

Alterations in Cytoplasmic Membrane are Associated with the Bactericidal Activity of Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Proteins in Oral Streptococci

Young Eun Choi, Yong Joon Cheong and Si Young Lee*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

(Received December 1, 2005 ; Accepted December 15, 2005)

Thrombin-induced platelet microbicidal proteins (tPMP) are antibacterial proteins released when platelets are stimulated by thrombin. It has been reported that tPMP has antibacterial activity against various bacterial species including causative agents of infective endocarditis. Most of the oral streptococci have resistance to the killing by tPMP and this fact may play an important role as a virulence factor in infective endocarditis. However, the susceptibility and resistance mechanism of oral streptococci for tPMP have not been revealed yet. In this study, the killing mechanism of tPMP for oral streptococci has been investigated. *Streptococcus rattus* BHT, a susceptible strain, and *Streptococcus gordonii* DL1, a resistant strain, have been used in this study. tPMP was isolated from platelet after stimulation with thrombin. Cell membrane depolarization was examined with 3,3'-dipropylthiodicarbocyanine iodide (DiSC₃), membrane potential-sensitive cyanine dye, by fluorescence spectrophotometry. The permeabilization of cell membrane by tPMP was investigated with propidium iodide (PI) by flow cytometry. tPMP susceptible *S. rattus* BHT showed the increase of the DiSC₃ fluorescence level meaning depolarization of cell membrane and increase of the uptake of PI which means permeabilization of cell membrane. However, tPMP resistant *S. gordonii* DL1 did not show depolarization and permeabilization. These results indicate that the increasing depolarization and permeabilization of oral streptococcal cell membrane are associated with the bactericidal activity of tPMP.

Keywords: streptococci, platelet microbicidal protein, cytoplasmic membrane, mechanism

*Corresponding author: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea. Tel.: +82-33-640-2455; Fax.: +82-33-642-6410; E-mail: siyoung@kangnung.ac.kr

서 론

항세균성 단백질 (antimicrobial protein)들은 세균을 직접 치사시키는 작용을 지녀, 인체 방어 기전에서 중요한 역할을 담당하고 있다 (Boman, 1995; Hancock and Scott, 2000; Nicolas and Mor, 1995). 혈소판 (platelet)은 여러 종류의 endogenous antimicrobial peptides를 지니고 있어 항세균 숙주 방어기전에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Yeaman, 1997; Yeaman *et al.*, 1998). Thrombin의 자극에 의하여 혈소판의 α -granules로부터 분비되는 (Dankert, 1988; Yeaman *et al.*, 1992) 항세균성 단백질은 thrombocidins (Zaat *et al.*, 1997) 혹은 thrombin-induced platelet microbicidal proteins (tPMPs) (Yeaman *et al.*, 1992; Yeaman *et al.*, 1997)으로 불리우고 있으며, 최근에는 thrombin으로 자극된 사람의 혈소판에서도 토끼에 서와 유사한 tPMP가 발견되었다 (Krijgsveld *et al.*, 2000). Thrombin 자극된 혈소판으로부터 분리 정제된 tPMP는 ~8.5 kDa 정도의 작은 분자량을 지니며 양이온 이고 lysozyme과는 구조적, 기능적으로 다른 것으로 알려졌다 (Yeaman *et al.*, 1992).

다양한 종류의 세균이 자극된 혈소판에 의하여 죽임을 당하는 것으로 알려져 있으며 (Czuprynski and Balish, 1981; Kahn and Flinton, 1974; Miragliotta *et al.*, 1988; Weksler and Nachman, 1971), 특히 tPMP는 감염성 심내막염의 주요 원인세균에 속하는 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*와 *Candida albicans*에 대하여 치사효과를 지니고 있는 것으로 보고되었다 (Dankert, 1988; Yeaman *et al.*, 1992; Yeaman *et al.*, 1993). tPMP의 세균 치사작용에 내성을 지니는 *S. aureus*와 *C. albicans*

는 감수성을 지니는 종에 비하여 더 심한 정도의 심내막염을 유발한다고 동물실험을 통하여 알려져 있다 (Dhawan *et al.*, 1998; Yeaman *et al.*, 1996). 이와 유사하게 Dankert 등의 연구에 의하면, tPMP가 세균성 심내막염의 vegetation에서의 구강 연쇄구균의 제거에 중요한 역할을 하고 있다고 보고하였다 (Dankert *et al.*, 1995).

