A bőr antimikrobiális peptidjeinek védelmi szerepe és ezek jelentősége

The significance of protective role of skin antimicrobial peptides

SCHNEIDER IMRE DR., RÓZSA ANNAMÁRIA DR., KOVÁCS L. ANDRÁS DR.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvoskar Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika

ÖSSZEFOGLALÁS

A bőr ún. fizikai barrierjének megismerését követően az utóbbi két évtizedben fedezték fel a kémiai barrier, amely a bőr felszínén található antimikrobiális peptidok (AMP)-ből (cathelicidin, LL-37, defensin, dermcidin) áll. Ez az AMP csoport a bőr felszínét pajzsként borítja és aktív szerepet játszanak a sérülések regenerációjában. Egyes körkékben a barrier sérülése esetén a környezetükben lévő kórokozók behatolását aladályozzák meg. Az AMP-ek kapcsolatot képeznek a szerzett és veleszületett immunitás között. Újabban vált ismertté, hogy az AMP-ek hatására a bőr laphámsejtes carcinómája és az ezt megelőző folyamatok, valamint a varicella-zoster vírus fertőzés vissza-szoríthatók.

Kulcsszavak:

kémiai barrier - antimikrobiális peptidok - szerzett immunitás

SUMMARY

After the discovery of the so-called physical barrier in the two decades the chemical barrier of the skin was described which consists of the antimicrobial peptides (cathelicidin, LL-37, defensin, dermcidin) on the skin surface. These peptides cover the surface of the skin as a shield and play an active role in the skin regeneration caused by different lesions. In the case of damages of skin barrier of several diseases they hamper the invading of causative agents. The antimicrobial peptides compose a bridge function between the innate-, and adaptive immunity. Recently it became known that after the influence of antimicrobial peptides the squamous cells carcinoma and its preceding forms as well varicella zoster infection can be repressing.

Key words:

chemical barrier - antimicrobial peptides - innate immunity

A véletlennek köszönhető, hogy az emberi szervezet első természetes antibiotikus hatású enzimét, a lysozyme-et 1922-ben A.Flemming felfedezte. Azóta több mint 1200 különböző típusú antibiotikus hatású peptidet izoláltak emlősből, rovarokból, növényekből és ezek megismerése hatással volt az orvostudomány fejlődésére. Kitűnt, hogy ezek az antimikrobiális peptid-, protein (=AMP)-ek jelentős szerepet játszanak a gazdaszervezet védelmében. A peptidoknak nemcsak pleiotropikus hatásuk van és nemcsak elpusztítják a baktériumokat, hanem ellenőrzik is a szervezetet a gyulladás, angiogenezis és a sebgyógyulás (18) vonatkozásában.

Az utóbbi években több száz természetesen előforduló peptid jellegű antibiotikumot fedeztek fel, amelyek a patogén mikrobák növekedését képesek gátolni. Ezek az AMP-ek a veleszületett immunitás válaszában vesznek részt és a fertőzés elleni gyors, „első vonalbeli” választ teszik lehetővé.

A korábbiaktól eltérően ma már ismert, hogy az AMP-ek a bőr felszínén kémiai pajzsot, védőréteget képeznek és emellett a veleszületett és szerzett immunvédekezés számos összetevőjét koordinálják (22).

Az AMP-ek a kis polipeptidok különböző csoportját képezik és ezek létezése több mint 20 éve ismert, de az első szervezet immun válaszában való funkcióját csak újabban fedezték fel és a veleszületett immunitás effektoraiként a gombák, baktériumok és vírusok széles skáláját direkt módon pusztítják el. A legtöbb AMP-ben közös az a jelleg, hogy kationos töltésük van és a hidrofob aminosavak révén a bakteriális membránnal lépnek kölcsönhatásba (2).

Fontosabb AMP-ek az emberi bőrben

Cathelicidinek. A nevük a tartósan védett „cathelin” előanyag domén szóból származik. Ezeket az N-terminál jelző peptidok jellemzik. A cathelin-t először a sertés

neutrofilekből izolálták a cathepsin-L inhibitoraként és innen származik az elnevezés. Az emberben is csak egy cathelicidin gén van. A humán cathelicidin (= C)-t, az LL-37/hCAP18-t a humán csontvelőből izolált cDNA-ból klónozták. Az érett AMP-t LL-37-nek nevezik, mivel a neutrofil proteázok általi feldolgozásuk után két leucine maradékkal keletkezett és ez 37 aminosav hosszúságú. A hCAP18 elnevezés ettől függetlenül kreált szó, utalva arra, hogy felismerje a humán C-t, mint cationos proteint, amelynek a tömege a proteolitikus hasítás előtt ~ 18 kDa volt. Az LL-37-et jellemzik:

