

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЯСНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ
имени В.М. Горбатова»

РЕФЕРАТ

по иностранному языку

Тема: «Роль антимикробных пептидов во врожденном иммунитете»

Аспирант:

Ф.И.О.: Василевская Е.Р.

Научный руководитель:

уч. звание, уч. степень: к.т.н.

Ф.И.О.: Федулова Л.В.

Преподаватель:

уч. звание, уч. степень д.п.н., проф.

Ф.И.О. Полушина Л.Н.

Роль антимикробных пептидов во врожденном иммунитете

ТОМАС ГАНЦ

Департамент медицины и патологии и Институт легочных исследований им. Уилла Роджерса, школа медицины при Калифорнийском Университете, Лос-Анджелес, Калифорния 90095-1690

ОБЗОР. Важное средство защиты у эукариот – выработка организмом антимикробных пептидов и белков. Большие антимикробные белки, содержащие более 100 аминокислот, часто способны растворять ферменты и питательные белки или содержат участки, ориентированные на конкретные макромолекулы микроорганизмов. Действие меньших по размеру антимикробных пептидов в значительной степени нарушает структуру или функции микробной клеточных мембран. Сотни антимикробных пептидов были обнаружены в эпителиальных слоях, фагоцитирующих клетках и жидкостях организмов многоклеточных животных, от моллюсков до человека. Некоторые антимикробные пептиды образуются постоянно, другие индуцируются в ответ на инфекцию или воспаление. Исследования регуляции синтеза антимикробных пептидов у дрозофилы были особенно плодотворными, и дали новую опору для анализа защитных реакций млекопитающих. На данный момент известно, что общие закономерности антимикробных реакций беспозвоночных были сохранены у позвоночных («врожденный иммунитет»), где они способствуют защите организма как самостоятельно, так и в сложном взаимодействии с адаптивным иммунитетом.

Антимикробные пептиды – происхождение и определение.

Многоклеточные организмы постоянно защищаются от паразитирования потенциально вредных микробов. При отсутствии проникающего ранения, наиболее чувствительными для проникновения микробов местами являются эпителиальные поверхности (кожа, влажная поверхность глаз, носа, дыхательных путей и легких, рото-

вой полости и желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной и репродуктивной систем). Поскольку механизмы, требующие специфического распознавания антигенов, зависят от клонированного распространения иммуноцитов, то полное развитие начальных механизмов защиты занимает несколько дней, поскольку организм должен узнать конкретные характеристики данного класса микробов и выбрать либо основополагающий механизм, либо быстро индуцируемый.

Некоторые уникальные микробные молекулярные особенности признаются дополнительными рецепторами, которые вызывают локализованные эффекторные механизмы ("механизмы распознавания"), в то время как другие структурные и метаболические характеристики делают микробы выборочно чувствительными к действию вредных антимикробных веществ, в том числе химически высокореактивных молекул, литических ферментов, порообразующих молекул или веществ, которые отделяют необходимые питательные вещества.

Некоторые антимикробные вещества могут присутствовать в организме изначально; частичный синтез или расщепление других антимикробных веществ обычно спровоцировано вторжением микробов, а еще часть антимикробных веществ может быть доставлена в район «вторжения» бактерий подвижными клетками. В отличие от врожденного иммунитета, адаптивный иммунитет (антитела и распознающие антиген цитотоксические лимфоциты) является следствием более высшего эволюционного развития, и развит в полной мере только у высших позвоночных. Специфичность распознавания антигенов лимфоцитами, вероятно, довольно ограничена при первом столкновении с определенным видом бактерий, но она особенно эффективно работает против стойких микробов или против микробов, с которыми организм сталкивался ранее.

Мечников еще в прошлом столетии обратил внимание на врожденные антимикробные свойства эпителиальных поверхностей, придавая особое значение механическому очищению, как, например, происходит во время непрерывного движения слезной пленки поперек фронтальной поверхности глаза. Мечников также отметил, что микробы, проникшие сквозь эпителиальные поверхности, были встречены мобильными

клетками (фагоцитами), которые поглощают и убивают захватчиков. Описав убийство микробов фагоцитами, Мечников предположил, что бактерицидные вещества должны присутствовать именно в фагоцитах, и посчитал, что это «ферменты» (энзимы). В 1920 году Флеминг обнаружил, что подвижное покрытие эпителия содержит антимикробный фермент, который он назвал лизоцим, и показал, что то же самое вещество было обнаружено в фагоцитах в больших количествах. Более поздние исследования определили основной объект лизоцима, как сахарозная связь в муреиновой (пептидогликазной) клеточной стенке бактерии.

За последние 40 лет был охарактеризован целый ряд дополнительных антимикробных веществ, вырабатываемых эпителием, и фагоцитов, начиная от небольших неорганических молекул, таких как пероксид водорода, до больших белковых комплексов, порожденных активацией полного каскада. Антимикробные пептиды обычно называют полипептидами антимикробных веществ, которые кодируются в генах и синтезируются рибосомами, и содержат менее 100 аминокислотных остатков. Это определение выделяет их из большинства (но не из всех) пептидных антибиотиков, бактериальных и грибковых, которые синтезируются определенными метаболическими путями и часто включают в себя экзотические аминокислоты.

1) Симпозиум Сравнительной иммунологии, данные представлены на ежегодном собрании Общества по интегративной и сравнительной биологии, 2-6 января 2002 года в Анахайме, Кальфорния.

