

ÜBERSICHT

Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika

Robert Bals¹

ZUSAMMENFASSUNG

□ Antimikrobielle Peptide sind natürlich vorkommende Antibiotika. Als Bestandteil des Innate Immune Systems von Vertebraten besitzen sie neben ihrer direkten antimikrobiellen Funktion auch andere Aufgaben, beispielsweise als Entzündungsmediator. Ihr antimikrobielles Spektrum ist weit und umfasst gramnegative und -positive Bakterien, Pilze und lipidumhüllte Viren.

□ Aufgrund ihrer Struktur können antimikrobielle Peptide in verschiedene Familien eingeteilt werden. Beim Menschen kommen Peptide der Defensin-, Cathelicidin- und Histatinfamilie vor. Sie werden in verschiedenen Zelltypen gebildet, insbesondere in Abwehrzellen, wie Makrophagen oder Neutrophilen, sowie in Epithelzellen. Krankheiten mit Verminderung der Aktivität antimikrobieller Peptide sind durch Immunschwächen charakterisiert. Möglicherweise besteht auch eine Verbindung zur Lungenerkrankung bei zystischer Fibrose.

□ Ausgehend von natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptiden wurden Abkömmlinge als Antibiotika weiterentwickelt. In diesem Überblick wird zum einen die Biologie antimikrobieller Peptide, zum anderen die Verwendung dieser Moleküle als Medikament besprochen.

Schlüsselwörter: Infektionen · Antimikrobielle Peptide · Antibiotika · Zystische Fibrose · Host Defense

Med Klin 2000;95:496–502.

ABSTRACT

Antimicrobial Peptides and Peptide Antibiotics

□ Antimicrobial peptides are naturally occurring antibiotics. As part of the innate immune system of vertebrates they have direct antimicrobial function. Further, they can act as mediators of inflammation. Their antimicrobial spectrum covers gram-positive and -negative bacteria as well as fungi and certain viruses.

□ Based on their structure, antimicrobial peptides can be divided into several families. Peptides of the defensin, cathelicidin, and histatin families have been isolated from humans, where they have been found in defense cells, such as macrophages or neutrophils, as well as in epithelial cells. Decreased production of antimicrobial peptides is associated with immune deficiencies. Further, lung disease in cystic fibrosis may be linked to the dysfunction of antimicrobial peptides.

□ Based on naturally occurring antimicrobial peptides, derivatives of these molecules were developed as innovative antibiotic drugs. The present review focuses on the biology of antimicrobial peptides as well as their potential as drugs.

Key Words: Infectious diseases · Antimicrobial peptide · Antibiotic · Cystic fibrosis · Host defense

Med Klin 2000;95:496–502.

Viele Antibiotika zeigen einen langsamen Verlust ihrer Wirksamkeit gegenüber multiresistenten Mikroorganismen. Die schnelle Vermehrung von Bakterien und ihre genetische Variabilität erlauben Mikroorganismen, in kurzer Zeit gegen Antibiotika resistent zu werden. Hier stellt die Tatsache ein besonderes Problem dar, dass in den letzten Jahrzehnten keine neue Klassen von Antibiotika eingeführt wurden. So sind beispielsweise neue Dritt- und Viertgenerationscephalosporine, Imipenem und neue Fluorochinolone lediglich Derivate älterer Grundsubstanzen.

In dieser Übersicht soll zum einen die Eignung antimikrobieller Peptide zur Verwendung als Medikament besprochen werden. Zum anderen soll die Biologie antimikrobieller Peptide diskutiert und dabei auch auf die Rolle dieser Moleküle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eingegangen werden. Als antimikrobielle Peptide werden Peptidmoleküle bezeichnet, die antimikrobielle Aktivität besitzen, weniger als 100 Aminosäuren lang und von individuellen Genen kodiert sind.

STRUKTUR ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Zurzeit werden zwei Gruppen von Peptidantibiotika klinisch verwendet, nämlich die Gramizidine und die Polymyxine [51]. Diese Substanzen werden meist für topische Anwendungen eingesetzt, eine systemische Anwendung ist durch Nebenwirkungen begrenzt. Polypeptidantibiotika wurden aus Mikroorganismen isoliert, so stammt Colistin beispielsweise aus *Bacillus polyxyma*. Auch für andere antimikrobielle Peptide dienten natürliche Substanzen als Ausgangsmaterial. In Tieren oder Pflanzen vorkommende Peptide wurden meist mit Techniken der Proteinbiochemie gereinigt. Ausgehend von Charakteristika ihrer Struktur, wurden dann Abkömmlinge der natür-

¹ Medizinische Klinik und Poliklinik I (Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck), Schwerpunkt Pneumologie (Leiter: Priv.-Doz. Dr. C. Vogelmeier), Klinikum der Universität München, Großhadern.

Eingang des Manuskripts: 21. 3. 2000.

