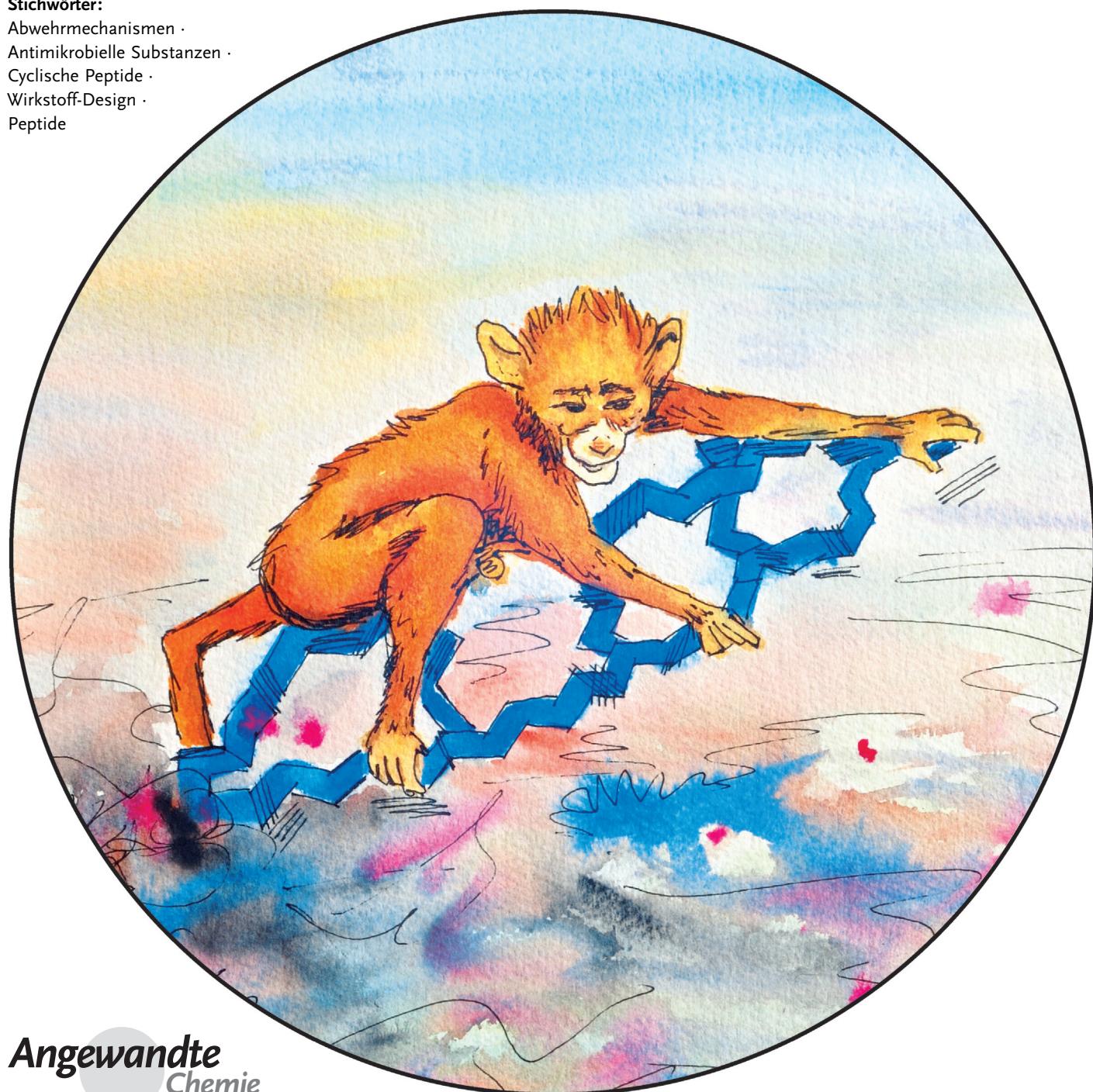


Chemie und Biologie von Theta-Defensinen

Anne C. Conibear und David J. Craik*

Stichwörter:

Abwehrmechanismen ·
Antimikrobielle Substanzen ·
Cyclische Peptide ·
Wirkstoff-Design ·
Peptide



Cyclische Peptide werden in vielen verschiedenen Organismen vorgefunden und zeichnen sich durch ihre Stabilität und ihre Rolle bei Abwehrmechanismen aus. Warum wurde in Säugetieren nur eine Klasse cyclischer Peptide gefunden? Möglicherweise haben wir noch nicht gründlich genug nach ihnen geforscht, oder die für ihre Erkennung notwendigen Techniken sind noch nicht vollständig entwickelt. Wir verstehen auch ihre faszinierende Biosynthese aus zwei separaten Genprodukten noch nicht. Die Bewältigung dieser Schwierigkeiten wird die Anwendung chemischer Hilfsmittel sowie Erkenntnisse über andere Klassen cyclischer Peptide erfordern. Wir stellen hier die neuesten Entwicklungen bei der Charakterisierung von Theta-Defensinen vor und beschreiben die wichtige Rolle, die die Chemie bei der Skizzierung ihrer Wirkmechanismen spielte. Darüber hinaus betonen wir das Potenzial von Theta-Defensinen als antimikrobielle Substanzen und als Gerüste für Peptidwirkstoffe.

1. Natürliche cyclische Peptide

1.1. Einleitung

Ribosomal synthetisierte cyclische Peptide wurden mittlerweile in Bakterien, Pilzen, Pflanzen sowie Tieren entdeckt^[1–4] und zeichnen sich durch viele verschiedene Größen, Strukturen und biologische Eigenschaften aus (Abbildung 1).^[5–8] Als die pharmazeutische Industrie begann, sich für Peptidwirkstoffe zu interessieren, erwiesen sich cyclische Peptide aufgrund ihrer Zersetzungsstabilität als äußerst viel-

versprechend.^[9–11] Theta-Defensine (θ -Defensine) sind die einzige bekannte Klasse cyclischer Peptide aus Säugetieren und der Schwerpunkt dieses Aufsatzes. Sie müssen aber im breiteren Zusammenhang mit weiteren cyclischen Peptiden verstanden werden, da sie mit jenen gängige Eigenschaften und Probleme teilen. Wir beschreiben, wie einige dieser Probleme für andere Klassen cyclischer Peptide angegangen wurden und wie diese zu unserem Verständnis von θ -Defensinen beitragen können.

Die hier beschriebenen cyclischen Peptide sind alle direkte Genprodukte, anzumerken ist aber, dass es viele nicht ribosomal synthetisierte cyclische Peptide gibt.^[12,13] Ein Beispiel hierfür ist Cyclosporin, ein Pilzpeptid, das als Immunsuppressivum eingesetzt wird.^[14] Außerdem gibt es eine wachsende Zahl bioaktiver Peptide, die künstlich cyclisiert wurden, um die durch ein cyclisches Peptidrückgrat bewirkte, erhöhte Stabilität zu nutzen. Ein Beispiel hierfür ist das cyclisierte Kegelschneckenpeptid Vc1.1, das in einem Tierversuch eine erhöhte Stabilität und Potenz aufwies.^[15]

Die Suche nach neuen cyclischen Peptiden ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da das Fehlen der Termini cyclische Peptide unempfindlich gegen traditionelle Sequenzierungsmethoden macht. Außerdem wird die Suche auf der Ebene der Nukleinsäuren durch die unbekannte Position der „Termini“ und die geringe Größe des Gens erschwert. Neue Suchmethoden befinden sich allerdings in der Entwicklung, insbesondere solche unter Zuhilfenahme der Massenspek-

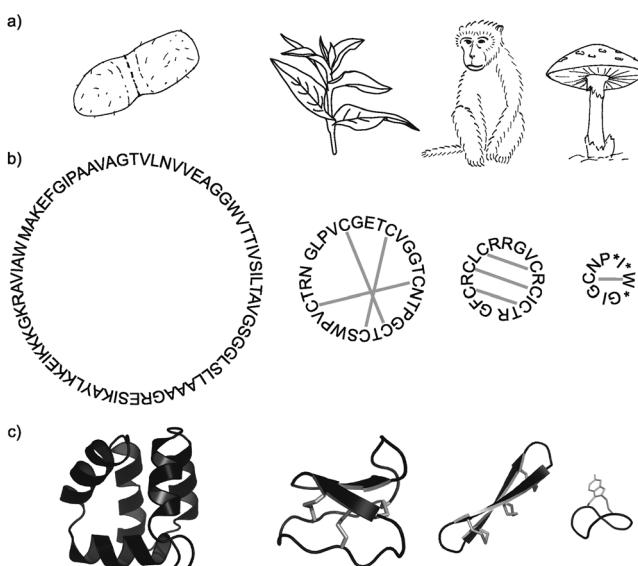


Abbildung 1. Vielfalt cyclischer Peptide. a) Cyclische Peptide kommen in Bakterien, Pflanzen, Tieren und Pilzen vor. b) Sie unterscheiden sich in ihren Sequenzen, ihrer Größe und ihren Disulfidverknüpfungen. Aminosäuresequenzen von AS-48, Kalata B1, RTD-1 und α -Amanitin mit als graue Linien gezeichneten Disulfidbindungen und mit einem Stern gekennzeichneten, posttranslational modifizierten Resten. c) Dreidimensionale Strukturen von AS-48 (PDB 1E68),^[5] Kalata B1 (PDB 1NB1),^[6] RTD-1 (PDB 2LYF)^[7] und α -Amanitin (PDB 1K83)^[8] in der Bänderdarstellung.

Aus dem Inhalt

1. Natürliche cyclische Peptide	10787
2. Säugetierdefensine	10789
3. Verteilung und Vielfältigkeit	10790
4. Genstruktur und Biosynthese	10791
5. Struktur und Stabilität	10792
6. Synthese	10793
7. Antimikrobielle Wirkung	10794
8. Anwendungen	10795
9. Zusammenfassung und Ausblick	10796

[*] A. C. Conibear, Prof. D. J. Craik
Institute for Molecular Bioscience
The University of Queensland
Brisbane, 4072 QLD (Australia)
E-Mail: d.craik@imb.uq.edu.au
Homepage: <http://www.imb.uq.edu.au/index.html?page=11695>

trometrie,^[16] und Daten zu den aufgefundenen cyclischen Peptiden werden in Cybase gesammelt.^[17] Wir erwarten, dass mit der Entwicklung neuer Entdeckungsmethoden andere Klassen cyclischer Peptide sowie neuartige Bioaktivitäten und Anwendungen bekannt werden.

