

Monika Żyłowska¹, Agnieszka Wyszyńska¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka*¹

¹Institut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, Zakład Genetyki Bakterii,
ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa

Wpłynęło w marcu 2011 r.

1. Wstęp. 1.1. Ogólna charakterystyka antybakteryjnych peptydów. 1.2. Klasyfikacja antybakteryjnych peptydów. 1.3. Mechanizmy działania antybakteryjnych peptydów. 2. Charakterystyka defensyn. 2.1. Klasyfikacja, identyfikacja i struktura defensyn. 2.1.1. Defensyny α . 2.1.2. Defensyny β . 2.1.3. Defensyny θ . 2.1.4. Defensyny bezkręgowców. 2.1.5. Defensyny roślinne. 2.2. Biosynteza defensyn. 2.3. Struktura genetyczna i regulacja ekspresji genów kodujących defensyny. 2.4. Interakcje defensyn z błoną komórkową patogenu. 2.5. Modulacja działania układu immunologicznego przez defensyny. 2.6. Mechanizmy oporności bakterii na defensyny. 3. Podsumowanie

Antimicrobial peptides – defensins

Abstract: Numerous organisms produce antimicrobial peptides (AMP) as part of their innate immunity and host defense. Antimicrobial peptides are implicated in antibacterial as well as antifungal activity in phagocytes, inflammatory fluids and intestinal secretions. Among them, the most abundant and the best characterized are defensins. Most of them have been recently sequenced and their structures have been solved. Defensins are small (about 5 kDa), mainly basic, cysteine – rich peptides. The global fold comprises an antiparallel β sheet and an α helix, which is stabilized by disulfide bridges. The mammalian defensins can be subdivided into three main classes according to their structural differences: α , β and, recently described, θ defensins. Several models have been recently proposed to explain the mechanism of bacterial membrane perturbation by defensins, leading to pore formation. This review describes recent findings in defensin biology focusing mainly on mammalian defensins.

1. Introduction. 1.1. Characterization of antimicrobial peptides. 1.2. Antimicrobial peptide classification. 1.2. Mechanism of antibacterial peptide activity. 2. Main features of defensins. 2.1. Defensin classification, structure and identification. 2.1.1. Defensins α . 2.1.2. Defensins β . 2.1.3. Defensins θ . 2.1.4. Invertebrate defensins. 2.1.4. Plant defensins. 2.2. Defensin biosynthesis. 2.4. Genetic organization and expression of gene encoding defensins. 2.4 Interaction between defensins and bacterial cell wall. 2.5. Influence of defensins on vertebrate immunological system. 2.6. Mechanisms of bacterial resistance to defensins. 3. Summary

Słowa kluczowe: antybakteryjne peptydy, defensyny, oporność, patogeny, układ immunologiczny

Key words: antimicrobial peptides, defensins, immunological system, pathogens, resistance

1. Wstęp

1.1. Ogólna charakterystyka przeciedrobnoustrojowych peptydów

Istotnym elementem mechanizmów odpornościowych funkcjonującym zarówno u roślin, jak i zwierząt – bezkręgowych i kręgowców, są peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP, *antimicrobial peptides*). Są one prawdopodobnie jednym z podstawowych i jednocześnie najbardziej prymitywnych mechanizmów obronnych.

AMP zostały opisane na początku lat osiemdziesiątych XX wieku u żab i ropuch, u których bezpośrednio po zranieniu obserwowano wydzielanie substancji niszczących drobnoustroje. Substancje te nazwano magaininami. Następnie wykryto podobne substancje u innych gatunków zwierząt: cekropiny u ciem, tachyplezyny u krabów, tioniny u roślin i defensyny u ssaków. Odkrycie pokrewieństw strukturalnych i funkcjonalnych między tymi substancjami pozwoliło na wysunięcie

hipotezy, że AMP są jednym z najstarszych mechanizmów obronnych [80].

Do chwili obecnej opisano ponad 1500 przeciwdrobnoustrojowych peptydów. Dzięki dostępnym bazom danych można na bieżąco śledzić odkrycia w dziedzinie AMP. Informacje możemy znaleźć zarówno w specjalistycznych bazach danych, takich jak Antimicrobial Sequence Database (AMSDb) [<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html>] i Antimicrobial Peptide database (APD) [<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>], jak i w ogólnych bazach danych takich jak GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>], EMBL [<http://www.ebi.ac.uk/embl/>] i innych [63].

AMP są produkowane w wielu tkankach przez różne typy komórek roślin, grzybów i zwierząt oraz bakterii. Mają kilka wspólnych cech: są małymi peptydami o ładunku dodatnim. Znamy również peptydy anionowe i amfipatyczne. Peptydy te wykazują aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz przeciw pasożytniczą. Oprócz niszczenia patogenów

* Autor korespondencyjny: Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka, Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

AMP mają zdolność do neutralizacji toksyn, wykazują aktywność chemotaktyczną, modulują działanie układu immunologicznego oraz indukują procesy angiogenezy i gojenia ran [7].

1.2. Klasyfikacja antybakteryjnych peptydów

Klasyfikacja AMP przyjmuje jako kryterium podziału ich sekwencję aminokwasową, liczbę mostków dwusiarczkowych oraz strukturę. Aktualnie najczęściej stosowana jest klasyfikacja zaprezentowana przez B r o d g e n a, według którego możemy wśród tych peptydów wyróżnić pięć podgrup [5].

Do pierwszej z nich należą anionowe peptydy. Są one małe (726,1–823,8 Da) a dominującymi aminokwasami w ich sekwencji są kwas asparaginowy i kwas glutaminowy. Produkowane są np. przez komórki nabłonkowe w milimolarnych stężeniach. W obecności cynku, który jest ich kofaktorem, wykazują aktywność wobec bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Do tej klasy peptydów należy m.in. dermicydyna, produkowana w gruczołach potowych człowieka. Rozpuszcza się w pocie i po proteolitycznym procesowaniu do peptydu o długości 47 aminokwasów, jest razem z potem wydzielana na powierzchnię skóry. Oprócz właściwości bakteriobójczych dermicydyna ma również właściwości grzybobójcze, np. w stosunku do drożdżaka białego (*Candida albicans*) [20].

Do drugiej podgrupy należy około 290 krótkich, kationowych peptydów o strukturze α -helisy. Zwykle ich długość nie przekracza 40 reszt aminokwasowych. W roztworach wodnych struktura wielu z tych peptydów jest zaburzona, natomiast w obecności trifluoroetanolu, dodecylsulfianu sodu (SDS) i lipidu A, cząsteczka przyjmuje właściwą konformację. Peptydy należące do tej klasy są aktywne wobec Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii. Przedstawicielami tej grupy są cekropiny: A i B. Po raz pierwszy opisano je u ćmy *Hyalophora cecropia*, później stwierdzono ich obecność również u ssaków. Ich strukturę cechuje obecność dwóch α -helis, obie wykazują właściwości cytolityczne w stosunku do kilku linii komórek nowotworowych [40]. Innym przykładem jest pierwszy poznany peptyd przeciwdrobnoustrojowy, magainina zbudowany z 21–27 aminokwasów. Przedstawicielami tej podgrupy są również andropina, mellityna i ceratotoksyna owadów, dermaseptyna, bombinina, brewinina i buforyna II płazów, misguryna i pleurocydyna ryb oraz owispiryna, królicza katelicydyna CAP-18 (*cationic antimicrobial peptide*) i ludzka katelicydyna LL-37.

Trzecią podgrupę tworzy około 44 kationowych peptydów z dominującą liczbą takich aminokwasów jak: prolina, arginina, glicyna i tryptofan. Do tej klasy należy m.in. PR-39 (*proline-arginine rich antibacterial peptide*), peptyd izolowany z jelita cienkiego świń

i z neutrofilii. Inne przykłady to: abaecyna bogata w prolinę, drozomycyna i apidaecyna bogate w prolinę i argininę, koleopterycyna i hymeoptaecyna owadów bogate w glicynę, oraz baktencyna bogata w prolinę i argininę, profenina bogata w prolinę i fenyloalaninę, idolicydyna i histatyny ssaków bogate w tryptofan.

Kolejną podgrupę stanowią anionowe i kationowe peptydy zawierające reszty cysteinowe i mostki disulfidowe [1–3]. Przykładem takich peptydów jest proteogryna, 16-aminokwasowy peptyd z dwoma mostkami disulfidowymi, izolowany z leukocytów świń. Do tej klasy należy również bardzo zróżnicowana grupa defensyn. Do tej pory opisano ok. 300 defensyn kręgowców (80 α -defensyn, około 190 β -defensyn, 5 defensyn θ), ok. 170 defensyn owadów, ok. 60 defensyn roślinnych [<http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>]. Inne peptydy należące do tej grupy to m.in. drozomycyna owadów, tachyplezyna skorupiaków oraz brewinina ssaków, która charakteryzuje się obecnością tylko jednego mostka disulfidowego [5].