Annahme des überarbeiteten Manuskripts: 14. 6. 2000.

lichen Moleküle synthetisiert und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet. Kationische Peptide mit antimikrobieller Funktion wurden in allen Lebensformen, vom Bakterium bis hin zum Menschen, gefunden und stellen so wohl einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, den eigenen Organismus gegen aggressive Eindringlinge zu schützen [17, 20, 33]. In den letzten Jahren wurden weit mehr als 100 unterschiedliche Moleküle beschrieben. Hinsichtlich ihrer zellulären Herkunft sind antimikrobielle Peptide von Vertebraten in Abwehrzellen, wie Makrophagen oder Granulozyten, aber auch in Blutplättchen oder insbesondere Epithelzellen exprimiert.

Die Gene antimikrobieller Peptide von Eukaryonten weisen Intron-Exon-Struktur auf [18]. Genfamilien strukturell ähnlicher Moleküle finden sich in Genomen oft in Clustern angeordnet. Das primäre Translationsprodukt ist ein Präpropeptid (Abbildung 1), dessen N-terminales Targetingpeptid beim Eintritt in das endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Der Propeptidanteil,

| Strukturmerkmal | Typische Vertreter und Vorkommen |
|--|--|
| Lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteine | Magainine (Frosch) LL-37/hCAP-18 (Cathelicidin, Mensch) |
| Peptide mit Cysteinen und Disulfidbindungen | Protegrin (Cathelicidin, Schwein) β -Defensine (Defensin, Säuger) α -Defensine (Defensin, Säuger) |
| Peptide mit ungewöhnlich hohem Anteil von ein oder zwei spezifischen Aminosäuren | PR-39 (Schwein) Indolicidin (Rind) |

Tabelle 1. Übersicht über verschiedene Klassen antimikrobieller Peptide, zusammen mit Strukturmerkmalen, typischen Vertretern und Vorkommen. Die Einteilung erfolgt aufgrund von Merkmalen der Sekundärstruktur. Es ist auch möglich, antimikrobielle Peptide nach anderen Gesichtspunkten einzuteilen, zum Beispiel nach Homologie ihrer Nukleotid- oder Aminosäuresequenz. So sind LL-37 und PR-39, die hier in verschiedenen Gruppen angesiedelt sind, Familienmitglieder der Cathelicidine, die sich durch Sequenzhomologien auszeichnen.

welcher oft negativ geladen ist, hat möglicherweise die Funktion, die Aktivität des eigentlichen Peptids durch ladungsabhängige Interaktionen zu inhibieren. Das Propeptid kann intrazellulär gespeichert werden. Die Aktivierung durch

Abspaltung des Propeptidanteils erfolgt möglicherweise für einige Peptide noch intrazellulär, für α -Defensine der Maus wurde beschrieben, dass die Aktivierung durch die Metalloproteinase Matrilysin extrazellulär geschieht [52].

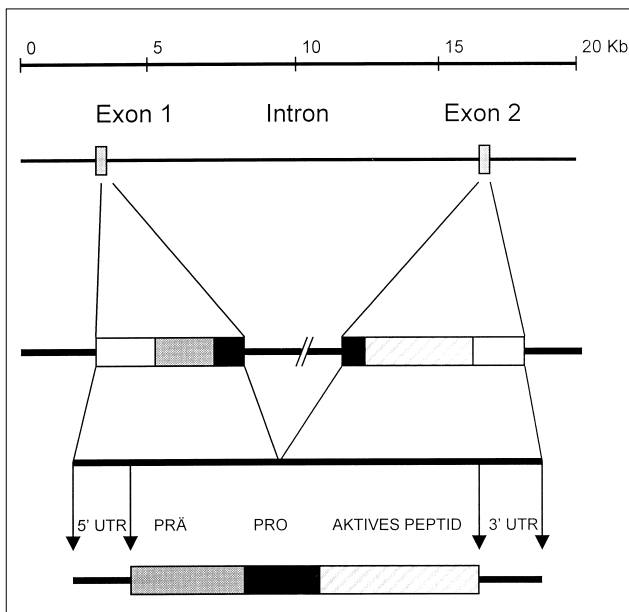


Abbildung 1. Darstellung der genomischen Struktur eines antimikrobiellen Peptids zusammen mit dem Aufbau der mRNA und des Peptids am Beispiel eines β -Defensins. Die Gene der meisten antimikrobiellen Peptide von Eukaryonten sind in Exons gegliedert, die von Introns unterbrochen werden. Nach Synthese der mRNA (UTR = untranslated region, nicht translatierter Bereich) wird ein Präpropeptid gebildet, wobei für das aktuelle Beispiel das erste Exon des Gens für das Prä- und einen Teil des Peptids kodiert, das zweite Exon für das restliche Peptidmolekül.

