

## ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY: VZTAH MEZI JEJICH STRUKTUROU A ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITOU

IVANA DOLEŽÍLKOVÁ<sup>a,b</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a,b</sup> a TOMÁŠ MACEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,

<sup>b</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Společná laboratoř ÚOCHB AV ČR a VŠCHT Praha, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

ivana.dolezilкова@vscht.cz; martina.mackova@vscht.cz; tom.macek@uochb.cas.cz;

Došlo 22.2.10, přepracováno 30.9.10, přijato 22.10.10.

**Klíčová slova:** antimikrobiální aktivita, antimikrobiální peptidy, mechanismus účinku, struktura, mikrobiální rezistence

### Obsah

1. Úvod
2. Obecná struktura antimikrobiálních peptidů
  - 2.1. Mechanismus specifity antimikrobiálních peptidů a jejich selektivní toxicita
    - 2.1.1. Srovnání stavby mikrobiálních membrán
3. Mechanismy účinku
  - 3.1. Membránu narušující peptidy
  - 3.2. Jiné mechanismy účinku
4. Vztah mezi strukturou antimikrobiálních peptidů a jejich aktivitou
  - 4.1. Peptidy se strukturou  $\beta$ -listu
  - 4.2. Peptidy s  $\alpha$ -helikální strukturou
  - 4.3. Peptidy s rozvolněnou strukturou
  - 4.4. Peptidy se strukturou smyčky
5. Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům
  - 5.1. Konstitutivní rezistence
  - 5.2. Adaptivní rezistence
6. Perspektivy praktického využití antimikrobiálních peptidů
7. Závěr

### 1. Úvod

Před objevem syntetických antimikrobiálních látek byly děje v rámci vrozené imunity těmi nejdůležitějšími mechanismy, které zajišťovaly přežití při napadení patogenními mikroorganismy. Vrozené imunitní mechanismy stojí na prvním počátku imunitní reakce organismu a teprve druhotně uvádějí do chodu mechanismy imunity adaptivní.

Například u člověka tvoří první obrannou linii vrozené imunity neutrofilové. Disponují obrannými mechanismy jednak závislými na kyslíku (produkce metabolitů kyslíku, chloru), ale i mechanismy na kyslíku nezávislými, kam řadíme i produkci antimikrobiálních peptidů<sup>1</sup>.

Antimikrobiální peptidy jsou v přírodě všudypřítomné s více než 1000 známými zástupci a jsou složkou první obranné linie organismů proti infekčním mikroorganismům<sup>2</sup>. Tyto mikroorganismy jsou schopny ovlivnit imunitní odpověď včetně posílení vrozené imunity a potlačení zánětlivých procesů<sup>3</sup>. Organismy vylučují kationické a anionické peptidy s antimikrobiálním účinkem a jejich stručný přehled zde podávají tabulky I a II. Anionické antimikrobiální peptidy mají malou velikost, anionický charakter, za který jsou odpovědné homopolymerní asparátové oblasti a jako kofaktor pro baktericidní aktivitu potřebují zinek. Poprvé byly nalezeny u ovce<sup>4</sup>. Mechanismus účinku u těchto peptidů zatím nebyl spolehlivě prokázán, avšak předpokládá se, že bakteriální buňka je přijímá společně se zinkem. Baktericidní účinek anionických peptidů je inhibován v přítomnosti fosfátu nebo EDTA, naproti tomu s rostoucí koncentrací NaCl se zvyšuje<sup>3</sup>. Anionické antimikrobiální peptidy byly nalezeny v plicích, játrech, tenkém střevu savců a rovněž v krevním séru.

Kationické antimikrobiální peptidy jsou obecně definovány jako peptidy s méně než 50 aminokyselinami, převážujícím pozitivním nábojem, se zastoupením lysinových a argininových zbytků a značným obsahem (50 % a více) hydrofobních reziduí. Antimikrobiální peptidy mají celou řadu zajímavých vlastností. Především díky svému pozitivnímu náboji reagují s bakteriálními membránami, na kterých převládá za fyziologických podmínek náboj negativní. Těmito membránami pak pronikají prostřednictvím pórů nebo „koberec“ pokrývají membránu a vedou k jejímu narušení. Po proniknutí do cytoplazmy dochází k buněčné smrti např. porušením DNA, RNA, syntézy proteinů nebo respirace<sup>6</sup>. Antimikrobiální peptidy poměrně spolehlivě rozlišují savčí buňky od buněk mikrobiálních, a to na základě složení bakteriální membrány, která na rozdíl od hostitelských buněk postrádá cholesterol a je bohatá na negativně nabitě fosfolipidy. Tyto peptidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriím, mikroskopickým houbám a protozům. Jejich účinnost byla pozorována již při minimální inhibiční koncentraci (MIC) 0,25–4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Některé kationické peptidy inhibovaly replikaci obalených virů jako virus chřipky A, virus vesikulární stomatitidy (VSV) a viru lidské imunodeficiency (HIV-1). Kationické peptidy mohou rovněž vykazovat protirakovinotvornou aktivitu nebo podporovat hojení. Nedávné studie rovněž indikovaly roli kationických peptidů jako efektorů vnitřní imunitní odpovědi<sup>7</sup>. Některé peptidy jsou v současnosti předmětem výzkumu s potenciálem využití jako lokální prostředky