Ostatnią podgrupę AMP stanowią anionowe i kationowe peptydy będące fragmentami większych białek. Mają one aktywność przeciwbakteryjną i są strukturalnie podobne do wcześniej opisanych peptydów, ale ich rola w odporności nie jest do końca poznana. Do tej klasy należy m.in. laktoferrycyna. Jest to peptyd obecny w neutrofilach, w mleku i w ślinie, powstały na skutek hydrolizy przez kwaśną peptydazę laktoferryny, białka wiążącego żelazo.

1.3. Mechanizmy działania przeciwbakteryjnych peptydów

AMP niszą komórki drobnoustroju głównie przez dezintegrację ich osłon komórkowych. Wiążą się z błoną komórkową patogenu dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym między ujemnie naładowanymi lipidami błony komórkowej drobnoustroju a kationowymi peptydami. Aby dotrzeć do błony cytoplazmatycznej, peptyd musi „pokonać” zewnętrzne warstwy komórki – u bakterii Gram-ujemnych błonę zewnętrzną i cienką warstwę peptydoglikanu, a u Gram-dodatnich grubą warstwę peptydoglikanu. Umożliwiają mu to ujemnie naładowane cząsteczki obecne w osłonach komórek bakteryjnych, z którymi peptyd może oddziaływać – m.in. anionowe fosfolipidy i grupy fosforanowe lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych oraz kwasy tejchojowe i lipotejchojowe wchodzące w skład peptydoglikanu bakterii Gram-dodatnich. Gdy peptyd zakotwiczy się w błonie cytoplazmatycznej drobnoustroju, następuje zmiana jego struktury a następnie wbudowanie do dwuwarstwowej fosfolipidowej błony cytoplazmatycznej. W niskim stężeniu peptydy są wbudowywane do błony równoległe, natomiast gdy ich stężenie wzrasta, zmieniają położenie na prostopadłe. W odpowiednio wysokim stężeniu i prostopadłej względem błony orientacji, peptydy zaczy-

nają tworzyć transmembranowe pory. W zależności od budowy peptydu możemy wyróżnić trzy mechanizmy niszczenia błon: „klepek beczki”, „pierścieniowy” i „dywanowy”. Istnieje również czwarty, rzadziej występujący mechanizm tworzenia „nieuporządkowanych pierścieniowych porów” [43].

W modelu „klepek beczki” biorą udział α -helikalne peptydy. Formują w centrum membrany wiązkę z kanałem w środku. Od tej formy pochodzi nazwa mechanizmu działania – wiązka ta przypomina beczkę zbudowaną z klepek. Powstałe w błonie pory powodują wyciekanie składników cytoplazmy i spadek potencjału błonowego. W ten sposób niszczą błonę peptydy takie jak alametycyna i gramicydyna A [34].

Drugim mechanizmem niszczenia błon jest model „dywanowy”. W tym modelu peptydy kumulują się na powierzchni błony cytoplazmatycznej, nie przenikając przez nią. Peptydy oddziałują elektrostatycznie z hydrofilowymi głowami fosfolipidów pokrywając powierzchnię błony jak dywan. Przy dużym stężeniu peptydów następuje destabilizacja błony, jej pęknięcie, obniżenie potencjału błonowego komórki i wyciekanie składników cytoplazmy. Jest to mechanizm podobny do działania detergentu. Tak działa np. cekropina [55].

Kolejnym mechanizmem jest model „pierścieniowy”. Peptydy wnikają między dwie warstwy błony i powodują, że pojedyncza warstwa fosfolipidowa zagina się do wewnątrz tworząc szczelinę, w której znajdują się głowy fosfolipidów i peptydy. Peptydy połączone są przez cały czas z polarnymi głowami lipidów, nawet podczas przenikania przez dwuwarstwową błonę. Ten mechanizm niszczenia błon jest reprezentowany przez magaininę, protegrynę i mellitynę [60].

Ostatnią ze strategii niszczenia błon jest mechanizm tworzenia „nieuporządkowanych pierścieniowych porów”. Ta modyfikacja porów pierścieniowych polega na tym, że ułożenie peptydów jest mniej restrykcyjne niż w modelu „pierścieniowym”. Peptydy nie ustawiają się zawsze prostopadle w stosunku do błony, tak jak to było w modelu „pierścieniowym”, ale mogą być zakotwiczone w błonie pod różnym kątem [43].

Pomimo wielu różnic, te cztery mechanizmy mają również cechy wspólne. Wszystkie one prowadzą do destabilizacji błony i utraty zdolności komórki do życia. Zaburzony zostaje potencjał błonowy, gradient pH, regulacja osmotyczna oraz zatrzymany proces oddychania. Lokalne stężenie peptydów w błonie jest około 10 000 razy wyższe niż ich stężenie w fazie wodnej [43].

Oprócz dezintegracji błony komórkowej, przeciwdrobnoustrojowe peptydy mogą zabijać komórki patogenu w inny sposób. Wiele peptydów przekracza błonę cytoplazmatyczną i kumuluje się wewnątrz komórki. Peptydy te hamują syntezę kwasów nukleinowych poprzez wiązanie z DNA lub/i RNA, syntezę białek wpływając na aktywność ATPazową DnaK czy syntezę skład-

ników ściany komórkowej. Niektóre dodatkowo blokują aktywność innych enzymów [5, 6, 50].

Przedstawiona praca przeglądowa dotyczy jednej klasy AMP – defensyn.

2. Charakterystyka defensyn

2.1. Klasyfikacja, identyfikacja i struktura defensyn

Defensyny są małymi (3–5 kDa) peptydami przeciwdrobnoustrojowymi o strukturze β -harmonijki, zawierającymi zwykle sześć reszt cysteinowych połączonych trzema mostkami dwusiarczkowymi. Możemy wśród nich wyróżnić 5 grup: defensyny kręgowców, do których należą defensyny ssaków α -, β -, i θ - oraz defensyny bezkręgowców i roślin. Obecnie znamy około 550 defensyn [www.defensins.bii.a-star.edu.sg].

Defensyny są wytwarzane przez różnorodne komórki wielu tkanek różnych organizmów. Defensyny α zidentyfikowano u królików, świnek morskich, szczurów, myszy i ludzi, natomiast defensyny β u bydła, owiec, kóz, świń, ptaków i ludzi.

Ludzkie defensyny α , HNP-1,2,3,4 są wytwarzane w granulach neutrofilii, a defensyny HD-5,6, (*human defensins*) w komórkach Paneth'a oraz komórkach nabłonkowych dróg rozrodczych kobiet. Ludzkie defensyny β charakteryzuje większa różnorodność miejsca wytwarzania. HBD-1 (*human beta-defensin*) jest syntetyzowana w komórkach nabłonkowych płuc i dróg moczowych, łożysku, nerkach, trzustce, tchawicy i prostaty, HBD-2 w komórkach nabłonkowych skóry, płuc, jelit i dróg moczowo-płciowych, HBD-3 w komórkach nabłonkowych nosa, migdałków, trzustki i oskrzeli oraz w ślinie i wydzielinie pochwowej a HBD-4 w jądrach, żołądka i macicy, płucach i nerkach [26, 62].

Defensyny θ wytwarzane są przez leukocyty i monocyty małe. U człowieka również zidentyfikowano gen, które mógłby potencjalnie kodować defensynę θ , ale w jego sekwencji nukleotydowej występuje przedwczesny kodon „stop”, co powoduje zahamowanie procesu translacji [47].

Defensyny bezkręgowców zostały wyizolowane z organizmów nicieni, stawonogów i mięczaków, natomiast defensyny roślinne są wytwarzane przez wiele gatunków roślin.

Wszystkie defensyny charakteryzują się strukturą stabilizowaną przez mostki disulfidowe pomiędzy resztami cysteinowymi. W defensynach α i β występują 3 mostki disulfidowe – w przypadku defensyn α pomiędzy cysteinami 1 i 6, 2 i 4 oraz 3 i 5, natomiast w przypadku defensyn β pomiędzy cysteinami 1 i 5, 2 i 4 oraz 3 i 6. W defensynach θ również występują trzy mostki disulfidowe. Niektóre defensyny bezkręgowców są stabilizowane przez 3 mostki disulfidowe – pomiędzy

cysteinami 1 i 5, 2 i 4 oraz 3 i 6, natomiast inne charakteryzują się obecnością 4 mostków łączących cysteiny 1 i 8, 2 i 5, 3 i 6, 4 i 7, tak jak u roślin [31].

