



닭과 돼지의 항균펩타이드 NK-Lysin으로부터 조합된 펩타이드의 *In Vitro* 항균효과

홍여진¹ · 이기용² · 양수진³ · 현순 릴레호이⁴ · 홍영호^{5*}

¹중앙대학교 동물생명공학과 박사후 연구원, ²중앙대학교 동물생명공학과 대학원생,
³서울대학교 수의학과 교수, ⁴USDA-ARS 책임연구원, ⁵중앙대학교 동물생명공학과 교수

In Vitro Antibacterial Effects of the Chimeric Peptides from Chicken and Pig Antimicrobial Peptide NK-Lysin

Yeojin Hong¹, Gi Yong Lee², Soo-Jin Yang³, Hyun Soon Lillehoj⁴ and Yeong Ho Hong^{5*}

¹Post-Doctoral Researcher, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

²Graduate Student, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

³Professor, Department of Veterinary Microbiology, College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

⁴Senior Research Immunologist, Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA

⁵Professor, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

ABSTRACT Antimicrobial peptides (AMPs) play an important role in innate immunity against pathogenic infections. AMPs exterminate pathogenic bacteria by disrupting cell membranes or inhibiting intracellular molecules. NK-2, first identified in pigs and derived from NK-lysin, has antimicrobial effects against bacteria and parasites. In this study, chimeric peptides (cpNK) of chicken and pig NK-2 and cpNK-derived peptides (cpNK-a1 and cpNK-a2) were synthesized, and their antimicrobial effects against various pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were investigated. The structure of chimeric peptides from chicken and pig NK-2, cpNK, include α -helix like NK-2 and peptide net charge was +9 like porcine NK-2. The cpNK peptide showed powerful bactericidal effects against most bacterial species, including MRSA, especially against gram-negative bacteria. Furthermore, cpNK-derived short peptides, cpNK-a1 and a2 also showed bactericidal activity, but the effects were weaker than those of cpNK. Therefore, we conclude that cpNK- and cpNK-derived short peptides have the potential to be used as antibiotic alternatives.

(Key words: chicken, pig, antimicrobial peptides, NK-lysin, NK-2)

서론

가축의 질병치료와 성장촉진을 위한 항생제 남용은 항생제 내성균(antibiotic resistant bacteria)의 발생을 초래하였다(Martínez, 2008; Zhu et al., 2013). 이에 따라 현재 많은 국가에서 성장촉진을 위한 항생제 사용은 금지되고 있으며, 질병치료를 위한 항생제 사용 또한 항생제 잔류 문제를 일으킬 수 있어 항생제를 대체할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Lillehoj and Lee, 2012; Wang et al., 2019).

항균펩타이드(antimicrobial peptides)는 항생제 대체물질 중 하나로서 12에서 50개 사이의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 박테리아, 바이러스, 곰팡이 등 다양한 병원체를 사멸시켜 선천성 면역에서 중요한 방어기작을 담당하고 있다(Kang et al., 2017; Wiesner and Vilcinskas, 2010). 항균펩타이드는 주로 양이온의 특징을 갖고 있기 때문에, 음이온 특징을 갖는 그람 음성균(gram-negative bacteria)의 lipopolysaccharides(LPS)와 그람 양성균(gram-positive bacteria)의 lipoteichoic acids에 결합하여 박테리아의 세포막을 파괴한다. 그 밖에 다른 항균펩타이드는 박테리아 내부의 DNA나

* To whom correspondence should be addressed : yhong@cau.ac.kr

RNA에 붙어 증식을 억제할 수 있다(Jenssen et al., 2006). 위와 같은 항균효과 이외에도 항균펩타이드는 사이토카인(cytokine)의 생성을 유도하고 상처를 치유하고 면역세포 증식 등을 증가시키는 등 다양한 면역조절 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Hong et al., 2020a; Hong et al., 2020b; Otvos Jr, 2016).

NK-lysin은 주로 natural killer(NK)세포와 T 림프구에서 생성되며 항균 및 항암효과가 있다고 알려져 있다(Hong et al., 2006; Lee et al., 2014). NK-2는 돼지의 NK-lysin의 39 - 65 아미노산 부분인 α -helix region을 갖는 펩타이드로서 여러 병원체를 사멸시키는 효과를 가지고 있다(Jacobs et al., 2003; Andr a et al., 2004; Schr oder-Borm et al., 2005).