- közvetlen antimikrobiális hatásuk van és más AMP-ekkel szinergizmusban hatnak,
- kemoattraktáns hatásuk van és stimulálják az endotél burjánzást az FRPL(= formyl peptide receptor-like 1)-hez való kapcsolódás által.
- toborozni képesek a hízósejteket és a hízósejtek is termelik az LL-37-et; ezáltal résztvesznek az innate immunitásban (= INIM) mind a direkt antimikrobiális hatásuk, mind a védő jellegű sejt elemek termelése révén.

A C-ek kemotaktikus hatásúak a monocitákra, makrofágokra és a CD4 T-limfocitákra. Ezeknek is egyedülálló funkciójuk az AP (= antigén prezentáló) sejtek toborzása és aktiválása az immunválasz felépítésében. Több mikrobiális komponens és endogén mediátorok vesznek részt ebben a folyamatban. E hatékony immunstimulátumok közé tartoznak a C-ek, defensinek, eosinofil-derived neurotoxink, stb. Oppenheim J. J. (20) javasolták, hogy ezeket a proteineket "alarmin" jelzővel lássák el, hogy felhívjuk ezzel is a figyelmet az immunrendszert riadóztató szerepükre. Ahogy a leukocitákban, úgy az AMP-eknek ez az „alarmin” hatása a G-protein kapcsolt receptorokon át történik (22).

Defensinek. Az AMP-ek változatos családját képvislik. Kis kationos peptidek, amelyek 6-8 cystein maradvánnyal rendelkeznek; amelyeket diszulfid hidak kötik össze és három különböző csoportba lehet ezeket osztani ember-nél: α -D. és β -D. A D-ek emlőszökben találhatók.

– α -defensinek. A humán neutrofilek négy α -D-t fejeznek ki, amelyeket humán neutrofil 1-4-nek nevezünk. Emberben a D-ek a neutrofilek azurofil szemcséiben tárolódnak mint teljesen kifejlődött érett peptidek.

– β -defensinek. E D-ek hasonló módon három diszulfid híddal rendelkeznek, de ezek térbelileg különféleképpen rendeződnek. E D-eket azonosították a *hámsejtek*-, *perifériás vér mononukleáris sejtek*-ben. Négy humán β -D-t ismerünk: HBD 1-4. A HBD-1 az epidermisben is kifejeződik. A HBD-2 alacsony szinten fejeződik ki az erősen gyulladásos bőrben (8). A HBD-2 a humán keratinocitákban való erős kifejeződése a D-ek fontos szerepére utal, amely a kután patogének elleni gazda védekezésben játszik szerepet (1a. ábra). A HBD-2 a CCR6-hoz kötődik és kemotaktikus hatása van az éretlen dendrit sejtek és a memória T-sejtekre (29); ezenkívül elősegíti a histamin (= H.) felszabadulást, valamint a prostaglandin D2 termelést a hízósejtekben. A HBD-2 lényegében nincs jelen az egészséges bőrben és a humán keratinocitákban való kife-

1. ábra

Az antimikrobiális peptidek kifejeződése a bőrben

jeződésük citokin (pl. IL-1) vagy bakteriális stimulushoz kötött (13). A HBD-3-at a psoriasisos pikkelyekből izolálták. Az újabb genom analízis azt sugallja, hogy sok β -D vár még felfedezésre.

Peptidek neve	Szövetekben való elhelyezkedésük	Funkciójuk
– Cathelicidin LL-37/hCAP-18	Hámszövet (bőr, stb.) Neutrofil sejtek Hízósejtek Verejték	Antimikrobiális, kemoattraktáns
α -Defensinek HNP-1-4, vagy HD-1-4 HD-5 és 6	Neutrofilek Hámréteg (bél, szájüreg, stb.)	Antimikrobiális kemotaktikus
β -Defensinek HBD-1-4	Hámsejtek (bőr, szájüreg, stb.) Perifériás vér mononukleáris sejtek, monociták.	Histamin felszab. antimikrobiális
Dermcidin	Verejtékmirigy	Antimikrobiális