2) Электронная почта: tganzen@ucla.edu

Распространение антимикробных пептидов

Большой частью антимикробные пептиды сконцентрированы в тканях животных, наиболее подверженных микробам, или в тех клетках, которые участвуют в защите организма (табл. 1). Эпителиальные поверхности выделяют антимикробные пептиды и из барьера эпителия, и из железистых структур (Zaslouff, 1987; Алмаз и др., 1991; Ouellette и Selsted, 1996; Джонс и Бевинс, 1992). В клетках фагоцитов содержатся несколько типов хранилищ органелл (гранул) для бактерицидных веществ и пищевари-

тельных ферментов (Levy, 1996; Ганц и Lehrer, 1997). В процессе фагоцитоза гранулы сливаются с фагоцитарной вакуолью, которая содержит поглощенные микробы, таким образом, микробы подпадают под удар сильно концентрированных бактерицидных и пищеварительных веществ. Другие гранулы выделяются в межклеточной жидкости, где они убивают микробы или препятствуют их размножению. Антимикробные пептиды в изобилии содержатся в обоих типах гранул (Ganz и др., 1985; Selsted и др., 1984; Cowland и др., 1995.).

У беспозвоночных подвижная часть крови (гемо-лимфа), как и гранулы фагоцитирующих клеток (гемоциты), содержит антимикробные пептиды (Боман и соавт., 1991; Iwanaga и др., 1994). Секреция антимикробных пептидов из жира тела (что эквивалентно секреции в печени у позвоночных) в гемолимфы, судя по всему, является доминирующим механизмом у поврежденных или зараженных насекомых, в то время наиболее важный первоисточник гемоцитов - мечехвосты. У них, как и у позвоночных животных и насекомых, эпителий - прежде всего эпителий кишечника - выделяет тканеспецифические антимикробные пептиды (Richman и Kafatos, 1996; Рихман и др., 1997), вполне вероятно, что именно из-за этой реакции, которая играет важную роль, насекомые устойчивы к кишечным паразитам.

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Почти все антимикробные пептиды являются катионными и амфипатическими. Самая простая структура антимикробного пептида, механизм действия которой были исследованы, соответствует либо α -спирали или бета-шпильке. Пептиды этих двух типов могут образовывать трансмембранные каналы. Длина простой спирали составляет примерно $1,5 \text{ \AA}$ в одном аминокислотном остатке, в то время как бета-шпилька размером примерно $3,5 \text{ \AA}$ в двух остатках. Так как углеводородное ядро фосфолипидной мембраны примерно 30 \AA в диаметре, ему необходимо около двадцати аминокислот, чтобы охватить мембраны либо α -винтового пептида, либо пептида - бета-шпильки. Действительно, простейшие антимикробные пептиды из этих двух классов – это пептиды кожи лягушки magainin (23 аминокислоты) (Bechinger и соавт., 1993;

Ludtke и др., 1996) и свиной пептид протегрин из лейкоцитов (16-18 аминокислот) (Au-Мелас и др., 1996; Fahrner и др., 1996). Существуют и меньшие естественные антимикробные пептиды (например, 12-аминокислотный циклический додекапептид (Ромео и соавт., 1988)), но их мембранная структура и механизм действия не были тщательно исследованы. Совсем недавно было показано, что даже еще более малые искусственные пептиды (из 6 или 8 аминокислот) могут генерировать поры в мембранах, собирая их в нанотрубки (Fernandez-Lopez и соавт., 2001). Вполне возможно, что в природе встречаются малые пептиды, использующие подобные механизмы, и рано или поздно они будут обнаружены.

Существуют три основные гипотезы о том, как нарушение целостности мембран способствует уничтожению микробов. Потеря жизнеспособности микробов может быть связана с кумулятивным эффектом утечки энергии, которая связана с равновесием внутриклеточных и внеклеточных концентраций ионов вплоть до нарушения мембраны. В качестве альтернативы антимикробные пептиды могут войти в клетку-мишень через потерявшие свою целостность мембраны, связаться с пока еще неизвестными внутриклеточными молекулами и вмешаться в их метаболические функции. Наконец, некоторые пептиды могут формировать поры, которые пропускают воду, но не позволяют осмотически активным веществам проникнуть внутрь. Проникновения воды создает осмотическое давление, которое со временем растягивает и нарушает целостность микробной мембраны (Lehrer и соавт., неопубликованное). В любом случае, процессы восстановления могут ограничить или полностью ликвидировать эти повреждения, если пептиды имеют низкую концентрацию или действуют короткое время. Длительное воздействие высоких концентраций противомикробных пептидов препятствует процессам восстановления, тогда воздействие микробов и ущерб станет необратимым.

Конструкция мембранных пор у магаининов (Ludtke и др., 1996; Matsuzaki, 1998; Шай, 1999) и тачуплезинонв ((3-х шпилечные пептиды мечехвостов, Matsuzaki и соавт., 1991) пользуется преимуществом у мембран, богатых анионными фосфолипидами, что является характерным свойством бактериальных мембран. И наоборот,

мембраны клеток животных богаты нейтральными фосфолипидами и холестерином, веществами, которые препятствуют включению этих пептидов в мембраны и образованию пор. Этот механизм объясняет, почему концентрации, необходимые, чтобы убить эукариотические клетки, гораздо выше тех, которые требуются для уничтожения большинства бактерий. По современным данным у других пептидов представлены аналогичные механизмы действия, которые часто встречается в животном и растительном царствах (Lohner и соавт., 1997).

