

## PARTICIPAREA CATESTATINEI LA APĂRAREA ANTIINFEȚIOASĂ A PIELII

SORINA SCHIPOR\*, ILINCA NICOLAE\*\*

București

### Rezumat

Producerea cutanată de AMPs (antimicrobial peptides) este un sistem primar pentru protecția organismului uman față de acțiunea unor microorganisme patogene sau agresivități toxice. Multe tipuri celulare care se găsesc permanent în piele produc AMPs. Dintre acestea amintim: keratinocite, sebocite, glande sudoripare, mastocite, neutrofile, celule NK.

AMPs sunt peptide fiziologic active care determină și coordonează multiple componente ale sistemului imunitar în născut și adaptativ.

Este binecunoscut faptul că pielea umană și sistemul neuroendocrin se află în relații strânse. Activitatea antibacteriană, antivirală și antifungică a graninelor la nivelul pielii este susținută de observația că procromacina, chromacina I și II, chromofungina, vaso-statina I, pancreastatina, catestatina sunt exprimate în keratinocite, mononucleare periferice, celule Merkel.

Catestatina, prezentată în acest referat, este o moleculă neuroendocrină secretată și indusă în epiderm după lezarea țesutului sau o infecție. Catestatina oferă noi informații despre comunicarea dintre sistemul imunitar cutanat și sistemul nervos.

**Cuvinte cheie:** AMPs (antimicrobial peptides), catestatină, epiderm.

### Summary

AMPs production in skin is a primary system for body defense against pathogens or toxicity. Many cell types that permanently reside in the skin produce AMPs, including keratinocytes, sebocytes, eccrine glands, and mast cells.

AMPs are physiologically active peptides that initiate and coordinates many components of innate and adaptive immune system.

Skin and neuroendocrine system have a close relationship. Antibacterial, antiviral and antifungal granins activity in skin is sustained by procromacin, chromacin I and II, chromofungin, vasostatin I, pancreastatin, catestatin expression in keratinocytes, mononucleated cells, Merkel cells.

This review summarizes most recent data about catestatin, neuroendocrine molecule secreted and induced in epidermis after tissue damage or infection, offering new informations regarding communication between cutaneous immune system and nervous system.

**Key words:** AMPs (antimicrobial peptides), catestatin, epidermis.

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 43-47

### Introducere

Sistemul neuroendocrin și pielea se află în relații strânse. Pielea se înscrie în ansamblul celulelor și organelor care asigură protecția organismului împotriva agresivității infecțioase sau toxice prin mecanisme de protecție externe și interne. Este bine cunoscut faptul că pielea

umană este permanent agresată de microorganisme, dar foarte rar este infectată. Această protecție este asigurată de: a. Existența unei bariere naturale alcătuită din stratul cornos, keratina și structuri lipidice care împiedică invazia agenților patogeni; b. Elaborarea unui răspuns imunitar în născut care are trei funcții majore: recunoașterea agentului patogen,

\* Institutul de Endocrinologie „C. I. Parhon”, București.

\*\* Centrul de Cercetări Dermatovenerologice, Spitalul Clinic „C. I. Parhon”, București.

stimularea celulelor efectoare, elaborarea unor produși capabili de a ucide microorganismele. Keratinocitele, celulele T și celulele dendritice pot funcționa ca APC (celule prezentatoare de antigen) nespecializate (1). Abilitatea keratinocitelor de a produce diferite citokine și molecule de adeziune a dus la recunoașterea că ele pot influența evenimente cutanate legate de apărarea antibacteriană, antifungică și antivirală, reactivitatea imună, angiogeneză și reepitelializare (1). În plus, dermul alături de timus, măduva osoasă, ganglionii limfatici, amigdale, plăcile Peyer, apendice și corionul mucoaselor, reprezintă organele limfoide la nivelul cărora se nasc, se maturează și se transformă limfocitele.

Producerea cutanată de AMPs (antimicrobial peptidea) este un sistem primar pentru protecția organismului uman, iar expresia unor AMPs crește ulterior ca răspuns la agresiuni infecțioase sau toxice (2, 3).

AMPs erau considerate că acționează numai ca antibiotice endogene, a căror funcție singulară era aceea de a distruge microorganismele. Recent, AMPs au fost reconsiderate ca peptide fiziologic active care determină și coordonează multiple componente ale sistemului imun înăscut și adaptativ. De aceea, pentru a desemna funcțiile acestor molecule ele au fost denumite "alarmine" (4). AMPs au capacitatea de a recunoaște factorii declanșatori ai unei infecții sau agresiuni mecanice și de a alerta celulele țintă (2, 3).