2.1.1. Defensyny α

Defensyny α nazywamy również defensynami klasycznymi. Są pierwszą odkrytą grupą defensyn. W 1980 roku L e h r e r wyizolował je z króliczych makrofagów, nieco później wykryto je również w króliczych granulocytach, a następnie w fagocytach innych ssaków, takich jak: świnki morskie, szczury, myszy i człowiek. Do chwili obecnej opisano około 80 defensyn α .

Ze względu na wiele interesujących funkcji, starano się poznać strukturę tych peptydów. Wiele z nich zostało oczyszczonych i zsekwencjonowanych. U człowieka dokładnie scharakteryzowano sześć α -defensyn, z których cztery są odnajdywane głównie w ziarnach z granulocytów (HPN-1, HPN-2, HPN-3 i HPN-4) a pozostałe dwie w komórkach Paneth'a jelita cienkiego (HD-5 i HD-6).

Metodami krystalograficznymi i spektroskopowymi rozwiązano struktury kilku defensyn. Udokumentowano, że wszystkie klasyczne defensyny mają podobną konformację zawierającą trzypasmową strukturę β -kartki i pętlę łączącą te pasma. Struktura ta tworzy tzw. „szpilkę do włosów”. Ludzkie defensyny tworzą formy dimeryczne, które formują wąską część lejka. Szersza część lejka jest tworzona przez sześciopasmowe β -kartki połączone dwoma pętlami. Takie ułożenie multimetrów jest łatwe do uformowania w roztworze oraz korzystne w dwuwarstwowej błonie lipidowej. Fałdowanie tych peptydów jest procesem konserwowanym [29, 51].

Klasyczne defensyny są aktywne w stężeniu od 1 do 100 $\mu\text{g/ml}$ przeciwko bakteriom, zarówno Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym, wirusom i grzybom. Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza defensyn w granulocytach jest często hamowana przez białka osocza oraz kationy sodu i wapnia. Efekt działania jonów sodu polega na zahamowaniu niespecyficznych interakcji elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowaną defensyną a ujemnie naładowaną błoną. Efekt hamującego działania wapnia jest częściej spotykany wobec bakterii Gram-ujemnych i polega na współzawodnictwie o specyficzne miejsca wiążące zewnętrznej błony tych drobnoustrojów [21].

Ludzkie defensyny, pomimo wielu podobieństw strukturalnych, różnią się aktywnością wobec tych samych gatunków drobnoustrojów. Wykazano, że najsilniejszą bakteriobójczą aktywność spośród defensyn neutrofilnych przeciwko *Staphylococcus aureus* wykazuje defensyna HNP-2 a najsłabszą HNP-4. Natomiast najsilniejszą aktywność przeciwko *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes* wykazuje HNP-4, a najsłabszą HPN-1 i HPN-3. Defensyna HD-5, podobnie jak HNP-2, wykazywała wysoką aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych,

a defensyna HD-6 wykazywała aktywność tylko wobec *Bacillus cereus* [17]. Co ciekawe, defensyny klasyczne mogą również stymulować adhezję niektórych bakterii do komórek wytwarzających te peptydy. Adhezja *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i *Neisseria meningitidis* do różnych typów komórek jest istotnie wyższa w obecności defensyn. Tak więc w niektórych przypadkach defensyny mogą działać niekorzystnie dla organizmu i brać udział w wywołaniu objawów chorobowych [24].

S a l z m a n i wsp. udowodnili, że α -defensyny wytwarzane przez komórki układu pokarmowego ssaków biorą udział w utrzymaniu homeostazy jelitowej. W jelicie cienkim człowieka dochodzi do ekspresji genów kodujących dwie α -defensyny: HD-5 i HD-6. Udokumentowano silną korelację pomiędzy poziomem α -defensyn a rodzajem limfocytów obecnych w jelitowej tkance limfatycznej. Zachowanie równowagi pomiędzy dwoma typami komórek T (helperowych i regulatorowych) jest niezbędna do prawidłowej regulacji odpowiedzi immunologicznej. W jej utrzymaniu biorą udział defensyny [59].

D e L e e u w i wsp. udowodnili, że defensyna HNP-1 wykazuje mechanizm działania inny niż permeabilizacja błony komórkowej. Peptyd ten wiąże się do prekursora syntezy ściany komórkowej, lipidu II, przez co hamuje syntezę ściany komórkowej patogenu. Niszczenie w ten sposób komórek bakteryjnych zależy od poziomu lipidu II. Obecność inhibitorów syntezy ściany komórkowej, takich jak fosfomycyna, D-cykloseryna lub bacitracyna, znacząco obniża zdolność defensyny HNP-1 do zabijania patogenów. Mechanizm ten wyjaśnia, dlaczego α -defensyny są dużo bardziej skuteczne wobec bakterii Gram-dodatnich niż defensyny β [14].

2.1.2. Defensyny β

Defensyny β , zbudowane 38–42 aminokwasów, odkryto na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku. Peptydy te zidentyfikowano u bydła, owiec, kóz, świń, ptaków (kur i indyków) i ludzi. Pierwszą β -defensyną odkrytą u ssaków był peptyd TAP (*tracheal antimicrobial peptide*) wyizolowany z bydłowej tkanki tchawicy przez Diamonda w 1991 roku. Peptyd ten wykazywał właściwości bakteriobójcze wobec Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii oraz właściwości przeciwgrzybicze wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* [15]. U ludzi pierwszą β -defensynę odkryto w 1995 roku (HBD-1). Jej obecność stwierdzono w komórkach nabłonkowych tchawicy, oskrzeli, dróg oddechowych, przyusznicy, błony śluzowej policzków, języka i dziąseł także w jelicie cienkim, trzustce, nerkach, prostaty, jądrach, pochwie, macicy, jajowodach, łożysku i grasicy. Defensyna HBD-1 działa przeciwko bakteriom Gram-ujemnym [3]. Obecnie znamy ok. 190 β -defensyn: 48 z nich to defensyny ludzkie. Rozwiązano struktury dwunastu z nich.

W sekwencjach aminokwasowych β -defensyn występuje sześć reszt cysteinowych, których położenie jest konserwowane. Oprócz nich występuje niewiele innych konserwowanych reszt aminokwasowych: glicyna i glutamina. W 4 β -defensynach (HBD-1–4) człowieka odnotowano wysoką zawartość kationowych reszt lizyny i argininy, zgromadzonych w karboksyterminalnym fragmencie peptydu [52].

Rdzeń β -defensyn jest zbudowany z trzech β -harmonijek tworzących antyrównoległą β -kartkę. β -kartka jest oflankowana α -helikalnym segmentem o zróżnicowanej długości. Orientacja α -helisy względem β -kartki jest stabilizowana przez mostki disulfidowe. Z powodu specyficznych połączeń pomiędzy resztami cysteinowymi β -defensyny zostały uznane za oddzielną grupę defensyn. Część drugiej β -harmonijki, z konserwowanym motywem Gly-X-Cys, formuje strukturę zwaną β -wybrzuszeniem niezbędną dla prawidłowego zwijania i formowania struktury natywnej ssaczych defensyn [82].

Defensyny β formują oligomeryczne struktury, które odgrywają znaczącą rolę w ich aktywności biologicznej i funkcjonowaniu. Za pomocą metod krystalograficznych zaobserwowano tworzenie oktamerów przez defensynę HBD-2. Oktamery tworzą cztery niekowalencyjnie połączone dimery, stabilizowane przez interakcje pomiędzy pierwszymi β -harmonijkami monomerów. Defensyna HBD-1 tworzy słabo połączone ze sobą dimery, stabilizowane przez mostki solne, podobnie jak defensyna HBD-3, której symetryczne dimery oprócz mostków solnych są stabilizowane przez wiązanie hydrofobowe. Defensyna HBD-3 tworzy w roztworach stabilne dimery. Jej aktywność przeciwbakteryjna jest niezależna od obecności soli, w odróżnieniu od HBD-1, której aktywność zależy od stężenia NaCl [4, 30].

β -defensyny wykazują różne spektrum działania, najczęściej jednak wykazują aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym oraz drożdżom. Np. defensyna bydłęca TAP jest aktywna wobec takich gatunków bakterii jak *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, oraz drożdżaków: *C. albicans* i *C. tropicalis* a jej minimalne stężenie hamujące wynosi 6–125 $\mu\text{g/ml}$ w zależności od drobnoustroju. Podobnie inne defensyny mogą wykazywać aktywność wobec wielu drobnoustrojów, jednak niektóre wykazują przeciwbakteryjne działanie w niższym stężeniu a inne dopiero wtedy, gdy ich stężenie jest odpowiednio wysokie [45].