Дефензины (Ganz и Lehrer, 1995) - это особенно многочисленная и широко распространённая группа антимикробных пептидов, которая характеризуется катионными бета-листовыми богатыми амфипатическими структурами, стабилизированными тремя дисульфидами. Они варьируются по размеру от 29 до 47 аминокислот, и содержатся в больших количествах во многих позвоночных гранулоцитах, клетках Панета (специализированных гранулах, которыми богаты кишечные клетки иммунной защиты), и на эпителиальных поверхностях. Подобно простым магацинам и протегринам, дефензины также образуют поры в поражённой мембране. Существует доказательство того, что пермеабиллизация клеток-мишеней нелетальна, до тех пор пока дефенсин не войдет в клетку и не нанесет дополнительные внутриклеточные повреждения (Лихтенштейн, 1991).

Регулирование синтеза и активация антимикробных пептидов

У беспозвоночных животных и растительных организмов, которые не имеют адаптивного иммунитета, антимикробные пептиды представляют собой основной компонент иммунной защиты (Fritig и др., 1998;.. Meister и др., 1997). Многие пептиды, содержащиеся в растениях и беспозвоночных животных (например, дефинзины насекомых и растительные дефинзины) структурно и функционально очень похожи на пептиды, выделенные из позвоночных собратьев, но полная эволюционная цепь до сих пор не установлена. И растения, и беспозвоночные индуцируют синтез антимикробных пептидов в ответ на инфекцию. Канал передачи сигналов и способы, которые опосредуют этот ответ, похожи на острую ответную реакцию животных и использу-

ют аналогичные транскрипционные регуляторы, прежде всего регуляторы семейства Rel/NF-kB. У позвоночных, синтез антимикробных пептидов либо на базовом уровне, либо индуцируется макромолекулами микробов и / или цитокинами. Эпителиальные бета-дефинзины, выделенные из трахеи крупного рогатого скота, являются трахейными антимикробными пептидами (ТАП). Они синтезируются в эпителии дыхательных путей, когда организм подвергается воздействию вдыхаемых бактерий или липополисахарида (Diamond и соавт., 1996). Эта ответная реакция инициируется липополисахаридными рецепторами, которые в конце концов посылают сигнал к транскрипционным регуляторам, включая NF-KB комплекс, действующий на связи NF-KB и инициирующий ТАП-ген. Кроме транскрипционной регуляции синтеза, стимул-зависимая дегрануляция предоставляет собой дополнительный уровень восприимчивости и специфичности. Таким образом, гранулоциты многих позвоночных животных содержат антимикробные пептиды-дефинзины в их фагоцитарных гранулах, и другой класс антимикробных пептидов, кателицидины, в гранулах, предназначенных для внеклеточной секреции (Rice и др., 1987, Сер-Енсен и соавт., 1997). Кишечные клетки Панета, расположенные в нижней части узкой железистой полости в тонком кишечнике, активируют свои богатые дефинзинами гранулы (Ouellette и Selsted, 1996) при воздействии холинергических или бактериальных раздражителей, которые связаны с приемом пищи (Qu и др. др., 1996).

Все известные антимикробные пептиды синтезируются в виде больших прескурсов, содержащих одну или несколько копий активной части пептида, которые освобождены от протеолитической обработки. В простейших случаях сопряженное с трансляцией удаление N-концевого сигнального пептида освобождает активный компонент, но чаще один или несколько анионных частей молекулы также удаляются во время обработки (Valore и Ganz, 1992; Terry и др., 1988; Zasloff, 1987). Пожалуй, самым интригующим и необъяснимым компонентом системы является кателицидин. Он относится к группе пептидов, сохранившей 100 аминокислотных остатков, которые часто протеолитически отщепляются, что приводит к большой вариативности C-концевого антимикробного домена (Дзанетти и соавт., 1995). В фагоцитах кателицидины, как правило, содержатся в виде неактивных предшественников в секреции

гранул. Чаще всего обработанный энзим представляет собой эластазу нейтрофилов, содержащихся в отдельном наборе гранул. Во время фагоцитоза эта бинарная система сочетает в себе еще и генерацию активных антимикробных пептидов. Функции охранных кателицидных доменов еще не до конца изучены.

Спектр действия

Многие антимикробных пептидов проявляют активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов, и даже некоторых вирусов с оболочкой и простейших. Другие пептиды являются более ограниченными по спектру своего действия. Даже незначительные изменения в структуре пептида могут влиять на активность, а систематические отзывы в связи между пептидной структурой и деятельностью являются важной областью будущих исследований. Собраны данные, что многие пептиды действуют синергически с большими полипептидами, чья антимикробная способность несет ферментативный характер (как, например, у лизоцимов), либо зависит от особого обнаружения бактериальных макромолекул (например, бактерицидная проницаемость вызывающие белка, BPI) (Levy и соавт., 1994). Также было описано синергетическое взаимодействие между двумя антимикробными пептидами в коже лягушки, магаинин-2 и ПГЛА, (Westerhoff и соавт., 1995). В дополнение к их воздействию на микробы, некоторые антимикробные пептиды могут функционировать в качестве регуляторных молекул в организме. Например, лабораторные исследования показывают, что дефинзины могут привлекать фагоциты и лимфоциты к очагам инфекции, ингибировать высвобождение кортизола из клеток надпочечников, вызвать пролиферацию фибробластов и изменения ионных потоков в эпителиальных клетках (Ganz и Лех-RER, 1995).