여러 종류의 세균들이 감염성 심내막염의 원인 세균으로 분리되지만, 구강 (oral cavity)이 이 질환을 야기시킬 수 있는 세균의 가장 주된 원인으로 알려져 있으며 (Knox and Hunter, 1991; Tunkel, 1992), 특히 구강 연쇄구균은 감염성 심내막염의 전체 경우 중 30-40%에서 원인균으로 판명되고 있다 (Roberts, 1992). tPMP가 구강 연쇄구균에 의한 감염성 심내막염의 진행에도 영향을 주는 것으로 보고 (Dankert *et al.*, 1995; Dankert *et al.*, 2001) 하고 있고 이러한 효과가 tPMP의 streptococci에 대한 항미생물 작용에 의한 것으로 추정되고 있다. 현재까지의 감염성 심내막염과 tPMP의 관계에 관한 연구는 주로 *S. aureus*를 중심으로 이루어져 이 세균에 대한 tPMP의 항미생물 기전은 일부 밝혀져 있으나, 감염성 심내막염의 원인 세균 중 가장 높은 비중을 차지하는 구강 연쇄구균의 경우는 아직 그 연구가 미흡하다.

본 연구에서는 tPMP의 구강연쇄구균에 대한 치사작용 기전을 밝히기 위하여 세균 세포막의 depolarization 및 permeabilization과 tPMP에 의한 세균의 치사간의 상호관계를 조사하였다.

재료 및 방법

세균과 배양

tPMP의 살균활성 결정에 이용한 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 균주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 구강 연쇄구균은 tPMP에 감수성을 지니는 *Streptococcus rattus* BHT와 내성을 보이는 *Streptococcus gordonii* DL1 (Lee *et al.*, 2001)을 사용하였다. 구강 연쇄구균의 배양은 Todd-Hewitt broth (THB) (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여 37°C에서 CO₂가 추가 (5%)된 상태에서 배양하였으며 *B. subtilis*는 brain heart infusion (BHI) broth (Difco)로 37°C에서 배양하였다. 세균의 수는 660 nm에서 혼탁도를 spectrophotometer로 측정하여 세균수: 혼탁도의 표준곡선을 이용하여 정하였다.

tPMP의 준비

트롬빈으로 자극된 tPMP는 Yeaman 등 (Yeaman *et al.*, 1992; Yeaman *et al.*, 1997)의 방법으로 준비하였다. 완충된 citrate 항응고 약제 (0.11 M sodium citrate·2H₂O와 0.002 M citric acid·H₂O, pH 5.5)가 든 실리콘 처

리된 유리튜브 (Vacutainer Systems, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 토끼로부터 혈액을 채취한 뒤 (항응고 약제: 혈액의 비율, 1:10), 20°C에서 원심 분리하여 (150×g, 15분) 튜브 상부에 혈소판이 풍부한 플라즈마 (platelet rich plasma, PRP) 현탁을 얻었다. 이 PRP 분획의 위쪽 2/3를 다른 튜브에 수집한 뒤 원심 분리하여 (2,000×g, 10분) 혈소판 펠릿을 얻고, 혈소판을 Tyrode 용액 (pH 6.8)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 2회 세척한 후 세척한 혈소판을 37°C로 미리 가온된 Eagle's Minimal Essential Medium (MEM, pH 7.4) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 현탁하였고, Hausser 혈구 측정기로 수를 산정하여 10⁹ 혈소판/ml로 되게 하였다. 혈소판 현탁액 1 ml 당 1 U의 bovine thrombin (Sigma Chemical Co.) (12.5 μl의 0.2 M CaCl₂ 포함)으로 37°C에서 30분간 자극하여 tPMP가 혈소판으로부터 분비되게 하였고, 원심 분리 (3,000×g, 15분)하여 tPMP가 풍부한 상층액을 얻었다. 얻은 tPMP는 실리콘 처리된 유리 튜브에 분주한 후 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