Tabulka I  
Kationické antimikrobiální peptidy <sup>67</sup>

| Peptidy s charakteristickou strukturou                           | Zdrojový organismus | Antimikrobiální aktivita   |
|------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Lineární peptidy se strukturou <math>\alpha</math>-helixu</i> |                     |                            |
| Cecropiny                                                        | hmyz, prase         | bakterie, plísně, viry     |
| Clavanin, styelin                                                | pláštěnci           | bakterie                   |
| Magainin, dermaseptin                                            | obojživelníci       | bakterie, protozoa         |
| Buforiny                                                         | obojživelníci       | bakterie, plísně           |
| Pleurocidin                                                      | ryby                | bakterie, plísně           |
| Moronecidin                                                      | ryby                | bakterie                   |
| <i>Lineární peptidy bohaté na prolin</i>                         |                     |                            |
| Drosocin, metchnikowin                                           | octomilka           | bakterie                   |
| Pyrrhocoricin                                                    | hmyz                | bakterie, plísně           |
| Metalnikowin                                                     | hmyz                | bakterie, plísně           |
| <i>Lineární peptidy bohaté na glycin</i>                         |                     |                            |
| Diptericiny, attaciny                                            | dvojkřídli          | bakterie                   |
| Shepherin I a II                                                 | rostliny            | G-bakterie, plísně         |
| Ac-AMP1, Ac-AMP2                                                 | rostliny            | G+bakterie, plísně         |
| <i>Lineární peptidy bohaté na histidin</i>                       |                     |                            |
| Histatin                                                         | člověk              | bakterie, plísně           |
| <i>Lineární peptidy bohaté na tyrosin</i>                        |                     |                            |
| Indolicin                                                        | skot                | bakterie                   |
| Lactoferrin                                                      | eukaryota           | bakterie                   |
| <i>Peptidy s jedním disulfidovým můstkem</i>                     |                     |                            |
| Thanatin                                                         | hmyz, rostliny      | bakterie, plísně           |
| Brevininy                                                        | žába                | bakterie                   |
| Lanthioniny                                                      | G+bakterie          | bakterie                   |
| <i>Peptidy se dvěma disulfidovými můstky</i>                     |                     |                            |
| Tachyplesin II                                                   | krab                | bakterie, plísně, viry     |
| Androctonin                                                      | štír                | bakterie, plísně           |
| Protegrin I                                                      | prase               | bakterie, plísně, viry     |
| <i>Peptidy se třemi disulfidovými můstky</i>                     |                     |                            |
| $\alpha$ -Defensiny                                              | savci               | bakterie, plísně           |
| $\beta$ -Defensiny                                               | savci               | bakterie, plísně           |
| Defensiny                                                        | hmyz                | bakterie, plísně, protozoa |
| Panaeidiny                                                       | kreveta             | bakterie, plísně           |
| <i>Peptidy s větším počtem disulfidových můstků</i>              |                     |                            |
| Tachycitin                                                       | krab                | bakterie, plísně           |
| Drosomycin                                                       | octomilka           | plísně                     |
| Gambicin                                                         | moskyt              | bakterie, plísně, protozoa |
| Heliomycin                                                       | motýl               | bakterie, plísně           |
| <i>Rostlinné defensiny</i>                                       |                     |                            |
| Defensin protein WT1                                             | rostliny            | plísně                     |
| alfAFP defensin                                                  | rostliny            | plísně                     |
| Bohaté na cystein                                                | rostliny            | bakterie, plísně           |
| So-D1-7                                                          | rostliny            | bakterie, plísně           |
| DmAMP1                                                           | rostliny            | plísně                     |

Tabulka II  
Nekationické antimikrobiální peptidy <sup>67</sup>

| Peptidy s charakteristickou strukturou                  | Zdrojový organismus | Antimikrobiální aktivita |
|---------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Anionické dipeptidy</i>                              |                     |                          |
| <i>Deriváty neuropeptidů</i>                            |                     |                          |
| Enkelytin                                               | lidské sérum        | bakterie                 |
| Peptid B                                                | lidské sérum        | bakterie                 |
| <i>Anionické peptidy bohaté na kyselinu asparagovou</i> |                     |                          |
| H-GDDDDDD-OH                                            | ovce                | bakterie                 |
| Dermicidin                                              | člověk              | bakterie                 |
| Maximin 15                                              | obojživelníci       | G+bakterie               |
| <i>Aromatické dipeptidy</i>                             |                     |                          |
| N-β-Alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyfenylalanin    | octomilka           | bakterie, plísně         |
| p-Hydroxycinnamaldehyd                                  | hmyz                | bakterie, plísně         |
| <i>Peptidy odvozené z kyslík-vázajících proteinů</i>    |                     |                          |
| Peptidy odvozené z hemocyaninu                          | kreveta             | bakterie                 |
| Peptidy odvozené z hemoglobinu                          | hmyz                | bakterie                 |
| Laktoferrin                                             | člověk              | bakterie, viry           |

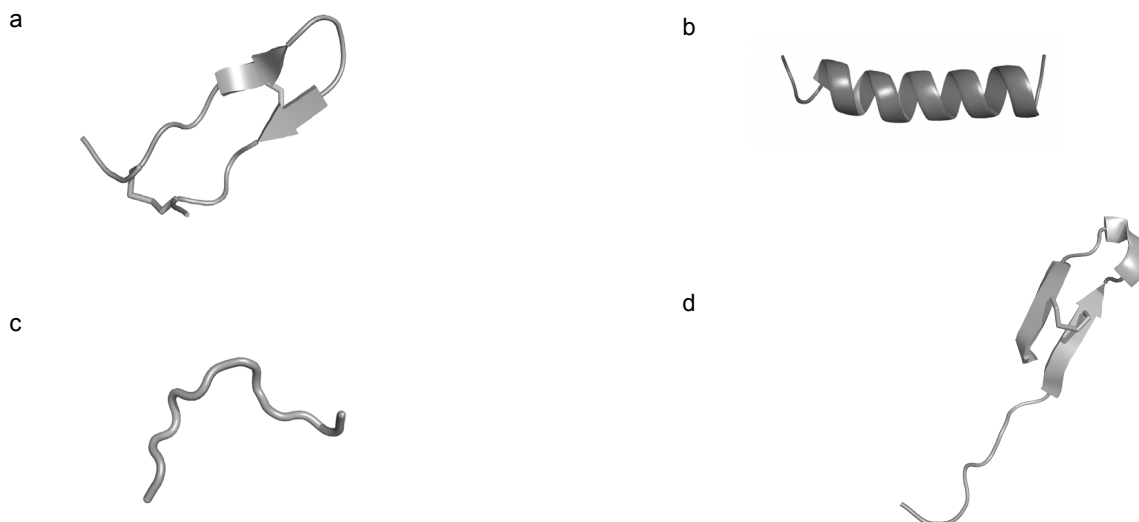
v prevenci bakteriální kolonizace katetrů a prostředky proti akné.

## 2. Obecná struktura antimikrobiálních peptidů

V současné době je známo mnoho kationických antimikrobiálních peptidů, které byly izolovány z rozmanitého spektra organismů nebo syntetizovány, a lze je najít

v databázi antimikrobiálních sekvencí (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag2.htm>). Peptidy jsou klasifikovány na základě jejich struktury do 4 základních skupin (obr. 1): β-list, α-helix, smyčka a rozvolněné peptidy, z nichž nejvíce zastoupeny jsou první dvě struktury<sup>8</sup>.

Vedle peptidů izolovaných z přírodních zdrojů bylo syntetizováno několik tisíc syntetických variant, které rovněž spadají do výše uvedených strukturních skupin<sup>9</sup>. Typickou vlastností společnou všem antimikrobiálním



Obr. 1. **Strukturní třídy antimikrobiálních peptidů;** (A) β-list, tachyplesin I, (B) α-helix, magainin 2, (C) rozvolněná struktura, indolicidin, (D) smyčka, thanatin. Převzato z databáze Protein Data Bank (PDB)

peptidům je jejich schopnost tvořit amfipatickou nebo amfilní konformaci, která je charakteristická periodicky se opakujícími úseky, ve kterých se střídají hydrofobní a hydrofilní domény. Schopnost zaujímat amfipatickou konformaci je často indukována interakcí s cytoplazmatickou membránou<sup>10</sup>.