Multe tipuri de celule care se găsesc permanent în piele produc AMPs. Dintre acestea amintim: keratinocite, sebocite, glande sudoripare, mastocite. Celulele circulante recrutate în piele, ca neutrofilele și celulele NK, participă la producția de AMPs cutanate (5, 6, 7).

La mamifere s-au descris numeroase proteine care au activitate AMPs demonstrată (1, 3). Astfel, s-au identificat în pielea mamiferelor peste 20 de proteine individuale cu activitate antiinfecțioasă, la care se adaugă numeroase alte molecule cu activități biologice bine definite, dar care exercită și activitate AMPs în piele (8, 9, 10).

Comunicarea și interdependența dintre sistemul imun cutanat și sistemul neuroendocrin este susținută de observații recente care demonstrează: i) capacitatea keratinocitelor de a secreta molecule cu activitate neuroendocrină, ii) inducerea neuropeptidelor în epiderm după agresiune fizică sau bacteriană, iii) dependența

acestor neuropeptide de integritatea barierei naturale a pielii, iv) capacitatea graninelor de a acționa atât ca antibiotice naturale, cât și ca neuropeptide.

## Cromogranine

Acțiunea antibacteriană (3), antifungică (3), antivirală (3) a *graninelor* la nivelul pielii este susținută de observația că aceste molecule sunt exprimate în keratinocite (11), mononuclearele periferice (3), țesuturile neuronale și neuroendocrine localizate în piele.

Celulele Merkel exprimă gena *Chga*, ceea ce permite folosirea acestui marker pentru detecția tumorilor celulelor Merkel. Identificarea CgA în keratinocite și în celulele Merkel furnizează o nouă ipoteză referitoare la rolul imunologic al celei Merkel (11).

Se sugerează că și keratinocitul poate funcționa ca un depozit pentru stocarea CgA. Lezarea țesuturilor sau infecția stimulează keratinocitele și induce eliberarea CgA în mediul extracelular, iar celulele Merkel conferă o supraveghere imunologică cutanată constitutivă.

Studii in vivo și in vitro au demonstrat rolul crucial al CgA în biogeneza granulelor cromafine. CgA este implicată în procesul formării acestor vezicule prin pH, proprietățile de agregare dependente de  $Ca^{2+}$  și catecolamine (11).

Graninele sunt codepozitate în veziculele secretorii din celulele cromafine din medulo-suprarenală și neuronii adrenergici cu catecolaminele, ATP, neuropeptide, acetilcolină,  $Ca^{2+}$ . Graninele au numeroase situsuri de clivare pentru serin endopeptidaze și plasmină. Procesarea proteolitică a graninelor generează peptide, care sunt eliberate în spațiul extracelular după stimulare. Graninele sunt secretate împreună cu catecolaminele în timpul răspunsului la stres. Eliberarea acestor peptide biologice active cu activitate antiinfecțioasă ar putea contracara supresia imunității mediată celular indusă de eliberarea corticoizilor (3). Aceste observații au sugerat existența unei legături directe între expresia graninelor, producția de glucocorticoizi și funcția de imunitate înăscută a pielii.

Cromograninele sunt proteine acide, izolate din granulațiile cromafine din medulo-suprarenală. Au fost descrise în detaliu 3 cromogranine: CgA, CgB, CgC (12).

a. CgA, 51 kDa, este alcătuită din 439 aminoacizi și un peptid semnal de 18 aminoacizi. Este prezentă în celulele suprarenalei, în insulele Langerhans, în insulinoame, în adenoamele hipofizare. În celulele secretoare de insulină și în celulele cromafine, CgA este precursorul catestatinei.

b. CgB, 76 kDa, este alcătuită din 657 aminoacizi și un peptid semnal de 20 aminoacizi. CgB este prezentă în diverse celule secretoare și apare ca un marker universal în adenomul hipofizar și în feocromocitom.

c. CgC, recent identificate

*Gena* umană a CgA este alcătuită din 8 exoni, separați de 7 introni și este localizată pe cromozomul 14q32. Prin translație se obține o proteină de 457 aminoacizi. Proteina matură conține mai multe resturi dibazice de aminoacizi, care sunt potențiale situsuri de clivare pentru PC1/3 și PC2 (prohormone converting endoproteases), care coexistă în granulele secretorii (12). În pielea umană, CgA este proteolitic scindată în fragmente cu activitate antibacteriană a căror expresie crește ca răspuns la infecție și rănire.

