

Den første forsvarslinje

Små, positivt ladede peptider er den mest primitive, men dog meget effektive forsvarslinje mod infektioner fra de fleste patogener. En del af det medfødte immunforsvar, der deles af alle levende organismer, lærer os nye måder at bekæmpe antibiotika-resistente patogener på

Af Dan Ifrah, Paul R. Hansen, og Xavier Doisy, Kemisk Institut, KVL

Alle levende organismer har udviklet forsvarsmekanismer mod patogener, mekanismer der er arts- og miljøspecifikke. Organismer udsættes for talrige potentielle patogener og har brug for et stærkt immunrespons. Alle levende organismer har et medfødt immunrespons. Det er en af de ældste og mest udbredte forsvarsmekanismer, og det har skabt særlig interesse for små kationiske antimikrobielle peptider (CAPs).

Det tilpassede immunrespons aktiveres ved at en kompleks række af begivenheder sættes i gang, hvilket kan tage dage. CAPs syntetiseres derimod hele tiden. Når der kræves et større respons, induceres der f.eks. single gen-indkodede CAPs som respons på lipopolysaccharider (LPS, en stor bestanddel af ydre membraner i Gram-negative bakterier) [1]. Antimikrobielle peptider er også vigtige »effector«-molekyler, der giver sekundær respons, når der er et passende immunsignal til stede. Som en første forsvarslinje er antimikrobielle peptider effektive, fordi target bakterieceller hurtigt dræbes. De er aktive mange steder (Gram-negative og Gram-positive bakterier, fungi, vira, tumorceller etc.), syntetiseres efter den første stimulering i store mængder på kort tid og virker som »effector«-molekyler, der forbinder det medfødte immunforsvar med det tilpassede [2].

Peptiderne oplagres i granuler i immunceller, fagocytter, epitelceller (lunger, luftrør, øjne etc.) og frigives som en første forsvarslinje mod infektioner.

Peptiderne er meget forskellige og fordelingen i plante-, insekt- og dyreriget

er varieret. Den store variation af CAPs vidner om deres plads i evolutionen, hvor tilpasning til miljøet har givet artsspecifikke klasser [3].

I første omgang studeredes især hvirvelløse dyr og amfibium (dyr der kan leve både i vand og på landjorden) som mulige kilder til antimikrobielle peptider (bier, skorpioner, frøer etc.). Det blev dog hurtigt klart, at alle levende organismer måtte være udstyret

med et lignende immunforsvar (ud over den tilpassede mekanisme). Det viste sig, at hvirveldyr har antimikrobielle peptider, bl.a. defensiner og cathelicidiner. De sidste to årtier er over 500 antimikrobielle peptider blevet karakteriseret og sekventeret (www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi.pag1.html). Meget af denne forskning har fokuseret på forståelsen af mekanismen, forbedring af peptidernes aktivitetsniveau og begrænsning af deres celletoksicitet.

Oprindelse og struktur

Selv om peptiderne er meget forskellige mht. længde, sekvenser og sekundær struktur har de alle særlige egenskaber, som gør dem velegnede til bakteriebekæmpelse. De er sædvanligvis polykationiske med en samlet positiv ladning, der stammer fra lysin og/eller arginin-enheder, de er amfifile, har en karakteristisk hydrofob og hydrofil overflade og består af mindre end 60 aminosyrer.

På trods af de store strukturelle forskelle og de store sekvensvariationer kan de fleste CAPs kategoriseres i fire store grupper (tabel 1):

1. Cystein-indeholdende peptider danner en eller flere disulfidbroer. α - og β -defensiner fra neutrofile granulocytter og epitelceller udgør f.eks. en stiv amfipatisk triple-strengt antiparallel β -sheet-struktur med tre disulfidbroer [4].

Peptider	Strukturel klasse	Aminosyresekvens
Cecropin P1	α -helix	SWLSKTAKKLENSAKKRRISEGAIAIQGGPR
Magainin II	α -helix	GIGKFLHSACKKFGKAFVGEIMNS
Kanin α -defensin (NP-1)	β -sheet	WC ₁ AC ₂ RRALC ₃ LPRERRAGFC ₃ RIRGRIHLC ₂ C ₁ RR
Human β -defensin	β -sheet	DHYN ₁ VSSGQC ₂ LYSAC ₃ PIFTKIQC ₂ YRGKAKC ₁ C ₁ K
Svineprotegrin 1	β -sheet	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₂ VC ₁ VGR-NH ₂
Kvæg act enicin	loop	RLC ₁ RIVVIRVC ₁ R
Brevinin 1E	loop	FLPLLAGLAANFLPKIFC ₁ KITRKC ₁
Kvæg ind olicidin	udvidet	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂
Svine PR39	udvidet	RRRRPPPYLPRPRPPPPFPRLPPRIPPGFPPRFPPRF-NH ₂
Aminosyrer i fed er positivt ladede ved neutral pH; de nedløjtede tal ved C repræsenterer forbindende disulfidbroer.		