1.2. Bakterielle cyclische Peptide

Von Bakterien produzierte Gen-kodierte cyclische Peptide^[4] bestehen üblicherweise aus 30–70 Aminosäuren. Bei ihnen handelt es sich um die erste beschriebene Klasse ribosomaler cyclischer Peptide; das cyclische Rückgrat von AS-48, einem Bakteriocin, wurde 1994 aufgeklärt.^[18] Cyclische Bakteriocine werden von Bakterien im Stamm Firmicutes produziert und haben aus α -Helices bestehende kugelförmige Strukturen.^[4] Cyanobakterien erzeugen Cyanobaktine, die zusätzlich zur Cyclisierung posttranskriptionale Modifikationen aufweisen.^[19] Sowohl cyclische Bakteriocine als auch Cyanobaktine scheinen zur Verteidigung gegen konkurrierende Bakterien produziert zu werden und könnten als antimikrobielle Wirkstoffe eingesetzt werden. Im Unterschied dazu spielen die cyclischen Pilins eine strukturelle Rolle und werden für den Transfer von genetischem Material verwendet.^[20] Der Mechanismus der Biosynthese von bakteriellen cyclischen Peptiden wird besser verstanden als der ihrer eukaryotischen Gegenstücke, da die Gene, die für diese kodieren, oftmals Cluster mit den Genen bilden, die für die sie prozessierenden Enzyme kodieren.^[19,21] Die Aufklärung dieser Mechanismen in Bakterien wird die rekombinante Herstellung cyclischer Peptide ermöglichen und somit die Entwicklung von Wirkstoffen auf Basis cyclischer Peptide vereinfachen.

1.3. Cyclische Peptide aus Pilzen

Pilze der Familie Amanitaceae produzieren zwei Klassen von cyclischen Peptiden, die Amatoxine und die Phallocidine, die beide ungewöhnliche posttranskriptionale Modifikationen aufweisen.^[2,22] Während Phallocidine aus sieben Resten mit einer Cys-Trp-Sulfidverknüpfung bestehen, setzen sich Amatoxine aus acht Resten mit einer Cys-Trp-Sulfoxidverknüpfung zusammen und sind hydroxyliert.^[23] Cyclische Pilzpeptide werden an ihren N- und C-terminalen Prozessierungsstellen von Pro-Resten flankiert, und es wird ange-

nommen, dass sie durch eine Prolyl oligopeptidase cyclisiert werden.^[22,24] Sowohl die Amatoxine als auch die Phallocidine sind für den Menschen hochgiftig; Amatoxine inhibieren durch Bindung an die RNA-Polymerase II die Transkription, und Phallocidine binden an F-Aktin, das die Faserstruktur innerhalb der Zelle stabilisiert.^[23,25]

1.4. Cyclische Peptide aus Pflanzen

Cyclische Peptide aus Pflanzen sind in drei Familien unterteilt, die Cyclotide,^[26] die Trypsininhibitoren der Sonnenblume^[27] und Orbitide.^[28] Cyclotide bestehen aus ca. 30 Resten und zeichnen sich durch das Motiv des cyclischen Cystinknotens aus.^[26,29] Nach der Entdeckung des prototypischen Cyclotids Kalata B1^[29,30] wurden Cyclotide in den Familien Violaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Solanaceae und Cucurbitaceae gefunden, und ihre Strukturen, Wirkungen und Anwendungen wurden ausführlich besprochen.^[2,31] Cyclotide werden basierend auf ihren Sequenzen und Wirkungen in die Bracelet-, Möbius- und Trypsininhibitor-Unterfamilien eingeteilt.^[26,32] Es wird angenommen, dass die natürliche Funktion von Cyclotiden aus ihrer Wirkung als pflanzliche Abwehrmoleküle gegen Schädlinge besteht,^[33] es wurden jedoch auch mehrere nicht hiermit in Beziehung stehende pharmakologische Wirkungen beschrieben, nämlich eine Anti-HIV-Aktivität^[34] sowie antibakterielle,^[35] antitumorale,^[36] hämolytische^[37] und uterotroponische Wirkungen.^[38] Alle diese Aktivitäten scheinen den Mechanismus der Membranbindung gemeinsam zu haben.^[39] Der exakte Mechanismus der Cyclotid-Biosynthese ist noch immer unklar; es wird allerdings angenommen, dass die Cyclotidvorstufe am N-Terminus gespalten wird und eine Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) eine Transpeptidierung zur Bildung des cyclischen Rückgrats ausführt.^[40] Zusätzlich zu ihrer offensichtlichen Anwendung in der Landwirtschaft zum Pflanzenschutz zeigten Cyclotide Potenzial als stabile Gerüste zum Design von Peptidwirkstoffen;^[41,42] eine mögliche Entwicklung für die Zukunft ist ihre Produktion in „Pflanzenfabriken“.^[43]

Die Trypsininhibitoren aus Sonnenblumen sind kleiner als Cyclotide und bestehen nur aus 14 Resten sowie einer Disulfidbindung.^[27] Die Nukleinsäuresequenzen, die für die Familie der cyclischen Peptide aus Sonnenblumen kodieren, liegen innerhalb von Genen, die für Albumin-Samenspeicherproteine kodieren und werden durch eine AEP cyclisiert.^[44] Die starke Wirkung des Sonnenblumen-Trypsininhi-



Anne Conibear erhielt ihren B.Sc. (Hons) und M.Sc. in Chemie 2010 an der Rhodes University in Südafrika. Zurzeit promoviert sie unter der Anleitung von David Craik am Institute for Molecular Bioscience der University of Queensland (Australien) über die Charakterisierung und Anwendung von θ -Defensinen. Ihr Forschungsinteresse liegt auf der Anwendung von NMR-spektroskopischen Verfahren in der Chemie und Biologie.



David Craik promovierte 1981 an der La Trobe University (Australien) und forschte als Postdoktorand an der Florida State sowie der Syracuse University in den USA. Er wurde 1988 Direktor der School of Pharmaceutical Chemistry am Victorian College of Pharmacy in Melbourne (Australien). 1995 nahm er eine Beschäftigung am Institute for Molecular Bioscience der University of Queensland auf. Seine Forschungen konzentrieren sich auf NMR-spektroskopische Anwendungen im Bereich des Wirkstoff-Designs und der Wirkstoff-Entwicklung.

bitors 1 (SFTI-1) wurde im Hinblick auf das Design potenzieller krebshemmender Verbindungen erforscht; chemisch synthetisierte Analoga von SFTI-1 inhibieren Matriptase^[45] und die Kallikrein-ähnliche Peptidase-4,^[46] Proteasen, die an Brust- bzw. Prostatakrebs beteiligt sind.

In einem vor kurzen erschienenen Bericht wurde die Bezeichnung Orbitide für kleine pflanzliche cyclische Peptide empfohlen, die zuvor unter der Bezeichnung Cyclolinopeptide oder Caryophyllaceae-artige Peptide bekannt waren.^[47] Orbitide bestehen aus fünf bis zwölf Aminosäuren und haben, im Unterschied zu Cyclotiden, einen großen Anteil hydrophober Reste sowie keine Disulfidbindungen.^[28,48] Es wurden mehr als 100 Orbitide in zehn Pflanzenfamilien entdeckt, und analog den Cyclotiden wird angenommen, dass ihre natürliche Funktion in Pflanzen auf einer antiherbivoren oder antibakteriellen Wirkung beruht, wenngleich viele verschiedene Bioaktivitäten in vivo nachgewiesen wurden.^[28,47] DNA-Vorstufen von Orbitiden wurden in *Saponaria vaccaria* identifiziert, und ihre Biosynthese scheint die Spaltung der Vorstufe durch eine Oligopeptidase, gefolgt von einer durch eine Serin-Protease vermittelten Cyclisierung, zu umfassen.^[49,50]

1.5. Cyclische Peptide aus Säugetieren

Seit ihrer Entdeckung 1999^[51] wurden deutliche Fortschritte beim Verständnis der antimikrobiellen Wirkung von θ-Defensinen erzielt. Viele Fragen sind allerdings noch ungeklärt, besonders im Hinblick auf die Biosynthese. Neueste Fortschritte bei der Synthese und Charakterisierung von θ-Defensinen sollten die Bemühungen zur Lösung dieser Probleme vereinfachen und neue Anwendungen für θ-Defensine aufzeigen. Nachstehend konzentrieren wir uns auf diese Herausforderungen und Chancen.

2. Säugetierdefensine

2.1. α-, β- und θ-Defensine

Bei Defensinen handelt es sich um Peptide mit mehreren Disulfidgruppen, die Teil des angeborenen Immunsystems von Säugetieren sind, eine Verteidigung gegen mikrobielle Krankheitserreger bieten und die Immunreaktion regulieren.^[52–54] α-Defensine bestehen aus 29–35 Aminosäuren und drei Disulfidbindungen in einer I-VI-, II-IV- und III-V-Anordnung (Abbildung 2).^[55,56] Sechs α-Defensine wurden im Menschen gefunden: Die menschlichen neutrophilen Peptide (HNP1–4) und die menschlichen Defensine (HD5 und HD6), die in den Paneth-Zellen des Darms exprimiert werden.^[57] β-Defensine sind größer als α-Defensine und bestehen aus ca. 45 Aminosäuren und drei Disulfidbindungen in einer I-V-, II-IV- und III-VI-Anordnung.^[55,58] Im Menschen sind mehr als 30 β-Defensine vorzufinden, vorzugsweise in Epithelzellen und dem männlichen Fortpflanzungssystem.^[59] Die dritte Klasse von Säugetierdefensinen sind die θ-Defensine (die wegen ihrer Strukturähnlichkeit zu dem griechischen Buchstaben Theta als solche bezeichnet werden), die aus 18 Resten

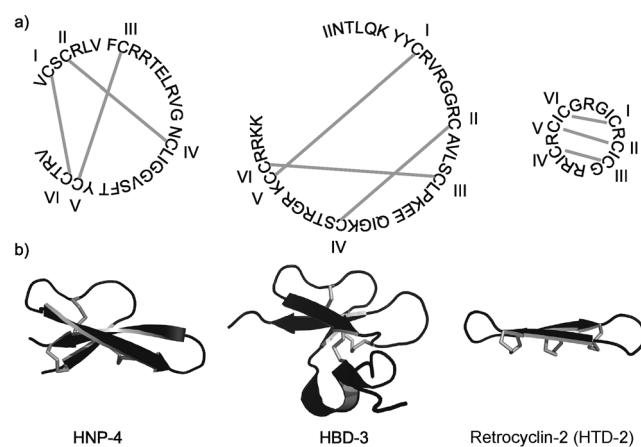


Abbildung 2. Säugetierdefensine. a) Säugetierdefensine werden in drei Klassen unterteilt: α-Defensine (z.B. HNP-4), β-Defensine (z. B. HBD-3) und θ-Defensine (z. B. HTD-2). Aminosäuren sind durch ihren Einbuchstabencode dargestellt, graue Linien stehen für Disulfidbindungen, und Disulfidverknüpfungen werden durch römische Ziffern wiedergegeben. b) Dreidimensionale Strukturen von HNP-4 (PDB 1ZMM),^[56] HBD-3 (PDB 1KJ6)^[58] und Retrocyclin-2 (PDB 2ATG)^[60] sind in der Bänderdarstellung mit grauen Disulfidbindungen abgebildet.