Z dosud známých kationických antimikrobiálních peptidů byla struktura většiny objasněna pomocí cirkulárního dichroismu (CD). Ačkoli tato metoda poskytuje relevantní informace o tom, ke které strukturní třídě daný peptid náleží, není natolik detailní, aby objasnila prostorovou konformaci. Proto, aby bylo možné vysvětlit vztah mezi strukturou a aktivitou peptidů, je důležité popsat jejich strukturu co nejpřesněji. Prozatím byla objasněna struktura asi 50 kationických antimikrobiálních peptidů, primárně pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Z těchto 50 struktur 36 jsou peptidy izolované z přírodních zdrojů a 14 jsou syntetická analoga. Přirozeně se vyskytující peptidy byly izolovány z různých organismů: 8 obratlovců, 6 členovců, 6 rostlin, 3 bakterie, 3 hmyz a 1 měkkýš. Příklady peptidů, jejichž struktura je známa, jsou uvedeny v tabulce III. Zde uvedené peptidy byly rozděleny s ohledem na strukturní třídy a jejich ID kódy jsou dostupné v Protein Data Bank (PDB)<sup>8</sup>.

## 2.1. Specifita antimikrobiálních peptidů a jejich selektivní toxicita

Peptidy s antimikrobiální aktivitou byly izolovány v zásadě ze všech tkání, ve kterých byly nalezeny. Klíčovým okamžikem odhadu jejich potenciální toxicity je rozlišení mezi mikrobiální a hostitelskou buňkou. Přístup peptidů k potenciálně napadnutelné hostitelské tkáni může být omezen buď lokalizací peptidu v buňce nebo vysoce regulovanou expresí.

### 2.1.1. Srovnání stavby mikrobiálních membrán

Všechny biologické membrány tvoří fluidní mozaika proteinů a fosfolipidů. U některých organismů se na výsledné struktuře povrchu biomembrán podílejí také steroly a glyceridy. Základní složkou všech biomembrán je fosfolipidová dvojvrstva. Tyto membrány jsou amfipatické, což znamená, že mají zároveň hydrofobní i hydrofilní domény. Přesto však lze nalézt mezi prokaryotickými a eukaryotickými buňkami významné rozdíly ve složení buněčné membrány. Buněčné membrány složené především z fosfatidylglycerolu, cardiolipinu a fosfatidylserinu nacházíme především u prokaryot, jejichž membrána bývá silně elektronegativní. Dvojvrstvy bohaté na zwitterionické fosfolipidy, fosfatidylethanolamin a fosfatidylcholin, mají oproti tomu neutrální náboj a nacházíme je především v savčí cytoplazmatické membráně. Savčí buňky a buňky hub obsahují v cytoplazmatické membráně navíc ještě steroly, které u prokaryot rovněž nenajdeme. Membrány lidských buněk jako např. erythrocyty se skládají převážně z fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a sfingomyelinu. Pro srovnání ostatní savčí buňky často obsahují méně fosfatidylethanolaminu, ale více sfingomyelinu. Membrány bakteriálních buněk mají oproti tomu mnohem nižší náboj a jsou tvořeny převážně fosfatidylglycerolem a cardiolipinem, které v savčích membránách téměř nenalezneme<sup>7</sup>. Fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin za normálních podmínek nemají žádný náboj. Mimoto analog fosfatidylcholinu, sfingomyelin, obsahující palmitoylový zbytek má také neutrální náboj. V mnoha membránových systémech je zastoupení fosfatidylcholinu a sfingomyelinu nepřímo spjaté. Také steroly, které jsou nalézány ve větší míře u eukaryotických organismů, jsou většinou neutrální. Naproti tomu hydroxylované fosfolipidy fosfatidylglycerol, cardiolipin a fosfatidylserin udržují negativní náboj. Z tohoto pohledu je zřejmé, že náboj biomembrán závisí na stechiometrii a uspořádání fosfolipidů.

Tabulka III

Kationické antimikrobiální peptidy se známou trojrozměrnou strukturou a jejich ID PDB (Identifikační kódy určující trojrozměrnou strukturu z databáze Protein Data Bank)<sup>8</sup>

| Příklad peptidu        | Struktura       | Zdroj                           | PDB ID |
|------------------------|-----------------|---------------------------------|--------|
| CA-MA                  | $\alpha$ -helix | syntetický                      | 1D9J   |
| Carnobacteriocin B2    | $\alpha$ -helix | <i>Carnobacterium piscicola</i> | 1CW5   |
| Magainin 2             | $\alpha$ -helix | <i>Xenopus laevis</i>           | 2MAG   |
| $\gamma$ -1-P thionin  | $\beta$ -list   | <i>Triticum turgidum</i>        | 1GPS   |
| Ah-Amp 1               | $\beta$ -list   | <i>Aesculus hippocastanum</i>   | 1BK8   |
| $\beta$ -defensin 12   | $\beta$ -list   | <i>Bos taurus</i>               | 1BNB   |
| Human defensin (HNP-3) | $\beta$ -list   | <i>Homo sapiens</i>             | 1DFN   |
| Leucocin A             | $\beta$ -list   | <i>Leuconostoc gelidum</i>      | 2LEU   |
| Protegrin-1 (Pg1)      | $\beta$ -list   | <i>Sus scrofa</i>               | 1PG1   |
| Ac-AMP2                | rozvolněná      | <i>Amaranthus caudatus</i>      | 1MMC   |
| Indolicidin            | rozvolněná      | <i>Bos taurus</i>               | 1G89   |
| Thanatin               | smyčka          | <i>Podisus maculiventris</i>    | 8TFV   |

### 3. Mechanismy účinku kationických peptidů

Mechanismus účinku kationických antimikrobiálních peptidů je v současnosti aktivně studován a množství dostupných informací stále roste. Většina experimentů se zaměřila primárně na interakce kationických peptidů s modelovými membránovými systémy. Další studie jsou vedeny s ohledem na celou mikrobiální buňku přednostně využívající barviva citlivá ke změně membránového potenciálu a fluorescenčně značené peptidy. Tyto studie prokázaly, že všechny antimikrobiální peptidy interagují s membránami a lze je rozdělit do dvou skupin: peptidy rozkládající membránu a ostatní. Alternativou k tomuto pohledu je hypotéza, že kationické antimikrobiální peptidy mají mnohonásobný účinek na buňku počínaje permeabilizací membrány, účinkem na buněčnou stěnu až k možné inhibici syntézy makromolekul. Proto mechanismus účinku zodpovědný za usmrcení bakterií a minimální efektivní koncentrace se liší u různých peptidů i bakterií<sup>11</sup>.