Badania dotyczące ludzkich defensyn β udokumentowały, że peptydy te wykazują większą aktywność wobec patogenów tlenowych niż wobec beztlenowych [36]. Niektóre badania wykazały również potencjalną przeciwbakteryjną aktywność syntetycznej defensyny HBD-4 wobec *Burkholderia cepacia*, bakterii odpornej na działanie innych peptydów przeciwdrobnoustrojowych i antybiotyków.

2.1.3. Defensyny θ

Defensyny θ są najpóźniej poznaną grupą defensyn. Pierwszą defensynę z tej grupy, RTD1 (*rhesus theta-defensin*), obecną w leukocytach i monocytach rezusa (*Rhesus macaque*), opisał zespół S e l s t e d a w 1999 roku [71]. Nieco później wykryto u rezusa obecność dwóch kolejnych defensyn – RTD-1 i RTD-2. Defensyny RTD-1, -2 i -3 wykazują aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz przeciwwirusową. Peptydy te mają kolistą strukturę, powstającą przez połączenie dwóch 9-aminokwasowych sekwencji pochodzących z prekursorów θ -defensyn. Budują je dwie antyrównoległe β -kartki połączone dwoma pętlami α . Defensyny θ wykazują aktywność w obecności NaCl, dwuwartościowych jonów oraz osocza, w odróżnieniu od defensyn α i β [73].

N g u y e n i wsp. prowadzili badania filogenetyczne, które ujawniły, że geny θ -defensyn występują u innych małp Starego Świata oraz u dwóch małp człekokształtnych (gibon i orangutan). U ludzi, szympansov i goryli występuje pseudogen, którego prekursor mRNA zawiera przedwczesny kodon „stop” w sekwencji sygnałowej, przez co nie dochodzi do jego translacji [47].

Defensyny θ są również wytwarzane przez pawiana. Pięć tych defensyn zostało wyizolowanych i oczyszczonych (BTD1-5, *babon theta-defensin*). Analizy RT-PCR mRNA pochodzącego ze szpiku kostnego pawiana wykazały obecność trzech (u *Papio Anubis*) i czterech (u *Theropitecus gelada*) prekursorów mRNA. Defensyny θ pawiana wykazały aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich oraz drożdży [23].

Zespół S t e g e m a n n a wyizolował dwie θ -defensyny (PhTD-1, -3, *papio hamadrys theta-defensin*) z leukocytów pawiana płaszczowego (*Papio hamadrys*). Defensyny te mają strukturę taką samą jak inne defensyny θ . Wykazują aktywność w stosunku do bakterii takich jak *Listeria monocytogenes*, metycylinooporne szczepy *S. aureus*, *E. coli* oraz drożdżaków *C. albicans* [69].

2.1.4. Defensyny bezkręgowców

Defensyny bezkręgowców, wyizolowane z komórek nicieni, stawonogów i mięczaków, pełnią kluczową rolę w odporności tych organizmów. Peptydy te są zbudowane z 38–45 reszt aminokwasowych, jednak sekwencja aminokwasowa defensyn u różnych gatunków jest odmienna. Obecnie znamy około 170 defensyn bezkręgowców.

Peptydy te wytwarzane są przez komórki tłuszczowe oraz komórki krwi – trombocyty. W strukturze trzeciorzędowej zawierają α -helisę połączoną pętlą z antyrównoległą β -kartką. U większości bezkręgowców struktura trzeciorzędowa defensyn jest stabilizowana przez trzy mostki disulfidowe, jednak w niektórych występują cztery mostki, np. w defensynie MGD1 wyizolowanej z *Mytilus galloprovincialis* oraz drozomycynie wyizolowanej z *Drosophilla melanogaster*.

Duża zmienność sekwencji aminokwasowej defensyn bezkręgowców wynika z różnorodności sekwencji aminokwasowej ich prekursorów oraz struktury intronów i eksonów. Ta wielka różnorodność jest skutkiem zmian defensyn w procesie ewolucji – wraz z ewolucją bezkręgowców ewoluowały defensyny przez nie produkowane [58].

Hemolimfa owadów nabywa właściwości przeciwdrobnoustrojowych po zranieniu owada lub penetracji przez drobnoustroje. Defensyny owadzie są dużą grupą peptydów odnajdywaną w hemolimfie różnych gatunków owadów. Większość defensyn owadzych ma aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii gramdodatnich. Do zahamowania wzrostu tych bakterii dochodzi już w niskim stężeniu defensyn (1–100 µg/ml). Gram-ujemne bakterie, drożdżaki i grzyby strzępkowe są mniej wrażliwe na ich działanie. Zidentyfikowano także kilka defensyn o właściwościach przeciwgrzybiczych: termicyna z *Pseudacanthotermes spiniger*, drozomycyna z *D. melanogaster*, heliomycyna z *Heliothis verescens* oraz gallerimycyna z larwy *Galleria mellonella* [2].

2.1.5. Defensyny roślinne

Defensyny roślinne są małymi peptydami, zbudowanymi z 45–54 reszt aminokwasowych, zawierającymi charakterystyczny wzór zwinięcia stabilizowany czterema mostkami disulfidowymi. Pierwsza roślinna defensyna, γ -tionina, została wyizolowana z ziaren pszenicy i jęczmienia w 1990 roku. Podobieństwo struktury γ -tioniny do defensyn ssaczy i owadzych pozwoliło zaklasyfikować ten peptyd do rodziny defensyn [11].

Struktura defensyn roślinnych jest podobna do struktur trzyczłonowych ssaczy β -defensyn i defensyn owadów – struktura β -kartki połączona równolegle z α -helisą.

W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 13 genów potencjalnie kodujących defensyny. Okazało się, że wytwarzane jest tylko 11 peptydów. Dwa dodatkowe geny kodują białka o długości 122 i 129 aminokwasów, których karboksyterminalne domeny wykazują obecność konserwowanego wzoru reszt cysteinowych charakterystycznego dla wszystkich roślinnych defensyn. Prawdopodobnie białka te są białkami fuzyjnymi [72].

Większość defensyn roślinnych hamuje wzrost wielu rodzajów grzybów, a niektóre również wykazują aktywność przeciwbakteryjną. W odróżnieniu do defensyn bezkręgowców i ssaków, defensyny roślinne nie oddziałują bezpośrednio z fosfolipidami błony komórkowej. Ich działanie opiera się głównie na modulowaniu stężenia jednowartościowych i dwuwartościowych kationów we wnętrzu komórki. Przeciwgrzybiczą aktywność wykazują defensyny wyizolowane z dalii, rzodkiewki, żurawki, groszku i lucerny [8].

2.2. Biosynteza defensyn

Dzięki sklonowaniu cDNA przedstawiciele wszystkich klas ludzkich defensyn wykazano, że wszystkie ich typy są syntetyzowane w postaci prepropeptydów, w których skład wchodzi: sekwencja sygnałowa, sekwencja aminokwasowa propeptydu oraz sekwencja aminokwasowa kodująca dojrzałe białko.

Defensyny α są produkowane w postaci prepropeptydu zbudowanego z 90–100 reszt aminokwasowych, w którego skład wchodzi: prekursor aminokwasowy zawierający w N-terminalnym fragmencie około 19-aminokwasową sekwencję sygnałową, ok. 5-aminokwasowy anionowy propeptyd oraz ok. 30-aminokwasową, C-terminalną, kationową sekwencję aminokwasową kodującą dojrzały peptyd [13]. Biosynteza defensyn α ma miejsce w szpiku kostnym oraz w neutrofilowych komórkach prekursorowych. Dojrzałe neutrofile krążą w krwi w poszukiwaniu odpowiedniej tkanki; w tym czasie nie zachodzi jeszcze synteza nowych defensyn. Podczas syntezy defensyn w komórkach szpiku kostnego, sekwencja sygnałowa jest szybko usuwana, ale późniejsze procesowanie proteolityczne prepropeptydu do dojrzałej defensyny zajmuje wiele godzin, a końcowe proteolityczne rozszczepienie ma miejsce już w dojrzałych granulach [75].

Struktura prekursora defensyn β jest prostsza. Prekursor jest zbudowany z aminokwasowej sekwencji sygnałowej, krótkiego propeptydu (może w ogóle nie być propeptydu) i C-terminalnej sekwencji aminokwasowej dojrzałej defensyny. Ich procesowanie również polega na obróbce proteolitycznej [20].

W biosyntezie defensyn θ biorą udział dwa prepropeptydy. W ich skład wchodzi aminokwasowe sekwencje sygnałowe, sekwencja aminokwasowa propeptydu oraz dojrzałej defensyny. Prepropeptydy są zbudowane z ok. 90 aminokwasów, natomiast dojrzały peptyd, po obróbce proteolitycznej, z 9 aminokwasów. Podczas procesowania dochodzi do połączenia C-terminalnych domen, w wyniku czego powstaje 18-aminokwasowy peptyd [71].