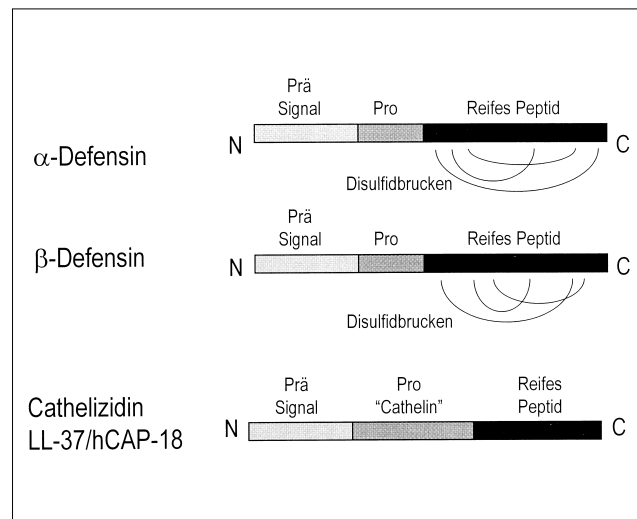


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Struktur verschiedener antimikrobieller Substanzen. Nach Abspaltung des Präproanteils hat das reife Peptid antimikrobielle Funktion. α - und β -Defensine zeichnen sich durch die Anwesenheit von drei intramolekularen Disulfidbrücken aus, unterscheiden sich jedoch in der Lage der Cysteine und deren Verknüpfung. Das Charakteristikum der Cathelicidine ist eine hoch konservierte Proregion, die Cathelin genannt wird. Das C-terminal gelegene reife Peptid ist dagegen sehr individuell (aus: Bals R, Gries M. Kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit. In: Reinhardt D, Goetz M, Kraemer R, et al. Hrsg. Mukoviszidose. Heidelberg: Springer, im Druck).

ÜBERSICHT

ALLGEMEINE STRUKTUR
ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Allen antimikrobiellen Peptiden sind zwei Eigenschaften gemeinsam: Zum einen besitzen sie wegen des Vorkommens kationischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) bei neutralem pH eine positive Nettoladung, zum anderen weist ihre dreidimensionale Struktur eine hydrophobe und eine hydrophile Seite auf [24]. Diese Struktureigenschaften sind für den Wirkungsmechanismus wichtig. Abgesehen von diesen Übereinstimmungen variieren Gruppen antimikrobieller Peptide in Länge, Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur.

GRUPPEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Peptidantibiotika sind integraler Bestandteil des Abwehrsystems von Tieren und Pflanzen [11, 54]. Eine Einteilung kann verschiedenen Prinzipien folgen.

In Tabelle 1 sind Gruppen antimikrobieller Peptide nach Merkmalen der Sekundärstruktur des Moleküls gegliedert. Eine andere Gliederung teilt die Substanzen aufgrund konservierter Sequenzabschnitte in Familien ein. Mitglieder einer Familie zeichnen sich so durch übereinstimmende Strukturcharakteristika aus, zum Beispiel die konservierten Cysteine der Defensine (Abbildung 2). Das gemeinsame Strukturmerkmal der Cathelicidine ist ein hoch konservierter Proanteil des Peptids. So unterscheiden sich Cathelicidine in der Länge des aktiven C-terminalen Peptids stark. Beim Menschen sind bislang Substanzen der Defensin-, Cathelicidin- und Histatinfamilie isoliert worden.

Es wurden auch anionische antimikrobielle Peptide beschrieben, die wohl durch Abspaltung aus größeren Proteinen entstehen [30]. Diese Substanzgruppe soll hier nicht besprochen werden.

WIRKUNGSMECHANISMUS
VON PEPTIDANTIBIOTIKA

WIRKUNGSPRINZIP

Die meisten antimikrobiellen Peptide sind bei physiologischem pH positiv geladen. Dadurch kommt es zu Interaktionen mit negativen Ladungen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, insbesondere mit Lipopolysacchariden (Abbildung 3). Diese ladungsabhängigen Interaktionen verleihen antimikrobiellen Peptiden eine relative Spezifität gegenüber Zellmembranen von Mikroorganismen, da diese im Allgemeinen mehr negative Ladungen aufweisen als eukaryontische Zellen. Nach der ladungsabhängigen Interaktion mit negativ geladenen Oberflächenmolekülen der Zielzelle kommt es zu Wechselwirkungen mit der Membran [28, 38]. Durch ihren amphipathischen Charakter können sich antimikrobielle