Procesarea proteolitică a CgA conduce la obținerea a numeroase peptide cu activitate AMPs. Dintre acestea, amintim:

- **procromacina** (CHGA 79-431 bovină) (3);
- **chromacina I și II** (CHGA 173-194 bovină și CHGA 195-221 bovină) (3);
- **chromofungina** (CHGA 47-86 bovină) (3);
- **vasostatina I** (CHGA 1-76 bovină) care acționează ca vasodilatator (3);
- **pancreastatina** (CHGA 250-301), hormon disglucemic (1);
- **catestatina** (CHGA 352-372), inhibitor al eliberării de catecolamine (1).

## Catestatina

Catestatina este un peptid alcătuit din 20 aminoacizi, exprimat în mononuclearele periferice, care exercită acțiune antiinfecțioasă față de numeroși germeni ce invadează țesutul cutanat (fungi, drojdii, bacterii). Catestatina inhibă eliberarea catecolaminelor din celulele cromafine ale medulosuprarenalei.

Catestatina este un peptid bazic, cu o structură  $\beta$ -pliată caracteristică și altor AMPs. Recent, au fost identificate câteva SNPs ale catestatinei și se

estimează că apar la 4% din populația umană. Acestea includ variantele polimorfice Gly364Ser, Arg372Gly și Pro370Leu (3).

Studii actuale bine documentate și elaborate confirmă că, catestatina este exprimată în keratinocite și este suprareglată după răniri și infecție, ceea ce susține încă odată legătura dintre apărarea antibacteriană a pielii și sistemul neuroendocrin (1).

Activitatea antibacteriană a catestatinei a fost observată față de mutantul *S. aureus*  $\Delta$ mprF. Membrana acestui mutant este lipsită de lizofosfatidilglicerol, ceea ce induce o încărcătură electrică negativă a membranei, o afinitate crescută pentru peptidele cationice și o activitate AMPs ridicată (13). Aceste rezultate sugerează capacitatea catestatinei de a acroșa membrana prin interacțiuni electrostatice (14). Substituțiile Gly364Ser sau Pro370Leu din structura catestatinei induc modificări conformaționale în scheletul peptidului, ceea ce se asociază cu creșterea capacității catestatinei de a interacționa cu membrana și amplificarea efectelor antibacteriene ale mutantilor comparativ cu catestatina de tip sălbatic (15). Activitatea antimicrobiană a catestatinei în piele este susținută de investigațiile in vitro efectuate în ultima perioadă. S-a arătat că efectul antimicrobian în piele este asigurat la concentrații de 5  $\mu$ M catestatină la om și 20  $\mu$ M la șoareci (16). Concentrația locală a catestatinei o depășește pe cea necesară anihilării microorganismelor, deoarece nu se poate determina compartimentul în care este repartizat peptidul și nici distribuția epitopului țintă.

Catestatina este procesată și eliberată în granulele secretorii ale medulosuprarenalei în timpul perioadelor de stres, în timpul infecției și/sau rănirii, ceea ce susține rolul catestatinei în acțiunea directă ca un AMPs. Abundența mRNA pentru Chga este amplificată după infecție, dar nesemnificativ crescută după distrugerea barierei epidermice. Restaurarea artificială a barierei cutanate folosind ocluzia cu latex, inhibă creșterea catestatinei, ceea ce definește rolul integrității structurale a pielii în eliberarea catestatinei. Deci, agresiunea mecanică sau toxică a pielii induce eliberarea în micromediu a catestatinei predepozitate, iar prezența infecției

determină creșterea expresiei genice, ceea ce asigură protecția cutanată (17).

Observații recente au identificat legături directe între producția de CgA și integritatea endotelială, când nivelurile TNF $\alpha$  sunt crescute, între producția de glucocorticoizi, CgA și mobilizarea celulelor imune în timpul infecțiilor cutanate.

Moleculă neuroendocrină secretată de keratinocite, indusă în epiderm după rănire, dependentă de integritatea barierei epidermice și capabilă de a acționa atât ca antibiotic natural cât și ca neuropeptid, catestatina oferă noi informații despre comunicarea dintre sistemul imun cutanat și sistemul nervos. Sunt necesare investigații suplimentare care să elucideze modul în care catestatina participă la imunitatea cutanată (3). Răspunsul la stres, asociat cu starea adaptativă "luptă sau fugi" ar putea influența activitatea neuroendocrină și antimicrobiană a pielii (18).

Studii experimentale susțin rolul catestatinei în reglarea funcțiilor cardiovasculare (1). Un nivel plasmatic scăzut al catestatinei este un factor de risc pentru dezvoltarea hipertensiunii la om. Hipertensiunea arterială la șoarecii Chga knockout este anulată prin injecția exogenă de catestatina.