1. táblázat

A leggyakoribb antimikrobiális peptidek eloszlása és funkciója emberben

Dermcidinek. E proteinek specifikusan és szervesen a verejtékmirigyek sejtjeiben fejeződnek ki, majd a verejtékbe szekretálódnak és a hám felszínére kerülnek (1b. ábra), ahol keverednek az LL-37-, HBD-1, HBD-2-vel és ezek az antimikrobiális aktivitás állandó forrását jelentik (17). A verejtékben egy proteolitikusan feldolgozott 47-

aminosavból álló peptid képződik és számos kórokozó ellen van hatása (23). A peptid hatása széles pH határokon belül érvényesül (24). A vizsgálatok szerint a dermcidin (= DCD.)-ek a cathelicidin-, és a β -defensinektől eltérően – amelyek gerjeszthető peptidok – kizárólag csak az emberi bőr immunvédekezésének szerves és kizárólagos része (21). Kimutatták, hogy a töltésüktől függetlenül a különböző DCD peptidok nem képesek pórust képezni a Gram negatív-, és -pozitív baktériumok membránjain (26). Immunelektronmikroszkópiás vizsgálatok mutatták ki, hogy a DCD peptidok a bakteriális felszínre képesek kötődni, jóllehet membrán károsodás (perturbation) ezen nem volt kimutatható (27).

Az AMP-ek szerepe a klinikumban

A fenti AMP-ek mellett külön helyet foglal el a *catetastatin*, a humán autonóm funkciókra ható neuroendocrine peptid, amelyről újabban mutatták ki, hogy egyben kután antimikrobiális peptid is. A vizsgálati eredmények szerint a peptid a humán hízósejtek számos funkcióját stimulálja és így részt vesz a bőr gyulladásos folyamataiban. Ez a tény amellet szól, hogy a peptidnek immunmoduláló hatása lehet és a neuroendokrin és kután immunrendszerek közötti kapcsolatot látják el (1). A bőrfelszínen lévő patogének növekedésének gátlása mellett a catestatin peptidok a keratinociták burjánzásának és migrálásának támogatása révén hozzájárulnak a kután sebgyógyuláshoz (10). Az AMP-eket először emlős bőrben, a sertések sebváladáskában fedezték fel cathelicidin PR-39 néven (6). Ezt követően a humán LL-37-et az epidermális keratinocitákban figyelték meg (5).

A fentiek mellett más, antimikrobiális aktivitással rendelkező peptidokat is megfigyeltek a bőrben: adrenomedullin (15), cystatin (28) stb.

Az AMP-ek kifejeződését számos dermatozissal kapcsolatban is vizsgálták:

Az LL-37 *emelkedett* kifejeződése volt megfigyelhető a humán keratinocitákban a következő dermatozisokban:

- psoriasis, lupus erythematosus, kontakt dermatitis (5).
- erythema toxicum neonatorum esetében; a peptid immunlokalizációja figyelhető meg a C15-öt kifejező neutrofilekben, EG-2-t kifejező eozinofilekben és a CD1-t kifejező dendrit sejtekben (14).
- verruca vulgaris, condyloma acuminatum (3).
- sebzésekben és a gyógyuló sebek hámjában (9).

Az LL-37 kifejeződés *csökkent*:

- atopiás dermatitis (= AD) (19).
- fekély-széli hámiban (9).

Az LL-37 *serkenti* az angiogenezist, mely igen fontos a sebgyógyulásban és a szövet regenerációban (11).

A tünetes *psoriasisos* betegek bőrében sok AMP fokozott mértékben fejeződött ki és különösen a C., β -defensinek, vagy az S100 proteinek jól vizsgáltak (16). Az AMP-ekről úgy gondolták, hogy rontják a betegek tüneteit, de az újabb adatok azt a lehetőséget sugallják, hogy az AMP kifejeződés gerjesztése javíthatja a beteg kilátásait. Az AMP-eknek a tünetes psoriasisos betegek szérumban való kifejeződése nincs összefüggésben a beteg-

ség súlyosságával. A fokozott AMP szinteknek a psoriasis esetében való előfordulása egy váratlan megfigyelés, amelyet még vizsgálni kell (7). A tünetes psoriasisos betegek keratinocitái fokozott Toll-like receptor (= TLR)-9-et fejeznek ki, amelyek hasonló módon lokalizálódnak a C.LL-37 emelkedett kifejeződésével. Tényesen a normális humán keratinociták az LL-37-nek kitéve, növelik a TLR9 kifejeződést. Ezt követően, ha a keratinocitákat LL-37-nek tették ki és ezt követően TLR9 liganddal, pl. CpG (= Cytosin phosphate Guanin)-, vagy genom DNA-val kezelték, úgy ezek fokozott mértékben növelték az I. típusú IFN-okat. A vizsgálati adatok azt sugallják, hogy a keratinociták felismerik és válaszolnak a DNA-ra és aktív módon vesznek részt a psoriasist jellemző immunológiai környezet kialakításában (16).