und drei Disulfidbindungen in einer I-VI-, II-V- und III-IV-Anordnung bestehen.^[51,60]

2.2. Entdeckung von θ-Defensinen

Das erste cyclische Säugetiergepeptid, Rhesus-θ-Defensin-1 (RTD-1), wurde im Laufe einer Studie zur Defensinexpression in Leukozyten von Rhesusaffen (*Macaca mulata*) entdeckt.^[51] Fraktionierung und Screening eines Leukozytenextrakts resultierte in der Isolierung eines aus 18 Resten bestehenden Peptids mit potenter antibakterieller Wirkung, und die Sequenzierung überlappender Fragmente führte zur Strukturaufklärung des cyclischen Rückgrats. Verdau mit Thermolysin offenbarte drei parallele Disulfidbindungen, die inzwischen als cyclische Cystinleiter bezeichnet werden.^[7,51,60] Eine Suche nach dem für RTD-1 kodierenden Gen ergab überraschenderweise zwei Gene (GenBank AF191102 und AF191103), von denen jedes für ein aus neun Resten bestehendes RTD-1-Fragment kodiert (Demidefensine RTD1a und RTD1b), gefolgt von drei Resten und einem Stopcodon (Abbildung 3a).^[51] Die Gene und Pseudogene von θ-Defensin werden als DEFT- (Defensin Theta) bzw. ψDEFT-Gene bezeichnet. Bei den Genen scheint es sich um verkürzte Gene des α-Defensins zu handeln,^[51] und die beiden kodierten Demidefensine^[61] sind durch Spleißen miteinander verbunden, um das aus 18 Resten bestehende cyclische θ-Defensin zu bilden. Bis heute sind θ-Defensine die einzigen bekannten cyclischen Peptide, die aus zwei separaten Genprodukten biosynthetisiert werden.^[3]

Eine ungelöste Frage ist, warum heterodimere θ-Defensine häufiger vorkommen als homodimere. Die Isolierung der Homodimere von RTD1a und RTD1b (RTD-2 und RTD-3) veranschaulicht, dass n Demidefensingene $(n/2)(n+1)$ θ-Defensine ergeben können.^[61,62] Später wurde ein drittes De-

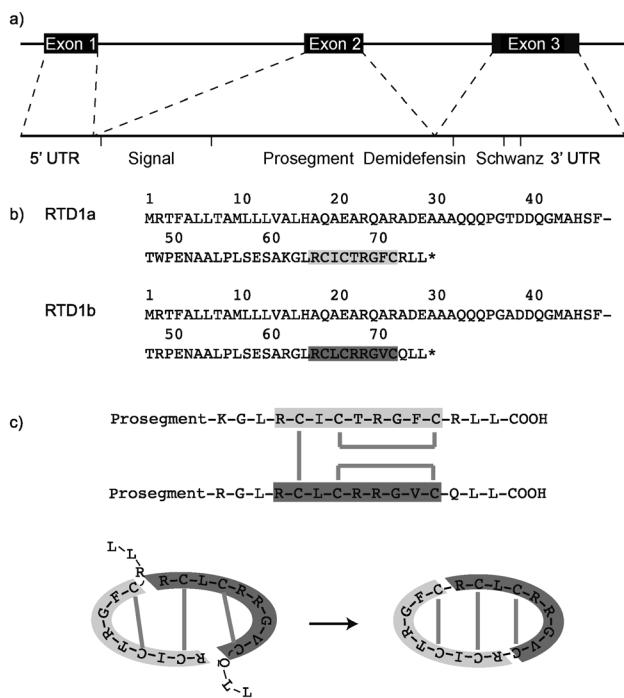


Abbildung 3. θ-Defensine werden über eine binäre Ligation von zwei aus neun Resten bestehenden Demidefensinen synthetisiert.^[51, 53]
a) Demidefensinge enthalten drei Exons und zwei Introns. b) Demidefensinvorstufen bestehen aus einer Signalsequenz, einem Prosegment, einem aus neun Resten zusammengesetztem Demidefensin (RTD-1a in Hellgrau und RTD1b in Dunkelgrau) sowie einem aus drei Resten bestehenden Endstück. Aminosäuren sind durch ihren Einbuchstabencode dargestellt, und Sterne repräsentieren Stopcodons.
c) In einem vorgeschlagenen Mechanismus für die Biosynthese verbinden eine intermolekulare und zwei intramolekulare Disulfidbindungen (graue Linien) zwei Demidefensine. Das N-terminale Prosegment wird gespalten, und zwei neue Peptidbindungen ligieren die Demidefensine unter gleichzeitiger Abspaltung der endständigen Reste zur Bildung des cyclischen Peptids.

midefensin, RTD1c, identifiziert, und die sechs entsprechenden θ-Defensine RTD-1 bis RTD-6 wurden aus den Neutrophilen von Makaken isoliert.^[61, 63] Zwar kann sich die Menge an θ-Defensinpeptiden zwischen Individuen um den Faktor drei unterscheiden, allerdings macht RTD-1 etwa 50% der Gesamtmenge an θ-Defensinen aus.^[63] Die Bevorzugung von heterodimeren gegenüber homodimeren Spezies und der hohe Anteil an RTD-1 bezüglich der anderen fünf Varianten könnten die Folge der unterschiedlichen Genkopienzahlen oder verschiedener Expressionsniveaus sein; diese Fragen bleiben aber offen.

Eine weitere große Aufgabe ist es zu verstehen, warum die Gene von θ-Defensin in Menschen als Pseudogene vorliegen und keine θ-Defensinpeptide bilden. Selsted und Mitarbeiter bemerkten die Ähnlichkeit der für RTD-1 kodierenden Gensequenz mit dem Gen, das für ein menschliches Pseudogen ähnlich α-Defensin kodiert (GenBank U10267)^[51] und ein Stopcodon in der Signalsequenz aufweist. Lehrer und Mitarbeiter synthetisierten das θ-Defensin, das aus zwei Kopien des Pseudogens in Abwesenheit des vorzeitigen Stopcodons produziert werden würde.^[64] Das Peptid wurde

Retrocyclin genannt und zeichnete sich durch eine potente Anti-HIV-Aktivität und eine geringe Cytotoxität aus, was der Frage, warum Menschen keine vererbaren intakten θ-Defensinge haben, eine ironische Wendung verleiht.^[64]

3. Verteilung und Vielfältigkeit

3.1. Sequenzvielfalt

Über die Verteilung und Vielfältigkeit von θ-Defensinen ist weniger bekannt als über die anderer cyclischer Peptide. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Aufsatzes waren 532 Cyclotide seit der Aufklärung ihrer cyclischen Struktur 1995^[29] aus 55 Pflanzenspezies isoliert worden,^[17] aber nur 11 verschiedene θ-Defensine aus drei Primatspezies seit ihrer Entdeckung 1999.^[51] Dieser Gegensatz reflektiert die höheren Schwierigkeiten, Gewebeproben von Primaten als solche von Pflanzen zu erhalten, oder aber das Fehlen effizienter Hilfsmittel zur Entdeckung. Zusätzlich zu den sechs aus Rhesusaffen (*Macaca mulata*) isolierten θ-Defensinen wurden vier θ-Defensin-cDNAs in Leukozyten des Anubis-pavians erkannt, was darauf schließen lässt, dass zehn θ-Defensine synthetisiert werden können; allerdings wurden nur fünf isoliert.^[65] Die beiden aus Leukozyten des Mantelpavians (*Papio hamadryas*) isolierten Peptide PhTD-1 und PhTD-3 wurden mithilfe von MALDI-MS sequenziert und wiesen Sequenzen auf, die mit BTD-1 bzw. BTD-3 identisch waren.^[66] Bis heute werden θ-Defensine, die auf der Peptidebene isoliert wurden, gemäß dem ersten Buchstaben der Primatspezies benannt, in der sie vorgefunden wurden. Mit der Entdeckung von θ-Defensinen in neuen Spezies wird zur Vermeidung von Mehrdeutigkeiten aber eine systematische Nomenklatur erforderlich sein.

Für das Verständnis der Biosynthese von θ-Defensinen fehlt das Wissen über ihre Sequenzvielfalt. Die Sequenzen aller bekannten, von Genen und Pseudogenen kodierten Demidefensine sind in Tabelle 1 aufgelistet. Alle auf der Peptidebene isolierten θ-Defensine enthalten sechs Cysteinreste. Interessant ist allerdings, dass die Pseudogene von *Pan troglodytes* und *Pan paniscus* nur für vier Cysteine kodieren. Die größte Sequenzvariation tritt in den vier Resten der β-Schleife sowie der Zahl an Argininresten auf, was eine Änderung der Ladung von +2 zu +6 zur Folge hat.^[67] Anders als bei den Cyclotiden wurden keine acyclischen θ-Defensin-analoga beschrieben, eine Beobachtung, die für einen Biosynthesemechanismus spricht, der sich von jenem der Cyclotide unterscheidet.

3.2. Verteilung von θ-Defensinen in Primaten

Die Verteilung von θ-Defensinen in Primaten und der Ursprung des Stopcodons in ψDEFT-Genen werden noch nicht verstanden. Durch eine phylogenetische Untersuchung von 21 Spezies der Alt- und Neuweltprimaten wurden neue DEFT- und ψDEFT-Gene ermittelt (Tabelle 1),^[67] und man fand heraus, dass die Gen-stilllegende Mutation in ψDEFT-Genen in einem gemeinsamen Vorfahren von Menschen,

Tabelle 1: Durch θ -Defensingene (DEFT) und ihre Pseudogene (ψ DEFT) kodierte Demidefensinsequenzen.