tPMP의 살균활성의 결정 및 표준화

트롬빈으로 유도된 tPMP의 살균활성은 Donaldson과 Tew (Donaldson and Tew, 1977)의 방법으로 결정하였다. tPMP의 생물활성의 측정은 tPMP의 살균작용에 민감한 indicator 세균인 *B. subtilis* ATCC 6633으로 시행하였다. tPMP가 든 microtiter 접시 (low protein binding plate, 96 well) (Corning Costar, Cambridge, MA, USA)에 *B. subtilis*를 식균하여 세균의 농도는 10⁴ CFU/ml, tPMP의 희석범위는 1:1 (비희석)에서 1:1,024 (최종 웰 용량=200 μl)되게 하였다. 한 웰에는 MEM에 현탁한 *B. subtilis*만 넣어 양성 성장 기준균으로 삼았다. Microtiter 접시를 37°C에서 1시간 배양한 후, 각 웰에서 20 μl씩 채취하여 0.01%의 sodium polyanetholsulfonate (SPS, tPMP에 의한 살균 작용의 저해제)를 함유한 PBS (PBS-SPS)로 희석하여 BHI 고체 배지에 식균, 배양 (37°C에서 18시간)한 뒤 CFU를 산정하였다. tPMP의 생물활성은 *B. subtilis*에 대하여 95% 이상의 치사율을 유지하는 가장 높은 tPMP 희석의 역수 (U/ml)로서 정의하고, tPMP의 특이활성은 준비한 tPMP의 총 단백질 함량을 측정 후 U/mg 으로 표시하였다.

구강 연쇄구균에 대한 tPMP의 살균성 확인

배양된 세균을 수집하여 PBS로 두 번 씻은 후 660 nm에서의 흡광도를 측정하고 미리 준비된 표준 곡선 (세균수: 흡광도)을 이용하여 세균수를 산정 하였다. 최종 세균 농도가 10⁴ CFU/ml 되게 tPMP (최종 농도 200 U/ml; 특이활성 500 U/mg)가 든 MEM 이나 tPMP가 든 MEM (기준균)에 넣고 1시간 배양한 후 20 μl씩 채취

하여 PBS-SPS로 희석하고 경우에 따라서는 생리식염수로 추가적으로 더 희석한 후 BHI 고체 배지에 식균, 배양하였다. CO₂가 추가 (5%)된 상태로 37°C에서 3일간 배양 후 CFU를 세어 기준균에 대한 실험균의 %로서 PMP의 구강 연쇄구균에 대한 살균성을 확인하였다 (Lee *et al.*, 2001).

tPMP에 의한 세포막 depolarization

Membrane potential-sensitive cyanine dye인 3,3'-dipropylthiodicarbocyanine iodide (DiSC₃, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)와 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 세포막의 depolarization을 조사하였다 (Friedrich *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Log phase의 세균을 5 mM HEPES-20 mM glucose buffer (pH 7.2)로 세정하고 현탁하여 OD₆₆₀=0.05로 맞추었다. 이 세균 현탁액에 KCl (최종농도 100 mM)과 DiSC₃ (최종농도 0.4 μM)을 첨가하고 안정될 때까지 기다린 후 (약 5-10 분) 1 ml의 세균 현탁액을 cuvette에 넣고 일정량의 tPMP를 더한 후 (tPMP 최종농도 40 U/ml) fluorescence spectrophotometer (excitation wavelength 622 nm, emission wavelength 670 nm) (F4500, HITACHI, Tokyo Japan)로 fluorescence를 측정하였다.

DiSC₃는 전하를 띠는 lipophilic dye로서 세균 세포막에 끼어들며, 만약 세균의 세포막이 depolarization되면 세균 세포막으로 uptake되어 있던 DiSC₃가 세포막 밖으로 release되며, 세균에 의한 quenching 작용이 없어지게 되어 DiSC₃의 fluorescence level이 증가하게 된다. 세포막의 depolarization을 일으키는 valinomycin에 노출시킨 세균을 양성대조군으로 이용하였으며, tPMP에 노출되지 않은 세균을 음성대조군으로 이용하였다. 실험에 사용한 형광물질의 stock solution은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.)로 1 mM되게 녹여서 사용하였다.