Mechanismus účinku je zatím nejlépe prostudován u gramnegativních bakterií. Počáteční interakce peptidu s bakteriální membránou spočívá v elektrostatických interakcích mezi kationickým peptidem a anionickou vrstvou lipidů ve vnější vrstvě membrány vedoucí k rozrušení membrány. Ukazuje se, že kationické peptidy mají větší afinitu k lipopolysacharidům (LPS) ve vnější vrstvě membrány gramnegativních bakterií než k přítomným dvoumocným kationům  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  (cit.<sup>12</sup>). Kationické peptidy vytlačí tyto kationy od negativně nabitých LPS, což vede k lokální destabilizaci ve vnější membráně. To podporuje tvorbu destabilizovaných oblastí, přes které se peptid dostane vnější membránou v procesu označovaném jako „vnesezení do buňky podporované samotným peptidem“<sup>13</sup>. Nyní je možný přístup k cytoplazmatické membráně. Peptidy poté interagují s vnější vrstvou cytoplazmatické membrány. Rozdíl mezi membránou narušujícími peptidy a ostatními spočívá v tom, jakým způsobem tato reorientace vede k narušení integrity membrány nebo translokaci peptidů do cytoplazmy.

#### 3.1. Peptidy narušující membránu

Peptidy narušující membránu jsou obecně řazeny do  $\alpha$ -helikální strukturní skupiny, ačkoli ne všechny  $\alpha$ -helikální peptidy rozrušují membránu. Například buforin, peptid CP10A a analogy pleurocinu zřejmě primárně nenarušují membránu. Narušení cytoplazmatické membrány je vysvětlováno třemi mechanistickými modely: mechanismus „sudové skruže“, mechanismus „micelárních agregátů“ a „kobercový“ model<sup>7</sup>.

Model „sudové skruže“ vysvětluje tvorbu transmembránových pórů reorientací amfipatických peptidů kolmo k membráně a kdy se zarovnávají způsobem, ve kterém postranní hydrofobní řetězce směřují vně do lipidické vrstvy. Polární postranní řetězce směřují dovnitř. Tyto póry umožňují unikání komponent cytoplazmatické membrány a také narušují membránový potenciál. Hlavním argumentem hovořícím proti této hypotéze jsou nedostatky upřed-

nostňovaného tvaru pórů demonstrované širokou variabilitou vzrůstu vodivosti indukovanou peptidy v modelových membránách<sup>14</sup>.

V modelu micelárních agregátů se peptidy orientují a asociují do micelárního nebo shlukovitého uspořádání, která zasahují do membrány. Předpokládá se, že kolaps tohoto micelárního agregátu může vysvětlit translokaci do cytoplazmy<sup>12</sup>.

U alternativního kobercového mechanismu se peptidy nevmežují do membrány, ale seřazují se paralelně k dvojvrstvě, setrvávají v kontaktu s lipidovými skupinami a účinně pokrývají okolní oblast. Orientace peptidů vede k lokálním poruchám ve stabilitě membrány, což má za následek tvorbu trhlin, vytékání složek cytoplazmy, porušení membránového potenciálu a ve výsledku dezintegraci membrány<sup>15</sup>.

Bez ohledu na to, který model je správný, narušení cytoplazmatické membrány má za následek rychlou depolarizaci buněčné stěny vedoucí k buněčné smrti, která u neaktivnějších peptidů nastává během 5 minut<sup>16</sup>. Je třeba zmínit, že depolarizace membrány sama o sobě není jediným letálním faktorem a doposud nebyly objasněny všechny fáze vedoucí od narušení membránové integrity k samotné buněčné smrti. Dále je třeba brát v úvahu, že každý z výše uvedených modelů může být správný v závislosti na zkoumaném peptidu. Nedávno bylo např. prokázáno, že nízké koncentrace cecropinu A, klasifikovaného jako lytický peptid, indukují u bakterií změny v transkripci<sup>17</sup>. Jiné studie prokázaly, že magainin 2 se může translokovat přímo do cytoplazmy bakterií. Ačkoliv úplný dosah těchto jevů ještě nebyl zcela objasněn, vše nasvědčuje pro účast těchto peptidů v mechanismech, které nesouvisí s narušením membrány<sup>18</sup>.

#### 3.2. Jiné mechanismy účinku

U peptidů, které nenarušují buněčnou membránu, se předpokládá působení na cíle v cytoplazmě. Membránová translokace je nyní nejčastěji připisována procesům podobným mechanismu micelární agregace poprvé prokázaném u žabího antimikrobiálního peptidu buforinu II, spíše než vznikem rozsáhlých membránových poruch, prasklina v membráně je dočasná a ke změně propustnosti membrány nedošlo<sup>19</sup>. Další studie prováděné s eukaryotickými buňkami prokázaly, že peptidy s vysokým obsahem argininu mají schopnost projít přes buněčnou i jadernou membránu a mohou sloužit jako přenašeče navázaných látek<sup>20</sup>. Pokud peptid přejde přes buněčnou membránu, předpokládá se u kationických peptidů interakce s DNA, RNA nebo celulárními proteiny a následná inhibice funkce těchto molekul. Tato interakce byla prozatím demonstrována pouze u pokusů *in vitro* a v ostatních studiích byla prokázána inhibice syntézy makromolekul po působení subletálních koncentrací peptidu<sup>21–23</sup>. Pro doplnění, u určitých peptidů bylo rovněž prokázáno působení na specifické enzymy. Pyrrolicorin, hmyzí peptid bohatý na aminokyseliny prolin, se váže na heat-shock protein DnaK, což zabraňuje správnému sbalení proteinů<sup>24</sup>, naproti tomu

mersacidin izolovaný z kmene *Bacillus* se váže na lipid II, což vede k zabránění syntézy peptidoglykanu<sup>25</sup>. Tyto peptidy ztrácejí svou aktivitu mnohem pomaleji než membránově aktivní peptidy, u kterých je jejich antimikrobiální účinek patrný v průběhu minut<sup>26,27</sup>. U pyrrolicorcinu byla schopnost zasahovat do sbalení proteinu pozorována zhruba po hodině a patrná lýze buňky po působení mersacidinu byla zaznamenána až po 3 hodinách<sup>24,25</sup>.

#### 4. Vztah mezi strukturou antimikrobiálních peptidů a jejich aktivitou

K diskusi byl pro každou skupinu vybrán reprezentativní zástupce.

##### 4.1. Peptidy se strukturou $\beta$ -listu

Pro tuto skupinu peptidů je charakteristická struktura  $\beta$ -listu stabilizovaná disulfidovými můstky. U větších peptidů z této strukturní rodiny mohou být rovněž zastoupeny menšinové helikální segmenty. Asi nejlépe charakterizované peptidy se strukturou  $\beta$ -listu jsou malé peptidy tachyplesiny se 17–18 aminokyselinami izolované z krevních buněk japonského kraba *Tachyplesus tridentatus*<sup>28</sup>. Tachyplesiny představují vhodný základní model těchto antimikrobiálních peptidů pro studie objasňující vztah mezi strukturou a aktivitou vzhledem k jejich malé velikosti a možnosti objasnění jejich struktury pomocí vysoce rozlišovací <sup>1</sup>H NMR. Tachyplesin I vykazuje střední antimikrobiální aktivitu (<12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MIC u *Escherichia coli* K12) a zároveň vysokou afinitu k lipopolysacharidům<sup>28,29</sup>. I přes to, že struktura tachyplesinů a jejich aktivita *in vitro* je poměrně dobře známá, přesný mechanismus jejich antimikrobiálního účinku je nejasný. Tachyplesiny sice vykazují vysokou afinitu k LPS, avšak předpokládá se, že intracelulární cíle rovněž existují. Ukázalo se, že se tachyplesin I dokáže navázat do menšího žlábků DNA<sup>22</sup>. Jiné studie zaměřené na strukturně příbuzný peptid polyphemusin I ukazují, že efektivně indukuje přechod přes cytoplazmatickou membránu, ale nezpůsobuje vyplavování calceinu v membránových studiích<sup>30</sup>. Z toho vyplývá, že tyto antimikrobiální peptidy sice silně narušují stabilitu lipidové membrány, které vede k uspořádání peptidů podél dvojvrstvy, ale nevytvářejí se dlouhodobě póry nebo transmembránové kanály, takže zřejmě mohou fungovat micelárním nebo podobným mechanismem<sup>8</sup>.