Биологическая роль и последствия наличия функциональных дефектов у антимикробных пептидов.

У насекомых при травмах или инфекциях происходит выделение антимикробных пептидов в жировом теле (у насекомых это эквивалент печени позвоночных) и в течение нескольких часов производит антимикробные гемолимфы (эквивалент крови у насекомых). По крайней мере, есть два различных пути ответной реакции. У дрозофил антигрибковая реакция индуцируется по Толл-ответному пути, который очень похож на спинно-вентральной морфогенетический путь, а также по чрезвычайному передатчику возбуждения у млекопитающих, который включает в себя цитокин интерлейкина-1 (IL-1). Антибактериальное раздражение в меньшей степени характеризуется IMD (ген синдрома иммунной недостаточности) системы. Генетические нарушения этих двух способов возбуждения у дрозофилы блокируют индукцию двух различных наборов антимикробных пептидов и являются причиной повышенной восприимчивости к грибковым или бактериальным инфекциям (Леметр и др., 1996; Meister и др., 1997.).

Свидетельством значительной роли антимикробных пептидов в защите организма млекопитающих является также их накопление. Во время испытаний на грызунах, нарушения в генах матрилизина помешали нормальной активации протеолитических кишечных дефинзинов (криптдинов) и увеличилась восприимчивость этих мышей к кишечным инфекциям (Wilson и соавт., 1999). У свиней при применении экзогенных ингибиторов протеолитической активации кателицидинов происходит рост популяции бактерий в ранах на коже (Cole и соавт., 2001). В наиболее достоверном эксперименте на сегодняшний день мыши с нарушенным геном кателин-зависимых антимикробных пептидов (КЗАМП) показали повышенную восприимчивость к таким инфекциям кожи, как стрептококк группы А (Nizet и соавт., 2001). Таким образом, вмешательство в синтезе и посттрансляционную обработку антимикробного пептида ослабляет устойчивость организма к инфекциям.

Что касается редких заболеваний человека, то в таких случаях сильно уменьшился специфический дефицит гранул, содержание дефинзинов (и, вероятно, некоторых других антимикробных пептидов и белков) в нейтрофильных гранулоцитах. У больных происходит рецидив и развиваются некоторые тяжелые бактериальные инфек-

ции. Интерпретация и определение этого дефекта была сделана на основе сложных белков, выделившихся у больных (Ganz и соавт., 1988).

Взаимодействие антимикробных пептидов с адаптивной иммунной системой

В дополнение к врожденной иммунной системы, присутствующей у всех животных, у позвоночных развилась адаптивная иммунная система, основанная на специфическом распознавании антигенов. Иммуноциты, участвующие в адаптивном иммунитете, обладают весьма разнообразными способами распознавания антигена рецепторами, порожденными соматическими перестройками в генах и соматическими генными мутациями, которые кодируют свои антигенные распознавательные сайты. Когда рецептор связывается с антигеном, иммуноцит подвергается клональной экспансии для создания серии нервных импульсов (или продуцирующих антитела, или способных непосредственно убить захватчика или ячейку, в которой он скрывается). Давно известно, что многие микробные антигены эффективнее вызывают реакцию, чем другие экологические антигены.

Хорошо известным примером практического применения этих экспериментальных наблюдений является использование полученных дополнительных микробов для увеличения числа антител, реагирующих на искусственные иммуногены. В общем, способность адаптивной иммунной системы реагировать более энергично на патогенные микробы может происходить из-за того, что активация врожденного иммунитета генерирует сигналы, активирующие адаптивные реакции чаще и интенсивнее (Хоффман и соавт., 1999). Появляется все больше доказательств того, что антимикробные пептиды, выделяющиеся в ответ на вторжение микробов, могут активировать адаптивный иммунитет (Лиллард, младший и соавт., 1999), по крайней мере частично - за счет привлечения антигенных дендритных клеток к месту инвазии (Yang и др. др., 2001).

Итоги и выводы

Антимикробные пептиды принимают участие в защите организмов беспозвоночных и позвоночных животных, способствуя уничтожению вторгшихся микробов. У высших позвоночных антимикробные пептиды могут также активировать адаптивный иммунитет.

The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity¹

TOMAS GANZ²

Departments of Medicine and Pathology and the Will Rogers Institute for Pulmonary Research, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California 90095-1690

SYNOPSIS. Production of antimicrobial peptides and proteins is an important means of host defense in eukaryotes. The larger antimicrobial proteins, containing more than 100 amino acids, are often lytic enzymes, nutrient-binding proteins or contain sites that target specific microbial macromolecules. The smaller antimicrobial peptides act largely by disrupting the structure or function of microbial cell membranes. Hundreds of antimicrobial peptides have been found in the epithelial layers, phagocytic cells and body fluids of multicellular animals, from mollusks to humans. Some antimicrobial peptides are produced constitutively, others are induced in response to infection or inflammation. Studies of the regulation of antimicrobial peptide synthesis in *Drosophila* have been particularly fruitful, and have provided a new paradigm for the analysis of mammalian host defense responses. It now appears that the general patterns of antimicrobial responses of invertebrates have been preserved in vertebrates (“innate immunity”) where they contribute to host defense both independently and in complex interplay with adaptive immunity.

