi peptydami wyizolowanymi z tego gatunku żachw są styeliny (ang. styelin), 31-32 aminokwasowe α-helikalne peptydy bogate w fenyloalaninę, wykazujące działanie bakteriobójcze, m.in. wobec bakterii morskich *Psychrobacter immobilis* i *Planococcus citreus*. Sekwencja aminokwasowa styelin wykazuje podobieństwo do cekropin. Warto zaznaczyć, że styelina D zawiera 6 reszt bromotryptofanu. Halocydyna i dicyntauryna *Halocynthia aurantium* są przykładami dimerycznych PP o szerokiej aktywności przeciwbakteryjnej. Halocydyna (ang. halocidin) to heterodimer zbudowany z dwóch różnych podjednostek (18 i 15 reszt aminokwasowych), a dicyntauryna (ang. dicynthaurin) jest homodimerem zawierającym dwa α-helikalne 30-sto aminokwasowe monomery. W obu przypadkach monomery połączone są kowalencyjnie jednym mostkiem dwusiarczkowym (BULET i współaut. 2004, TINCU i TAYLOR 2004, LI i współaut. 2015, FALANGA i współaut. 2016).

PODSUMOWANIE

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są bardzo starymi ewolucyjnie cząsteczkami obronnymi. Niezwykle szerokie występowanie PP u przedstawicieli wszystkich królestw jednoznacznie wskazuje na ich fundamentalną rolę w sukcesie ewolucyjnym złożonych organizmów wielokomórkowych. Ich zasadnicze znaczenie w odporności bezkręgowców podkreśla również fakt, że każdy opisany pod tym względem gatunek wytwarza zestaw peptydów zróżnicowanych pod względem struktury przestrzennej, właściwości biochemicznych, mechanizmu działania oraz spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Takie rozwiązanie niewątpliwie zwiększa skuteczność mechanizmów odporności wrodzonej w walce z patogenami. Olbrzymia różnorodność, a także efektywność działania naturalnie występujących PP sprawiają, że wśród nich poszukuje się wzorców do opracowywania cząsteczek, które mogłyby stać się alternatywą dla klasycznych antybiotyków.

Streszczenie

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są kluczowymi efektorami odporności wrodzonej. Wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciwpierwotniacze, a często przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe. Wiele z nich zaangażowanych jest w neutralizację endotoksyn patogenów oraz ma właściwości immunomodulacyjne, stąd określane są również jako peptydy odpornościowe. O bogactwie i różnorodności naturalnie występujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych świadczy ich liczba zgromadzona w bazie Antimicrobial Peptide Database (aps.unmc.edu/AP/main.php), która zawiera dane dotyczące ponad 2100 peptydów zidentyfikowanych u zwierząt. Spośród nich ponad 570 to peptydy odpornościowe bezkręgowców, w tym 495 opisanych u stawonogów. Niezwykle szerokie występowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych u przedstawicieli wszystkich królestw jednoznacznie wskazuje na ich fundamentalną rolę w sukcesie ewolucyjnym złożonych organizmów wielokomórkowych. Ich zasadnicze znaczenie w odporności bezkręgowców podkreśla ponadto fakt, że większość opisanych pod tym względem gatunków wytwarza zestaw peptydów zróżnicowanych pod względem struktury przestrzennej, właściwości biochemicznych, mechanizmu działania oraz spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

LITERATURA

AUGUSTIN R., BOSCH T. C., 2010. *Cnidarian immunity: a tale of two barriers*. Adv. Exp. Med. Biol. 708, 1-16.

BACHÈRE E., GUEGUEN Y., GONZALEZ M., DE LORGERIL J., GARNIER J., ROMESTAND B., 2004. *Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster Crassostrea gigas*. Immunol. Rev. 198, 149-68.

BÍLIKOVA K., HUANG S.-C., LINB I.-P., SIMUTH J., PENG C.-C., 2015. *Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of Apis mellifera.* Peptides 68, 190-196.

BOSCH T. C., 2014. *Rethinking the role of immunity: lessons from Hydra.* Trends Immunol. 35, 495-502.

BULET P., STOCKLIN R., MENIN L., 2004. *Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates*. Immunol. Rev. 198, 169-184.

CHARLET M., CHERNYSH S., PHILIPPE H., HETRU C., HOFFMANN J. A., BULET P., 1996. *Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, Mytilus edulis.* J. Biol. Chem. 271, 21808-21813.

COCIANCICH S., GHAZI A., HETRU C., HOFFMANN J. A., LETELLIER L., 1993a. *Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in Micrococcus luteus.* J. Biol. Chem. 268, 19239-19245.

COCIANCICH S., GOYFFON M., BONTEMS F., BULET P., BOUET F., MENEZ A., HOFFMANN J., 1993b. *Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 17-22.

CUTHBERTSON B. J., DETERDING L. J., WILLIAMS J. G., TOMER K. B., ETIENNE K., BLACKSHEAR P. J., BÜLLESBACH E. E., GROSS P. S., 2008. *Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function.* Dev. Comp. Immunol. 32, 167-181.