O abordare sistemică a permis identificarea peptidelor derivate din CgA care inhibă eliberarea altor hormoni. Astfel, pancreastatina inhibă eliberarea insulinei stimulată de glucoză în celulele  $\beta$ , vasostatina inhibă eliberarea PTH și relaxează mușchii netezi vasculari, CgA<sub>344-364</sub> inhibă secreția catecolaminelor stimulată de nicotină (1).

In vitro s-a demonstrat că o secvență alcătuită din 15 resturi de aminoacizi din extremitatea NH<sub>2</sub> asigură activitatea biologică completă a acestei molecule. Relevanța fiziologică de inhibiție a secreției catecolaminelor este asigurată la IC<sub>50</sub> de 200-300 mM catestatină bovină, deși concentrația CgA în granulele celulelor cromafine este considerată a fi de 0.4 mM, iar concentrația CgA în serul bovin este de 7 nM.

Catestatina umană blochează secreția de catecolamine stimulată de nicotină/acetilcolină IC<sub>50</sub> 500-800 nM în celulele PC12 de feocromocitom de șobolan diferențiate sub acțiunea NGF, în celulele cromafine de la șoareci și în

culturile primare de celule cromafine adrenale bovine (1).

Deci, funcțiile catestatinei sunt transspecifice (1). Catestatina manifestă potență crescută și antagonism necompetitiv cu substanța P (peptid inhibitor al eliberării de catecolamine) în secreția de catecolamine. La cea mai mare doză de nicotină (1000  $\mu$ M) catestatina a fost de 16 ori mai puternică decât substanța P (1). Acțiunea antagonică a catestatinei e noncompetitivă deoarece la stimularea celulelor PC12 cu nicotină sau hexametoniu, catestatina inhibă puternic și eficient secreția de catecolamine la orice doză, prin blocarea intrării Na<sup>+</sup> din spațiul extracelular în celulă. Catestatina blochează transducerea semnalului nicotinic colinergic.

## Concluzii

Catestatina acționează ca un antagonist al nAchR printr-un mecanism feedback negativ autocrin care, în final, influențează presiunea sangvină și funcțiile cardiace (1), ca și reglarea fiziologică a răspunsului imun cutanat (3).

Terapiile care controlează expresia catestatinei la nivelul pielii ar putea aduce noi abordări în managementul infecțiilor și al bolilor inflamatorii cutanate.

Intrat în redacție: 15.10.2009

## Bibliografie

1. Radek KA, Lopez-Garcia B, Hupe M, Niesman IR, Elias PM, Taupenot L *et al.* (2008) – The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol* 128: 1525–34.
2. YAMASAKI K., Gallo R. – Antimicrobial peptides in human skin disease, *Eur J Dermatol* 2008; 18.
3. Jürgen Schaubert, and Richard L. Gallo – Antimicrobial peptides and the skin immune defense system, *J Allergy Clin Immunol.* 2008 August; 122 (1): 261–266): 11-21.
4. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. – Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 601: 185–94.
5. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL – Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003; 170: 2274–8.
6. Lee DY, Yamasaki K, Rudsil J, Zouboulis CC, Park GT, Yang JM, *et al.* – Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to

- kill *Propionibacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 2008; 17:17.
7. Braff MH, Zaiou M, Fierer J, Nizet V, Gallo RL. – Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun* 2005; 73: 6771–81.
  8. Cutuli M, Cristiani S, Lipton JM, Catania A. – Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 233–9.
  9. Braff MH, Gallo RL. – Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 306: 91–110.
  10. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Gotz F. – Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 8405–10.
  11. Koljonen V, Haglund C, Tukiainen E, Bohling T (2005) – Neuroendocrine differentiation in primary Merkel cell carcinoma—possible prognostic significance. *Anticancer Res* 25: 853–8.
  12. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT 2003 – Mechanisms of disease: the chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348: 1134–1149.
  13. Oku Y, Kurokawa K, Ichihashi N, Sekimizu K (2004) – Characterization of the *Staphylococcus aureus* *mprF* gene, involved in lysinylation of phosphatidyl-glycerol. *Microbiology* 150: 45–51.
  14. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G *et al.* (2001) – *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* 193: 1067–1076.
  15. Wen G, Mahata SK, Cadman P, Mahata M, Ghosh S, Mahapatra NR *et al.* (2004) – Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am J Hum Genet* 74: 197–207.
  16. Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Hsiao RJ, Barbosa JA, Parmer RJ, O'Connor DT (1990) – Chromogranin A. Storage and release in hypertension. *Hypertension* 15:237–246.
  17. Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL (2005) – Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol* 124: 394–400.
  18. Viswanathan K, Daugherty C, Dhabhar FS (2005) – Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int Immunol* 17: 1059–1069.