Az *atopiás dermatitis*-es betegeknek hiányos permeabilitási barrierjük van, amely kedvez a patogén fertőzéseknek. Korábbi tanulmányok mutatták ki, hogy a gerjeszthető LL-37, HBD-2 és HBD-3 alacsonyabb szinten fejeződnek ki az AD-es betegek bőrében a psoriasisos betegekével szemben. Az AD-es betegeknek nagyobb a fogékonyságuk a *S.aureus* bőrfertőzésre, amely azt sugallja, hogy az AD-es betegek keratinocitái által kifejezett AMP-ek nem tudnak hatékonyan megküzdeni a fertőzéssel, vagy az AMP funkció megzavart. Az AD-es bőrben az AMP kifejeződés fokozása és a bőr barrier hiány korrigálása terápiás hatásúak lehetnek az AD-es betegek esetében (24).

Az AD-es betegek sokkal érzékenyebbek a *kután vírus fertőzések*re, különösen a *varicella zoster vírus (VZV) infekció*ira. Mind az LL-37-, mind a HBD-2-nek antivirális hatása van a VZV replikációra a HaCaT sejtvonal keratinocitáiban és a B-sejtekben, de ezek mechanizmusa különböző (4).

Az AMP-ek az immunrendszernek nemcsak effektorai, hanem fontos szerepet tulajdonítanak a tumor progressziónak és tumor szuppresszióknak néhány malignus folyamatban, mint a szájüreg laphám sejtés rákjában. A szerzők (25) az AMP-ek különböző csoportjait vették szisztemás vizsgálat alá: a laphám sejtés (squamous cell carcinoma = SCC) rák-, és rákelőző tüneteit. A HBD-1 szignifikánsan csökkent a SCC-ben szemben az UV-be sugárzott egészséges bőr-, aktinikus keratozis (= AK)-, és a SCC in situ (= SCCis)-val. Az RNase-7 kifejeződés fokozatosan csökkent a malignus átalakulás egyes lépéseivel párhuzamosan; az egészséges bőrben volt a legerősebb kifejeződés, míg a legalacsonyabb a SCC-ban. A HBD-2 és psoriasin jelentősen fejeződtek ki a SCC-, és SCCis-ban szemben az egészséges bőrbeni kifejeződéssel. A vizsgálatokból az vonható le, hogy a HBD-1 és RNase-7 tumor szuppresszorként, míg a HBD-2 és psoriasin tumor promotorként hathatnak. A HBD-2 és HBD-3 a farmakológiai terápia fejlődésében lehetséges célpontként szerepelhetnek.

Újabb kutatási eredmények szerint a vitamin-D3 kezelés az LL-37 fokozott kifejeződését idézte elő a tenyésztett *sebociták D-vitamin receptorán* át (12).

Egyes dermatológiai kórképekben (psoriasis, AD, stb) volt megfigyelhető, hogy a psoriasisos betegek keratinocitái a C-, LL-37-t erősebben fejezték ki az AD-sel szemben. Az előző kórképben fokozott TLR9 kifejeződés volt megfigyelhető. Az LL-37 és β -defensin-2 csökkentik a VZV-sal fertőzött keratinocitákban a vírus replikációt. Jelentős megfigyelés volt, hogy a bőr laphám sejtes rákjában és az ezt megelőző folyamatokban a HBD-1 és ribonuclease (RNase)-7 szintek csökkentek.

Az AMP-ek különböző formái a bőr felszínére kerülő kórokozók elpusztítását célozzák. Különböző dermatózisokban (psoriasis, lupus erythematosus, kontakt dermatitis) az LL-37 erősen kifejezett, míg AD-ben csökkent. AD-ben a HBD-2 és HBD-3 szint csökkent. Tumor vonatkozásban fontos, hogy a laphám sejtes rák (SCC) esetében a HBD kifejeződés jelentősen csökkent, míg a HBD-2 és psoriasin kifejezetten magas volt.

A fent tárgyalt természetes bioaktív peptidek ígéretes perspektívájúak. Ezek a defensív/immun peptidek az élő szervezet természetes fegyverzetéhez tartoznak és a jövő fertőzés ellenes eszközeinek kialakulása előtt biztos kiindulópontként szolgálnak.