Několik strukturních studií se zaměřilo na souvislost mezi přítomností disulfidových můstků a antimikrobiální aktivitou. Linearizace peptidů bylo docíleno přidáním látek chránících –SH skupiny<sup>31–33</sup> a substitucí jednotlivých aminokyselin<sup>33,34</sup>. Například lineární tachyplesin s navázanými ochrannými acetamidomethylovými skupinami vykazoval sníženou antibakteriální i antivirální aktivitu a zároveň bylo redukováno uvolňování calceinu z modelových membrán<sup>31,33</sup>. Calcein známý rovněž jako fluorexon je fluorescenční barvivo, jehož acetomethoxyderivát může být transportován přes buněčnou membránu do

buněk a umožňuje testovat životaschopnost buňky<sup>35,36</sup>. Ve studiích využívající liposomy a planární lipidové dvojvrstvy bylo prokázáno, že lineární analoga naprosto postrádají schopnost původního peptidu přejít přes membránu<sup>32</sup>. Analogy tachyplesinu linearizované substitucí aminokyselin se chovaly podobně jako předchozí. Z těchto pokusů je patrné, že ačkoliv stabilizující disulfidové můstky tachyplesinu nejsou absolutně nezbytné pro jeho antimikrobiální aktivitu, pro přechod přes membránu modelových systémů jsou nepostradatelné. Vzhledem k pozorovaným rozdílům v permeabilizaci membrány a jejímu rozrušení lze předpokládat, že mechanismus antimikrobiálního účinku původního a linearizovaného peptidu se liší<sup>32</sup>.

Nedávno byly pomocí <sup>1</sup>H NMR objasněny základní rozdíly ve struktuře tachyplesinu v roztoku a vázaného na micelární strukturu<sup>37</sup>. Interakce tachyplesinu s micelami spouští konformační změny, které vedou k ohybání molekuly peptidu kolem centrální aminokyseliny argininu současně s poodkrytím postranních hydrofobních řetězců. Lineární analog tachyplesinu, u něhož byly cysteiny nahrazeny tyrosinem, v roztoku zaujímaly náhodnou konformaci, avšak po navázání na micely byla výsledná konformace výrazně odlišná od nemodifikovaného tachyplesinu. Z toho je zřejmé, že disulfidové můstky se značnou měrou podílí na stabilitě molekuly, jejíž interakce s membránou je podmíněna ohybem molekuly. Tato strukturní flexibilita zřejmě umožňuje molekule peptidu přechod přes buněčnou membránu, ač se původně předpokládalo, že  $\beta$ -vlásečková struktura je rigidní<sup>8</sup>.

##### 4.2. Peptidy s $\alpha$ -helikální strukturou

Pro tuto skupinu peptidů je charakteristická  $\alpha$ -helikální konformace. Často je v centru molekuly patrný ohyb. V jedné studii bylo prokázáno, že toto zakřivení bylo utlumením hemolytické aktivity zásadní pro selektivitu peptidu<sup>38</sup>. Za nejlépe charakterizované zástupce této skupiny považujeme magaininy izolované z kůže africké žaby *Xenopus laevis*. Magainin 1 a 2 sestávají z 23 aminokyselin a vykazují antimikrobiální účinek střední intenzity (MIC proti *E. coli* 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )<sup>39</sup>. Struktura magaininu 2 byla určena pomocí <sup>1</sup>H NMR v přítomnosti SDS micel. Peptid zaujímá  $\alpha$ -helikální konformaci a mírným ohybem mezi 12. a 13. aminokyselinou<sup>40</sup>.

Antimikrobiální účinek magaininu se připisoval selektivní permeabilizaci bakteriální membrány, která vede k výkyvům v membránovém potenciálu<sup>41</sup>. Představa tohoto mechanismu je dále podpořena pozorováním, že nejsou patrné rozdíly v účinku mezi D- a L-enantiomery peptidu, což vylučuje možnost chirálního receptoru nebo enzymu jako cíle<sup>42,43</sup>. Provedené experimenty směřují k vysvětlení mechanismu účinku magaininu pomocí micelárního modelu, kde magainin interaguje se záporně nabitými fosfolipidy, spontánně vytváří dočasné póry v membráně, které po kolapsu membrány umožní peptidu přejít do vnitřní vrstvy<sup>44,45</sup>. Tento předpoklad demonstrují pokusy s modelovými systémy a depolarizace membrány v přítomnosti magaininu byla zaznamenána u *E. coli*<sup>46,47</sup>.

Spolu s objevem  $\alpha$ -helikálních magaininů byl studován vztah mezi strukturou peptidů a jejich aktivitou. Z *N*-terminálního zkrácení magaininu 2 je zřejmé, že první tři zbytky nehrají klíčovou roli v antimikrobiální aktivitě, avšak delece čtvrté aminokyseliny výrazně snižuje antimikrobiální působení a další odstranění páté a šesté aminokyseliny vede k úplné ztrátě antimikrobiální aktivity. Předpokládá se, že zkrácení peptidu na méně než 20 aminokyselin vede v konečném výsledku k tomu, že peptid není schopen překlenout lipidovou dvojvrstvu, a to vysvětluje z mechanického hlediska současnou ztrátu antimikrobiální aktivity<sup>48</sup>.

Interakce kationických peptidů s negativně nabitým povrchem buněk je nutným prvním krokem u obou typů mechanismů. Zůstává klíčovým úkolem objasnit síly, které vedou k příznivé interakci peptidu s buněčnou membránou stejně jako se přesvědčit, jestli jsou k sobě přitahovány pouze elektrostatickými silami. Přínos náboje k aktivitě magaininu 2 byl zkoumán s použitím analog s lišicím se kladným nábojem<sup>49</sup>. Bylo zjištěno, že zvýšení náboje k +5 doprovází zvýšení antimikrobiální aktivity. Dalším zvýšením náboje k +7 se nezměnila maximální aktivita zjištěná při náboji +5, avšak zvýšila se hemolytická aktivita. Zajímavé je, že v experimentech používající modelové membrány tvořené anionickým lipidem fosfatidylglycerolem se zjistilo, že zvýšení náboje peptidu vede ke snížení schopnosti proniknout membránou. To je pravděpodobně důsledek současného snížení hydrofobicity, které doprovází zvýšení náboje<sup>8</sup>.