Analiza sekwencji aminokwasowych najbardziej powszechnych defensyn, wydedukowana z sekwencji nukleotydowej ich cDNA, wykazuje charakterystyczny rozkład aminokwasów – ujemny ładunek sekwencji aminokwasowej propeptydu neutralizuje dodatni ładunek sekwencji aminokwasowej dojrzałego peptydu. Ta obserwacja sugeruje, że propeptyd oddziałuje z dojrzałym peptydem podczas biosyntezy defensyn, ułatwiając proces zwijania białka oraz zapobiegając nieprawidłowym interakcjom z innymi białkami [44].

2.3. Struktura genetyczna i regulacja ekspresji genów kodujących defensyny

Geny kodujące defensyny charakteryzują się bardzo różnorodną strukturą genetyczną i wieloma sposobami

regulacji kodujących je genów. Te wyizolowane ze szpiku zawierają trzy eksony, natomiast geny kodujące defensyny występujące w komórkach Paneth'a zawierają dwa eksony. Fragment 5' genów, nie podlegający translacji, oraz fragment kodujący sekwencję sygnałną są silnie konserwowane.

W obu grupach, propeptyd i dojrzała część defensyn są kodowane przez oddzielne eksony. Taka organizacja genetyczna może sprzyjać rekombinacji pomiędzy fragmentem kodującym propeptyd i fragmentem kodującym dojrzałą defensynę, co skutkuje powstawaniem różnych peptydów w tych samych przedziałach komórki. Zmienność peptydów może być też wynikiem różnej obróbki potranslacyjnej, co prowadzi do powstawania peptydów o różnym składzie aminokwasowym na N-końcu. Wszystkie geny kodujące klasyczne defensyny są zlokalizowane na chromosomie 8 [75].

W genomie człowieka odnaleziono około 40-stu regionów potencjalnie kodujących β -defensyny. Z powodu wysokiej częstości zachodzenia procesu duplikacji genów w skupiskach genów kodujących β -defensyny, możemy podejrzewać, że liczba tych genów jest nawet wyższa. Niektóre ze zidentyfikowanych genów to pseudogeny zawierające w mRNA przedwczesny kodon „stop”. Geny kodujące β -defensyny znajdują się na różnych chromosomach: 8, 6, 20 [61]. Geny kodujące ludzkie β -defensyny mają podobną strukturę genetyczną. Zawierają dwa eksony i jeden intron. Jedynym wyjątkiem jest gen kodujący defensynę HBD-1, który zawiera trzy eksony i dwa introny. Pierwszy ekson koduje hydrofobową sekwencję sygnałną a w drugim zawarte są informacje o sekwencji aminokwasowej dojrzałego białka poprzedzonego krótkim, anionowym propeptydem. Potranslacyjna obróbka obejmuje proteolityczne wycięcie sekwencji sygnałnej przez enzym elastazę lub proteinazę a następnie usunięcie N-końcowego propeptydu [74].

Regulacja ekspresji genów kodujących β -defensyny jest bardzo skomplikowana. Ekspresja defensyny HBD-1 może być konstytutywna lub indukowana obecnością lipopolisacharydu (LPS) lub interferonu gamma (IFN- γ) [16].

Poziom ekspresji genów kodujących defensynę HBD-2 w jelicie jest dużo niższy niż genów kodujących defensynę HBD-1, co sugeruje, że regulacja ekspresji musi przebiegać inaczej. Ekspresja hBD-2 jest stymulowana przez interleukinę 1 α (IL-1 α), interleukinę 1 β (IL-1 β), czynnik nekrozy nowotworów (TNF- α), izoleucynę, 1,25-dihydroksywitaminę D, lipopolisacharyd oraz niektóre Gram-ujemne bakterie [16]. Transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF- β 1) również stymuluje transkrypcję i ekspresję hBD-2, ale tylko w komórkach naczyń śródbłonna naczyniowego. W komórkach nabłonkowych jamy ustnej nie zaobserwowano stymulacji ekspresji genów kodujących tą defensynę przez czynnik TGF- β 1 [38]. Udowodniono również, że eks-

presja hBD-2 w limfocytach B może być indukowana przez DNA zawierający motywy CpG. DNA, zawierający nie zmetylowane dinukleotydy cytozyny i guaniny, stymuluje ekspresję hBD-2 w komórkach nabłonkowych układu oddechowego [28]. Indukcja ekspresji genów kodujących defensyny może również zachodzić po pobudzeniu receptorów TLR, które rozpoznają tzw. wzorce molekularne mikroorganizmów patogennych takie jak np. LPS, flagelinę czy lipoproteidy. Stymulacja TLR4 indukuje ekspresję hBD-2 w odpowiedzi na infekcję *Chlamydia pneumoniae* [9].

Podobnie regulowana jest ekspresja genu kodującego defensynę HBD-3, choć zaobserwowano wpływ na ten proces także transformowanego czynnika wzrostu α (TGF- α) oraz podobnego do insuliny czynnika wzrostu 1 (IGF-1) [66]. Ekspresję hBD-3 w keratynocytach stymuluje histamina. Defensyna HBD-3 wiąże się z receptorami na powierzchni komórek tucznych i wpływa na ich chemotaksję i degranulację, co w rezultacie prowadzi do uwolnienia histaminy. Uwolniona histamina aktywuje syntezę HBD-3 poprzez oddziaływanie z receptorem H1 obecnym na powierzchni keratynocytów [33]. Poznane czynniki regulujące ekspresję genów kodujących defensynę HBD-4 są podobne do czynników wymienionych w przypadku hBD-2 i hBD-3 [66].

2.4. Interakcje defensyn z błoną komórkową patogenu

Wszystkie defensyny mają zdolność do zabijania lub inaktywowania określonych gatunków bakterii, wirusów, grzybów lub pasożytów i są uważane za główne efekторы odporności wrodzonej organizmu. Do niszczącego działania defensyn dochodzi w wakuolach fagocytów, na powierzchni skóry i w komórkach nabłonkowych, gdzie panuje niska siła jonowa. Selektywność działania peptydów jest uzależniona od różnic w budowie błony komórkowej patogenów [83].

Celem przeciwbakteryjnego działania defensyn jest błona komórkowa patogenów. Peptydy te oddziałują elektrostatycznie z błoną poprzez interakcje z ujemnie naładowanymi lipidami lub/i oddziaływanie defensyn jest determinowane przez potencjał transmembranowy błony. Jej struktura różni się od bogatych w fosfatydylocholinę cytoplazmatycznych błon eukariotycznych i dzięki temu defensyny selektywnie działają tylko na błony komórkowe bakterii [79]. Wielu interesujących informacji dotyczących oddziaływań defensyn z błoną komórkową dostarczyły eksperymenty wykorzystujące sztucznie stworzone modele błon komórkowych lub pęcherzyki lipidowe.

K a g a n i wsp. analizowali oddziaływania króliczej defensyny NP-1 i ludzkiej HNP-1 wykorzystując dwuwarstwową błonę zbudowaną z lipidowej mieszaniny zawierającej w różnych ilościach cząsteczki fosfatydyletanolaminy, fosfatydylocholinę oraz fosfatydyloseryny.

Udokumentowano, że wydajność permeabilizacji błony przez defensyny zależy od jej składu chemicznego [37].

Stosując jako model badawczy małe jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe zbudowane z mieszaniny dipalmitylofosfocholiny i dioleilofosfatydyloseryny analizowano interakcje z błoną α -defensyn (NP-2 i HNP-1). Wykazano, że badane peptydy powodują fuzję i lizę pęcherzyków na drodze oddziaływań zarówno elektrostatycznych jak i hydrofobowych. Udokumentowano także, zgodnie z poprzednio poczynionymi obserwacjami, że defensyny o zredukowanych wiązaniach dwusiarczkowych nie wykazują pełnej aktywności [19, 51].

Wiele wsp. badali interakcje defensyny ludzkiej HNP-2 z dużymi jednowarstwowymi pęcherzykami lipidowymi zbudowanymi z ujemnie naładowanego lipidu palmitylooleilofosfatydyloglicerolu. Udowodnili oni, że defensyna ta tworzy pierścieniowe pory uformowane w heksamer. Zarówno natywna, jak i zredukowana forma HNP-2 powoduje przeciekanie błony prowadzące do śmierci komórki, jednak mechanizm działania obu tych form nieco się różni i jest zależny od stężenia dimerów peptydu wbudowanych w błonę [81].

2.5. Modulacja działania układu immunologicznego przez defensyny

Defensyny odgrywają istotną rolę zarówno we wrodzonej, jak i nabytej odporności organizmu. We wrodzonej odporności peptydy te głównie pełnią rolę cząsteczek efektorowych, natomiast w odporności nabytej przyczyniają się do regulacji odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na inwazję patogenów.