tPMP에 의한 세포막 permeabilization

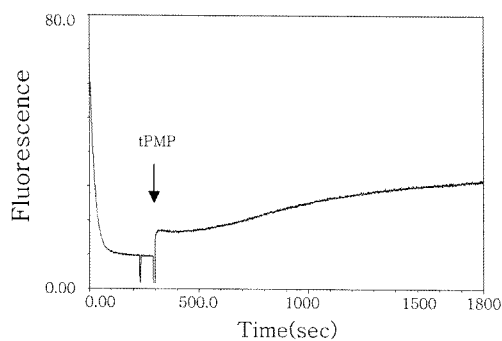
tPMP의 구강연쇄구균 세포막에 대한 permeabilization 여부 조사에 FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 사용한 flow cytometry 방법을 이용하였다 (Yeaman *et al.*, 1998). Log phase의 세균을 PBS로 세정하고 KCl-MEM으로 현탁하여 OD₆₆₀=0.2로 맞추었다. tPMP를 첨가하지 않은 군, tPMP를 높은 농도 첨가한 군 (tPMP 최종농도 80 U/ml), PMP를 낮은 농도 첨가한 군 (tPMP 최종농도 40 U/ml), ethanol을 첨가한 군 (최종농도 50%)으로 나누어 37°C에서 한시간 배양 후 KCl-MEM로 세정하고 다시 KCl-MEM으로 현탁하였다. Propidium iodide (PI, Molecular Probes)를 첨가하여 (최종 PI 농도 20 μM) 37°C에서 30분간 배양하고 시료 분석 바로 직전에 세균의 연쇄 및 응괴를 제거하기 위하여 3초간 sonication하였다. 시료의 형광은 488 nm에서 excite시키고 fluorescence emission은 620 nm 이상 pass filter를 이용하여 수집하였다. 각 시료의 분석을 위하여 100,000 개의 세균의 형광을 측정하였다.

PI는 정상적인 세균의 세포막에는 들어가지 않으나 2 nm 이상 크기의 구멍을 지나는 세포막에는 들어갈 수 있어 double-stranded nucleic acid와 결합하여 620 nm 이상에서 강한 형광을 낸다. PI fluorescence 평균값의 증가는 세균 세포막에 permeability가 생겼음을 제시해 준다고 해석된다 (Yeaman *et al.*, 1998). Ethanol에 노출된 구강연쇄구균을 양성대조군으로, tPMP에 노출되지 않은 세균을 음성대조군으로 이용하였다.

결과 및 고찰

tPMP에 감수성을 보이는 *S. rattus* BHT를 tPMP로 처리하면, 세포막의 depolarization에 의하여 DiSC₃의 fluorescence level이 증가함이 관찰되었다 (Fig. 1A). 그

A. *S. rattus* BHT



B. *S. gordonii* DL1

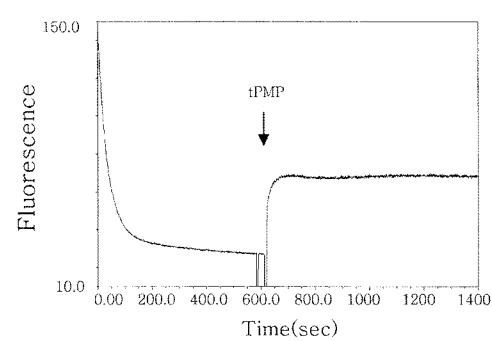


Fig. 1. Detection of bacterial cell membrane depolarization with fluorescence spectrophotometer. Log phase bacterial cells were incubated with 100 mM KCl and 0.4 μM DiSC₃ until stabilized. tPMP was added to cuvette containing DiSC₃ labeled bacteria and fluorescence was measured with fluorescence spectrophotometer. The data are a representative of three separate experiments for each strain.

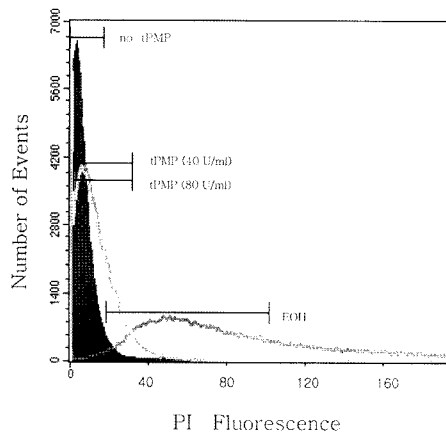
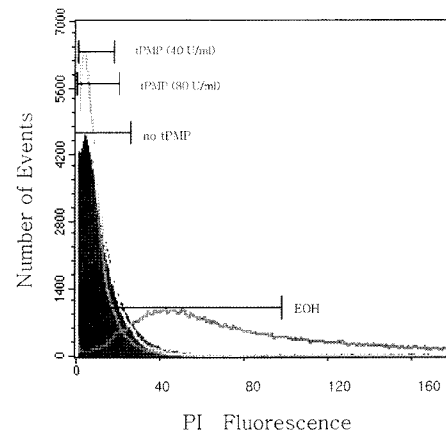
A. *S. rattus* BHTB. *S. gordonii* DL1

Fig. 2. Fluorescence profiles of *S. rattus* BHT and *S. gordonii* DL1 cytoplasmic membrane permeabilization due to tPMP. Profile distribution represents a total of 100,000 individual PI fluorescence events. The data are a representative of two separate experiments for each strain.