#### 4.3. Peptidy s rozvolněnou strukturou

Peptidy s rozvolněnou strukturou postrádají klasickou sekundární strukturu, zpravidla v důsledku vysokého zastoupení prolinu a glycinu. Ve skutečnosti tyto peptidy nevytvářejí svou finální strukturu intramolekulárními vodíkovými vazbami, ale pomocí vodíkových vazeb a van der Waalových interakcí s membránovými lipidy. Ze zástupců této skupiny lze jmenovat přirozeně se vyskytující indolicin<sup>50</sup>, Ac-AMP2 (cit.<sup>51</sup>) nebo syntetické peptidy Pw2 (cit.<sup>52</sup>) nebo tripticin<sup>53</sup>. Asi nejlépe charakterizovaným zástupcem této skupiny kationických antimikrobiálních peptidů je indolicin bohatý na tryptofan a prolin. Indolicin byl izolován z cytoplazmatických granulí lidských neutrofilů, skládá se ze 13 aminokyselin s amidovaným C-koncem. Mezi těmito 13 aminokyselinami je tryptofan zastoupen v 5 případech, což z indolicinu dělá peptid s nejbohatším známým zastoupením tryptofanu<sup>54</sup>. Konformace indolicinu závisí na okolním prostředí. Struktura indolicinu byla determinována s využitím metody <sup>1</sup>H NMR v micelách tvořených SDS nebo zwitterionickým dodecylfosfocolinem (DPC)<sup>55</sup>. V obou lipidových prostředích molekuly indolicinu zaujímají rozvolněnou konformaci, ačkoli v neutrálních DPC micelách zaujímá molekula více ohnutou strukturu díky přítomnosti dvou poloohybu u pátého a osmého aminokyselinového zbytku. U indolicinu byla zaznamenána střední antimikrobiální aktivita (MIC 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  proti *E. coli*)<sup>56</sup>, avšak ve srovnání

s ostatními peptidy např. s vlásenkovou strukturou (tachyplesin) nemá výraznou afinitu k LPS<sup>57</sup>.

Antimikrobiální mechanismus indolicinu doposud nebyl uspokojivě vysvětlen. Předpokládalo se, že indolicin způsobuje narušení cytoplazmatické membrány vytvářením kanálů změnou membránového potenciálu<sup>56</sup>. Tato hypotéza byla obecně přijímána vzhledem k malé velikosti indolicinu, která by umožňovala jeho přechod skrz biologickou membránu<sup>55</sup>. Avšak v experimentech s celými buňkami, kdy bylo usmrceno více než 99 % bakterií, se neprokázala schopnost indolicinu úplně depolarizovat cytoplazmatickou membránu *E. coli*<sup>58</sup> ani *S. aureus*<sup>59</sup>, což hovoří proti předpokládanému mechanismu rozpadu membrány. Ačkoli u *E. coli* může indolicin zřejmě jako důsledek inhibice syntézy DNA způsobit filamentaci, což ukazuje na to, že přechod přes membránu zřejmě probíhá<sup>60</sup>. Ve shodě s modelem micelárních agregátů vysvětlují mechanismus účinku indolicinu obě hypotézy, kdy vytváření neobvyklých transmembránových kanálů při kolapsu buňky vede ke vniknutí peptidu do cytoplazmy<sup>8</sup>.

Při pokusech s modelovými membránami se prokázalo, že indolicin není efektivní při přechodu přes membránu a předpokládá se, že je u bakterií nutný membránový gradient alespoň –140 mV k tomu, aby translokace mohla proběhnout. Pro pochopení strukturních podmínek pro antimikrobiální působení indolicinu bylo syntetizováno několik analog. Do popředí zájmu se dostala dvě analoga, CP-11 se zvýšeným kladným nábojem a CP10A, u kterého byly všechny proliny nahrazeny alaninem, a která vykazovala vyšší aktivitu na grampozitivní i gramnegativní bakterie. U peptidu CP-11 vedlo zvýšení náboje ke snížení schopnosti vmezeřit se do membránové vrstvy, k uvolňování calceinu a bez membránového potenciálu k přechodu přes membránu téměř nedošlo. V případě modifikovaného peptidu CP10A došlo ke zvýšení schopnosti začlenění se do membrány, překlápění lipidů a snadnějšímu přechodu přes membránu, zatímco uvoňování calceinu bylo sníženo<sup>61</sup>. Strukturální analýza pomocí <sup>1</sup>H NMR odhalila, že substituce prolinu alaninem znemožňuje peptidu CP10A zaujmout při přiblížení membráně helikální konformaci na rozdíl od původní rozvolněné struktury indolicinu<sup>55,62</sup>. Zdá se tedy, že u skupiny indolicinů způsobují změny v aktivitě peptidů především konformační změny spíše než změny náboje či hydrofobicity. Změna konformace z rozvolněné struktury na helikální vedla k intenzivnějšímu začlenění do membrány a přechodu, což má za následek lepší přístup do cytoplazmy a zde umístěným intracelulárním cílům<sup>8</sup>.

#### 4.4. Peptidy se strukturou smyčky

Pro tuto třídu peptidů je charakteristická smyčková struktura, která je dána přítomností jednoduché vazby (disulfidové, amidové nebo isopeptidové). Zástupcem s podrobně objasněnou strukturou je thanatin skládající se z 21 aminokyselinových zbytků, který byl izolován z brouka *Podiscus maculiventris*<sup>63</sup>. Podrobná struktura thanatinu popsána pomocí <sup>1</sup>H NMR potvrdila antiparalelní  $\beta$ -list

tvořený aminokyselinovými zbytky 8–21 a stabilizovaný disulfidovým můstkem mezi zbytky 11 a 18 (cit.<sup>64</sup>). U thanatinu byla zaznamenána vedle mírné antibakteriální aktivity proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím rovněž aktivita antifungální, což je srovnatelné s aktivitou peptidů se strukturou  $\beta$ -listu.

Ačkoli přesný mechanismus účinku thanatinu dosud nebyl objasněn, předpokládá se, že cílem není cytoplazmatická membrána. Mechanismus usmrcení bakteriálních buněk zřejmě závisí na konkrétním mikroorganismu, zvláště s přihlédnutím k faktu, že ačkoli D- i L-enantiomery jsou stejně aktivní proti grampozitivním bakteriím a plísním, L-thanatin vykazuje aktivitu pouze na gramnegativní bakterie. Toto nasvědčuje tomu, že u gramnegativních bakterií se vyvinul stereospecifický cíl typu receptoru, zatímco u grampozitivních bakterií a mikroskopických vláknitých hub dominují nespecifické interakce. Studie věnující se závislosti aktivity peptidu na struktuře odhalily, že zkrácení C-terminálního konce nebo N-terminálního konce o více než tři aminokyseliny významně redukuje aktivitu izolovaného smyčkového úseku peptidu<sup>63</sup>.