Defensyny α i β wywierają wpływ na odporność wrodzoną. Ludzkie neutrofilne defensyny α wprowadzone do mysich makrofagów podwyższają ich zdolność do fagocytozy [32]. Defensyny α człowieka, królika i świnki morskiej oraz defensyny β indukują aktywację i degranulację komórek tucznych, co prowadzi do uwolnienia histaminy i prostaglandyny D_2 , które są mediatorami stanu zapalnego [48]. HNP-1, -2 i -3 stymulują komórki tkanki nabłonkowej oskrzeli do transkrypcji genów interleukiny 8 (IL-8), aktywującej neutrofile [77]. Ludzkie defensyny α mogą zwiększać poziom produkcji czynnika nekrozy nowotworów (TNF) i interleukiny-1 (IL-1) oraz obniżać poziom produkcji interleukiny 10 (IL-10), która jest czynnikiem przeciwzapalnym, efektywnie limitującym produkcję czynników prozapalnych [10].

Defensyna HBD-3 wywołuje odwrotny efekt – działa przeciwzapalnie. Dowiedziono, że w obecności LPS, HBD-3 efektywnie hamuje akumulację czynników prozapalnych TNF- α i IL-6 w osoczu. Przeciwzapalny efekt działania HBD-3 nie jest zależny od IL-10 oraz od poziomu cAMP, ważnego czynnika kontrolującego układ immunologiczny. Zarówno cAMP jak i HBD-3 obniżają poziom czynnika TNF- α w komórce, ale obecność HBD-3 hamuje działanie cAMP, co sugeruje, że

cAMP i HBD-3 działają na zasadzie dwóch różnych mechanizmów. Obniżanie poziomu czynnika TNF- α w osoczu, indukowanego obecnością LPS, przez HBD-3 wskazuje, że HBD-3 może być ważnym czynnikiem kontrolującym proces zapalny i szok septyczny [63]. Co więcej, defensyny wzmacniają lub tłumią aktywację klasycznej ścieżki układu dopełnicza [76].

Defensyny jelitowe, HD-5 i HD-6, wytwarzane przez komórki Paneth'a w jelicie cienkim, odgrywają istotną rolę w zwalczaniu infekcji jelitowych. Znokautowane myszy z inaktywowanym genem kodującym matrylizynę, metaloproteazę przekształcającą nieaktywne formy defensyn wytwarzanych przez te komórki do form aktywnych, były dużo bardziej wrażliwe na zakażenia bakteryjne i szybciej umierały po infekcji *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Utwierdza to w przekonaniu, że α -defensyny pełnią ważną rolę w ochronie przed jelitowymi patogenami.

Defensyny HD-5 i HD-6 hamują rozwój choroby Leśniowskiego-Crohna – choroby zapalnej jelita. Uwalnianie defensyn z komórek Paneth'a jest stymulowane obecnością glikolipidów ścian komórkowych bakterii [70]. U pacjentów ze stanem zapalnym końcowej części jelita cienkiego – jelita krętego, wykazano dużo niższy poziom defensyn HD-5 i HD-6.

Defensyny α działają chemotaktycznie na niedojrzałe komórki dendrytyczne, niedojrzałe limfocyty T oraz limfocyty T CD8. Natomiast defensyny β są bardziej selektywne i działają chemotaktycznie wyłącznie na komórki posiadające receptor CCR6, odpowiedzialny za chemotaksję chemokiny prozapalnej makrofagów – białka 3 α (MIP-3 α , *macrophage inflammatory protein*) oraz defensyn β [49].

2.6. Mechanizmy oporności bakterii na defensyny

Różnorodność defensyn produkowanych przez wiele ewolucyjnie odległych organizmów utrudnia patogenom ochronę przed nimi. Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów oporności, pozwalających im uniknąć destrukcyjnej działalności niektórych przeciwbakteryjnych peptydów. Do tych strategii należy unikanie wiązania i wbudowywania peptydu w błonę oraz zmiany przepuszczalności błony cytoplazmatycznej. Najczęściej stosowaną strategią jest zmiana struktur osłon komórkowych.

Jednym z mechanizmów oporności wykształconych przez bakterie jest zamiana anionowych składników ściany komórkowej na składniki kationowe. Takiej strategii używa Gram-dodatni gronkowiec, *S. aureus*. Ujemny ładunek w ścianie komórkowej wytworzony przez kwasy tejchojowe jest modyfikowany przez wbudowywanie do osłon komórkowych D-alaniny transportowanej z cytoplazmy, przez produkty genów operonu *dlt*. Inaktywacja operonu *dlt* skutkuje zwiększeniem wrażliwości *S. aureus* na defensyny [54]. Ope-

ron *dlt* występuje również w genomach innych Gram-dodatnich patogenów np. *Listeria monocytogenes* [1] i *Streptococcus* grupy B [56].

Estryfikacja kwasów tejchojowych także powoduje zmianę ładunku ujemnego na dodatni, przez dodanie grup aminowych. *S. aureus* modyfikuje błonę poprzez wbudowanie L-lizyny do fosfatydyloglicerolu, dzięki obecności genu *mprF* kodującego syntazę lizylofosfatydyloglicerolu (LPG), co również skutkuje wzrostem oporności na defensyny [53].

Bakterie Gram-ujemne „bronią się” przed defensynami poprzez modyfikację zewnętrznej błony komórkowej. Modyfikacja ta polega na acylacji lipidu A lipopolisacharydu lub na redukcji płynności błony zewnętrznej wskutek oddziaływań hydrofobowych między wzrastającą liczbą acylowanych cząsteczek lipidu A. W komórkach *S. enterica* genem odpowiedzialnym za acylację lipidu A jest gen *pagP* kodujący transferazę palmitynową [27]. Jego homologami są *rcp*, kodujący białko Rcp *Legionella pneumophila* [57] i *htrB* kodujący acylotransferazę *Haemophilus influenzae* [68]. *S. enterica* sv. Typhimurium wykształciła również inny sposób obrony przed działaniem defensyn. Do fosforanowych grup w lipidzie A przyłączane są cząsteczki arabinozy, co redukuje oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationowymi peptydami a negatywnie naładowanymi fosforanami [25]. Ten mechanizm oporności wymaga aktywności dwuskładnikowego systemu regulatorowego PhoP-PhoQ. Dołączanie cząsteczek arabinozy do grup fosforanowych w lipidzie A jest również strategią obrony przed defensynami *Proteus mirabilis*, bakterii powodującej infekcje dróg moczowych. [42].

Dowiedziano również, że „niszczenie” błony komórkowej *S. enterica* sv. Typhimurium prowadzi do indukcji regulonu σ^E , kontrolującego ekspresję wielu genów, między innymi genów zaangażowanych w mechanizmy oporności na defensyny [12].

Podobnie jest w przypadku bakterii *Listeria monocytogenes* i *L. ivanovii* – termoregulowany czynnik transkrypcyjny PrfA kontroluje ekspresję genów regulujących oporność bakterii na defensyny. W temp. 37°C patogene szczepy *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* są odporne na bakterioobójcze działanie defensyn HD-1 i HD-2, natomiast szczepy niepatogenne są wrażliwe [39].

Mycobacterium marinum wytwarza specyficzne lipidowe składniki ściany komórkowej, występujące jedynie u prątków – kwasy mikołowe. Ich wytwarzanie jest zależne między innymi od obecności genu *kasB* (*3-oxyl-(acyl carrier protein) synthase I*). Badania wykorzystujące mutagenезę insercyjną wykazały, że mutanty z unieczynnionym genem *kasB* wykazują większą wrażliwość na defensyny [22].

W komórkach niektórych Gram-ujemnych bakterii oporność na defensyny związana jest z obecnością specyficznych białek błony zewnętrznej. W komórkach *Yersinia enterocolitica* oporność warunkowana jest obec-

nością plazmidu pYVe, który koduje między innymi wielofunkcyjną adhezynę A (YadA). Mutanty ze znokautowanym genem kodującym białko YadA wykazują wyższą wrażliwość na defensyny niż szczepy dzikie [78].

Inny rodzaj strategii wypracowanej przez mikroorganizmy polega na wytwarzaniu polisacharydowych otoczek. Przykładem może być występowanie otoczki komórek *Klebsiella pneumoniae*, która zapewnia bakterii oporność na defensyny HNP-1 oraz HBD-1 i -2. Otoczka *K. pneumoniae* nie tylko chroni bakterię przed niszczącym działaniem peptydów, ale może również, prawdopodobnie na drodze przekazywania sygnału, hamować ekspresję genów β -defensyn HBD-1 i -2 w komórkach nabłonkowych układu oddechowego. Mutanty ze znokautowanymi genami kodującymi antygen O lipopolisacharydu wykazywały podobny poziom oporności jak dzikie patogeny, co utwierdza w przekonaniu, że nie antygen O, a otoczka polisacharydowa ma największy wpływ na oporność *K. pneumoniae*. Bezotoczkowe mutanty indukują wyższy poziom indukcji ekspresji β -defensyn niż typ dziki i są na nie dużo bardziej wrażliwe [46].