Tabel 1. Eksempler på forskellige CAP-strukturer.

Peptider	Effekt	Rolle i immunsystemet	Refs
α - and β -defensiner	Induceres ved betændelse	Syntese induceres af bakteriel infektion	[4, 12]
α -defensiner	Induceres IL-8 i epiteceller	Rekrutterer neutrofiler	[13]
PR-39	Chemotaxis af neutrofiler	Forøger fagocytisk aktivitet	[2]
LL-37 (cathelicidin)	Chemotaxis af T-celler	Rekrutterer T-hjælpeceller og initierer cellulært immunrespons	[11]

Tabel 2. CAPs som »effector«-molekyler

- Lineære peptider (f.eks. cecropin fra silkesommerfugle og magainin fra frøskind [4]) er ofte tilfældigt snoet i et polært miljø. I et hydrofobt miljø associerer de med libidbilaget i bakterielle membraner og får en α -helisk amfifil struktur [5].
- Peptider, der defineres af en disulfidbro, er loop-strukturer med haler. Brevinin fra frøskind har en disulfidbro ved den ekstreme ende af C-terminus såvel som Bactenecin fra ko- og fåreneutrofiler [6].
- Peptider med en eller flere aminosyrer som er overudtrykt, f.eks. histatin fra humane spytkirtler (rige på histidin [7]) og indolicidin fra okseneutrofiler (rige på tryptophan [8]).

De bedst kendte antimikrobielle pattedyrspeptider er cathelicidiner og defensiner.

Cathelicidiner findes i neutrofiler og er naturligt opbevarede precursorer. De spaltes enzymatisk til en meget effektiv antibakteriel agent, der frigives ekstracellulært [9].

Defensiner syntetiseres også som prepropeptider og lagres i fagocytiske vakuoler. De frigives inde i cellen som respons på infektion [10]. Ud over at være effektive antibakterielle agenter initierer cathelicidiner og defensiner et tilpasset respons [11]. CAPs fungerer ofte som »effector«-molekyler, der kommunikerer og sender specifikke beskeder mellem det medfødte og det tilpassede immunsystem. Det resulterer f.eks. i (tabel 2) degranulering af neutrofiler, hvilket frigiver store mængder peptider og initierer pro-betændelsesprocesser [10].

Aktivitetsmekanisme og toksicitet

Den stigende interesse for CAPs skyldes den voksende bakterielle resistens mod traditionel antibiotika. Patogener kan udvikle utallige komplekse mekanismer til at modstå antibiotika: udstrømningspumper, modifikation af membranreceptorer, modifikation af transmembranporer etc. [14]. En af CAPs vigtigste egenskaber er den positive ladning, der favoriserer elektrostatiske interaktioner med bakterielle membraner, der indeholder negativt ladede sure phospholipider [3]. Dyre- og plante-ydermembraner består af elektrisk neutrale zwitterioniske phospholipider (phosphatidylcholin og sphingomyelin), og det er derfor mindre sandsynligt, at de elektrostatisk tiltrækker de positivt ladede peptider. Ud over den positive ladning kan peptidernes hydrofobe egenskaber bruges til at forudsige deres celletoksicitet over for eukaryote celler [15].

Selv om en del CAPs er aktive inden for et bredt spektrum, er de fleste peptider kun aktive mod visse typer mikroorganismer. Derfor er effektiviteten også baseret på synergi mellem forskellige typer peptider, der syntetiseres af specialiseret væv, såvel som andre komponenter i det medfødte immunforsvar (som lactoferrin [16] og lysozym [17]).

Pga. den vigtige forskel mellem deres membraner har Gram-positive og Gram-negative bakterier forskelligt respons over for samme CAP. Derfor skal man have et godt kendskab til

begge bakterielle membraner for at kunne designe effektive peptider. Peptiderne skal kunne skelne mellem bakterielle membraner og pattedyrs-membraner, hvorved celletoksiske bivirkninger som f.eks. rød blodcellehæmolyse undgås. CAPs har en meget skarp-sindig og selektiv aktivitets- og genkendelsesmekanisme. Modificeres graden af

hydrofobe egenskaber ved at tilføje eller fjerne en positivt ladet enhed ændres peptidernes effektivitet og selektivitet for target dramatisk [18]. Gennem de sidste to årtier er visse mønstre dukket op som et resultat af omfattende studier af strukturaktivitet af forskellige klasser af CAPs.