Spezies	Demidefensin	Sequenz ^{a]}
<i>Macaca mulata</i> ^[51, 63, 67] (Rhesusaffe)	DEFT2 (RTD-1a)	RCICTRGFC RLL
	DEFT1 (RTD-1b)	RCLCRRGVC QLL
	DEFT3 (RTD-1c)	RCICVLGIC RLL
	DEFT4	RCICTRGV CQLL
<i>Homo sapiens</i> ^[64, 67] (Mensch)	ψ DEFT1,2,3,5,6	RCICGRGIC RLL
	ψ DEFT4	RCICGRRIC RLL
<i>Pongo Pygmaeus abelii</i> ^[67] (Sumatra-Orang-Utan)	ψ DEFT1	RCICRRGVC RFL
	DEFT1,2,4	RCICRRGVC RLL
	DEFT3	RCICGRGVC RLL
<i>Gorilla gorilla</i> ^[67] (Flachland-Gorilla)	ψ DEFT1	RCICGRGIC RLL
<i>Pan troglodytes</i> ^[67] (Gewöhnlicher Schimpanse)	ψ DEFT1	RCIGGRGIC GLL
<i>Pan paniscus</i> ^[67] (Bonobo)	ψ DEFT1	RCIGGRGIC GLL
<i>Hylobates syndactylus</i> ^[67] (Siamang)	DEFT1	RCICGRGVC RLL
<i>Macaca nemestrina</i> ^[67] (Schweinsaffe)	DEFT1	RCICRRGVC QLL
<i>Colobus guereza kikutensis</i> ^[67] (Schwarz-weißer Stummelaffe)	DEFT1	RCVCTRGFC HLL
<i>Papio anubis</i> ^[65] (Anubispavian)/ <i>Papio hamadryas</i> ^[66] (Mantelpavian)	BTD-a	RCVCTRGFC RLL
	BTD-b	RCVCRRGVC QLL
	BTD-c	RCICLLGIC RLL
	BTD-d	RCFCRRGVC QLL

[a] Demidefensinsequenz mit Cysteinen fett gesetzt und dem aus drei Resten bestehenden „Endstück“ in Grau.

Schimpansen und Gorillas vor 7,5–10 Millionen Jahren erfolgte, als die Abstammungsgruppe der Orang-Utans abzweigte.^[67] Orang-Utans (*Pongo Pygmaeus abelii*) haben sowohl intakte als auch stillgelegte Kopien von DEFT-Genen.^[68] Des Weiteren scheint das Stopcodon aus einer Serie schrittweiser Mutationen im Codon 17 hervorgegangen zu sein; CAC/T (Histidin) in Altweltaffen, CAG (Glutamin) in Orang-Utans und TAG (Stop) in Neuweltaffen.^[59, 67]

In Übereinstimmung mit ihrer Rolle bei der angeborenen Immunantwort werden θ -Defensine hauptsächlich im Knochenmark produziert.^[51] Sie werden in den Phagozyten, Neutrophilen und Eosinophilen exprimiert, scheinen nicht abgesondert zu werden, sind aber in den azuropilen Granula lokalisiert.^[51, 54] Vor kurzem wurde aber über die Expression von RTD-1 durch Paneth-Zellen in den Krypten des Dünndarms von Rhesusaffen berichtet.^[69] Im Menschen ist die Expression von ψ DEFT-Genen im Knochenmark am höchsten, wird aber auch in der Skelettmuskulatur, der Milz, dem Thymus und den Hoden beobachtet.^[67]

3.3. Menschliche Retrocycline

Macht unsere Unfähigkeit zur immanenten Produktion von θ -Defensinen uns anfälliger für HIV? Diese brennende Frage wird schwer abschließend zu beantworten sein. Es

wurden keine θ -Defensinpeptide in Menschen gefunden, es liegen aber sechs ψ DEFT-Gene im menschlichen Genom vor, fünf (ψ DEFT1–5) auf dem Chromosom 8p23 (gi: 501091),^[70] vorgelagert dem HNP-1-Gen, und eins (ψ DEFT6) auf dem Chromosom 1q41.^[59, 67] Wenngleich Retrocyclin-1 zwei Subtypen des Thai-HIV-1 inhibiert, zeigte die Sequenzierung von DEFT-Genen dauerhaft HIV-1-seronegativer weiblicher Prostituierter aus Thailand, dass sie alle ψ DEFT-Gene besaßen.^[71] Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die weibliche HIV-1-Resistenz nicht auf die θ -Defensinproduktion zurückzuführen war. Trotzdem verbleibt die Möglichkeit, dass einige isolierte Populationen intakte DEFT-Gene zurück behalten haben und somit intrinsisch vor HIV geschützt sind.^[71]

4. Genstruktur und Biosynthese

4.1. Struktur von DEFT-Genen

DEFT-Gene bestehen aus drei Exons und zwei Introns (Abbildung 3a). Die Exons kodieren für ein 76 Reste umfassendes Propeptid, das aus einem Signalpeptid mit 20 Resten, einem Prosegment mit 44 Resten, einem Demidefensin mit neun Resten und einem Endstück mit drei Resten besteht (Abbildung 3b).^[51] Zwar unterscheiden sich die Strukturen und die Disulfidverknüpfungen von α - und θ -Defensinen, allerdings lassen gemeinsame Merkmale ihrer Vorstufenpeptide darauf schließen, dass ein ähnlicher Mechanismus für die Prozesierung verantwortlich sein könnte.^[53]

4.2. Biosynthese cyclischer Peptide

Die Aufklärung des Mechanismus der Biosynthese ist für alle Klassen cyclischer Peptide anspruchsvoll, über die Biosynthese von θ -Defensinen ist aber noch weniger bekannt als über die der anderen Klassen. Es wird angenommen, dass die Cyclisierung in den verschiedenen Reichen getrennt entstanden ist, obwohl ähnliche Merkmale, wie die Protease-vermittelte Transpeptidierung, vorliegen.^[1, 72] In Cyclotiden werden konservierte Gly-Leu-Pro-Sequenzen am N-Terminus von sowohl dem Cyclotid als auch dem Propeptid durch die AEP-Protease erkannt. Es wird angenommen, dass das C-terminale Propeptid gespalten wird, was es dem N-Terminus des Cyclotids ermöglicht, das Propeptid an der Erkennungsstelle zu ersetzen. Das N-terminale Gly wirkt dann als Nuc-

leophil und cyclisiert die Peptidkette.^[40] Auf ähnliche Weise wird das TrbC-Pilin in Bakterien gespalten und durch die TraF-Protease cyclisiert.^[20,53] Auch die Biosynthese von θ -Defensin involviert wahrscheinlich eine Protease; allerdings müssen *zwei* neue Peptidbindungen gebildet werden.

4.3. θ -Defensine: Zusammensetzen der Einzelteile

Wie werden zwei Peptid- und drei Disulfidbindungen zwischen Demidefensinen gebildet, um ein θ -Defensin aufzubauen? Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass zwei Disulfid-stabilisierte β -Haarnadelstrukturen gebildet werden, die durch die Disulfidbrücke zwischen den Ketten für die Ligation zusammengehalten werden (Abbildung 3c).^[51] Struktureigenschaften der Vorstufen könnten die Assoziation der Demidefensine für die Ligation ebenfalls steuern.^[62] Mögliche Entwicklungen, die aus der Aufklärung der Biosynthese von θ -Defensin hervorgehen, sind die Identifikation neuer cyclischer Peptide sowie Erkenntnisse darüber, wie es zur Peptidcyclisierung in Säugetieren kam.

Es gibt keine eindeutigen Hinweise darauf, ob menschliche Zellen die Fähigkeit zur Weiterverarbeitung von Demidefensinkopien beibehalten haben. In zwei unabhängigen Studien wurden menschliche promyelozytische HL-60-Zellen, die α -Defensine weiterverarbeiten können, mit Pro- θ -defensin-cDNA transfiziert. In der einen Studie wurden weder vollentwickelte θ -Defensine noch θ -Defensinvorstufen nachgewiesen,^[53] in der anderen wurden aber vorhandene cyclische Retrocycline mit Anti-HIV-Aktivität beschrieben.^[73] Außerdem wurden in der zweiten Studie Aminoglycoside verwendet, um das Stopcodon des menschlichen ψ DEFT-Gens auszulesen und die endogene Expression von Retrocyclin wiederherzustellen.^[73] Zur Identifikation von Proteinen, die mit Defensinvorstufen wechselwirken und an deren Verarbeitung beteiligt sein könnten, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Das von stromalen Zellen abgeleitete factor 2-like protein 1 (SDF2L1), ein Teil des Chaperonkomplexes des Endoplasmatischen Retikulums, wechselwirkte mit α -, β - und θ -Defensinen, was darauf schließen lässt, dass es eine Rolle bei der Biosynthese oder dem Packaging spielt.^[74]

5. Struktur und Stabilität

5.1. NMR-Strukturen von θ -Defensinen in Lösung

Die Strukturen von natürlichen und modifizierten θ -Defensinen wurden mithilfe von NMR-Spektroskopiedaten aufgeklärt, wodurch Kenntnisse über ihre Stabilität und den Wirkmechanismus gewonnen wurden. Die über drei Disulfidbindungen vernetzte β -Faltstruktur wurde mithilfe eines Moleküldynamikmodells vorhergesagt^[51] und später anhand einer NMR-Struktur von RTD-1 (PDB 1HVZ) in Lösung bestätigt.^[75] Verbreiterte NMR-Signale und geringe Kern-Overhauser-Effekte (NOE) deuteten darauf hin, dass RTD-1 flexibel ist (Abbildung 4a).^[75] Die Struktur von synthetischem Retrocyclin (HTD-2; PDB 2ATG) wurde anschlie-

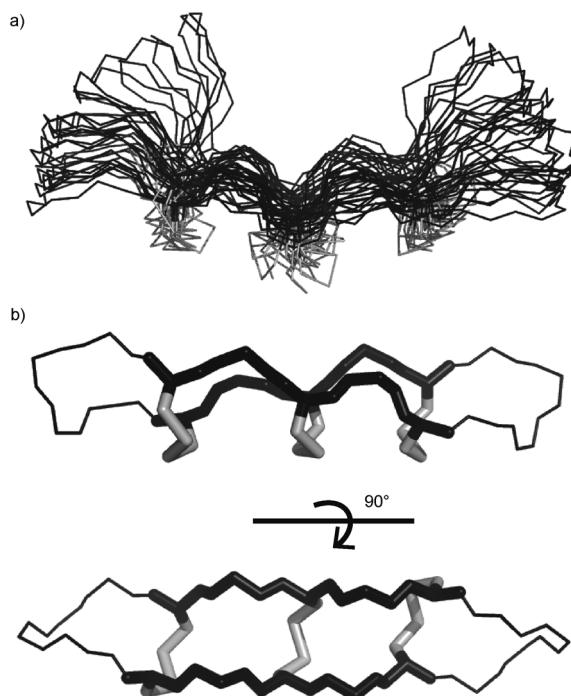


Abbildung 4. NMR-Strukturen von θ -Defensinen. a) Ensemble der 20 energetisch niedrigsten Strukturen von RTD-1 (PDB 1HVZ)^[75] mit grau dargestellten Disulfidbindungen. Hierbei handelt es sich um die zuerst publizierte θ -Defensinstruktur; sie spricht für eine Flexibilität der Schleifenregion. b) Das symmetrische θ -Defensin BTD-2 (PDB 2LYE)^[7] mit dem Motiv der cyclischen Cystinleiter in Stabdarstellung.