닭의 NK-lysin은 *Eimeria* 감염 닭의 장 림프구(Intestinal lymphocytes)에서 많이 발현되었으며, 돼지의 NK-2 부분에 해당하는 닭의 NK-2(cNK-2) 또한 항균효과를 가지고 있어, 닭에서 콕시디움증(Coccidiosis)을 일으키는 *E.tenella*와 *E.acervulina*의 포자소체를 사멸시켰다(Lee et al., 2013). 그 밖에도 cNK-2는 닭의 대식세포주(HD11)와 단핵구(primary monocytes)에서 CCL4, CCL5, IL-1 β 와 같은 케모카인(chemokine)과 사이토카인의 발현을 증가시켰으며, p38과 ERK1/2, c-Jun N-terminal kinases (JNK)를 통해 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway를 유도하는 것으로 나타났다 (Kim et al., 2017).

본 연구에서는 항생제 대체제로서 NK-lysin의 활용가능성을 확인하기 위하여 닭과 돼지의 NK-lysin의 39-65 아미노산 부분인 NK-2를 조합한 펩타이드(cpNK)와 cpNK로부터 크기를 줄인 두 개의 펩타이드(cpNK-a1, cpNK-a2)의 항균효과를 *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 같은 병원균과 메티실린(meticillin) 내성균을 이용하여 측정하였다.

재료 및 방법

1. 펩타이드 합성

닭의 NK-2 (39-65 aa)와 돼지의 NK-2 (39-65 aa)를 조합한 chimeric 펩타이드(cpNK)와 cpNK의 서열을 기반으로 짧은 서열의 펩타이드인 cpNK-a1과 cpNK-a2를 90%의 순도로 (주)펩트론(Daejeon, Republic of Korea)에서 주문 제작하여 사용하였다 (Table 1).

2. 항균효과 검증 실험

합성된 펩타이드들의 항균효과를 검증하기 위해 그람 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 43888, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis YHS 383, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 43174, *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis YHS 386와 그람 양성균인 *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 and *Staphylococcus aureus* ATCC 27664를 37°C에서 tryptic soy broth (TSB) (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 16시간 배양하였다. 배양된 박테리아를 PBS (pH 7.4)를 이용하여 5.0×10^5 colony-forming units (CFU)/mL이 되도록 희석하였다. 25 μ L의 희석된 박테리아에 농도에 맞게 희석된 펩타이드를 처리한 뒤 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 후 standard colony counting assay를 통해 박테리아의 CFU를 측정하였다.

항생제 내성균을 이용한 항균효과 검증을 위해 Methicillin-susceptible strain인 *S. aureus* RN4220와 Methicillin-resistant strain인 *S. aureus* MW2와 *S. aureus* USA300을 Luria-Bertani (LB) broth (Sigma)에 배양 후, 5×10^3 CFU의 박테리아에 25, 50 μ g/mL의 cpNK를 처리하여 37°C에서 2, 4시간 배양한 뒤 colony counting assay를 진행하였다 (Yeaman et al., 1992; Xiong et al., 2005).

Table 1. Peptide sequences for antimicrobial activity assay

Peptides	Sequences	aa	Charge	Mw	pI	Hydro-phobicity
Porcine NK-2	KILRGVCKKIMRTFLRRISKDILTGGK	27	+9	3,203.05	12.1	40.74%
Chicken NK-2	RRQRSICKQLLKKLRQQLSDALQNNDD	27	+4	3,268.74	10.8	31.72%
Chicken+ Pig NK-2 (cpNK)	RRQRSICKQLLKKLLRRISKDILTGGK	27	+9	3,280.07	12.3	37.41%
cpNK-a1	RSICKQLLKKLLRRISKDILT	21	+6	2,369.98	11.6	42.95%
cpNK-a2	KQLLKKLLRRISK	13	+6	1,624.09	12.5	30.53%