S. aureus wytwarza stafylokinazę, białko aktywujące plazminogen. Okazało się, że stafylokinaza również indukuje uwalnianie α -defensyn z leukocytów wielojądrowych. Stafylokinaza wiąże się z α -defensynami, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania bakterioobójczego działania defensyn. Stafylokinaza z zablokowanym miejscem wiążącym plazminogen zachowuje zdolność do neutralizacji działania defensyn, ale jedna mutacja punktowa w stafylokinazie – zmiana lizyny na alaninę w pozycji 74, skutkuje obniżeniem oporności o 50% [35]. *Streptococcus* grupy A wykazuje podobny mechanizm oporności. Patogen ten wytwarza wielofunkcyjne białko M, które pokrywa powierzchnię komórki oraz jest jednym z istotnych czynników wirulencji. Białko M w obecności czynników przeciwbakteryjnych aktywuje sekrecję białka SIC (*complement inhibitor protein*) na zewnątrz komórki, które ma zdolność do wiązania się z α -defensynami i ich inaktywowania [18].

Kolejnym mechanizmem oporności na defensyny są pompy wyrzutowe (*efflux pumps*). *H. influenzae* wytwarza białka budujące pompę wyrzutową o aktywności zależnej od stężenia jonów K^+ , dzięki której możliwe jest aktywne usuwanie β -defensyn z komórki bakteryjnej, przy równoczesnym pobieraniu jonów potasu do jej wnętrza [41].

Wiele innych patogenów również posiada pompy wyrzutowe, ale zapewniają one oporność na inne rodzaje AMP, np. *Neisseria gonorrhoeae* posiada zależny od energii system wyrzutowy MtrCDE, który warunkuje oporność na protegrynę-1 i ludzką katelicydynę LL-37 [65].

Patogeny mogą też modulować poziom ekspresji genów kodujących defensyny. *Shigella flexneri*, Gram-ujemny patogen powodujący ciężkie zatrucia pokarmowe wpływa na poziom ekspresji genów kodujących

AMP. W komórkach pobranych podczas biopsji odbytniczej pacjentów zarażonych tą bakterią stwierdzono bardzo niski poziom defensyny HBD-1 i katelidycyny LL-37. Sperandio i wsp. badali za pomocą techniki qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) poziom ekspresji genów kilku AMP w dwóch różnych liniach komórkowych zainfekowanych dzikim i zmutowanym szczepem *S. flexneri*. Typ dziki modulował ekspresję genów kodujących HBD-3 i LL-37, natomiast mutant z inaktywowanym genem *mxiE* (gen kodujący czynnik transkrypcyjny MxiE), nie wpływał na ekspresję tych genów. Białka zależne od aktywatora MxiE są niezbędne dla procesu inwazji. Aktywator transkrypcji MxiE pośrednio wpływa na transkrypcję genów kodujących defensyny – zależne od niego cząsteczki efektorowe obniżają poziom ekspresji genów kodujących chemokiny, co prowadzi do zablokowania rekrutacji komórek dendrytycznych do zainfekowanego miejsca [67].

Mechanizmy oporności bakterii na defensyny kształtowały się od milionów lat, dlatego istnieje tak wiele strategii wykorzystywanych przez różne gatunki bakterii. Niektóre mikroorganizmy wykształciły kilka mechanizmów oporności, dzięki czemu są odporne na kilka rodzajów peptydów. Jednak gdy porównamy szybkość pojawiania się szczepów opornych na antybiotyki, które są powszechnie stosowane od niecałych 100 lat do szybkości pojawiania się szczepów opornych na defensyny, które istnieją od milionów lat, możemy stwierdzić, że oporność bakterii na działanie tych peptydów kształtuje się bardzo powoli.

3. Podsumowanie

Bardzo wiele organizmów, odległych ewolucyjnie, wytwarza defensyny, jednak ich rolę odkryto stosunkowo niedawno, około 30 lat temu. Od tamtego momentu rozpoczęto intensywne badania dotyczące ich struktury, mechanizmu działania, biosyntezy, regulacji ekspresji oraz czynników wpływających na ich aktywność.

Defensyny są peptydami o ogromnym potencjale, który może być wykorzystany w niedalekiej przyszłości w terapiach przeciwbakteryjnych, wykazują bowiem nie tylko bezpośrednie, niszczące działanie wobec drobnoustrojów, ale również działają na komórki układu immunologicznego, stymulując lub hamując ich aktywność i kontrolując nabytą odpowiedź immunologiczną organizmu na infekcje. Trwają badania kliniczne dotyczące wielu defensyn. W 2005 roku duńska firma biotechnologiczna Novozymes ogłosiła sensacyjne odkrycie pierwszego peptydu przeciwbakteryjnego, nazwanego Plectasin, występującego u grzyba, *Pseudoplectania nigrella* i wykazującego aktywność wobec wieloopornych szczepów bakterii Gram-dodatnich, m.in. wobec

Streptococcus pneumoniae. Wykazano, że związek ten stosowany w terapii zapalenia płuc spowodowanego *S. pneumoniae* jest równie skuteczny jak penicylina i wankomycyna, a oprócz tego nie jest toksyczny [www.drugdevelopment-technology.com]. Również syntetyczna defensyna, o sekwencji aminokwasowej identycznej jak defensyna wytwarzana naturalnie przez kleszcze wykazuje wysoką aktywność antibakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich i może znaleźć zastosowanie terapeutyczne. Prowadzone są też liczne badania, często z wynikami pozytywnymi, dotyczące zastosowania defensyn w terapiach przeciwnowotworowych.

Piśmiennictwo

1. Abachin E., Poyart C., Pellegrini E., Milohanic E., Fiedler F., Berche P., Trieu-Cuot P.: Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1–14 (2002)
2. Aerts A.M., Francois I.E., Cammue B.P., Thevissen K.: The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **65**, 2069–2079 (2008)
3. Bensch K.W., Raida M., Magert H.J., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G., hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331–335 (1995)
4. Boniotto M., Crovella S. i wsp.: A study of host defence peptide beta-defensin 3 in primates. *Biochem. J.* **374**, 707–714 (2003)
5. Brogden K.A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238–250 (2005)
6. Brotz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P.E., Sahl H.G.: The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 154–160 (1998)
7. Bulet P., Stocklin R., Menin L.: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169–184 (2004)
8. Caaveiro J.M., Molina A., Gonzalez-Manas J.M., Rodriguez-Palenzuela P., Garcia-Olmedo F., Goni F.M.: Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.* **410**, 338–342 (1997)
9. Carratelli R.C., Mazzola N., Paolillo R., Sorrentino S., Rizzo A.: Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to *Chlamydia pneumoniae* in mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**, 116–124 (2009)
10. Chaly Y.V., Paleolog E.M., Kolesnikova T.S., Tikhonov II, Petratchenko E.V., Voitenok N.N.: Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 257–266 (2000)
11. Colilla F.J., Rocher A., Mendez E.: Gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* **270**, 191–194 (1990)
12. Crouch M.L., Becker L.A., Bang I.S., Tanabe H., Ouellette A.J., Fang F.C.: The alternative sigma factor sigma is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Mol. Microbiol.* **56**, 789–799 (2005)
13. Daher K. A., Lehrer R. I., Ganz T., Kronenberg M.: Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 7327–7331 (1988)