## 5. Rezistence vůči antimikrobiálním peptidům

### 5.1. Konstitutivní rezistence

Konstitutivní rezistence vůči antimikrobiálním peptidům byla pozorována u bakterií rodu *Proteus*, *Serratia* a často i *Pseudomonas*. Jedním z možných důvodů této rezistence je elektrostatická afinita mezi antimikrobiálními peptidy a bakteriální stěnou. Další možnou příčinou rezistence může být nevhodný energetický metabolismus nebo růstová fáze mikroorganismu. Opouzdřené bakterie jsou často rezistentní nejen k antimikrobiálním peptidům, ale rovněž k opsonizaci či fagocytóze. Tvorba bakteriálního pouzdra nebo biofilmu zvyšuje rezistenci jak k antimikrobiálním peptidům, tak k syntetickým antibiotikům, což je typické pro rody a druhy bakterií *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus anthracis*<sup>1</sup>.

### 5.2. Adaptivní rezistence

*Salmonella typhimurium* přežívá v makrofázích díky změnám vnější membrány, navíc produkuje proteasy, které snadno rozloží antimikrobiální peptidy. Produkce proteas poskytuje rezistenci i bakteriím jako *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* a *Streptococcus pneumoniae*. *Haemophilus influenzae* často exprimuje vysoké množství fosfatidylcholinu, jež imituje fosfatidylcholin v savčích membránách, díky tomu na něj antimikrobiální peptidy neúčinkují. Změna fluidity, potenciálu a složení bakteriální stěny vede také k rezistenci vůči antimikrobiálním peptidům. Příkladem může být modifikace fosfatidylcholinu (inkorporace D-lysinu do fosfatidylcholinu) nebo kyseliny lipoteichoové (inkorporace D-alaninu) vedoucí k redukci negativního náboje a rezistenci k antimikro-

biálním peptidům. Za rezistenci mohou být zodpovědné rovněž genetické mutace. Kupříkladu mutace genu *mur B* vede ke změnám struktury peptidoglykanu u kmene *Staphylococcus aureus* a výsledné rezistenci k působení některých antimikrobiálních peptidů. U pathogenu *Neisseria gonorrhoeae* bylo rovněž pozorováno zpětné vyloučení peptidů, které do buňky již pronikly<sup>1</sup>.

## 6. Perspektivy praktického využití antimikrobiálních peptidů

Hlavní motivací pro vývoj peptidů s terapeutickým účinkem spočívá převážně v jejich různých způsobech aplikace. Efektivní může být jejich samotný antimikrobiální nebo imunomodulační účinek nebo mohou působit synergicky s již známými antibiotiky. Antimikrobiální peptidy vykazují aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů a ačkoliv jejich účinek není tak silný jako u běžně používaných antibiotik, jejich hlavní výhodou je jejich antimikrobiální efekt na multirezistentní kmeny. Ačkoli interakce peptidů s cytoplazmatickou membránou je zjevná a některé peptidy mají schopnost narušit membránu již při jejich minimální inhibiční koncentraci (MIC), u některých peptidů byl prokázán jejich přechod přes cytoplazmatickou membránu a následný vliv na intracelulární procesy v buňce. Minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace jsou často velmi podobné, což naznačuje, že antimikrobiální peptidy mají v drtivé většině baktericidní účinek. Vedle toho na antimikrobiální peptidy nevzniká rezistence tak často a snadno jako na klasická antibiotika, a proto se stávají významnými činiteli v boji proti multirezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Avšak existují i mikroorganismy, které jsou vůči antimikrobiálním peptidům přirozeně rezistentní, např. *Burkholderia*, *Proteus* nebo *Serratia* sp.<sup>65</sup>.

Počátečním bodem pro vývoj nových peptidových preparátů je jejich izolace z přírodních zdrojů a následná modifikace jejich struktury. Tímto výzkumem se zabývá např. společnost Micrologix (<http://www.migenix.com>), v minulosti se mu rovněž věnovaly dnes již neexistující společnosti Magainin Pharmaceuticals a IntraBiotics. Mezi peptidové preparáty „první generace“ se řadí např. pexiganan odvozený z magaininu 2 nebo IB 367 odvozený z prasečího protegrinu. Vývoj těchto preparátů byl pozastaven, neboť se neprokázala očekávaná účinnost nebo byl preparát shledán příliš toxickým. Jeden z preparátů, který byl úspěšný ve třetí fázi klinických zkoušek, je MX-226 (Migenix) odvozený z peptidu na bázi indolicinu. Tento preparát byl vyvinut pro prevenci kontaminace žilních katétrů a vykazoval 49% pokles infekcí a 21% pokles kolonizace katétrů. Dalším úspěšným preparátem je MX594AN na bázi indolicinu (Migenix) určený pro léčbu mírného až středního akné. Z dalších preparátů lze jmenovat např. Pexiganan v podobě krému pro léčbu impetiga a kožních vředů nebo Isegranin v podobě ústního roztoku<sup>6,65,66</sup>.

## 7. Závěr

Ačkoli množství antimikrobiálních peptidů, jejichž chemická struktura již byla objasněna, stále roste, počet peptidů s přesně známou strukturou je stále relativně malý. Analýzy, které zkoumají vztah struktury a aktivity, prozatím odhalily dvě hlavní podmínky pro antimikrobiální aktivitu – kladný náboj a indukovanou amfipatickou konformaci. Ve skutečnosti jsou zřejmě nutné i změny konformace na aktivnější strukturu. Třeba u tachyplesinu s  $\beta$ -vlásečkovou strukturou se předpokládalo, že jeho struktura zůstává rigidní, avšak v lipidovém prostředí dochází k výrazným změnám ve struktuře. Studie zkoumající mechanismus účinku se zaměřily primárně na chemické a strukturní vlastnosti peptidů, na ostatní faktory již méně. Speciálně komponenty membrán mohou mít významný vliv na antimikrobiální aktivitu peptidů. Lze zmínit především lipidy, jejichž rozmanitost u různých mikroorganismů může uspokojivě vysvětlit rozdíly v aktivitě peptidů u jednotlivých bakteriálních druhů.