bend in Gegenwart von Micellen aus Natriumdodecylsulfat (SDS) bestimmt, die die gestreckte Konformation des Peptids stabilisieren könnten.^[60] Erst vor kurzem ermöglichten Fortschritte bei NMR-Spektroskopiemethoden die Bestimmung definierter Strukturen von drei θ -Defensinen sowie die Charakterisierung der cyclischen Cystinleiter (Abbildung 4b): RTD-1 (PDB 2LYF); HTD-2 (PDB 2LZI); und das erste symmetrische θ -Defensin, BTD-2 (PDB 2LYE).^[7] Die Strukturen bestehen aus zwei stark eingeschränkten β -Strängen, die durch $\beta 1'$ -Schleifen miteinander verbunden sind; heteronukleare NOEs sowie vorhergesagte Ordnungsparameter lassen darauf schließen, dass θ -Defensine starrer sind als zuvor angenommen.^[7] Mehrere Strukturen von θ -Defensinen stehen nun über die Protein Data Bank (PDB) für Modellierungen und Anwendungen beim Peptiddesign zur Verfügung.^[76,77]

Die mögliche Rolle der Selbstassoziation beim Wirkmechanismus von θ -Defensinen ist noch immer unklar. Dichte-Ultrazentrifugation und NMR-Diffusionsmessungen deuten darauf hin, dass Retrocyclin bei hohen Konzentrationen Trimere bildet. Auf Grundlage einer selektiven Verbreiterung der Cysteinsignale wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem Peptide entlang ihrer Längsachsen selbstassoziiieren, wobei die Disulfidbindungen nach innen gerichtet sind.^[60] NMR-Diffusionsmessungen an RTD-1, BTD-2 und HTD-2 stützten diese Hypothese und erweiterten den Konzentrationsbereich, was für die mögliche Bildung weiterer Aggregationszustände spricht.^[7]

Die Disulfidverknüpfungen in der cyclischen Cystinleiter sind bestens bekannt und wurden mithilfe mehrerer Methoden bestätigt: einer rechnerischen Methode, die die Verknüpfungen von Disulfidbindungen in Peptiden vorhersagt,^[78] einem Vergleich der energieminierten Strukturen aller 15 möglichen Disulfidverknüpfungen, der Berechnung der Wahrscheinlichkeiten jeder möglichen Disulfidverknüpfung mit PADLOC^[79] (*Pattern of disulfides from local constraints*) und Messungen der Cystein-Cystein-Abstände in einer Struktur ohne die Einschränkungen durch die Disulfidbindungen.^[76]

5.2. Thermische und proteolytische Stabilität von θ -Defensinen

Die eingeschränkte Struktur von θ -Defensinen macht sie bemerkenswert stabil, was mit einer Resistenz gegen hohe Konzentrationen an Proteasen in entzündetem Gewebe in Einklang ist.^[51,53] Synthetische θ -Defensinanaloge mit variierender Zahl und Anordnung von Disulfidbindungen verdeutlichen die Abhängigkeit der Struktur und Stabilität von der cyclischen Cystinleiter:^[77] Während Analoga mit drei, zwei oder einer zentralen Disulfidbindung strukturiert und stabil waren, waren diejenigen ohne Disulfidbindungen oder cyclisches Rückgrat unstrukturiert und zersetzen sich in Serum rasch. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass θ -Defensinanaloge mit zwei oder drei Disulfidbindungen ihre Struktur bei Temperaturen oberhalb von 80 °C beibehielten.^[77] Im Unterschied dazu waren die Disulfidbindungen für die antibakteriellen Eigenschaften oder die Fähigkeit zur Membranbindung nicht notwendig; die Cystinleiter könnte allerdings eine Rolle bei der molekularen Erkennung und der antibakteriellen Wirkung bei physiologischen Salzkonzentrationen spielen.^[53] Acyclische θ -Defensinanaloge zeigen eine schwächere antibakterielle Wirkung als cyclische θ -Defensine, was darauf schließen lässt, dass das cyclische Rückgrat wichtig für die Wirkung ist.^[75,77] Ein D-Retrocyclanalagon, das mit der Maßgabe einer noch größeren Stabilität synthetisiert wurde, wies eine potente Anti-HIV-Aktivität auf als L-Retrocyclin.^[80]

6. Synthese

6.1. Chemische Synthese

Die Zugänglichkeit von θ -Defensinen mithilfe chemischer Synthese (Abbildung 5) vereinfachte Untersuchungen ihrer Wirkungsweisen und Mechanismen. Frühe Synthesen nutzten Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Chemie für den Aufbau des Peptidrückgrats durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS), gefolgt von einer Oxidation, um die Termini (Reste 1 und 18) in räumliche Nähe zueinander für die Ligation zu bringen, wofür die Kupplungsreagentien 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und Hydroxybenzotriazol (HOBr) verwendet wurden.^[51,61] Wenngleich diese Strategie erfolgreich verlief, führte Racemisierung der Cysteinreste zu geringen Ausbeuten.^[53] In einer späteren Studie wurden drei Methoden für die Cyclisierung der oxidierten

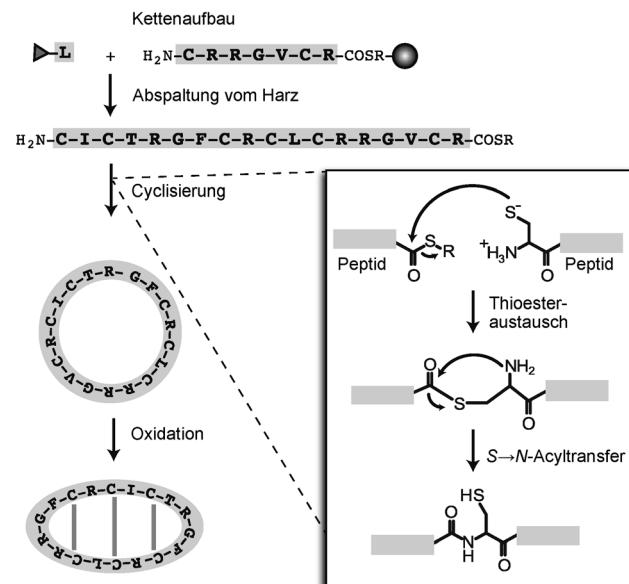


Abbildung 5. Die chemische Synthese von θ -Defensinen besteht aus drei Schritten: Der Anordnung der Peptidkette auf einem Harz, der Abspaltung vom Harz sowie der Cyclisierung und Oxidation zur Bildung des kreisförmigen Rückgrats und der drei Disulfidbindungen. Ein grauer Bereich steht für das Harz, und die Aminosäuren sind durch den Einbuchstabencode dargestellt. Die Peptidkette wird vom C- zum N-Terminus durch Kupplung N-terminal geschützter (graues Dreieck) Aminosäuren an den freien N-Terminus der Peptidkette aufgebaut. Einsetzung: Cyclisierung durch native chemische Ligation. Die Reaktion umfasst den Thioesteraustausch eines Thioester-Linkers (COSR) am C-Terminus des Peptids gegen die freie Thiolgruppe eines N-terminalen Cysteins. Ein spontaner S→N-Acyltransfer setzt dann die Thiolgruppe des Cysteins frei und bildet eine Peptidbindung.

RTD-1-Vorstufe untersucht: 1) *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in Dimethylformamid (DMF); 2) (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) und DIPEA in DMF und 3) HOBr und EDC in Dimethylsulfoxid (DMSO).^[75] Während mit HBTU infolge von Nebenreaktionen Produktgemische erhalten wurden, ergaben sowohl BOP als auch EDC/HOBr das gewünschte Hauptprodukt. Wegen der einfacheren Reinigung wurde die EDC/HOBr-Methode empfohlen.^[75]

Die schwierige Aufgabe der Cyclisierung zu θ -Defensin wurde mittlerweile mithilfe der nativen chemischen Ligation größtenteils bewältigt. Die native chemische Ligation^[81] wurde ursprünglich für die Ligation von zwei Peptidketten entwickelt, ist aber auch für die Synthese cyclischer Peptide ideal, besonders solcher mit mehreren Cysteinresten.^[82] Die Reaktion umfasst den Thioesteraustausch eines C-terminalen Thioester-Linkers gegen eine freie Thiolgruppe eines N-terminalen Cysteinrests. Die Bildung der Peptidbindung wird durch einen irreversiblen S→N-Acyltransfer erreicht, der die freie Thiolgruppe des Cysteins regeneriert (Abbildung 5, Ersatztext).^[81] Mehrere natürliche θ -Defensine und Analoga wurden mithilfe der *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-SPPS, gefolgt von einer Cyclisierung durch native chemische Ligation und gleichzeitig ablaufender Oxidation, synthetisiert.^[7,77] Außerdem

dem werden in zunehmendem Maße Fmoc-kompatible Strategien verfügbar, und vor kurzem wurden die Cyclisierung und Oxidation einer linearen θ -Defensinvorstufe im Ein-topfverfahren beschrieben.^[83]

6.2. Semirekombinante Synthese

Das Fehlen effizienter Cyclisierungsmethoden *in vivo* erschwerte die rekombinante Produktion von θ -Defensinen, es wurden aber mehrere semirekombinante Vorgehensweisen beschrieben. RTD-1 und ein Analogon mit drei N-methylierten Resten wurden mittels Umprogrammierung des Codons in einem zellfreien Expressionssystem synthetisiert.^[84] Die Peptidvorstufen enthielten eine C-terminale Cys-Pro-Glycolsäuresequenz, die sich selbst zu einem Diketopiperadinthioester umordnet, der sich anschließend zur Cyclisierung des Peptids umlagert.^[84] Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass nichtproteinogene oder N-methylierte Aminosäuren einbezogen werden können. Außerdem wurde ein bakterielles Expressionssystem zur Generierung von RTD-Inteinvorstufen verwendet, die nachfolgend entweder *in vitro* oder *in vivo* über einen modifizierten Intein-Spleißmechanismus cyclisiert werden.^[85] Diese Strategie eröffnet die Möglichkeit zum rekombinanten Aufbau von Bibliotheken cyclischer Peptide oder von isotopenmarkierten Peptiden; allerdings müssen die Ausbeuten für eine Produktion im Großmaßstab noch verbessert werden.^[85]

6.3. Chemisch modifizierte θ -Defensine

Viele θ -Defensinanaloga wurden chemisch synthetisiert, um ihren Wirkmechanismus zu untersuchen oder die antibakteriellen oder antiviralen Eigenschaften zu optimieren. Beispiele hierfür sind Pseudogenprodukte, Lys-Mutanten für Markierungen mit Chromophoren, Tyr-Mutanten und Retrosowie Enantioanaloga zur Untersuchung ihrer Anti-HIV-Aktivität und der Bindung von Kohlenhydraten.^[86,87] Chemische Synthesen wurden außerdem zur Erzeugung vereinfachter Retrocyclinanaloga^[88] sowie von Disulfidbindungs- und θ -Defensinanaloga mit nichtnatürlichen bioaktiven Epitopen verwendet.^[76,77] Die Oxidation ungeschützter Cysteinreste scheint die natürliche I-VI-, II-V- und III-IV-Disulfidverknüpfung (in Form einer Leiter) zu ergeben.^[76] Dennoch wurde in einer Studie, in der RTD-1 mithilfe orthogonal geschützter Cysteine synthetisiert wurde, angemerkt, dass die korrekte Bildung von Disulfidpaaren durch β -Faltblattbildung unterstützt wurde.^[89] RTD-1 wurde auch als Beispiel für eine Methode zur Synthese von Peptiden mit mehreren Disulfidgruppen in komplexen Anordnungen herangezogen, die keine orthogonalen Schutzgruppen erfordert; die Disulfidbindungen in RTD-1 wurden durch Watson-Crick-Basenpaare ersetzt.^[90] Das resultierende RTD-1-Analogon hatte eine verdrillte β -Faltblattstruktur ähnlich der von natürlichem RTD-1, eine niedrige hämolytische Aktivität und eine geringfügig höhere antibakterielle Wirkung als RTD-1.