ANTIMICROBIAL PEPTIDES—BACKGROUND AND DEFINITION

Multicellular organisms continually defend themselves against parasitization by potentially harmful microbes. In the absence of penetrating injury, the most common sites of initial encounter with microbes are the epithelial surfaces (skin, the moist surfaces of the eyes, nose, airways and the lungs, mouth and the digestive tract, and the urinary and reproductive systems). Because mechanisms requiring specific antigen recognition depend on clonal proliferation of immunocytes, and therefore take days to weeks to develop fully, the initial host resistance mechanisms must recognize or target microbe-specific class characteristics and employ mechanisms that are either constitutive or rapidly inducible. Some unique microbial molecular features are recognized by complementary receptors that trigger localized effector mechanisms (“pattern recognition”) while other structural or metabolic characteristics make the microbes selectively susceptible to the action of injurious antimicrobial substances including chemically highly reactive molecules, lytic enzymes, pore-forming molecules, or substances that sequester essential nutrients. Certain antimicrobial substances may be present constitutively; the local synthesis or release of others is provoked by invading microbes; and yet other antimicrobial substances can be brought into the area of invasion by mobile cells. Unlike innate immunity, adaptive immunity (antibodies and antigen-recognizing cytotoxic lymphocytes) is a late evolutionary development developed fully only in higher vertebrates. Specific antigen recognition by lymphocytes probably plays a limited role during the initial encounter but it is especially effective against

persistent microbes or against microbes previously encountered by the host.

The innate antimicrobial properties of epithelial surfaces were noted a century ago by Metchnikoff, who emphasized the cleansing role of mechanical factors such as the continuous movement of the tear film across the frontal surface of the eye. Metchnikoff also observed that microbes that breached the epithelial surfaces were met by mobile cells (phagocytes) that ingested and killed the invaders. Having described the phagocytic killing of microbes, Metchnikoff surmised that microbicidal substances must be present in phagocytes and thought that these were “ferments” (enzymes). In the 1920s, Fleming discovered that the fluid coating the epithelia contained an antimicrobial enzyme which he named lysozyme, and showed that the same substance was also found in abundance in phagocytes. Later studies identified the main target of lysozyme as a sugar linkage in the peptidoglycan cell wall of bacteria.

Over the past 40 years, a number of additional antimicrobial substances produced by epithelia and phagocytes have been characterized, ranging in size from small inorganic molecules such as hydrogen peroxide to large protein complexes such as those generated by the activation of the complement cascade. Antimicrobial peptides are conventionally defined as polypeptide antimicrobial substances, encoded by genes and synthesized by ribosomes, with fewer than 100 amino acid residues. This definition distinguishes them from most (but not all) peptide antibiotics of bacteria and fungi, which are synthesized by specialized metabolic pathways and often incorporate exotic amino acids.

DISTRIBUTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

The highest concentrations of antimicrobial peptides are found in animal tissues exposed to microbes or cell types that are involved in host defense (Table 1). Epithelial surfaces secrete antimicrobial peptides from

¹ From the Symposium *Comparative Immunology* presented at the Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology, 2–6 January 2002, at Anaheim, California.

² E-mail: tganzt@ucla.edu

TABLE 1. Structures, distribution and activities of antimicrobial peptides.

Structure	Representative peptides	Species and tissue	Antimicrobial activity (reported)
4-disulfide α -helix + (3-sheet	plant defensins drosomycin	plants arthropod hemolymph	fungi
3-disulfide (3-sheet-rich	α -defensins (3-defensins)	vertebrate neutrophils epithelia	bacteria, fungi, enveloped viruses
3-disulfide α -helix + (3-sheet	insect defensins	arthropod hemolymph molluscs	Gram + bacteria
3-disulfide 2 α -helices + (3-sheet)'-thionins (crambin)	plants	bacteria, fungi, mammalian cells
2-disulfide (3-sheet	protegrins tachyplesins, polyphemusins	pig neutrophils horseshoe crab hemocytes	bacteria, fungi, enveloped viruses
1-disulfide cyclic	bactenecin-1, cyclic dodecapeptide ranalexin, brevinin	ruminant leukocytes amphibian skin	bacteria
α -helix	cecropins ma- gainin, PGLa LL-37	insect hemolymph amphibian skin mam- malian leukocytes	bacteria
linear with repeating motifs	bactenecins 5 and 7, PR-39, indol- cidin diptericin, apidaecin	mammalian leukocytes insect hemolymph	bacteria

both barrier epithelia and glandular structures (Zaslhoff, 1987; Diamond *et al.*, 1991; Ouellette and Selsted, 1996; Jones and Bevins, 1992). Phagocytic cells contain several types of storage organelles (granules) for microbicidal substances and digestive enzymes (Levy, 1996; Ganz and Lehrer, 1997). In the process of phagocytosis, granules fuse to phagocytic vacuoles that contain ingested microbes, thereby exposing the microbes to very high concentrations of microbicidal and digestive substances. Other granules are secreted into the extracellular fluid where their contents kill microbes or inhibit their multiplication. Both types of granules contain abundant antimicrobial peptides (Ganz *et al.*, 1985; Selsted *et al.*, 1984; Cowland *et al.*, 1995).