IRODALOM

1. Aung Gyi., Niyonsaba F., Ushio H. et al.: Catestatin, a neuroendocrin antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology* (2011) 132, 527-539.
2. Bardan A., Nizet V., Gallo R.: Antimicrobial peptides and the skin. *Expert Opin. Biol. Ther.* (2004) 4, 543-549.
3. Conner K., Nern K., Rudusill J. et al.: The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma acuminatum and verruca vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2002) 47, 347-350.
4. Crack L. R., Jones L., Malavige G. N. et al.: Human antimicrobial peptide LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin. Exp. Derm.* (2012) 37, 534-543.
5. Frohm M., Agerberth B., Ahangari G. et al.: The expression of the gene coding for the antimicrobial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 15258-15263.
6. Gallo R. L., Ono M., Povsic T. et al.: Syndecans cell surface heparan sulfate proteoglycans are induced by a prolin-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1994) 91, 11035-11039.
7. Gambichler T., Bechara F. G., Scola N. et al.: Serum levels of antimicrobial peptides and proteins do not correlate with psoriasis severity and are increased after treatment with fumaric acid esters. *Arch. Dermatol. Res.* (2012) 304, 471-474.
8. Harder J., Bartels J., Christophers E. et al.: A peptide antibiotic from human skin. *Nature* (1997) 387, 861.
9. Heilborn J. D., Nilsson M. F., Kratz G. et al.: The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in reepithelisation of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J. Invest. Dermatol.* (2003) 120, 379-389.
10. Hoq M. I., Niyonsaba F., Ushio H. et al.: Human catestatin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* (2011) 64, 108-118.
11. Koczulla R., von Degenfeld G., Kupatt C. et al.: An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* (2003) 111, 1665-1672.
12. Lee W. J., Cha H. W., Sohn M. Y. et al.: Vitamin D increases expression of cathelicidin in cultured sebocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 2012 Jun 14. (ePub ahead of print)
13. Liu A. Y., Destoumieux D., Wong A. V. et al.: Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria and the state of differentiation. *J. Invest. Dermatol.* (2002) 118, 275-281.
14. Marchini G., Lindow S., Brismari H. et al.: The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br. J. Dermatol.* (2002) 147, 1127-1134.
15. Martinez A., Elsassar Th., Muro-Cacho C. et al.: Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology* (1997) 138, 5597-5607.
16. Morizane S., Yamashaki K., Mühleisen B. et al.: Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J. Invest. Dermatol.* (2012) 132, 135-143.
17. Murakami M., Ohtake T., Dorschner R. A. et al.: Cathelicidin antimicrobial peptide expression in sweat, an innate defense system for skin. *J. Invest. Dermatol.* (2002) 119, 1090-1095.
18. Nakatsuji T., Gallo R. L.: Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J. Invest. Dermatol.* (2012) 132, 887-895.
19. Ong P. Y., Ohtake T., Brandt C. et al.: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* (2002) 347, 1151-1160.
20. Oppenheim J. J., Yang D.: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* (2005) 17, 359-365.
21. Rieg S., Garbe C., Sauer B.: Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br. J. Dermatol.* (2004) 151, 534-539.
22. Schaubert J., Gallo R. L.: Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2008) 122, 261-266.
23. Schitteck B., Hippel R., Sauer B. et al.: Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* (2001) 2, 1133-1137.
24. Schitteck B.: The antimicrobial skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Curr. Probl. Dermatol.* (2011) 41, 54-67.
25. Scola N., Gambichler T., Saklaoui H. et al.: The expression of antimicrobial peptides is significantly altered in cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions. *Br. J. Dermatol.* (2012) 167, 591-597.
26. Senyürek I., Paulmann M., Sinnberg T. et al.: Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2009) 53, 2499-2509 [PubMed].
27. Steffen H., Rieg S., Wiedemann I. et al.: Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2006) 50, 2608-2620 [PubMed].
28. Zeeuwen P. L., van Vlijmen-Willems I. M., Janxsen B. J. et al.: Cystatin M/E expression is restricted to differentiated epidermal keratinocytes and sweat glands: a new skin-specific proteinase inhibitor that is a target for cross-linking by transglutaminase. *J. Invest. Dermatol.* (2001) 116, 693-701.
29. Yang D., Chertov O., Bykowska S. N. et al.: Beta-defensin linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* (1999) 286, 525-528.

Érkezett: 2012. 09. 07.

Közlésre elfogadva: 2012. 09. 14.