To kriterier ser ud til at være vigtige: kationiske egenskaber og et hydrofobt indhold på mindst 50%. Selv om CAPs præcise drabsmekanisme for bakterier stadig debatteres, har Shai-Matsuzaki-Huang-modellen forudsagt et vist antal trin [19-21]:

- peptiderne tiltrækkes elektrostatisk til den bakterielle celleoverflade, den såkaldte selvpromoverende genkendelses-»pathway« og
- når en tærskel i ratioen peptid/lipid nås, organiserer peptiderne sig og danner en permeations-»pathway« [22].

Der er to hypoteser:

I »the carpet mechanism theory« dækker peptiderne den bakterielle membran. Når peptiderne når en vis koncentration, vil de virke som detergenter og lave huller i den bakterielle membran.

I »the barrel-stave mechanism theory« [23] vil peptiderne efter at have nået en vis grænse spontant organisere sig selv i aggregater. Disse strukturer danner porer i den bakterielle membran og ødelægger den osmotiske balance og det elektriske potentiale, hvilket resulterer i bakteriel celledød [24].

En tredje mindre udforsket teori går ud på, at peptiderne bruger deres fysio-kemiske egenskaber til at passere gennem den bakterielle membran. Når de er inde i bakterien, når de deres egentlige mål (nukleinsyrer, proteiner). Ændring af DNA-syntesen eller forstyrrelse af proteinsyntesen indikerer at visse CAPs virkelig reagerer på denne måde.

Resistens er stadig et problem

For at kunne bruge CAPs som et alternativ til bakterielt resistente antibiotika skal deres aktivitet og specificitet forstærkes. In vivo-studier har vist, at det kræver en meget højere dosis af CAP at påvirke membranlækager i bakterien. Det samme gælder inaktivering af visse CAPs forårsaget af metal-ioner, serum, proteaser og høje saltkoncentrationer (f.eks. defensiner i epitellungevæv [25]). Utallige forsøg på at indføre modstand mod visse CAPs [26] sammenlignet med traditionelt antibiotika er ikke lykkedes. Det demonstrerer, hvor vigtige CAPs kan være som alternativ i kampen mod resistente patogener [27,28]. En forklaring er det besvær og den energi, der kræves for bakterien modificerer sin cellemembran til at overføre resistens. Det står i modsætning til traditionelle antibiotika, der har specifikke targets, som effektivt kan modificeres af bakterien.

På trods af CAPs ideale natur som et alternativ til »traditionelle« antibiotika, har de vist tegn på resistens: tilfælde af resistens er blevet påvist i visse bakterier, hvor ydermembranen f.eks. modificeres ved at reducere antallet af negative ladninger eller forøge antallet af positive. Det afspejler kun den langvarige sameksistens mellem mennesker og bakterier [29,30].

Der er behov for, at man globalt begrænser den skade, der skyldes overdreven receptudskrivning og rutinemæssig supplement af fødevarer og varer med antimikrobielle midler [31].

Konklusion

Gennem de sidste 50 år har ubetænksom brug af antibiotika på globalt plan skabt et evolutionært pres på bakterierne. Deres svar på preset var resistens over for mange antibiotika inklusive vancomycin. Den dramatiske situation har medført en søgen efter antibiotika med nye reaktionsmekanismer og CAPs er lovende kandidater.

Artiklen er oversat fra engelsk af redaktionen for Dansk Kemi.

E-mail-adresser:

Dan Ifrah: dif@kvl.dk

Paul R. Hansen: prh@kvl.dk

Xavier Doisy: xd@kvl.dk

Referencer:

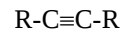
- Hancock, R.E.W.; Scott, M.G., The role of antimicrobial peptides in animal defences. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2000, 97, 8856-8861.
- Gudmundsson, G.H.; Agerberth, B., Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J. Immunol. Methods*, 1999, 232, 45-54.
- Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415, 389-395.
- O'Neil, D.A.; Porter, E. M.; Elewaut, D.; Anderson, G. M.; Eckmann, L.; Ganz, T.; Kagnoff, M. F., Expression and regulation of the human b-Defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 1999, 163, p. 6718-6724.
- Bechinger, B., Structure and functions of channel forming peptides: Magainin, Cecropins, Melittin, and Alamethicin. *J. Membrane Biol.*, 1997, 156, 197-211.
- Kumari, V.K.; Nagaraj, R., Structure-function studies on the amphibian peptide brevinin 1E: translocating the cationic segment from the C-terminal end to a central position favours selective antibacterial activity. *J. Peptide Res.*, 2002, 58, 433-441.
- Helmerhorst, E.J., Characterization of Histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 5643-5649.
- Staubitz, P., Structure-function relationships in the Tryptophan-rich antimicrobial peptide Indolicidin. *J. Peptide Sci.*, 2001, 7, 552-564.
- De, Yang; Chen, Q.; Schmidt, A. P.; Anderson, G. M.; Wang, J. M.; Wooters, J.; Oppenheim, J. J.; Chertov, O., LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived Cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood Neutrophils, Monocytes, and T-cells. *J. Exp. Med.*, 2000, 192, 1069-1074.
- Yang, D.C., O.; Oppenheim, J. J., The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defences and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, 58, 978-989.
- Chertov, O.; Michiel, D. F.; Xu, L.; Wang, J. M.; Tani, K.; Murphy, W. J.; Longo, D. L.; Taub, D. D.; Oppenheim, J. J., Identification of Defensin-1, Defensin-2, and CAP37/Azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from Interleukin-8-stimulated Neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 2935-2940.
- Stolzenberg, E. D.; Anderson, G. M.; Ackermann, M. R.; Whitlock, R. H.; Zasloff, M., Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 8686-8690.
- Van Wetering, S.; Mannesse-Lazeroms, S. P.; Van Sterkenburg, M. A.; Daha, M. R.; Dijkman, J. H.; Hiemstra, P. S., Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272, L888-96.
- Markham, P. N.; Neyfakh, A. A., Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, 4, 509-514.
- Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M., Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 2001, 501, 146-150.
- Nibbering, P.H.; Ravensbergen, E.; Welling, M. M.; van Berkel, L. A.; van Berkel, P. H. C.; Pauwels, E. K. J.; Nuijens, J. H., Human Lactoferrin and peptides derived from its N-terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect. Immunol.*, 2001, 69, 1469-1476.
- Masschalck, B.; Van Houdt, R.; Van Haver, E. G. R.; Michiels, C. W.,

- Inactivation of Gram-negative bacteria by Lysozyme, denatured Lysozyme, and Lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 339-344.
- Subbalakshmi, C.; Bikshapathy, E.; Sitaram, N.; Nagaraj, R., Antibacterial and hemolytic activities of single Tryptophan analogs of Indolicidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 274, 714-716.
 - Yang, L.; Weiss, T. M.; Lehrer, R. I.; Huang, H. W., Crystallization of antimicrobial pores in membranes: Magainin and Protegrin. *Biophys. J.*, 2000, 79, 2002-2009.
 - Matsuzaki, K., Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defence? Magainins and Tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462, 1-10.
 - Shai, Y., Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by a-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462, 55-70.
 - Shai, Y., From innate to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr. Pharm. Design*, 2002, 8, 715-725.
 - Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y., Interaction of antimicrobial Dermaseptin and its fluorescently labelled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 1992, 31, 12416-12423.
 - Ehrenstein, G.; Lecar, H., Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.*, 1977, 10, 1-34.
 - Shin, S.Y.; Sung-Tae, Y.; Park, E. J.; Eom, S. H.; Song, W. K.; Kim, Y.; Hahn, K.-S.; Kim, J. I., Salt resistance and synergistic effect with Vancomycin of a-helical antimicrobial peptide P18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 290, 558-562.
 - Mor, A., Peptide-based antibiotics: A potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Dev. Res.*, 2000, 50, 440-447.
 - Steinberg, D.; Hurst, M. A.; Fujii, C. A.; Kung, A. H.; Ho, J. F.; Cheng, F. C.; Loury, D. J.; Fiddes, J. C., Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41, 1738-1742.
 - Moellering, J.R.C., Antibiotic resistance: Lessons for the future. *Clin. Infect. Dis.*, 1998, 27, 135-142.
 - Peschel, A.; Collins, L.V., Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides*, 2001, 22, 1651-1659.
 - Peschel, A.; Jack, R. W.; Otto, M.; Collins, L. V.; Staubitz, P.; Nicholson, G.; Kalbacher, H.; Nieuwenhuizen, W. F.; Jung, G.; Tarkowski, A.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G., 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.*, 2001, 193, 1067-1076.
 - Anderson, R., The pandemic of antibiotic resistance. *Nat. Med.*, 1999, 5, 147-149.

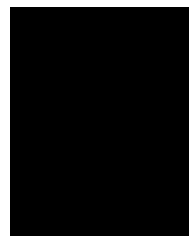
Nyt om cyclopentyn

Noriyuki Suzuki i Japan har sammen med medarbejdere fremstillet et stof med en cyclopentynring, se figur.

De fleste af Dansk Kemis læsere har i 1. gymnasieklasse lært, at i ethynderivater



ligger RCCR altid på en ret linie. Det er altså ikke længere rigtigt. Der findes ikke-lineære. Det skal tilføjes, at Noriyuki Suzuki forgæves har forsøgt at fremstille enklere cyclopentynderivater.



Bos

2002: Chemical & Engineering News. 28. januar: 52