러나 tPMP에 내성을 보이는 *S. gordonii* DL1 균주는 tPMP로 처리하여도 세포막의 depolarization이 관찰되지 않았다 (Fig. 1B). Fig. 2는 FACScan으로 얻은 세균의 PI fluorescence profile을 보여 준다. tPMP에 의한 세균 치사에 감수성을 보이는 *S. rattus* BHT 균주는 tPMP 처리시 tPMP 처리하지 않은 세균에 비하여 PI fluorescence가 증가되어 관찰되었다 (Fig. 2A). PI fluorescence 정도는 tPMP의 농도에 의하여 영향을 받지 않았다. tPMP에 내성 균주인 *S. gordonii* DL1은 tPMP 처리시 PI fluorescence 정도가 tPMP 처리하지 않은 세균에 비하여 크게 변화가 없었다 (Fig. 2B). 각각의 개별 세균의 평균 PI fluorescence를 비교하여 보면 (Table 1), tPMP를 처리한 경우 *S. rattus* BHT의 PI fluorescence 증가율 (71%)이 *S. gordonii* DL1의 경우 (26%)보다 크게 관찰되었다. 실험에 사용한 tPMP의 농도 80 U/ml에서는 *S. rattus* BHT에 대한 세균 치사율이 약 80-90%였으며, 40 U/ml에서는 60-70%의 치사율을 보였다 (Data not shown).

Antimicrobial peptide에 대한 그람 음성세균의 치사 기전은 많이 연구되어 왔으나 (Barker *et al.*, 2000; Groisman

et al., 1992; Gunn *et al.*, 2000; Gunn and Miller, 1996; Lysenko *et al.*, 2000; McCoy *et al.*, 2001; Stumpe *et al.*, 1998) 그람 양성세균의 이들 peptide에 대한 치사 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. tPMP에 의한 *S. aureus*의 치사에서 세균의 세포막이 주요 target인 것으로 추정되고 있지만 (Koo *et al.*, 1997; Koo *et al.*, 1999) 아직 정확한 작용 기전은 알려져 있지 않다.

Yeaman 등의 연구에 의하면 *S. aureus*의 경우 tPMP에 감수성이 있는 종이라도 종에 따라 tPMP에 의한 세포막의 depolarization과 permeabilization 양상이 다르게 나타난다고 보고하고 있다 (Yeaman *et al.*, 1998). 즉 어떤 종은 tPMP에 의하여 세포막의 depolarization과 permeabilization이 동시에 일어나지만 또 다른 종에서는 depolarization은 관찰되지 않고 permeabilization만 관찰된다고 알려져 있다. 최근의 연구에 의하면 항미생물 peptide에 의한 세포막의 permeabilization은 다양한 세포내 변화들을 추가적으로 초래하는 것으로 보고되고 있으며 이러한 추가적인 세포내 변화들로는 세포내 용해질의 손실, 세포막의 depolarization, DNA, RNA, 단백질 합성의 억제 등을 포함한다고 알려져 있다 (Koo *et al.*, 2001). 그러나 아직까지 세균 세포막의 permeabilization만으로 세균의 치사가 가능한지 혹은 다른 부위에서의 다른 작용이 동반이 되어야 하는지는 불확실하다. 또한 *S. gordonii* DL1에서 tPMP에 의한 세포막의 permeabilization 및 depolarization 현상이 *S. rattus* BHT의 경우에 비하여 낮게 나타나는 이유는 잘 알려져 있지 않지만 세균이 지닌 세포외 다당류의 차이가 이들 다당류에 의한 세균 세포막에 대한 보호작용에 차이가 생기며 나타나는 현상이 아닌가 추정된다.