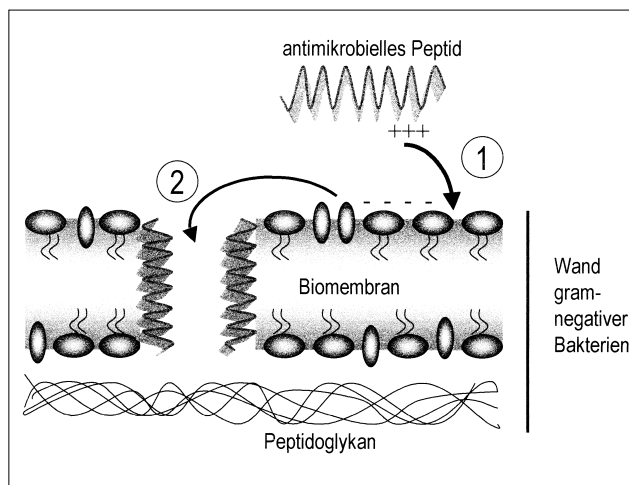


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Wirkungsweise kationischer antimikrobieller Peptide. In einem ersten Schritt (1) kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Peptid und negativ geladenen Substanzen der Oberfläche von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharid. Die amphipathische Eigenschaft der Peptide erlaubt bei Vorliegen ausreichender Konzentrationen, Kanäle in Biomembranen zu formen (2), in denen die hydrophoben Seiten der Peptidmoleküle nach außen hin zu den Membranlipiden gerichtet sind, die hydrophilen Seiten die Innenwand des Kanals bilden. Die Ausbildung dieser Poren führt schließlich zur Abtötung des Mikroorganismus. Die Fähigkeit antimikrobieller Peptide, Mikroorganismen in kurzer Zeit (Minuten) abtöten zu können, lässt sich durch diesen Wirkungsmechanismus erklären (aus: Bals R, Griese M. Kleinmolekulare antimikrobielle Substanzen der Atemwegsflüssigkeit. In: Reinhardt D, Goetz M, Kraemer R, et al. Hrsg. Mukoviszidose. Heidelberg: Springer, im Druck).

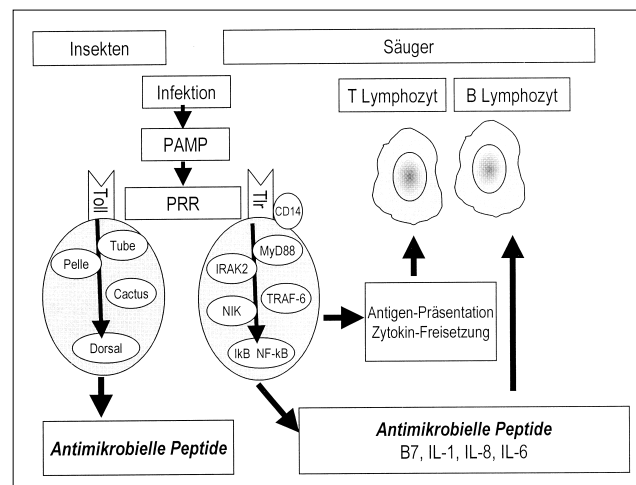


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Immunsystems mit Betonung des Innate Immune Systems und der Funktion antimikrobieller Peptide. In den letzten Monaten wurde erkannt, dass das Innate Immune System bei *Drosophila* und bei Säugern (Maus, Mensch) homologe Rezeptoren besitzt, die Toll bzw. Toll Like Receptor (TLR) genannt wurden [35, 43, 53]. Diese Rezeptoren interagieren als Pattern Recognition Receptor (PRR) mit Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP), konservierten Molekülstrukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen. Bei Insekten wird nach Aktivierung der Toll-Rezeptoren über eine intrazelluläre Signalkaskade die Expression antimikrobieller Peptide hochreguliert. Analog dazu könnte bei Säugern ebenfalls durch die Aktivierung der TLR die Expression antimikrobieller Peptide stimuliert werden. Bei Insekten haben antimikrobielle Peptide eine direkte antimikrobielle Funktion, bei Säugern trat im Laufe der Evolution die wichtige Funktion hinzu, auch Zellen des adaptiven Immunsystems zu stimulieren. Innate und adaptives Immunsystem sind also eng miteinander verbunden.

Peptide in Membranen einlagern und in Komplexen mit mehreren Peptiden Kanäle durch die Membran bilden (Abbildung 3). Der Vorgang, der schließlich zum Untergang der betroffenen Zelle führt, besteht in der Ausbildung von Kanälen durch die zytoplasmatische Membran mit Zusammenbruch des Membranpotentials. Es sind auch noch andere Wirkungsmechanismen beschrieben worden, die zum Teil auch spezifische Interaktionen mit Rezeptormolekülen oder Interaktionen mit intrazellulären Molekülen beinhalten. Ein Beispiel hierfür ist das Cathelicidin PR-39, ein antimikrobielles Peptid, welches aus dem Darm und neutrophilen Granulozyten des Schweins isoliert wurde [1, 48]. Die antibakterielle Funktion beruht nicht wie bei anderen Peptiden auf der Ausbildung von Membranporen, sondern auf der Bindung an intrazelluläre Rezeptoren. Weiter hat dieses Peptid eine Rolle bei der Wundheilung [16], bei der Attraktion von Neutrophilen [29] sowie bei der Angiogenese [37].