7. Antimikrobielle Wirkung

7.1. Antibakterielle und membranzerstörende Wirkung

Die antimikrobielle Wirkung von θ -Defensinen war der Grund für deren Entdeckung und entspricht wahrscheinlich ihrer natürlichen Funktion.^[51] Während α -, β - und θ -Defensine alle bei 0.5–5 μM antimikrobiell wirken, haben θ -Defensine den Vorteil einer geringeren Empfindlichkeit gegen physiologische Salzkonzentrationen.^[54] Das cyclische Rückgrat könnte eine Rolle bei diesem Mangel an Empfindlichkeit gegenüber Salz spielen, denn das acyclische Analogon oRTD-1 wirkt um den Faktor drei schlechter gegen *E. coli* und *S. aureus* als cyclisches RTD-1.^[51] Dagegen sind die Disulfidbindungen für die antibakterielle Wirkung nicht essenziell.^[77] θ -Defensine binden außerdem an bakterielle Toxine und neutralisieren diese. Retrocyclin-1 und seine Analoga sind aktive Wirkstoffe gegen Milzbrandbazillen und -sporen und binden an Milzbrandtoxin.^[91] Acyclische oder reduzierte und alkylierte Analoga von Retrocyclin sind allerdings inaktiv, was darauf schließen lässt, dass das cyclische Rückgrat und die Disulfidbindungen eine Rolle bei der Toxinbindung spielen.^[91] Darüber hinaus wirkt Retrocyclin-1 gegen *L. monocytogenes* und inhibiert Listeriolysin O, ein porenbildendes Toxin, das es Bakterien ermöglicht, aus den Phagosomen zu entweichen.^[92] Antimykotische Wirkungen gegen *C. albicans*, *C. neoformans*, *V. dahliae* und *F. oxysporum* wurden ebenfalls beschrieben.^[51,65,93]

Die Aufklärung des Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung in der komplexen Umgebung einer Entzündung, in der zahlreiche Inhibitoren und Enhancer vorhanden sind, ist anspruchsvoll.^[54] Es wird angenommen, dass die antibakterielle Wirkung von θ -Defensinen über ihre Wechselwirkung mit Membranen oder Glycoproteinen erfolgt, da beide Enantiomere eine ähnliche antibakterielle Wirkung aufweisen.^[80] Wie anhand der Aktivität von RTD-1 gegen klinische Isolate von Antibiotika-resistentem *S. aureus* und *P. aeruginosa* veranschaulicht, können θ -Defensine gegen resistente Bakterien wirken, da sie die Zellmembran und nicht das spezifische Enzym angreifen.^[94] Dynamische Differenzkalometrie und Röntgenstreuungsmessungen zeigten, dass θ -Defensine selektiv auf anionische Membranen gegenüber zwitterionischen Membranen reagieren und dass die positiv geladene Seite von θ -Defensinen wohl mit den anionischen Phospholipid-Kopfgruppen wechselwirkt.^[95] Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Messungen zufolge hat BTD-2 eine höhere Affinität für anionische Membranen als für zwitterionische; zudem beeinflusst die Zahl an Disulfidbindungen die Membranbindungsaffinität nicht.^[77] Messungen der Membrankrümmung mithilfe von Kleinwinkel-Röntgenstreuung zeigten, dass θ -Defensine in bakteriellen Membranmodellen eine negative Gaußsche Krümmung hervorrufen, was eine membranzerstörende Wirkung andeutet, die von dem Aufbau der kationischen Aminosäuren abhängt.^[96] Orientierte Circulardichroismus-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalysen von RTD-1 in Lipiddoppelschichten zeigten sowohl einen parallel ausgerichteten membran gebundenen Zustand des Peptids als auch einen Zustand, in dem Poren in der Zellmembran gebildet wurden. Der Über-

gang zwischen diesen beiden Zuständen und der exakte Mechanismus sind allerdings unklar.^[97] Festphasen-NMR-spektroskopischen Messungen zufolge nimmt ¹⁵N-markiertes Retrocyclin-2 in Dilauroylphosphatidylcholin(DLPC)-Doppelschichten eine Transmembranorientierung an, ist aber in der dickeren 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin(POPC)-Doppelschicht eher in der Ebene (ca. 65°) ausgerichtet.^[98]

7.2. Antivirale Wirkung

Die potente Anti-HIV-Aktivität von Retrocyclin wurde erstmals von Cole et al. beschrieben,^[64] und das therapeutische Potenzial weckte großes Interesse.^[68] Retrocyclin inhibi-

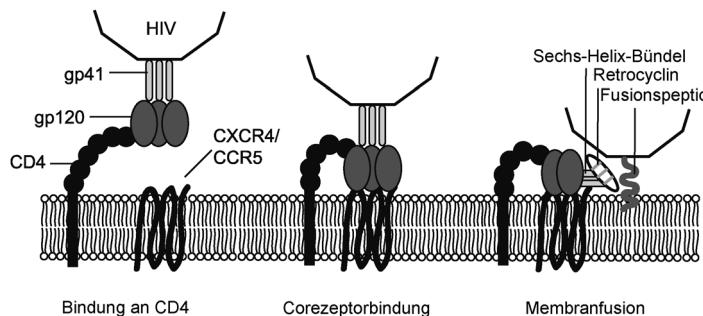


Abbildung 6. Vereinfachter Mechanismus des Eintritts des HI-Virus in die Wirtzelle. Das HI-Virus bindet durch Anheften des viralen gp120-Proteins an einen CD4-Rezeptor der Oberfläche der Wirtzelle an die Zellmembran des Wirts. Eine Konformationsänderung von gp120 ermöglicht nachfolgend eine Anbindung an den Corezeptor, und zwar den Chemokinrezeptor CXCR4 oder CCR5. Die Bindung an den Corezeptor exponiert das hydrophobe gp4-Fusionspeptid, das in die Zellmembran des Wirts inseriert. Jede Untereinheit des trimeren gp41-Proteins wird anschließend zur Bildung des Sechs-Helix-Bündels in der Mitte gefaltet, was die virale Zellmembran und die des Wirts zusammenzieht und eine Membranfusion zur Folge hat. Es wird angenommen, dass Retrocyclin durch Bindung an das Sechs-Helix-Bündel von gp41 den Eintritt von HI-Viren inhibiert.

biert bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen die HIV-1-Replikation, allerdings nur, wenn die Zugabe zu den Zellen vor der Infektion erfolgt, da es nicht direkt den Virus inaktiviert, sondern dessen Eintritt in die Zelle durch Blockieren der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran verhindert (Abbildung 6).^[64,86,99] Die Inhibierung des Viruseintritts könnte durch die Fähigkeit von Retrocyclin zur Erkennung und Bindung von Zuckermolekülen an der Zelloberfläche vermittelt werden; ein fluoreszenzmarkiertes Retrocyclin-analogon bildete auf der Oberfläche von CD4+-Zellen Flecken.^[64,87] Untersuchungen zur Zellfusion sowie SPR-Experimente zeigten, dass Retrocyclin-1 an die C-Heptad-Repeat-Segmente von gp41 bindet, was die Bildung eines Sechs-Helix-Bündels verhindert (Abbildung 6).^[100] Docking-Studien zeigten Glutaminsäurereste in den C-Heptad-Repeat-2-Segmenten von gp41, an die Argininreste von Retrocyclin binden könnten. Allerdings hatte eine Mutation dieser Reste keine Resistenz gegen Retrocyclin zur Folge, da die Mutationen das Virus weniger infektiös machten.^[101] In einer

neuen Untersuchung erwies sich RC-101 als wirksam gegen HIV-Stämme, die resistent gegen den Fusionsinhibitor Enfuvirtid sind, was darauf hindeutet, dass die beiden antiviralen Wirkstoffe an unterschiedliche Stellen der Heptad-Repeat-2-Domäne binden.^[102] Außerdem wurden die Effekte kompensierender Mutationen in RC-101-resistenten Virusstämmen als Beitrag zur Entwicklung Retrocyclin-basierter Fusionsinhibitoren untersucht.^[102]

Die wichtige Rolle der Chemie bei der Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von θ-Defensinen wird durch die vielfältigen synthetisierten θ-Defensinanaloge deutlich. Beispielsweise wurde ein wirksameres Retrocyclin-analogon (Retrocyclin-101) durch Ersetzen von Arg9 mit Lys entwickelt.^[103] In einer anderen Studie fand man heraus, dass ein Retroanalogen von Retrocyclin die HIV-Infektion tatsächlich verstärkt.^[104] Die Fähigkeit von Retrocyclin zur Inhibierung des HIV-Eintritts ist vom HIV-Subtyp abhängig, was möglicherweise auf verschiedenartige Glycoproteine zurückzuführen ist.^[103] HIV-infizierte menschliche Zellen, die in Gegenwart von Retrocyclin-101 gezüchtet worden waren, um eine Selektion hinsichtlich einer Resistenz zu erzielen, zeichneten sich nur durch eine fünfmal geringere Anfälligkeit für HIV aus. In den resistenten Viren wurden drei Mutationen identifiziert, die alle in den Hüllglycoproteinen gp120 und gp41 aufraten und als Ersatz für negative oder neutrale Reste durch positiv geladene Reste fungierten.^[105]

θ-Defensine wirken außerdem gegen Grippe und Herpes, wobei ihre Lectin-ähnlichen Kohlenhydrat-bindenden Eigenschaften eine Rolle spielen könnten.^[106] Retrocyclin wirkt gegen das Influenza-A-Virus, indem es an das Surfactantprotein D bindet^[107] und den Viruseintritt durch Vernetzung und Immobilisierung der Membranglycoproteine inhibiert, die eine Rolle bei der Membranfusion spielen.^[108] Mit Retrocyclin-2 transfierte Zellen und Hühnerembryos zeigten eine vermindernde Infektion mit dem Vogelgrippevirus H5N1, es war aber unklar, ob die Zellen cyclisches Retrocyclin exprimierten.^[109] Chemisch synthetisierte, verkürzte θ-Defensinanaloge waren ebenfalls wirksam gegen Influenza A.^[88,110] Außerdem inhibierte eine Serie von θ-Defensinen und Analoga den Zelleintritt des Herpes-simplex-Virus durch Binden von Oberflächenglycoproteinen,^[111] und Retrocyclin-2 war ein effektives Mittel zur Prophylaxe gegen das Herpes-simplex-Virus des Typs 1 in einem Mausmodell für Keratitis.^[112]