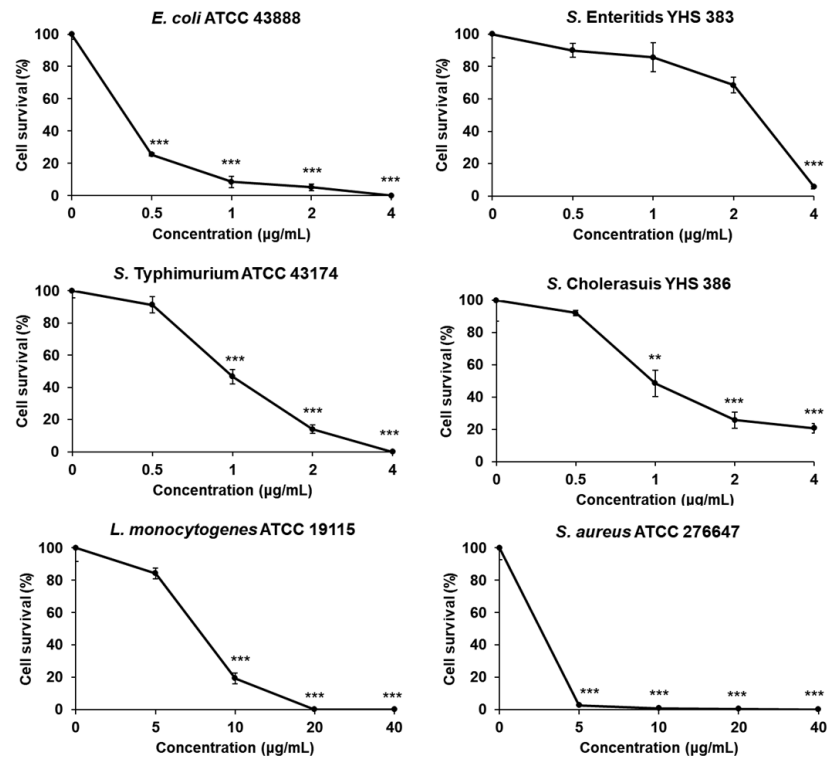


Fig. 2. Antibacterial activity of cpNK peptide. The pathogens were incubated with cpNK peptide for 4 h at 37°C. Cell survival (%) was calculated as (surviving CFU/negative control CFU)×100. Each data point is the mean±SEM (** $P<0.01$ and *** $P<0.001$).

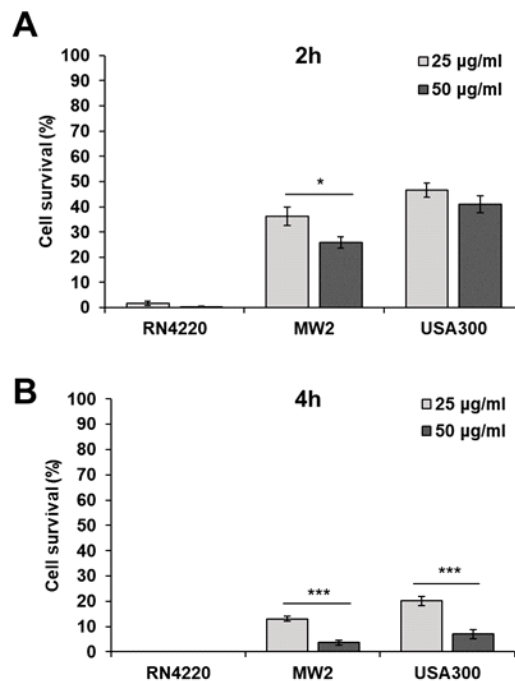


Fig. 3. Antibacterial activity of cpNK chimeric peptide against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MW2, USA300 and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* RN4220 were incubated with cpNK peptide for 2 and 4 h at 37°C. Cell survival (%) was calculated as (surviving CFU/negative control CFU)×100. Each data point is the mean±SEM (* $P<0.01$ and *** $P<0.001$).

을 때, 25 µg/mL에선 20.2%, 50 µg/mL에선 7.0%의 생존율을 보였다. 항생제 내성이 없는 RN4220의 경우, cpNK를 2시간 처리한 경우 25 µg/mL에선 1.7%, 50 µg/mL에서는 0.3%의 생존율을 보였다. 또한, 25와 50 µg/mL의 cpNK를 4시간 처리했을 때에 RN4200은 모두 0%의 생존율을 보였다.

위의 결과를 통해 cpNK 펩타이드는 두 개의 MRSA 박테리아 중 *S. aureus* MW2에서 더 높은 항균효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

4. cpNK Chimeric 펩타이드로부터 변형된 펩타이드의 *In Vitro* 항균효과

27aa의 cpNK chimeric 펩타이드에서 실제 항균효과를 보이는 core region을 찾기 위해 6aa를 줄인 cpNK-a1 (Fig. 4)

와 14aa를 줄인 cpNK-a2 (Fig. 5)의 항균효과를 검증하였다. cpNK-a1를 *E. coli*에 처리할 경우, 5 µg/mL 부터 유의적으로 생존율이 감소하였으며 10, 20, 40 µg/mL에서 모두 생존율이 0%였다 (Fig. 4). *S. Enteritidis*는 cpNK-a1에 의해 생존율이 5 µg/mL을 처리했을 때 96.9%의 생존율을 보였지만 10 µg/mL부터는 모두 0%의 생존율을 보였다. *S. Typhimurium*은 5 µg/mL의 cpNK-a1를 처리하였을 때, 1.9%의 생존율을 보였으며 10 µg/mL부터는 0%로 나타났다. *S. Choleraesuis*는 5 µg/mL의 cpNK-a1에 의해 17.7%의 생존율을 나타냈으며, 20 µg/mL부터 0%가 나타났다. 그람 양성균인 *L. monocytogenes*의 경우 5 µg/mL의 cpNK-a1에 의해 생존율이 44.5%로 낮아졌으며 10 µg/mL부터는 0%였다. *S. aureus*는 5 µg/mL의 cpNK-a1부터 유의적으로 생존율이 감소하였으며, 40 µg/mL