IN-VITRO-WIRKSAMKEIT

Die mögliche Funktion dieser Stoffe als Abwehrsubstanz gegenüber Mikroorganismen wurde lediglich aus In-vitro-Versuchen abgeleitet, in denen gereinigte Substanzen antimikrobielle Aktivität zeigten. Das Wirkungsspek-

trum antimikrobieller Peptide ist breit und umfasst nicht nur grampositive und -negative Bakterien, sondern auch Pilze und Viren mit Lipidhüllen [24]. Obwohl ihre antimikrobielle Aktivität in vitro nicht so hoch ist wie die einiger konventioneller Antibiotika, liegen minimal inhibitorische Konzentrationen (MIC) gegen multiresistente Organismen mit 1 bis 8 µg/ml im Bereich potenter Antibiotika. Antimikrobielle Peptide töten Bakterien im Gegensatz zu konventionellen Antibiotika im Verlauf weniger Minuten, sie sind mikrobizid. Es sind einige Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber antimikrobiellen Peptiden beschrieben worden, im Allgemeinen besteht jedoch eine ausgesprochen geringe Tendenz zur Ausbildung von Resistenzen [24]. Mechanismen zur Resistenzentwicklung umfassen Veränderungen von Effluxpumpensystemen [47] oder die Modifikation von Oberflächenbestandteilen der äußeren Hülle von Mikroorganismen [39, 46].

Für einige Substanzen konnte ein Synergismus mit chemischen Antibiotika oder mit körpereigenen Abwehrsubstanzen, wie Lysozym oder Lactoferrin, nachgewiesen werden [3, 4]. Neben der mikrobiziden Wirkung besitzen Peptidantibiotika eine Aktivität gegen Endotoxin [6, 27].

VERWENDUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE ALS PHARMAKA

KLINISCHE STUDIEN

Mehrere Studien zur In-vivo-Toxizität und -Wirksamkeit antimikrobieller Peptide wurden als Tierexperimente oder als Phase-I- bis -III-Humanstudien durchgeführt und publiziert. Diese Studien haben zum Ziel, antimikrobielle Peptide oder deren Derivate als innovative Antibiotika oder anti-LPS-Medikamente zur Behandlung septischer Zustände zu entwickeln. Dabei wurden meist synthetisch hergestellte Substanzen verwendet, deren Baumerkmale oft von natürlich vorkommenden Substanzen abgeleitet wurden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über den Status antimikrobieller Peptide als Therapeutika. Die Entwicklungen auf diesem Gebiet werden zumeist von Biotechnologiefirmen in Allianz mit großen Pharmafirmen getragen.

Neben der antimikrobiellen Wirksamkeit besitzen einige antimikrobielle Peptide die Eigenschaft, bakterielles Endotoxin (LPS) zu binden und zu inaktivieren. Eine Vielzahl von Tierstudien belegt, dass antimikrobielle Peptide auch in vivo gegen Infektionen wirksam sind. So schützte die Applikation von MBI-27 und MBI-28 Mäuse gegen peritoneale Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und gegen Sep-

| Firma | Substanz | Anwendungsbereich | Entwicklungsstufe |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| Magainin Pharmaceuticals | Pexiganan | Diabetische Fußulzera | Phase III abgeschlossen |
| | Defensine | | Vorklinisch |
| Micrologix Biotech | Bactolysin | Kathetersepsis | Phase II |
| Intrabiotics | IB-367 (Protegrin) | Orale Mukositis bei Chemotherapie | Phase II |
| | Ramoplanin (Lipopeptid) | Sepsis | Phase II |
| Xoma | Neuprex (BPI) | Meningitis | Phase III abgeschlossen |
| Demegen | Peptidyl MIM | Geschlechtskrankheiten, Verbrennungen | Präklinisch |
| Cubist Pharmaceuticals | Daptomycin | Sepsis | Phase III |
| Periodontix | P-113 (Histatin) | Lungeninfektion | Präklinisch |
| | HistaWasch (Histatin) | Periodontitis | Phase II |

Tabelle 2. Übersicht über aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Herstellung antimikrobieller Peptide als Antibiotika. Die Studien umfassen die Phasen I bis III, gehen also über rein toxikologische Beobachtungen bis hin zum Wirksamkeitsnachweis. Die Tabelle enthält die Information, die dem Autor im März 2000 von den genannten Firmen direkt oder die durch die Firmen-Websites im World Wide Web zur Verfügung gestellt wurden.

ÜBERSICHT

sis [22]. Auch die Gabe des Cathelicidins LL-37 führte zu einer protektiven Wirkung gegen die letalen Folgen einer LPS-Applikation [27]. Wir zeigten, dass auch die endogene Überproduktion dieses Peptids in einem murinen Modell gegen Lungeninfektion und Sepsis schützt [6]. Auch konnte in einem Tiermodell der zystischen Fibrose der Abwehrdefekt der Atemwegszellen durch Überexpression von LL-37 korrigiert werden [8]. Pexiganan, IB-367 oder Bactolysin wurden in klinischen Studien der Phasen I bis III getestet und sind zum Teil auf dem Weg der Arzneimittelzulassung in den USA (Tabelle 2).