8. Anwendungen

Die offensichtlichste Anwendung von θ-Defensinen ist die als antimikrobielle Substanzen. Während ihre antibakteriellen Wirkungen vergleichbar mit denen anderer antimikrobieller Peptide sind, hat die potente Anti-HIV-Aktivität von θ-Defensinen großes Interesse auf sich gezogen. In mehreren Berichten wurde die Verwendung von Retrocyclinen in modernen Mikrobioziden zur Verringerung der HIV-1-Transmission vorgeschlagen.^[113,114] Eine sich auflösende Polyvinylalkoholfilm-Formulierung von RC-101 wurde auf ihre

Sicherheit und Wirkung als vaginale Mikrobizid in vitro und ex vivo getestet, Untersuchungen zur Langzeitstabilität und Bioverfügbarkeit stehen aber noch aus.^[115]

Es wurde auch vorgeschlagen, dass θ -Defensine als immunmodulierende Wirkstoffe eingesetzt werden könnten.^[116,117] Während α - und β -Defensine die adaptive Immunantwort stimulieren, unterdrücken θ -Defensine die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen durch Modulation der Immunantwort.^[55,117] In einem polymikrobiellen Sepsismodell wiesen Mäuse nach Verabreichung von RTD-1 ein geringeres Niveau von Tumornekrosefaktor und Interleukinen auf. Außerdem waren systemisch verabreichte θ -Defensine untoxisch, plasmastabil und stimulierten in erwachsenen Schimpansen keine Immunantwort.^[117] In einer früheren Untersuchung beugte eine Behandlung mit RTD-1 einer letalen Infektion von Mäusen mit einem Maus-adaptierten Stamm des Coronavirus vor, welches das Schwere Akute Respiratorische Syndrom hervorruft.^[118] θ -Defensine neutralisieren allerdings weder Viren noch Lipopolysaccharid, was darauf schließen lässt, dass ihre immunmodulierende Wirkung sowie die Fähigkeit zur Bindung von Kohlenhydrat-haltigen Zelloberflächenrezeptoren dabei helfen, eine Virusinfektion zu verhindern.^[117,118] Außerdem könnte die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren oder Plasmaproteine die θ -Defensine an den Infektionsstellen konzentrieren.^[59]

θ -Defensine sind wegen ihrer eingeschränkten Struktur, Stabilität und geringen Cytotoxität sowie ihrer inhärenten Bioaktivitäten vielversprechende Gerüste für das Design von Peptidwirkstoffen.^[77] Das Konzept eines „prototypischen Designtemplats“ wurde auf Tachypleasinanaloga angewendet, die ähnlich rigide Strukturen wie θ -Defensine, aber nicht den zusätzlichen Vorteil eines cyclischen Rückgrats haben.^[89] Als Nachweis dafür, dass θ -Defensine als Gerüste für Peptidwirkstoffe verwendet werden können, diente die cyclische Cystinleiter von RTD-1 zur Einschränkung und Stabilisierung der Integrin-bindenden Arg-Gly-Asp-Sequenz (RGD) in einer oder beiden Schleifen.^[76] Die RGD-haltigen θ -Defensine zeichneten sich durch eine potente und selektive Integrin-bindende Wirkung aus, was veranschaulicht, dass sich das θ -Defensingerüst eine nichtnatürliche Bioaktivität aneignen kann. Außerdem deutete die höhere Integrin-bindende Wirkung von Analoga mit RGD in beiden Schleifen an, dass die natürliche Symmetrie von θ -Defensinen beim Design difunktionaler Peptidtherapeutika genutzt werden könnte.^[76] Die Entwicklung chemischer Strategien zur Synthese von θ -Defensinanalogen wird deren Anwendung als Wirkstoffgerüste vorantreiben, indem sie einen Zugang zu neuartigen Molekülen mit nichtnatürlichen Aminosäuren, Markern, Mutationen und chemischen Modifikationen eröffnet.

9. Zusammenfassung und Ausblick

In den 1990er Jahren kam mit der Strukturaufklärung cyclischer Peptide in Bakterien, Pilzen und Pflanzen und der Aufdeckung ihres ribosomalen Ursprungs ein neues Forschungsgebiet auf. Die Entdeckung von θ -Defensinen 1999 zeigte, dass Säugetiere ebenfalls cyclische Peptide produzieren. Seit dem Jahr 2000 ermöglichen chemische Hilfsmittel

zur Entdeckung, Sequenzierung, Synthese und Strukturbestimmung die Untersuchung der Struktur und Wirkmechanismen cyclischer Peptide. Während das Interesse an den antimikrobiellen Eigenschaften von θ -Defensinen zu mechanistischen Erkenntnissen führte, blieb die Entdeckung neuer θ -Defensine deutlich hinter der anderer Peptide zurück. Darüber hinaus handelt es sich bei der Frage nach dem Mechanismus der Biosynthese von θ -Defensinen aus zwei getrennten Genprodukten noch immer um eine der faszinierendsten und zugleich am schwersten zu beantwortenden auf diesem Gebiet. Das wachsende Interesse der pharmazeutischen Industrie an Peptid-basierten Wirkstoffen bei gleichzeitig steigender Zahl validierter Targets für Wirkstoffe, welche Protein-Protein-Wechselwirkungen stören, dürfte zu zahlreichen Anwendungen von θ -Defensinen führen. Weitere Untersuchungen zu den Strukturen, den Wirkmechanismen und der Synthese von θ -Defensinen werden helfen, deren Weiterentwicklung hin zu Therapeutika voranzutreiben. Für die nächsten Jahre gehen wir von der Entdeckung neuer θ -Defensine sowie der Entwicklung neuartiger Anwendungen auf der Grundlage ihrer vorteilhaften chemischen Eigenschaften und biologischen Aktivitäten aus.

Unsere Arbeiten an cyclischen Peptiden werden vom Australian Research Council (grant ID DP0984390) und vom National Health and Medical Research Council (grant ID APP1047857) gefördert. D.J.C. ist ein NHMRC Professorial Fellow (grant ID APPP1026501). A.C.C. wird durch ein University of Queensland International PhD Scholarship gefördert.

Eingegangen am 6. Februar 2014
Online veröffentlicht am 30. Juli 2014

Übersetzt von Dr. Farina Schill, Göttingen

- [1] D. J. Craik, *Science* **2006**, *311*, 1563–1564.
- [2] U. Göransson, R. Burman, S. Gunasekera, A. A. Strömstedt, K. J. Rosengren, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27001–27006.
- [3] R. I. Lehrer, A. M. Cole, M. E. Selsted, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27014–27019.
- [4] M. Montalbán-López, M. Sánchez-Hidalgo, R. Cebrián, M. Maqueda, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27007–27013.
- [5] C. Gonzalez, G. M. Langdon, M. Bruix, A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Rico, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11221–11226.
- [6] K. J. Rosengren, N. L. Daly, M. R. Plan, C. Waine, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8606–8616.
- [7] A. C. Conibear, K. J. Rosengren, P. J. Harvey, D. J. Craik, *Biochemistry* **2012**, *51*, 9718–9726.
- [8] D. A. Bushnell, P. Cramer, R. D. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1218–1222.
- [9] A. T. Bockus, C. M. McEwen, R. S. Lokey, *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 821–836.
- [10] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136–147.
- [11] F. Giordanetto, J. Kihlberg, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278–295.
- [12] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 7036–7043.
- [13] C. T. Walsh, *Science* **2004**, *303*, 1805–1810.
- [14] J. F. Borel, C. Feurer, H. U. Gubler, H. Stahelin, *Agents Actions* **1976**, *6*, 468–475.