14. de Leeuw E., Li C., Zeng P., Diepeveen-de Buin M., Lu W.Y., Breukink E., Lu W.: Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett.* **584**, 1543–1548 (2010)
15. Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W.L., Bevins C.L.: Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3952–3956 (1991)
16. Duits L.A., Ravensbergen B., Rademaker M., Hiemstra P.S., Nibbering P.H.: Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*, **106**, 517–525 (2002)
17. Ericksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I.: Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**, 269–275 (2005)
18. Frick I.M., Akesson P., Rasmussen M., Schmidtchen A., Bjorck L.: SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* **278**, 16561–16566 (2003)
19. Fujii G., Selsted M.E., Eisenberg D.: Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein. Sci.* **2**, 1301–1312 (1993)
20. Gallo R.L., Nizet V.: Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 402–409 (2003)
21. Ganz T.: Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biol.* **327**, 539–549 (2004)
22. Gao L.-Y., Laval F., Lawson E.H., Groger R.K., Woodruff A., Morisaki J.H., Cox J.S., Daffe M., Brown E.J.: Requirement for kasB in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* **49**, 1547–1563 (2003)
23. Garcia A.E., Osapay G., Tran P.A., Yuan J., Selsted M.E.: Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes. *Infect. Immun.* **76**, 5883–5891 (2008)
24. Gorter A.D., Hiemstra P.S., de Bentzmann S., van Wetering S., Dankert J., van Alphen L.: Stimulation of bacterial adherence by neutrophil defensins varies among bacterial species but not among host cell types. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 105–111 (2000)
25. Groisman E.A., Parra-Lopez C., Salcedo M., Lipps C.J., Heffron F.: Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11939–11943 (1992)
26. Guani-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S.O., Teran L.M.: Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* **135**, 1–11 (2010)
27. Guo L., Lim K.B., Gunn J.S., Bainbridge B., Darveau R.P., Hackett M., Miller S.I.: Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*, **276**, 250–253 (1997)
28. Han S.H., Kim Y.E., Park J.A., Park J.B., Kim Y.S., Lee Y., Choi I.G., Kwon H.J.: Expression of human beta-defensin-2 gene induced by CpG-DNA in human B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 443–448 (2009)
29. Hill C.P., Yee J., Selsted M.E., Eisenberg D.: Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, **251**, 1481–1485 (1991)
30. Hoover D.M., Chertov O., Lubkowski J.: The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins. *J. Biol. Chem.* **276**, 39021–39026 (2001)
31. Hughes A.L.: Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **56**, 94–103 (1999)
32. Ichinose M., Sawada M.: Enhancement of phagocytosis by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Peptides*, **17**, 1405–1414 (1996)
33. Ishikawa T., Kanda N., Hau C.S., Tada Y., Watanabe S.: Histamine induces human beta-defensin-3 production in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **56**, 121–127 (2009)
34. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.: Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491–511 (2006)
35. Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol.* **172**, 1169–1176 (2004)
36. Joly S., Maze C., McCray P.B., Jr., Guthmiller J.M.: Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1024–1029 (2004)
37. Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T., Lehrer R.I.: Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 210–214 (1990)
38. Kawsar H.I., Ghosh S.K., Hirsch S.A., Koon H.B., Weinberg A., Jin G.: Expression of human beta-defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor beta. *Peptides*, **31**, 195–201 (2010)
39. Lopez-Solanilla E., Gonzalez-Zorn B., Novella S., Vazquez-Boland J.A., Rodriguez-Palenzuela P.: Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 101–105 (2003)
40. Mader J.S., Hoskin D.W.: Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **15**, 933–946 (2006)
41. Mason K.M., Munson R.S., Jr., Bakaletz L.O.: A mutation in the sap operon attenuates survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of otitis media. *Infect. Immun.* **73**, 599–608 (2005)
42. McCoy A.J., Liu H., Falla T.J., Gunn J.S.: Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**, 2030–2037 (2001)
43. Melo M.N., Ferre R., Castanho M.A.: Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 245–250 (2009)
44. Michaelson D., Rayner J., Couto M., Ganz T.: Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.* **51**, 634–639 (1992)
45. Miyasaki K.T., Lehrer R.I.: Beta-sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **9**, 269–280 (1998)
46. Moranta D., Regueiro V., March C., Llobet E., Margareto J., Larrate E., Garmendia J., Bengoechea J.A.: *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 1135–1146 (2010)
47. Nguyen T.X., Cole A.M., Lehrer R.I.: Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides*, **24**, 1647–1654 (2003)
48. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I.: Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1066–1075 (2001)
49. Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D.: Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 17–21 (2003)

50. Otvos L., Jr., OI., Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M.: Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, **39**, 14150–14159 (2000)
51. Pardi A., Zhang X.L., Selsted M.E., Skalicky J.J., Yip P.F.: NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry*, **31**, 11357–11364 (1992)
52. Pazgier M., Hoover D.M., Yang D., Lu W., Lubkowski J.: Human beta-defensins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **63**, 1294–1313 (2006)
53. Peschel A., van Strijp J.A. i wsp.: *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 (2001)
54. Peschel A., Otto M., Jack R.W., 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.* **274**, 8405–8410 (1999)
55. Powers J.P., Hancock R.E.: The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, **24**, 1681–1691 (2003)
56. Poyart C., Pellegrini E., Marceau M., Baptista M., Jaubert F., Lamy M.C., Trieu-Cuot P.: Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* **49**, 1615–1625 (2003)
57. Robey M., O'Connell W., Cianciotto N.P.: Identification of *Legionella pneumophila rcp*, a *pagP*-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect. Immun.* **69**, 4276–4286 (2001)
58. Rodriguez de la Vega R.C., Possani L.D.: On the evolution of invertebrate defensins. *Trends. Genet.* **21**, 330–332 (2005)
59. Salzman N.H., Bos N.A. i wsp.: Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76–83 (2009)
60. Sato H., Feix J.B.: Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1245–1256 (2006)
61. Schutte B.C., Mitros J.P., Bartlett J.A., Walters J.D., Jia H.P., Welsh M.J., Casavant T.L., McCray P.B., Jr.: Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2129–2133 (2002)
62. Schwaab M., Gurr A., Hansen S., Minovi A.M., Thomas J.P., Sudhoff H., Dazert S.: Human beta-Defensins in different states of diseases of the tonsilla palatina. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **267**, 821–830 (2010)
63. Seebah S., Suresh A., Zhuo S., Choong Y. H., Chua H., Chuon D., Beuerman R., Verma C.: Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic. Acids. Res.* **35**, D265–268 (2007)
64. Semple F., Webb S., Li H.N., Patel H.B., Perretti M., Jackson I.J., Gray M., Davidson D.J., Dorin J.R.: Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1073–1078 (2010)
65. Shafer W.M., Qu X., Waring A.J., Lehrer R.I.: Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1829–1833 (1998)
66. Sorensen O.E., Cowland J.B., Theilgaard-Monch K., Liu L., Ganz T., Borregaard N.: Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* **170**, 5583–5589 (2003)
67. Sperandio B., Regnault B., Guo J., Zhang Z., Stanley S.L., Jr., Sansonetti P.J., Pedron T.: Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J. Exp. Med.* **205**, 1121–1132 (2008)
68. Starner T.D., Swords W.E., Apicella M.A., McCray P.B., Jr.: Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect. Immun.* **70**, 5287–5289 (2002)
69. Stegemann C., Tsvetkova E.V., Aleshina G.M., Lehrer R.I., Kokryakov V.N., Hoffmann R.: *De novo* sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **24**, 599–604 (2010)
70. Tanabe H., Ayabe T., Bainbridge B., Guina T., Ernst R.K., Darveau R.P., Miller S.I., Ouellette A.J.: Mouse paneth cell secretory responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* **73**, 2312–2320 (2005)
71. Tang Y.Q., Yuan J., Osapay G., Osapay K., Tran D., Miller C.J., Ouellette A.J., Selsted M.E.: A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*, **286**, 498–502 (1999)
72. Thomma B.P., Cammue B.P., Thevissen K.: Plant defensins. *Planta*, **216**, 193–202 (2002)
73. Tran D., Tran P., Roberts K., Osapay G., Schaal J., Ouellette A., Selsted M.E.: Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **52**, 944–953 (2008)
74. Valore E.V., Ganz T.: Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. *Methods Mol. Biol.* **78**, 115–131 (1997)
75. Valore E.V., Ganz T.: Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood*, **79**, 1538–1544 (1992)
76. van den Berg R.H., Faber-Krol M.C., van Wetering S., Hiemstra P. S., Daha M.R.: Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood*, **92**, 3898–3903 (1998)
77. Van Wetering S., Mannesse-Lazeroms S.P., Dijkman J.H., Hiemstra P.S.: Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: modulation of cytotoxicity and IL-8 production. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 217–226 (1997)
78. Visser L.G., Hiemstra P.S., van den Barselaar M.T., Ballieux P.A., van Furth R.: Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect. Immun.* **64**, 1653–1658 (1996)
79. Weinberg A., Krisanaprakornkit S., Dale B.A.: Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **9**, 399–414 (1998)
80. Wiechula B.E., Tustanowski J.P., Martirosian G.: Antimicrobial peptides. *Wiad. Lek.* **59**, 542–547 (2006)
81. Wimley W.C., Selsted M.E., White S.H.: Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein. Sci.* **3**, 1362–1373 (1994)
82. Xie C., Prahl A., Ericksen B., Wu Z., Zeng P., Li X., Lu W.Y., Lubkowski J., Lu W.: Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids. *J. Biol. Chem.* **280**, 32921–32929 (2005)
83. Yang D., Biragyn A., Kwak L.W., Oppenheim J.J.: Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**, 291–296 (2002)