PRODUKTION VON PEPTID-ANTIBIOTIKA ALS PHARMAKA

Die zwei wesentlichen Methodengebiete zur Entwicklung und Produktion von Peptidantibiotika sind Protein-/Peptidbiochemie und Rekombinante-DNA-Technologie [24]. Mittels chemischer Synthese können Peptide in beliebiger Variabilität erzeugt und mittels Methoden der kombinatorischen Chemie und des High Throughput Screening auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden [12, 32]. Um die hohen Kosten der Erzeugung größerer Mengen von Peptidantibiotika mittels chemischer Synthese zu umgehen, wurden auch rekombinante Methoden eingesetzt, um die Zielsubstanzen beispielsweise als Fusionsproteine zu erzeugen. Allerdings stellt sich bei diesem Ansatz das Problem der Reinigung.

Ob sich Peptidantibiotika für klinische Anwendungen eignen, wird von vielen Faktoren abhängen, darunter Toxizität, Stabilität und Immunogenität der Substanzen sowie Fragen der Anwendbarkeit und Formulierungen [32]. Derzeit werden die meisten klinischen Studien für topische Anwendungen durchgeführt. Einige Substanzen werden auch für inhalative oder gastrointestinale Applikationsrouten entwickelt. Diese topischen Anwendungen erlauben allerdings keinen Schluss auf die Verwendbarkeit antimikrobieller Peptide für den Einsatz als systemische Antibiotika. Aufgrund ihres Wirkungsspektrums ist in der Zukunft die Verwendung antimikrobieller Peptide nicht nur als Antibiotika, sondern auch

als Immunmodulatoren sowie anti-LPS-Pharmaka denkbar.

FAMILIEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE DES MENSCHEN

Organismen, die lediglich über ein „primitives“ Immunsystem verfügen, welches ohne B- und T-Zellen auskommt, sind in der Lage, ihren Körper wirkungsvoll gegen eindringende Mikroorganismen zu schützen [13]. Bestandteile dieses altertümlichen Abwehrsystems sind auch beim Menschen vorhanden und haben neben ihrer ursprünglichen direkten Abwehrfunktion auch die Aufgabe, das adaptive Immunsystem zu regulieren. Dieses Innate Immune System ist eine erste Barriere gegen pathogene Einflüsse und steht zeitlich und räumlich vor dem adaptiven Immunsystem [14, 41, 42]. Das Innate Immune System leistet folgende Aktivitäten: 1. Erkennung von Mikroorganismen als fremd, 2. initiale Bekämpfung und Eliminierung des Pathogens und 3. Aktivierung des adaptiven Immunsystems, wenn notwendig. Antimikrobielle Peptide sind mit ihrer Funktion als mikrobizide Substanzen und als Entzündungsmediator insbesondere an den Punkten 2. und 3. beteiligt und dienen damit als Effektorsubstanzen des Innate Immune Systems (Abbildung 4).

DEFENSINE

Defensine sind antimikrobielle Peptide, die drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzen und hauptsächlich β -Faltblattstruktur aufweisen. α - und β -Defensine sind zwei Untergruppen, die sich unter anderem in der Ausbildung der Disulfidbrücken unterscheiden (siehe Abbildung 2) [17]. Derzeit sind beim Menschen sechs α -Defensine und zwei β -Defensine bekannt, deren Gene auf Chromosom 8 gruppiert liegen.

□ **Humane α -Defensine:** α -Defensine sind zwischen 29 und 35 Aminosäuren lang und weisen eine dreisträngige β -Blattstruktur auf. α -Defensine des Menschen, Human Neutrophil Peptides 1–4 (HNP 1–4) finden sich vor allem in den primären (azurophilen) Granula neutrophiler Granulozyten, wo sie einen Hauptteil des Granulainhalts (bis zu 18% der gesamten Protein-

masse eines Neutrophilen) ausmachen und einen wichtigen nicht oxidativen Mechanismus zur Abtötung von Mikroorganismen darstellen [34]. Im Verlauf der Akkumulation von Neutrophilen bei Atemwegsentzündungen kommt es in den Atemwegen zu hohen Konzentrationen an α -Defensinen, welche zytotoxische Effekte zur Folge haben können [26, 50]. Human Defensin 5 und 6 (HD-5, HD-6) sind in Paneth-Zellen des Dünndarms und zum Teil auch im Urogenitaltrakt exprimiert [10], werden jedoch auch in den Atemwegen gefunden. Neben der antimikrobiellen Aktivität dieser Substanzen wurden auch Funktionen als Entzündungsmediatoren [26] und Ionenkanäle [36, 40] beschrieben.

□ **Humane β -Defensine:** β -Defensine sind zwischen 36 und 42 Aminosäuren lang und werden insbesondere an epithelialen Oberflächen produziert. Beim Menschen wurden Human β -Defensin 1 (hBD-1) und Human β -Defensin 2 (hBD-2) isoliert [3, 9, 25]. Beide β -Defensine werden zusammen mit anderen antimikrobiellen Substanzen von Epithelien auf Körperoberflächen gebildet, so beispielsweise im Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationsstrakt. hBD-1 ist konstitutiv exprimiert, die Transkription und Sekretion von hBD-2 dagegen werden durch inflammatorische Mediatoren stimuliert [3, 49].