- [15] R. J. Clark, J. Jensen, S. T. Nevin, B. P. Callaghan, D. J. Adams, D. J. Craik, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6695–6698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6545–6548.
- [16] H. Mohimani, W.-T. Liu, J. S. Mylne, A. G. Poth, M. L. Colgrave, D. Tran, M. E. Selsted, P. C. Dorrestein, P. A. Pevzner, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4505–4512.
- [17] C. K. Wang, Q. Kaas, L. Chiche, D. J. Craik, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D206–210.
- [18] B. Samyn, M. Martinez-Bueno, B. Devreese, M. Maqueda, A. Galvez, E. Valdivia, J. Coyette, J. Van Beeumen, *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 87–90.
- [19] K. Sivonen, N. Leikoski, D. Fewer, J. Jokela, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1213–1225.
- [20] M. Kalkum, R. Eisenbrandt, E. Lanka, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 417–424.
- [21] M. Maqueda, M. Sanchez-Hidalgo, M. Fernandez, M. Montalban-Lopez, E. Valdivia, M. Martinez-Bueno, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 2–22.
- [22] H. E. Hallen, H. Luo, J. S. Scott-Craig, J. D. Walton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19097–19101.
- [23] J. Vetter, *Toxicon* **1998**, *36*, 13–24.
- [24] H. Luo, H. E. Hallen-Adams, J. D. Walton, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18070–18077.
- [25] C. D. Kaplan, K.-M. Larsson, R. D. Kornberg, *Mol. Cell* **2008**, *30*, 547–556.
- [26] D. J. Craik, N. L. Daly, T. Bond, C. Waine, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1327–1336.
- [27] S. Luckett, R. S. Garcia, J. J. Barker, A. V. Konarev, P. R. Shewry, A. R. Clarke, R. L. Brady, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 525–533.
- [28] N.-H. Tan, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 840–895.
- [29] O. Saether, D. J. Craik, I. D. Campbell, K. Sletten, J. Juul, D. G. Norman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4147–4158.
- [30] L. Gran, *Medd. Nor. Farm. Selsk.* **1970**, *12*, 173–180.
- [31] M. Cemazar, S. Kwon, T. Mahatmanto, A. S. Ravipati, D. J. Craik, *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1534–1545.
- [32] L. Chiche, A. Heitz, J. C. Gelly, J. Gracy, P. T. Chau, P. T. Ha, J. F. Hernandez, D. Le-Nguyen, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 341–349.
- [33] C. Jennings, J. West, C. Waine, D. Craik, M. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10614–10619.
- [34] K. R. Gustafson, T. C. McKee, H. R. Bokesch, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 331–340.
- [35] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, K. W. Chiu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8913–8918.
- [36] E. Svångård, U. Göransson, Z. Hocaoglu, J. Gullbo, R. Larsson, P. Claeson, L. Bohlin, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 144–147.
- [37] D. G. Barry, N. L. Daly, R. J. Clark, L. Sando, D. J. Craik, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6688–6695.
- [38] L. Gran, F. Sandberg, K. Sletten, *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 197–203.
- [39] S. T. Henriques, Y.-H. Huang, M. A. R. B. Castanho, L. A. Bagatolli, S. Sonza, G. Tachedjian, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33629–33643.
- [40] D. J. Craik, U. Malik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 546–554.
- [41] D. J. Craik, M. Cemazar, N. L. Daly, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2006**, *9*, 251–260.
- [42] K. Jagadish, J. A. Camarero, *Biopolymers* **2010**, *94*, 611–616.
- [43] D. J. Craik, J. S. Mylne, N. L. Daly, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 9–16.
- [44] J. S. D. Mylne, N. L. Colgrave, N. L. Daly, M. L. Chanson, A. Elliot, A. G. McCallum, E. J. Jones, A. Craik, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 257–259.
- [45] P. Li, S. Jiang, S.-L. Lee, C. Y. Lin, M. D. Johnson, R. B. Dickson, C. J. Michejda, P. P. Roller, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5976–5983.
- [46] J. E. Swedberg, et al., *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 633–643.
- [47] P. G. Arnison, et al., *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108–160.
- [48] H. Morita, K. Takeya, *Heterocycles* **2010**, *80*, 739–764.
- [49] J. A. Condie, G. Nowak, D. W. Reed, J. J. Balsevich, M. J. T. Reaney, P. G. Arnison, P. S. Covello, *Plant J.* **2011**, *67*, 682–690.
- [50] C. J. S. Barber, P. T. Pujara, D. W. Reed, S. Chiwocha, H. X. Zhang, P. S. Covello, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12500–12510.
- [51] Y.-Q. Tang, J. Yuan, G. Ösapay, K. Ösapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, *Science* **1999**, *286*, 498–502.
- [52] R. I. Lehrer, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 727–738.
- [53] M. E. Selsted, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 365–371.
- [54] M. E. Selsted, A. J. Ouellette, *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 551–557.
- [55] R. I. Lehrer, T. Ganz, *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 96–102.
- [56] A. Szyk, Z. B. Wu, K. Tucker, D. Yang, W. Y. Lu, J. Lubkowski, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 2749–2760.
- [57] A. J. Ouellette, C. L. Bevins, *Inflamm. Bowel. Dis.* **2001**, *7*, 43–50.
- [58] D. J. Schibli, H. N. Hunter, V. Aseyev, T. D. Starner, J. M. Wiencek, P. B. McCray, B. F. Tack, H. J. Vogel, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 8279–8289.
- [59] A. M. Cole, W. Wang, A. J. Waring, R. I. Lehrer, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 373–381.
- [60] N. L. Daly, Y. K. Chen, K. J. Rosengren, U. C. Marx, M. L. Phillips, A. J. Waring, W. Wang, R. I. Lehrer, D. J. Craik, *Biochemistry* **2007**, *46*, 9920–9928.
- [61] L. Leonova, V. N. Kokryakov, G. Aleshina, T. Hong, T. Nguyen, C. Zhao, A. J. Waring, R. I. Lehrer, *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 461–464.
- [62] D. Tran, P. A. Tran, Y. Q. Tang, J. Yuan, T. Cole, M. E. Selsted, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3079–3084.
- [63] P. Tongaonkar, P. Tran, K. Roberts, J. Schaal, G. Ösapay, D. Tran, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, *J. Leukocyte Biol.* **2011**, *89*, 283–290.
- [64] A. M. Cole, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1813–1818.
- [65] A. E. Garcia, G. Ösapay, P. A. Tran, J. Yuan, M. E. Selsted, *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 5883–5891.
- [66] C. Stegemann, E. V. Tsvetkova, G. M. Aleshina, R. I. Lehrer, V. N. Kokryakov, R. Hoffmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 599–604.
- [67] T. X. Nguyen, A. M. Cole, R. I. Lehrer, *Peptides* **2003**, *24*, 1647–1654.
- [68] W. T. Penberthy, S. Chari, A. L. Cole, A. M. Cole, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2231–2242.
- [69] C. M. Lucero, et al., *Clin. Vacc. Immunol.* **2013**, *20*, 1320–1328.
- [70] R. G. E. Palfrance, L. C. Sadro, S. Solomon, *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7*, 199–205.
- [71] C. Yang, L. Boone, T. X. Nguyen, D. Rudolph, K. Limpakarnjanarat, T. D. Mastro, J. Tappero, A. M. Cole, R. B. Lal, *Infect. Genet. Evol.* **2005**, *5*, 11–15.
- [72] B. F. Conlan, M. A. Anderson, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 4318–4328.
- [73] N. Venkataraman, A. L. Cole, P. Ruchala, A. J. Waring, R. I. Lehrer, O. Stuchlik, J. Pohl, A. M. Cole, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e95.
- [74] P. Tongaonkar, M. E. Selsted, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 5602–5609.
- [75] M. Trabi, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4211–4221.
- [76] A. C. Conibear, A. Bochen, K. J. Rosengren, P. Stupar, C. Wang, H. Kessler, D. J. Craik, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 451–459.
- [77] A. C. Conibear, K. J. Rosengren, N. L. Daly, S. T. Henriques, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10830–10840.
- [78] A. Shehu, L. E. Kavraki, C. Clementi, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 482–493.

- [79] L. Poppe, J. O. Hui, J. Ligutti, J. K. Murray, P. D. Schnier, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 262–266.
- [80] S. M. Owen, D. Rudolph, W. Wang, A. M. Cole, M. A. Sherman, A. J. Waring, R. I. Lehrer, R. B. Lal, *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 469–476.
- [81] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [82] J. A. Camarero, T. W. Muir, *Chem. Commun.* **1997**, 1369–1370.
- [83] T. L. Aboye, Y. L. Li, S. Majumder, J. F. Hao, A. Shekhtman, J. A. Camarero, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2823–2826.
- [84] T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 888–890.
- [85] A. Gould, Y. L. Li, S. Majumder, A. E. Garcia, P. Carlsson, A. Shekhtman, J. A. Camarero, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 1359–1365.
- [86] C. Münk, G. Wei, O. O. Yang, A. J. Waring, W. Wang, T. Hong, R. I. Lehrer, N. R. Landau, A. M. Cole, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2003**, *19*, 875–881.
- [87] W. Wang, A. M. Cole, T. Hong, A. J. Waring, R. I. Lehrer, *J. Immunol.* **2003**, *170*, 4708–4716.
- [88] P. Ruchala, et al., *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17*, 325–336.
- [89] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 783–790.
- [90] S. Rapireddy, L. Nhon, R. E. Meehan, J. Franks, D. B. Stoltz, D. Tran, M. E. Selsted, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4041–4044.
- [91] W. Wang, et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32755–32764.
- [92] E. Arnett, R. I. Lehrer, P. Pratikhya, W. Lu, S. Seveau, *Cell. Microbiol.* **2011**, *13*, 635–651.
- [93] M. Ni, Y. J. Zhao, N. Bibi, M. Y. Shao, S. N. Yuan, K. Fan, G. X. Zhang, F. Li, X. D. Wang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 2043–2052.
- [94] K. P. Tai, K. Kamdar, J. Yamaki, V. V. Le, D. Tran, P. Tran, M. E. Selsted, A. J. Ouellette, A. Wong-Berenger, *Innate Immun.* **2013**, DOI: 10.1177/1753425913514784.
- [95] P. M. Abuja, A. Zenz, M. Trabi, D. J. Craik, K. Lohner, *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 301–306.
- [96] N. W. Schmidt, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6720–6727.
- [97] T. M. Weiss, L. Yang, L. Ding, A. J. Waring, R. I. Lehrer, H. W. Huang, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10070–10076.
- [98] M. Tang, A. J. Waring, R. I. Lehrer, M. Hong, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3616–3624.
- [99] A. Seidel, Y. Ye, L. R. de Armas, M. Soto, W. Yarosh, R. A. Marcisin, D. Tran, M. E. Selsted, D. Camerini, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9737.
- [100] S. A. Gallo, et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18787–18792.
- [101] C. A. Fuhrman, A. D. Warren, A. J. Waring, S. M. Dutz, S. Sharma, R. I. Lehrer, A. L. Cole, A. M. Cole, *FEBS J.* **2007**, *274*, 6477–6487.
- [102] M. P. Wood, A. L. Cole, P. Ruchala, A. J. Waring, L. C. Rohan, P. Marx, P. M. Tarwater, P. Gupta, A. M. Cole, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55478.
- [103] S. M. Owen, D. L. Rudolph, W. Wang, A. M. Cole, A. J. Waring, R. B. Lal, R. I. Lehrer, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2004**, *20*, 1157–1165.
- [104] Q. W. Wang, et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2007**, *23*, 508–514.
- [105] A. L. Cole, O. O. Yang, A. D. Warren, A. J. Waring, R. I. Lehrer, A. M. Cole, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6900–6905.
- [106] W. Wang, S. M. Owen, D. L. Rudolph, A. M. Cole, T. Hong, A. J. Waring, R. B. Lal, R. I. Lehrer, *J. Immunol.* **2004**, *173*, 515–520.
- [107] M. Doss, et al., *J. Immunol.* **2009**, *182*, 7878–7887.
- [108] E. Leikina, et al., *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 995–1001.
- [109] Q.-l. Liang, K. Zhou, H.-x. He, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 387–392.
- [110] M. Doss, et al., *J. Immunol.* **2012**, *188*, 2759–2768.
- [111] B. Yasin, W. Wang, M. Pang, N. Cheshenko, T. Hong, A. J. Waring, B. C. Herold, E. A. Wagar, R. I. Lehrer, *J. Virol.* **2004**, *78*, 5147–5156.
- [112] C. R. Brandt, R. Akkarawongsa, S. Altmann, G. Jose, A. W. Kolb, A. J. Waring, R. I. Lehrer, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2007**, *48*, 5118–5124.
- [113] A. M. Cole, R. I. Lehrer, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1463–1473.
- [114] A. M. Cole, A. L. Cole, *Am. J. Reprod. Immunol.* **2008**, *59*, 27–34.
- [115] A. B. Sassi, M. R. Cost, A. L. Cole, A. M. Cole, D. L. Patton, P. Gupta, L. C. Rohan, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2282–2289.
- [116] J. Ding, Y.-Y. Chou, T. L. Chang, *J. Innate Immun.* **2009**, *1*, 413–420.
- [117] J. B. Schaal, et al., *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51337.
- [118] C. L. Wohlford-Lenane, D. K. Meyerholz, S. Perlman, H. Zhou, D. Tran, M. E. Selsted, P. B. McCray, Jr., *J. Virol.* **2009**, *83*, 11385–11390.