여러 연구성적들이 tPMP 작용의 중요한 표적의 하나는 미생물의 세포막임을 제시하는 이외에도 세균 세포내

Table 1. PI uptake (permeabilization) of *S. rattus* BHT and *S. gordonii* DL1 due to tPMP

	<i>S. rattus</i> BHT		<i>S. gordonii</i> DL1	
	%	(PI)	%	(PI)
no tPMP	100	(4.2 ± 0.05*)	100	(10.3 ± 1.0)
tPMP (40 U/ml)	171	(7.2 ± 0.7)	126	(13.0 ± 0.9)
tPMP (80 U/ml)	171	(7.2 ± 0.7)	125	(12.9 ± 0.4)
Ethanol	545	(22.9 ± 15.3)	310	(32.0 ± 0.8)

*Mean ± SD of two separate experiments.

다른 표적이 존재할 가능성도 있음을 보여 주고 있으나 아직 정확한 작용기전은 모르는 상태이다. tPMP에 의한 세균 치사기전에 있어서 미생물의 세포막 이외의 세균 세포내 다른 표적이 존재할 가능성도 있음을 제시하는 결과들이 다양하게 보고되고 있다. tPMP가 *S. aureus*에서 유도하는 세포막에 대한 효과는 수분 안에 일어나는 특성이지만 세포의 치사는 이 막 효과가 있는 지 1-2 시간 뒤에 일어난다 (Yeaman *et al.*, 1998). 이러한 사실은 어떤 세포내의 과정이 tPMP로써 시발된 미생물 치사 경로에 관련됨을 제시한다고 할 수 있다.

본 연구자의 실험 결과에 의하면 (Lee *et al.*, 2001) 대부분의 구강 연쇄구균은 tPMP의 세균 치사에 대하여 내성을 지니고 있으며, 이러한 구강연쇄구균의 성질은 감염성 심내막염 원인세균들 중에 구강연쇄구균이 가장 높은 비중을 차지 하는 주요 원인이 될 수 있을 것이다. 세균이 지니는 tPMP의 치사작용에 대한 내성이 감염성심내막염의 유발 및 진행에 있어서 중요한 세균 병독력 (virulence factor)으로 작용할 수 있을 가능성을 제시해 준다고 할 수 있다. 본 연구에서는 구강연쇄구균의 tPMP에 의한 세포막의 deporalization과 permeabilization이 tPMP에 의한 이들 세균의 치사와 상호 연관이 있음을 보였다. 구강연쇄구균에 있어서 세균 세포막의 permeabilization과 세포내 또 다른 작용이 tPMP에 의한 세균의 치사에 어떻게 상대적으로 기여하는 지와 세포막의 permeabilization이 구강연쇄구균에서 세포내 현상과 어떤 연관이 있는지는 더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어 진 것임 (02-PJ1-PG3-20501-0008).

참고문헌

Barker, H.C., Kinsella, N., Jaspe, A., Friedrich, T. and O'Connor, C.D.: Formate protects stationary-phase *Escherichia coli* and *Salmonella* cells from killing by a cationic antimicrobial peptide. *Mol. Microbiol.* **35**:1518-1529, 2000.

Boman, H.G.: Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:61-92, 1995.

Czuprynski, C.J. and Balish, E.: Interaction of rat platelets with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **33**:103-108, 1981.

Dankert, J.: Role of platelets in early pathogenesis of viridans group streptococcal endocarditis. Ph. D. dissertation. University of Groningen. Groningen, The Netherlands 1988.

Dankert, J., Krijgsveld, J., van Der, W.J., Joldersma, W. and

Zaat, S.A.: Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans streptococcal endocarditis. *J. Infect. Dis.* **184**:597-605, 9-1-2001.

Dankert, J., van-der Werff, J., Zaat, S.A., Joldersma, W., Klein, D. and Hess, J.: Involvement of bactericidal factors from thrombin-stimulated platelets in clearance of adherent viridans streptococci in experimental infective endocarditis. *Infect. Immun.* **63**:663-671, 1995.

Dhawan, V.K., Bayer, A.S. and Yeaman, M.R.: In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with enhanced progression and hematogenous dissemination in experimental *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Infect. Immun.* **66**:3476-3479, 1998.

Donaldson, D.M. and Tew, J.G.: beta-Lysin of platelet origin. *Bacteriol. Rev.* **41**:501-513, 1977.

Friedrich, C.L., Moyles, D., Beveridge, T.J. and Hancock, R.E.: Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2086-2092, 2000.

Groisman, E.A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C.J. and Heffron, F.: Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:11939-11943, 1992.

Gunn, J.S. and Miller, S.I.: PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* **178**:6857-6864, 1996.

Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K. and Miller, S.I.: Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **68**:6139-6146, 2000.

Hancock, R.E. and Scott, M.G.: The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:8856-8861, 2000.

Kahn, R.A. and Flinton, L.J.: The relationship between platelets and bacteria. *Blood* **44**:715-721, 1974.

Knox, K.W. and Hunter, N.: The role of oral bacteria in the pathogenesis of infective endocarditis. *Aust. Dent. J.* **36**:286-292, 1991.

Koo, S.P., Bayer, A.S., Kagan, B.L. and Yeaman, M.R.: Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by transmembrane voltage polarity and magnitude. *Infect. Immun.* **67**:2475-2481, 1999.

Koo, S.P., Bayer, A.S. and Yeaman, M.R.: Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **69**:4916-4922, 2001.

Koo, S.P., Yeaman, M.R., Nast, C.C. and Bayer, A.S.: The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylococcal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infect. Immun.* **65**:4795-4800, 1997.

Krijgsveld, J., Zaat, S.A., Meeldijk, J., van Veelen, P.A., Fang, G., Poolman, B., Brandt, E., Ehlert, J.E., Kuijpers, A.J., Engbers, G.H., Feijen, J. and Dankert, J.: Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J. Biol.*

- Chem. **275**:20374-20381, 2000.
- Lee, S.Y., Lee, J. and Choe, S.-J.: Bactericidal activity of thrombin-induced platelet microbicidal protein against *Streptococcus rattus* BHT. J. Bacteriol. Virol. **31**:317-324, 2001.
- Lysenko, E.S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J.M. and Weiser, J.N.: Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. Infect. Immun. **68**:1664-1671, 2000.
- McCoy, A.J., Liu, H., Falla, T.J. and Gunn, J.S.: Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 2030-2037, 2001.
- Miragliotta, G., Lafata, M. and Jirillo, E.: Anti-bacterial activity mediated by human platelets. Agents Actions **25**: 401-406, 1988.
- Nicolas, P. and Mor, A.: Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu. Rev. Microbiol. **49**:277-304, 1995.
- Roberts, R.B.: Streptococcal endocarditis: the viridans and beta hemolytic streptococci. In: Kaye D, ed. Infective Endocarditis. New York: Raven Press, 191-208, 1992.
- Stumpe, S., Schmid, R., Stephens, D.L., Georgiou, G. and Bakker, E.P.: Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180**: 4002-4006, 1998.
- Tunkel, A.R.: Infecting microorganism. In: Kaye D, ed. Infective Endocarditis. New York: Raven Press, 85-97, 1992.
- Weksler, B.B. and Nachman, R.L.: Rabbit platelet bactericidal protein. J. Exp. Med. **134**:1114-1130, 1971.
- Yeaman, M.R.: The role of platelets in antimicrobial host defense. Clin. Infect. Dis. **25**:951-968, 1997.
- Yeaman, M.R., Bayer, A.S., Koo, S.P., Foss, W. and Sullam, P.M.: Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. J. Clin. Invest **101**:178-187, 1998.
- Yeaman, M.R., Ibrahim, A.S., Edwards-JE, J., Bayer, A.S. and Ghannoum, M.A.: Thrombin-induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:546-553, 1993.
- Yeaman, M.R., Puentes, S.M., Norman, D.C. and Bayer, A.S.: Partial characterization and staphylocidal activity of thrombin-induced platelet microbicidal protein. Infect. Immun. **60**:1202-1209, 1992.
- Yeaman, M.R., Soldan, S.S., Ghannoum, M.A., Edwards-JE, J., Filler, S.G. and Bayer, A.S.: Resistance to platelet microbicidal protein results in increased severity of experimental *Candida albicans* endocarditis. Infect. Immun. **64**:1379-1384, 1996.
- Yeaman, M.R., Tang, Y.Q., Shen, A.J., Bayer, A.S. and Selsted, M.E.: Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. Infect. Immun. **65**:1023-1031, 1997.
- Zaat, S.A., Koper, M., Grasselie, H., Meeldijk, J., Krijgsveld, J. and Dankert, J.: Cell-adherent glucan does not protect endocarditis-causing viridans streptococci against bactericidal proteins from human blood platelets. Adv. Exp. Med. Biol. **418**:709-712, 1997.
- Zhang, L., Dhillon, P., Yan, H., Farmer, S. and Hancock, R.E.: Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:3317-3321, 2000.