### Seznam zkratk

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| DPC | dodecylfosfocholin              |
| LPS | lipopolysacharidy               |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| PDB | databáze Protein Data Bank      |
| SDS | sodiumdodecylsulfát             |
| VSV | virus vesikulární stomatitidy   |

*Tato studie byla podpořena granty GA ČR 522/09/1693, MSM 60461375, GA ČR 305/09/H008.*

### LITERATURA

1. Marková J.: *Alergie* 4, 332 (2007).
2. Bechinger B., Lohner K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1529 (2006).
3. Fales – Williams A. J., Brogden K. A., Huffman J. M., Gallup J. M., Ackermann M. R.: *Vet. Pathol.* 39, 706 (2002).
4. Heidari M., Hamir A., Cutlip C. R., Brogden K. A.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 69 (2002).
5. Brogden K. A., Ackermann M. R., McCray P. B. Jr., Huttner K. M.: *Infect. Immun.* 67, 4256 (1999).
6. Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536 (2004).
7. Yeaman M. R., Yount N. Y.: *Pharmacol. Rev.* 55, 27 (2003).
8. Powers J. P. S., Hancock R. E. W.: *Peptides* 24, 1681 (2003).
9. Blondelle S. E., Lohner K.: *Biopolymers* 55, 74 (2000).
10. Rotem S., Mor A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1582 (2009).
11. Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086 (2000).
12. Hancock R. E. W., Chapple D. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317 (1999).
13. Epand R. M., Vogel H. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 11 (1999).
14. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 7235 (1999).
15. Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y.: *Biochemistry* 31, 12416 (1992).
16. Friedrich C., Scott M. G., Karunaratne N., Yan H., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1542 (1999).
17. Hong R. W., Shchepetov M., Weiser J. N., Axelsen P. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1 (2003).
18. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K.: *Biochemistry* 34, 6521 (1995).
19. Park C. B., Yi K. S., Matsuzaki K., Kim M. S., Kim S. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8245 (2000).
20. Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K.: *J. Biol. Chem.* 276, 5836 (2001).
21. Park C. B., Kim H. S., Kim S. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 253 (1998).
22. Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y.: *Biochemistry* 31, 2998 (1992).
23. Patrzykat A., Friedrich C. L., Zhang L., Mendoza V., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 605 (2002).
24. Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B. A., Hoffman R., Otvos Jr. L.: *Biochemistry* 40, 3016 (2001).
25. Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl H. G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 154 (1998).
26. Giacometti A., Cirioni O., Barchiesi F., Del Prete M. S.: *Peptides* 20, 1265 (1999).
27. Giacometti A., Cirioni O., Greganti G., Quarta M., Scalise G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3320 (1998).
28. Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S.: *J. Biol. Chem.* 263, 16709 (1998).
29. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1562, 32 (2002).
30. Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 35714 (2001).
31. Matsuzaki K., Nakayama M., Fukui M., Otaka A., Funakoshi S., Fujii N.: *Biochim. Biophys. Acta* 32, 11704 (1993).
32. Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y.: *Biochemistry* 36, 9799 (1997).
33. Tamamura H., Ikoma R., Niwa M., Funakoshi S., Murakami T., Fujii N.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 41, 978 (1993).
34. Rao A. G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 361, 127 (1999).
35. Shimanouchi T., Ishii H., Yoshimoto N., Umakoshi H., Kuboi R.: *Colloids Surf., B* 73, 156 (2009).
36. Fujita T., Yamada H., Fukuzumi M., Nishimaki A.,

- Yamamoto A., Muranishi S.: *Life Sci.* 60, 303 (1996).
37. Laederach A., Andreotti A. H., Fulton D. B.: *Biochemistry* 41, 12359 (2002).
  38. Zhang L., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 8102 (1999).
  39. Zasloff M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5449 (1987).
  40. Gesell J., Zasloff M., Opella S. J.: *J. Biomol. NMR* 9, 127 (1997).
  41. Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 391 (1998).
  42. Bessalle R., Kapitkovsky A., Gorea A., Shalit I., Fridkin M.: *FEBS Lett.* 274, 151 (1990).
  43. Wade D., Boman A., Wahlin B., Drain C. M., Andreu D., Boman H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4761 (1990).
  44. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K.: *Biochemistry* 34, 6521 (1995).
  45. Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1327, 119 (1997).
  46. Juretic D., Chen H. C., Brown J. H., Morell J. L., Hendler R. W., Westerhoff H. V.: *FEBS Lett.* 249, 219 (1989).
  47. Juretic D., Hendler R. W., Kamp F., Caughey W.S., Zasloff M., Westerhoff H. V.: *Biochemistry* 33, 4562 (1994).
  48. Zasloff M., Martin B., Chen H. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 910 (1988).
  49. Dathe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M.: *FEBS Lett.* 501, 146 (2001).
  50. Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W., Cullor J. S.: *J. Biol. Chem.* 267, 4292 (1992).
  51. Martins J. C., Maes D., Loris R., Pepermans H. A., Wyns L., Willem R.: *J. Mol. Biol.* 258, 322 (1996).
  52. Trabi M., Schirra H. J., Craik D. J.: *Biochemistry* 40, 4211 (2001).
  53. Schibli D. J., Hwang P. M., Vogel H. J.: *Biochemistry* 38, 16749 (1999).
  54. Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L., Tang Y. Q., Smith W., Cullor J. S.: *J. Biol. Chem.* 267, 4292 (1992).
  55. Rozek A., Friedrich C. L., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 39, 15765 (2000).
  56. Falla T. J., Karunaratne D. N., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 271, 19298 (1996).
  57. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1562, 32 (2002).
  58. Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W.: *Biochemistry* 38, 7235 (1999).
  59. Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086 (2000).
  60. Subbalakshmi C., Sitaram N.: *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 91 (1998).
  61. Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 35714 (2001).
  62. Friedrich C. L., Rozek A., Patrzykat A., Hancock R. E. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 24015 (2001).
  63. Fehlbauer P., Bulet P., Chernysh S., Briand J. P., Roussel J. P., Letellier L., Hetru Ch., Hoffmann J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1221 (1996).
  64. Mandard N., Sodano P., Labbe H., Bonmatin J. M., Bulet P., Hetru C., Ptak M., Vovelle F.: *Eur. J. Biochem.* 256, 404 (1998).
  65. Marr A. K., Gooderham W. J., Hancock R. E. W.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468 (2006).
  66. Andres E., Dimarcq J. L.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 448 (2005).
  67. Vizioli J., Salzet M.: *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 494 (2002).

I. Doležilková<sup>a,b</sup>, M. Macková<sup>a,b</sup>, and T. Macek<sup>a,b</sup>

(<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, <sup>b</sup> Joint Laboratory of IOCB and Institute of Chemical Technology, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Antimicrobial Peptides: The Relationship of Their Structure and Antibacterial Activity**

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important component of natural defence of most living organisms against invading pathogens. AMPs are mostly cationic and amphipathic peptides (mol. weight <10 kDa) of variable length, amino acid sequence and structure. In the past two decades several AMPs have been isolated from a wide variety of animals, both vertebrates and invertebrates, and plants as well as from bacteria and fungi. The peptides exhibit a broad-spectrum antimicrobial activity against a wide range of microorganisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, yeasts, fungi and viruses. A few peptides are also cytotoxic to sperm and tumour cells. AMPs are classified by three-dimensional NMR structure analysis. To date, a number of AMPs have been chemically characterized. Structure-activity studies reveal two main requirements for antimicrobial activity – a positive charge and an induced amphipathic conformation. AMPs are excellent candidates for novel antimicrobial agents; a few peptides have undergone clinical trials.