CYTRYŃSKA M., MAK P., ZDYBICKA-BARABAS A., SUDER P., JAKUBOWICZ T., 2007. *Purification and characterization of eight peptides from Galleria mellonella.* Peptides 28, 583-543.

CYTRYŃSKA M., ZDYBICKA-BARABAS A., 2015. *Defense peptides: recent developments.* BioMol Concepts 6, 237-251.

DA SILVA P., JOUVENSAL L., LAMBERTY M., BULET P., CAILLE A., VOVELLE F., 2003. *Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite Pseudacanthotermes spiniger.* Protein Sci. 12, 438-446.

DAI H., RAYAPROLU S., GONG Y., HUANG R., PRAKASH O., JIANG H., 2008. *Solution structure, antibacterial activity, and expression profile of Manduca sexta moricin.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 855-863.

DIMARCQ J. L., BULET P., HETRU C., HOFFMANN J., 1998. *Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates.* Biopolymers 47, 465-477.

FALANGA A., LOMBARDI L., FRANCI G., VITIELLO M., IOVENE M. R., MORELLI G., GALDIERO M., GALDIERO S., 2016. *Marine antimicrobial peptides: Nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria.* Int. J. Mol. Sci. 17, 785-798.

FEHLBAUM P., BULET P., MICHAUT L., LAGUEUX M., BROEKAERT W. F. O., HETRU CH. S, HOFFMANN J. A., 1994. *Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antitungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides.* J. Biol. Chem. 269, 33159-33163.

FREDRICK W. S., RAVICHANDRAN S., 2012. *Hemolymph proteins in marine crustaceans.* Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2, 496-502.

GAO B., ZHU S., 2014. *An insect defensin-derived β-hairpin peptide with enhanced antibacterial activity.* ACS Chem. Biol. 9, 405-413.

KONG C., ENG S. A., LIM M. P., NATHAN S., 2016. *Beyond traditional antimicrobials: A Caenorhabditis elegans model for discovery of novel anti-infectives.* Front. Microbiol. 7, 1956.

LAMBERTY M., ADES S., UTTENWEILER-JOSEPH S., BROOKHART G., BUSHEY D., HOFFMANN J. A., BULET P., 1999. *Insect immunity: Isolation the lepidopteran Heliothis virescens of a novel insect defensin with potent antifungal activity.* J. Biol. Chem. 274, 9320-9326.

LAUTH X., NESIN A., BRIAND J. P., ROUSSEL J. P., HETRU C., 1998. *Isolation, characterization and chemical synthesis of a new insect defensin from Chironomus plumosus (Diptera).* Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 1059-1066.

LEE Y. S. , YUN E. K. , JANG W. S. , KIM I., LEE J. H. , PARK S. Y., RYU K. S., SEO S. J., KIM C. H. , LEE I. H., 2004. *Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, Galleria mellonella.* Insect Mol. Biol. 13, 65-72.

LI C., BLENCKE H. M., HAUG T., STENSVÅG K., 2015. *Antimicrobial peptides in echinoderm host defense.* Dev. Comp. Immunol. 49, 190-197.

LI W., LI S., ZHONG J., ZHU Z., LIU J., WANG W., 2011. *A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, Pheretima guillelmi (Michaelsen).* Peptides 32, 1146-1150.

MIYOSHI N., SAITO T., OHMURA T., KURODA K., SUITA K., IHARA K., ISOGAI E., 2016. *Functional structure and antimicrobial activity of persulcatusin, an antimicrobial peptide from the hard tick Ixodes persulcatus.* Parasit. Vectors 9, 85-96.

MYLONAKIS E., PODSIADLOWSKI L., MUHAMMED M., VILCINSKAS A., 2016. *Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides.* Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. doi: 10.1098/rstb.2015.0290.

OTERO-GONZÁLEZ A. J., MAGALHÃES B. S., GARCIA--VILLARINO M., LÓPEZ-ABARRATEGUI C., SOUSA D. A., DIAS S. C., FRANCO O. L., 2010. *Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control.* FASEB J. 24, 1320-1334.

OTVOS L. J. R., 2000. *Antibacterial peptides isolated from insects.* J. Peptide Sci. 6, 497-511.

PERRIGAULT M., TANGUY A., ALLAM B., 2009. *Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, Mercenaria mercenaria, in response to quahog parasite unknown (QPX).* BMC Genomics 10, 377-394.

PILLAI A., UENO S., ZHANG H., LEE J. M., KATO Y., 2005. *Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode Ascaris suum.* Biochem. J. 390, 207-214.

ROSA R. D., SANTINI A., FIEVET J., BULET P., DESTOUMIEUX-GARZO D., BACHE E., 2011. *Big Defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster Crassostrea gigas.* PLoS One 6, e25594.