In invertebrates, the fluid portion of blood (hemolymph) as well as the granules of phagocytic cells (hemocytes) contain antimicrobial peptides (Boman *et al.*, 1991; Iwanaga *et al.*, 1994). Secretion of antimicrobial peptides from the fat body (equivalent to the liver in vertebrates) into hemolymph appears to be the dominant mechanism in injured or infected insects, while hemocytes may be the more important source in horseshoe crabs. Like in vertebrates, insect epithelia, most prominently the gut, secrete tissue-specific antimicrobial peptides (Richman and Kafatos, 1996; Richman *et al.*, 1997), a response which is likely to be important in insect resistance to intestinal parasites.

STRUCTURES AND MECHANISM OF ACTION

Almost all antimicrobial peptides are cationic and amphipathic. The simplest antimicrobial peptide structures whose mechanism of action has been investigated are either α -helices or (3-hairpins. Both types of peptides can form transmembrane channels. The length of a simple α -helix is approximately 1.5 Å per amino acid residue whereas that of a (3-hairpin is roughly 3.5 Å per two residues. Since the hydrocarbon core of the phospholipid membrane is roughly 30 Å across it takes

about twenty amino acids to span the membrane by either an α -helical or (3-hairpin peptide. Indeed, the simplest antimicrobial peptides of these two classes are the frog skin peptide magainin (23 amino acids) (Bechinger *et al.*, 1993; Ludtke *et al.*, 1996) and the pig leukocyte peptide protegrin (16–18 amino acids) (Aumelas *et al.*, 1996; Fahrner *et al.*, 1996). Smaller natural antimicrobial peptides exist (*e.g.*, the 12 amino acid cyclic dodecapeptide (Romeo *et al.*, 1988)) but their structure in membranes and their mechanism of action have not been extensively investigated. More recently, it has been demonstrated that even smaller artificial peptides (6 or 8 amino acids) can generate pores in membranes by assembling into nanotubes (Fernandez-Lopez *et al.*, 2001). It is possible that naturally occurring small peptides that employ similar mechanisms will be discovered.

There are three major hypotheses about how the disruption of membrane integrity kills the target microbes. The loss of microbial viability may be due to the cumulative effects of energy drain due to the equilibration of intracellular and extracellular ion concentrations through the disrupted membrane. Alternatively, antimicrobial peptides may enter the target cell through the disrupted membrane, bind to as yet unknown intracellular molecules and interfere with their metabolic function. Finally, some peptides may generate pores that admit water but do not allow osmotically active substances to pass. The entry of water generates osmotic pressure that eventually stretches and breaks the microbial membrane (Lehrer *et al.*, unpublished). Either way, repair processes may limit or reverse these lesions when peptide concentrations are low or limited in time. Prolonged exposure to higher concentrations of antimicrobial peptides overwhelms the repair capacity of the microbe and the damage becomes irreversible.

The assembly of membrane pores by magainins (Ludtke *et al.*, 1996; Matsuzaki, 1998; Shai, 1999) and

tachyplesins (β -hairpin peptides from horseshoe crab hemocytes) (Matsuzaki *et al.*, 1991) is favored by membranes that are rich in anionic phospholipids, a characteristic property of bacterial membranes. Conversely, the cell membranes of animals are rich in neutral phospholipids and cholesterol, substances that inhibit the incorporation of these peptides into membranes and the formation of pores. This mechanism explains why the concentrations necessary to kill eukaryotic cells are much higher than those required for killing most bacteria. Current evidence favors similar mechanisms of action for other peptides commonly found in the animal and plant kingdoms (Lohner *et al.*, 1997).

Defensins (Ganz and Lehrer, 1995) are particularly abundant and widely distributed antimicrobial peptides characterized by a cationic β -sheet rich amphipathic structure stabilized by a conserved three-disulfide motif. They range in size from 29 to 47 amino acids, and are abundant in many vertebrate granulocytes, Paneth cells (specialized granule-rich intestinal host defense cells), and on epithelial surfaces. Like the simpler magainins and protegrins, defensins also form pores in target membranes. There is evidence that the permeabilization of target cells is nonlethal unless followed by defensin entry into the cell and additional intracellular damage (Lichtenstein, 1991).

REGULATION OF SYNTHESIS AND RELEASE

In invertebrates and plants, organisms that lack adaptive immunity, antimicrobial peptides constitute a major component of host defense (Fritig *et al.*, 1998; Meister *et al.*, 1997). Many of the plant and invertebrate peptides (e.g., insect defensins and plant defensins) structurally and functionally resemble their vertebrate counterparts but a comprehensive evolutionary lineage has not yet been established. Both plants and invertebrates induce the synthesis of antimicrobial peptides in response to infection. The signaling pathways that mediate this response are similar to the acute phase response in animals and employ similar transcriptional regulators, most prominently the rel/NF-KB family. In vertebrates, antimicrobial peptide synthesis is either constitutive or inducible by microbial macromolecules and/or cytokines. The epithelial β -defensin of the bovine trachea, the tracheal antimicrobial peptide (TAP), is synthesized in the airway epithelia when these are exposed to inhaled bacteria or lipopolysaccharide (Diamond *et al.*, 1996). This response is initiated by lipopolysaccharide receptors that ultimately signal to transcriptional regulators including the NF-KB complex, acting on NF-KB binding motifs in the promoter of the TAP gene. In addition to transcriptional regulation of synthesis, stimulus-dependent degranulation provides an additional level of responsiveness and specificity. Thus the granulocytes of many vertebrates contain antimicrobial defensin peptides in their phagocytic granules and another class of antimicrobial peptides, cathelicidins, in granules destined for extracellular secretion (Rice *et al.*, 1987; Sor-

ensen *et al.*, 1997). Intestinal Paneth cells, positioned at the bottom of narrow crypts in the small intestine, release their defensin-rich granules (Ouellette and Selsted, 1996) upon stimulation by cholinergic or bacterial stimuli, both of which are associated with food ingestion (Qu *et al.*, 1996).