CATHELICIDINE: LL-37/hCAP-18

Beim Menschen wurde nur ein Vertreter dieser Familie gefunden und LL-37 (nach den beiden N-terminalen Aminosäuren des aktiven Peptids) oder hCAP-18 (Human Cationic Antimicrobial Peptide) genannt [23, 31]. Initial wurde LL-37/hCAP-18 in neutrophilen Granulozyten beschrieben, später wurde das Peptid auch auf Körperoberflächen, wie der Haut, gefunden [15]. In den Atemwegen wird LL-37/hCAP-18 in den gleichen Zelltypen produziert, in denen auch β -Defensine und andere Abwehrsubstanzen gebildet werden [4]. Nach intrazellulärer Speicherung werden Cathelicidine bei der Sekretion durch Endoproteolyse aktiviert. Die Überexpression von LL-37 mittels Gentransfermethoden resultierte in einer Steige-

rung der lokalen Infektabwehr in Tiermodellen von zystischer Fibrose, Lungenentzündung oder septischem Schock [6, 8].

BIOLOGISCHE FUNKTIONEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE

Die namensgebende antimikrobielle Aktivität wurde in zahlreichen In-vitro-Untersuchungen belegt. Die Bedeutung antimikrobieller Peptide für das Abwehrsystem von Vertebraten ist im Wesentlichen spekulativ. Die gezielte Ausschaltung antimikrobieller Peptide von Fruchtfliegen resultierte in einer selektiven Kolonialisierung der Tiere mit verschiedenen Mikroorganismen [35]. Genetische Methoden in Mausmodellen sind notwendig, um die Funktion antimikrobieller Peptide von Säugern zu klären. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität der Atemwegsflüssigkeit, welche aus einem humanen bronchialen Xenograftmodell gewonnen wurde, signifikant abnahm, nachdem die Expression von hBD-1 durch die Applikation von Antisense-Oligonukleotiden spezifisch gehemmt wurde [21]. Murine Homologe antimikrobieller Peptide des Menschen eröffnen wichtige Möglichkeiten, genetische Strategien in Mausmodellen anzuwenden [2, 5, 44, 45].

BEZIEHUNG ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE ZUR PATHOGENESE VON ERKRANKUNGEN

Ein Vielzahl von Indizien weist darauf hin, dass antimikrobielle Peptide für die Abwehr des menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen. Direkte Beweise stehen allerdings aus. Auch Beziehungen zwischen Ausfällen der Funktion antimikrobieller Peptide und Krankheiten sind meist nur spekulativ. Ein wichtiger Grund dafür ist, dass das Abwehrsystem des Menschen ein äußerst komplexes Gefüge zahlreicher Mitspieler ist, deren isolierte Funktion nur schwer experimentell zu erfassen ist.

Eine angeborene Störung der Ausreifung von Granulozyten zeichnet sich durch die Verminderung von Proteinen der spezifischen Granula aus und ist klinisch durch gehäufte bakterielle Infektionen charakterisiert [19].

Das derzeitige Interesse an antimikrobiellen Peptiden steht vor allem mit der Erforschung der Pathogenese der zystischen Fibrose im Zusammenhang. Initial wurde spekuliert, dass eine erhöhte Salzkonzentration der Atemwegsflüssigkeit bei Patienten mit zystischer Fibrose zu einer Inaktivierung von Defensinen führen würde [7]. Diese Hypothese konnte zwar bislang weder bestätigt noch widerlegt werden, unterstützte jedoch eine intensive Suche nach antimikrobiellen Peptiden des humanen Respirationstraktes.

AUSBLICK

Die Rolle antimikrobieller Peptide als Bestandteil des Innate Immune Systems ist in den letzten Jahren entdeckt und dokumentiert worden. Neben ihrer Bedeutung als Antibiotika wurden insbesondere auch andere Funktionen der Moleküle, wie die als Entzündungsmediator, erkannt. In der Zukunft werden aus verschiedenen Bereichen Erkenntnisgewinne zu erwarten sein. Zum einen werden durch die Ergebnisse des Human Genome Project und die Möglichkeiten der Bioinformatik neue Moleküle entdeckt werden. Zum anderen werden Funktionen antimikrobieller Peptide durch die Anwendungen verschiedener Techniken analysiert werden. Insbesondere genetische Ansätze werden informativ sein. Dazu gehören insbesondere genetisch veränderte Tiere, wie zum Beispiel Knockout- oder transgene Mäuse.

Weiter können antimikrobielle Peptide als Ausgangsmoleküle für die Entwicklung innovativer Antibiotika verwendet werden. Neben Screening von natürlichen Quellen neuer antimikrobieller Peptide und Modifizierung der Molekülstruktur werden diese Entwicklungen über aufwändige toxikologische und pharmazeutische Untersuchungen womöglich zu neuen Klassen von Pharmaka führen. Dies ist gerade vor dem Hintergrund steigender Resistenzen vieler Mikroorganismen von entscheidender praktischer Bedeutung. Mit ihrer Rolle als Entzündungsmediator bieten antimikrobielle Peptide des Menschen möglicherweise auch als Drug Target Ansatzpunkte zur Behandlung von Erkrankungen.