SCHUHMANN B., SEITZ V., VILCINSKAS A., PODSIADLOWSKI L., 2003. *Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, Galleria mellonella.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 53, 125-133.

SCOCCHI M., TOSSI A., GENNARO R., 2011. *Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action.* Cell. Mol. Life Sci. 68, 2317-2330.

SEO J. K., CRAWFORD J. M., STONE K. L., NOGA E. J., 2005. *Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, Crassostrea virginica.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1998-2004.

SIMON A., KULLBERG B. J., TRIPET B., BOERMAN O. C., ZEEUWEN P., VAN DER VEN-JONGEKRIJG J., VERWEIJ P., SCHALKWIJK J., HODGES R., VAN DER MEER J. W., NETEA M. G., 2008. *Drosomycin-like defensin, a human homologue of Drosophila melanogaster drosomycin with antifungal activity.* Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1407-1412.

SMITH V.J., FERNANDES J. M., KEMP G. D., HAUTON C., 2008. *Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans.* Dev. Comp. Immunol. 32, 758-772.

TASIEMSKI A., VANDENBULCKE F., MITTA G., LEMOINE J., LEFEBVRE C., SAUTIÈRE P. E., SALZET M., 2004. *Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon*

bacterial challenge in an annelid, the leech Theromyzon tessulatum. J. Biol. Chem. 279, 30973-30982.

TASSANAKAJON A., AMPARYUP P., SOMBOONWIWAT K., SUPUNGUL P., 2011. *Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp*. Mar. Biotechnol. 13, 639-657.

TASSANAKAJON A., SOMBOONWIWAT K., AMPARYUP P., 2015. *Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates.* Dev. Comp. Immunol. 48, 324-341.

TINCU J. A., TAYLOR S. W., 2004. *Antimicrobial peptides from marine invertebrates.* Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3645-3654.

TONK M., CABEZAS-CRUZ A., VALDÉS J. J., REGO R. O. M., RUDENKO N., GOLOVCHENKO M., BELL-SAKYI L., DE LA FUENTE J., GRUBHOFFER L., 2014. *Identification and partial characterisation of new members of the Ixodes ricinus defensin family*. Gene 540, 146-152.

TORRES A. M., KUCHEL P. W., 2004. *The β-defensin-fold family of polypeptides*. Toxicon 44, 581-588.

VAN KAN E., DEMEL R., BREUKINK E., VAN DE BENT A., KRUIJFF B., 2002. *Clavanin permeabilizes target membranes via two distinctly different pH-dependent mechanisms.* Biochemistry 41, 7529-7539.

VILJAKAINEN L., PAMILO P., 2008. *Selection on an antimicrobial peptide defensin in ants*. J. Mol. Evol. 67, 643-652.

WANG G., LI X., WANG Z., 2016. *APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education*. Nucleic Acids Res. 44, D1087-D1093.

YI H., CHOWDHURY M., HUANG Y., YU X., 2014. *Insect antimicrobial peptides and their applications*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5807-5822.

ZHANG Z-T., ZHU S-Y., 2009. *Drosomycin, an essential component of antifungal defence in Drosophila*. Insect Mol. Biol. 18, 549-556.

ZHAO J., SONG L., LI C., NI D., WU L., ZHU L., WANG H., XU W., 2007. *Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop Argopecten irradians and the antimicrobial activity of its recombinant protein.* Mol. Immunol. 44, 360-368.

ZHU S, GAO B., 2014. *Nematode-derived drosomycin-type antifungal peptides provide evidence for plant-to-ecdysozoan horizontal transfer of a disease resistance gene.* Nat. Commun. doi: 10.1038/ncomms4154.

KOSMOS Vol. 66, 4, 563–574, 2017

AGNIESZKA ZDYBICKA-BARABAS, SYLWIA STĄCZEK, MAŁGORZATA CYTRYŃSKA

Department of Immunobiology, Institute of Biology and Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 St., 20-033 Lublin, E-mail: barabas@poczta.umcs.lublin.pl

DIVERSITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN INVERTEBRATES

Summary

Antimicrobial peptides (AMPs) are the key effectors of innate immunity. They exhibit antimicrobial, antifungal, antiprotozoal, and often antiviral and anticancer activities. Many of them are involved in neutralization of pathogen endotoxins, have immunomodulatory properties, and are therefore referred to as defense peptides (host defense peptides). The wealth and diversity of naturally occurring AMPs is evidenced by their numbers in the Antimicrobial Peptide Database (aps.unmc.edu/AP/main.php), which contains data on over 2100 peptides identified in animals. Of these, over 570 are invertebrate peptides, including 495 described in arthropods. The unusually widespread presence of AMPs in all kingdoms clearly indicates their fundamental role in the evolutionary success of complex multicellular organisms. Their essential role in invertebrate immunity further emphasizes the fact that most species produce a set of defense peptides varied in terms of spatial structure, biochemical properties, mechanism of action and spectrum of antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial peptides, cecropins, defense peptides, defensins, innate immunity, invertebrates