All known antimicrobial peptides are synthesized as larger precursors, containing one or multiple copies of the active peptide segment which are released by proteolytic processing. In the simplest cases the cotranslational removal of an N-terminal signal peptide frees the active moiety but more commonly one or more anionic propieces are also removed during processing (Valore and Ganz, 1992; Terry *et al.*, 1988; Zasloff, 1987). Perhaps the most intriguing and as yet unexplained processing pattern is seen with cathelicidins, a group of peptides with a conserved 100 amino acid domain that is frequently proteolytically cleaved from the highly variable C-terminal antimicrobial domain (Zanetti *et al.*, 1995). In phagocytes, the cathelicidins are commonly stored as inactive precursors in secretory granules. In many cases, the processing enzyme is neutrophil elastase contained in a separate set of storage granules. During phagocytosis, this binary system combines to generate active antimicrobial peptides. The function of the highly conserved cathelin domain is not yet known.

SPECTRUM OF ACTIVITY

Many antimicrobial peptides display activity against gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts and fungi, and even certain enveloped viruses and protozoa. Other peptides are more restricted in their spectrum. Even minor variations in peptide structure can influence activity, and a systematic understanding of the relationship between peptide structure and activity is an important area for future investigations. Evidence is accumulating that many peptides act synergistically with larger polypeptides whose antimicrobial activity is enzymatic (e.g., lysozyme) or is dependent on specific recognition of bacterial macromolecules (e.g., the bactericidal permeability-inducing protein, BPI) (Levy *et al.*, 1994). Synergistic interactions between two antimicrobial peptides in the frog skin, magainin 2 and PGLa, have also been reported (Westerhoff *et al.*, 1995). In addition to their action on microbes, some antimicrobial peptides can function as regulatory molecules in the host. For example, *in vitro* studies suggest that defensins can attract phagocytes and lymphocytes to sites of infection, inhibit the release of cortisol from adrenal cells, induce the proliferation of fibroblasts and modify ionic fluxes in epithelial cells (Ganz and Lehrer, 1995).

BIOLOGICAL ROLE AND CONSEQUENCES OF DEFECTS IN THE FUNCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

In insects, injury or infection elicits the production of antimicrobial peptides in the fat body (the insect equivalent of the vertebrate liver) and within a few hours renders the insect hemolymph (the insect equiv-

alent of blood) antimicrobial. At least two distinct pathways participate in the induction response. In *Drosophila*, the antifungal response is induced by the Toll signaling pathway that is very similar to the dorsoventral morphogenetic pathway as well as to the acute phase response in mammals, which involves the cytokine interleukin-1 (IL-1). The antibacterial response involves a less extensively characterized *imd* (immune deficiency gene) system. Genetic disruption of these two pathways in *Drosophila* blocks the induction of two distinct sets of antimicrobial peptides and causes increased susceptibility to fungal or bacterial infections, respectively (Lemaitre *et al.*, 1996; Meister *et al.*, 1997).

Evidence for the significant role of antimicrobial peptides in the host defense of mammals is also accumulating. In mouse knockout models, the disruption of the matrilysin gene prevented the normal proteolytic activation of intestinal defensins (cryptidins) and increased the susceptibility of these mice to intestinal infections (Wilson *et al.*, 1999). In pigs, the application of an exogenous inhibitor of the proteolytic activation of cathelicidins increased bacterial proliferation in skin wounds (Cole *et al.*, 2001). In the most direct experiment to date, mice with disrupted genes for the cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) showed increased susceptibility to skin infections with group A streptococci (Nizet *et al.*, 2001). Thus, interference with synthesis and posttranslational processing of antimicrobial peptides weakens host resistance to infections.

In a rare human disease, specific granule deficiency, the content of defensins (and probably several other antimicrobial peptides and proteins as well) in neutrophil granulocytes is severely decreased. The patients develop recurrent and severe bacterial infections. However, the interpretation and attribution of this defect is made complex by the multiple proteins affected (Ganz *et al.*, 1988).

INTERACTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES WITH THE ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM

In addition to the innate immune system present in all animals, vertebrates evolved an adaptive immune system based on specific recognition of antigens. The immunocytes involved in adaptive immunity possess highly diverse antigen recognition receptors generated by somatic gene rearrangements and somatic mutations in the genes that encode their antigen recognition sites. When its receptor binds an antigen, the immunocyte undergoes clonal expansion to generate an effector population (either antibody-producing or capable of directly killing the invader or the cell harboring it). It has long been known that many microbial antigens are more effective in eliciting this response than other environmental antigens. A well-known practical application of this observation is the use of microbe-derived adjuvants to increase antibody responses to artificial immunogens. Broadly speaking, the ability of the adaptive immune system to respond more vigor-

ously to pathogenic microbes can be accounted for by positing that the activation of the innate immune responses generates signals that make the activation of adaptive responses more likely or more intense (Hoffmann *et al.*, 1999). There is increasing evidence that antimicrobial peptides released in response to microbial invasion can activate adaptive immunity (Lillard, Jr. *et al.*, 1999), at least in part by attracting antigen-presenting dendritic cells to the site of invasion (Yang *et al.*, 2001).