Danksagung: Für kontinuierliche Unterstützung danke ich den Herren Prof. Dr. G. Steinbeck, Priv.-Doz. Dr. C. Vogelmeier und Prof. Dr. James M. Wilson. Meine Arbeiten zum Thema „Innate Immune System des Respirationstraktes“ werden unterstützt durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ba 1641/3-1).

LITERATUR

1. Agerberth B, Lee J, Bergmann T, et al. Amino acid sequence of PR-39: isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem* 1991;202:849–54.
2. Bals R, Goldman MJ, Wilson JM. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun* 1998;66:1225–32.
3. Bals R, Wang X, Wu Z, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998;102:874–80.
4. Bals R, Wang X, Zasloff M, et al. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9541–6.
5. Bals R, Wattler S, Nehls M, et al. Mouse beta-defensin 3 is a regulated antimicrobial peptides expressed in mucosal organs. *Infect Immun* 1998;67:3542–7.
6. Bals R, Weiner D, Moscioni A, et al. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* 1999;67:6084–9.
7. Bals R, Weiner D, Wilson J. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999;103:303–7.
8. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, et al. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 1998;103:1113–7.
9. Bensch KW, Raida M, Magert H-J, et al. hBD-1: a novel b-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331–5.
10. Bevins CL, Jones DE, Dutra A, et al. Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics* 1996;31:95–106.
11. Boman H. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 1991;65:205–7.
12. Breithaupt H. The new antibiotics. *Nat Biotechnol* 1999;17:1165–9.
13. Charlet M, Chernysh S, Philippe H, et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem* 1996;271:21808–13.
14. Fearon D, Locksley R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50–4.
15. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997;272:15258–63.
16. Gallo R, Ono M, Povsic T, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11035–9.
17. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmac Ther* 1995;66:191–205.
18. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:584–9.
19. Ganz T, Metcalf J, Gallin J, et al. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and “specific” granule deficiency. *J Clin Invest* 1988;552–6.
20. Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* 1997;34:343–54.
21. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88:553–60.

ÜBERSICHT

22. Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun* 1996;64:4922–7.
23. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 1996;238:325–32.
24. Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997;349:412–22.
25. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
26. Hiemstra P, van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1998;12:1200–8.
27. Hirata M, Zhong J, Wright SC, et al. Structure and functions of endotoxin-binding peptides derived from CAP18. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:317–26.
28. Hristova K, Selsted ME, White SH. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J Biol Chem* 1997;272:24224–33.
29. Huang H-J, Ross C, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol* 1997;61:624–9.
30. Kalfa VC, Brogden KA. Anionic antimicrobial peptide-lysozyme interactions in innate pulmonary immunity. *Int J Antimicrob Agents* 1999;13:47–51.
31. Larrick J, Hirata M, Balint R, et al. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995;63:1291–7.
32. Latham PW. Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol* 1999;17:755–7.
33. Lehrer R, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr Opin Immunol* 1999;11:23–7.
34. Lehrer R, Ganz T, Selsted M. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991;229–30.
35. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973–83.
36. Lencer W, Cheung G, Strohmeier G, et al. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8585–9.
37. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 1999;6:49–55.
38. Lohner K, Latal A, Lehrer RI, et al. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 1997;36:1525–31.
39. Lysenko ES, Gould J, Bals R, et al. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:1664–71.
40. Maget-Dana R, Ptak M. Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys J* 1997;73:2527–33.
41. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10:399–415.
42. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295–8.
43. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–7.
44. Morrison G, Davidson D, Dorin J. A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 1999;442:112–6.
45. Morrison GM, Davidson DJ, Kilanowski FM, et al. Mouse beta defensin-1 is a functional homolog of human beta defensin-1. *Mammal Genome* 1998;9:453–7.
46. Peschel A, Otto M, Jack R, et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999;274:8405–10.
47. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, et al. 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* 1998;95:1829–33.
48. Shi J, Ross C, Chengappa M, et al. Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analogous to PR-39, an antimicrobial peptide from the small intestine. *J Leukoc Biol* 1994;56:807–11.
49. Singh P, Jia H, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14961–6.
50. Soong L, Ganz T, Ellison A, et al. Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* 1997;46:98–102.
51. Spitzky K. Polypeptides antibiotics. In: Kiemmerle H, ed. *Antimicrobial chemotherapy*. New York: Thieme, 1983: 207–17.
52. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999;286:113–7.
53. Yang R-B, Mark M, Gray A, et al. Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. *Nature* 1998;395:284–8.
54. Zasloff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1991;4:3–7.

Korrespondenzanschrift:

Dr. med. Dipl.-Biol. Robert Bals,
 Medizinische Klinik und Poliklinik I,
 Schwerpunkt Pneumologie,
 Klinikum der Universität München,
 Großhadern,
 Marchioninistraße 15,
 D-81773 München,

Telefon (+49/89) 7095-3071,
 Fax -8877,
 E-Mail: rbals@
 med1.med.uni-muenchen.de