Summary and conclusions

Antimicrobial peptides participate in host defense of invertebrates and vertebrates by contributing to the killing of invading microbes. In higher vertebrates, antimicrobial peptides may also activate adaptive immunity.

REFERENCES

- Aumelas, A., M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despau, G. Grassy, B. Calas, and A. Chavanieu. 1996. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur. J. Biochem.* 237:575–583.
- Bechinger, B., M. Zasloff, and S. J. Opella. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 2:2077–2084.
- Boman, H. G., I. Faye, G. H. Gudmundsson, J. Y. Lee, and D. A. Lidholm. 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 201:23–31.
- Cole, A. M., J. Shi, A. Ceccarelli, Y. H. Kim, A. Park, and T. Ganz. 2001. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood* 97:297–304.
- Cowland, J. B., A. H. Johnsen, and N. Borregaard. 1995. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* 368:173–176.
- Diamond, G., J. P. Russell, and C. L. Bevins. 1996. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:5156–5160.
- Diamond, G., M. Zasloff, H. Eck, M. Brasseur, W. L. Maloy, and C. L. Bevins. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3952–3956.
- Fahrner, R. I., T. Dieckmann, S. S. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, and J. Feigon. 1996. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem. Biol.* 3:543–550.
- Fernandez-Lopez, S., H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, and M. R. Ghadiri. 2001. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature* 412:452–455.
- Fritig, B., T. Heitz, and M. Legrand. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10:16–22.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer. 1995. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66: 191–205.
- Ganz, T. and R. I. Lehrer. 1997. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 4:53–58.
- Ganz, T., J. A. Metcalf, J. I. Gallin, L. A. Boxer, and R. I. Lehrer. 1988. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J. Clin. Invest.* 82:552–556.
- Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76:1427–1435.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz.

1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313–1318.
- Iwanaga, S., T. Muta, T. Shigenaga, Y. Miura, N. Seki, T. Saito, and S. Kawabata. 1994. Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 712:102–116.
- Jones, D. E. and C. L. Bevins. 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267:23216–23225.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973–983.
- Levy, O. 1996. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Haematol.* 56:263–277.
- Levy, O., C. E. Ooi, J. Weiss, R. I. Lehrer, and P. Elsbach. 1994. Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 94:672–682.
- Lichtenstein, A. 1991. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J. Clin. Invest.* 88:93–100.
- Lillard, J. W., Jr., P. N. Boyaka, O. Chertov, J. J. Oppenheim, and J. R. McGhee. 1999. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:651–656.
- Lohner, K., A. Latal, R. I. Lehrer, and T. Ganz. 1997. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 36:1525–1531.
- Ludtke, S. J., K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35:13723–13728.
- Matsuzaki, K. 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376:391–400.
- Matsuzaki, K., M. Fukui, N. Fujii, and K. Miyajima. 1991. Interactions of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1070:259–264.
- Meister, M., B. Lemaitre, and J. A. Hoffmann. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays* 19:1019–1026.
- Nizet, V., T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R. A. Dorschner, V. Pestonjamas, J. Piraino, K. Huttner, and R. L. Gallo. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454–457.
- Ouellette, A. J. and M. E. Selsted. 1996. Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10:1280–1289.
- Qu, X. D., K. C. Lloyd, J. H. Walsh, and R. I. Lehrer. 1996. Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. *Infect. Immun.* 64:5161–5165.
- Rice, W. G., T. Ganz, J. M. Kinkade, Jr., M. E. Selsted, R. I. Lehrer, and R. T. Parnley. 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70:757–765.
- Richman, A. and F. C. Kafatos. 1996. Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8:14–19.
- Richman, A. M., G. Dimopoulos, D. Seeley, and F. C. Kafatos. 1997. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.* 16:6114–6119.
- Romeo, D., B. Skerlavaj, M. Bolognesi, and R. Gennaro. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263:9573–9575.
- Selsted, M. E., D. Szklarek, and R. I. Lehrer. 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45:150–154.
- Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462:55–70.
- Sorensen, O., K. Arnljots, J. B. Cowland, D. F. Bainton, and N. Borregaard. 1997. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* 90:2796–2803.
- Terry, A. S., L. Poulter, D. H. Williams, J. C. Nutkins, M. G. Giovannini, C. H. Moore, and B. W. Gibson. 1988. The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide. *J. Biol. Chem.* 263:5745–5751.
- Valore, E. V. and T. Ganz. 1992. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79:1538–1544.
- Westerhoff, H. V., M. Zasloff, J. L. Rosner, R. W. Hendler, A. De Waal, A. Vaz Gomes, P. M. Jongsma, A. Riethorst, and D. Jurcic. 1995. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *Eur. J. Biochem.* 228:257–264.
- Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286:113–117.
- Yang, D., O. Chertov, and J. J. Oppenheim. 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* 58:978–989.
- Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo. 1995. Cathelicidins: A novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374:1–5.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5449–5453.