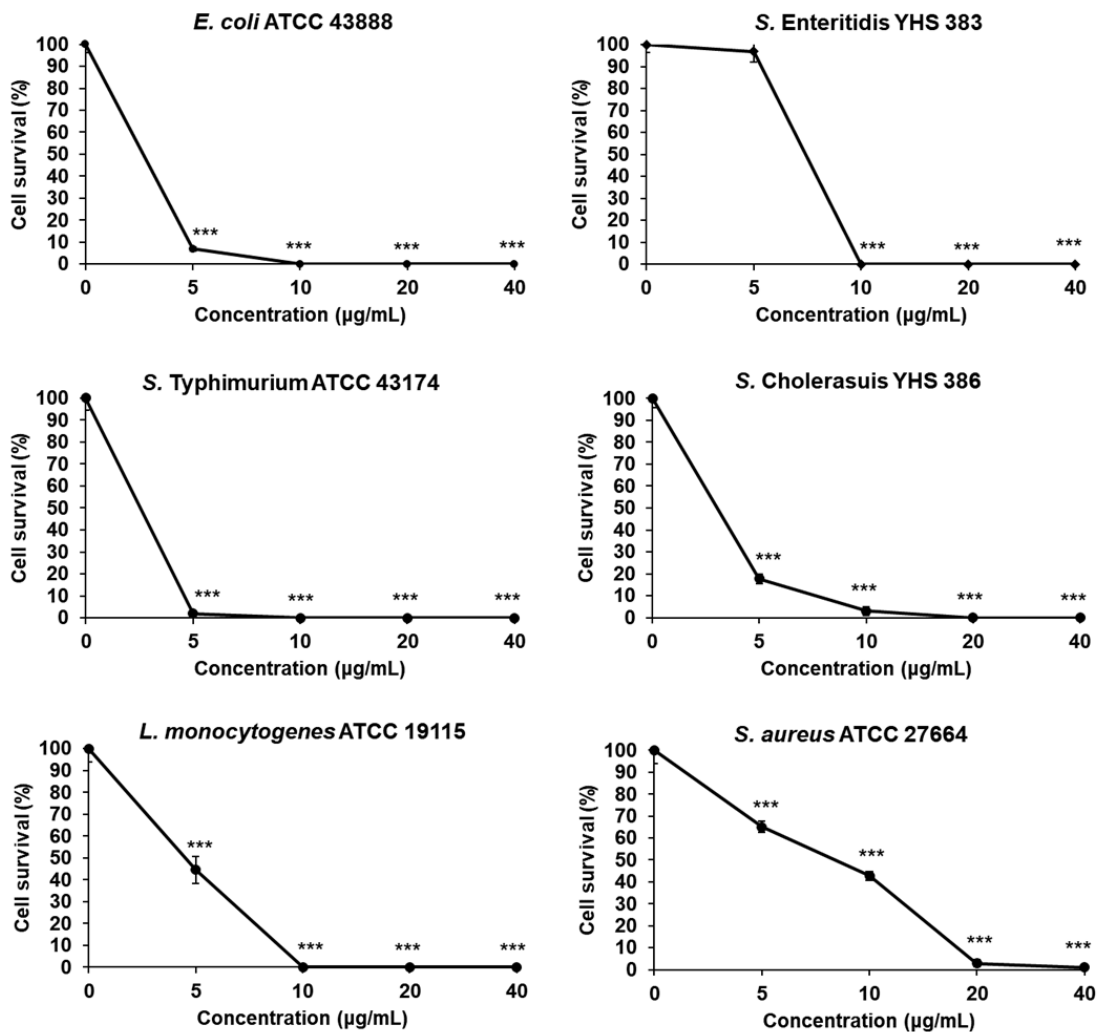


Fig. 4. Antibacterial activity of cpNK-a1. The pathogens were incubated with cpNK-derived cpNK-a1 peptide for 4 h at 37°C. Cell survival (%) was calculated as (surviving CFU/negative control CFU)×100. Each data point is the mean±SEM (***)P<0.001).

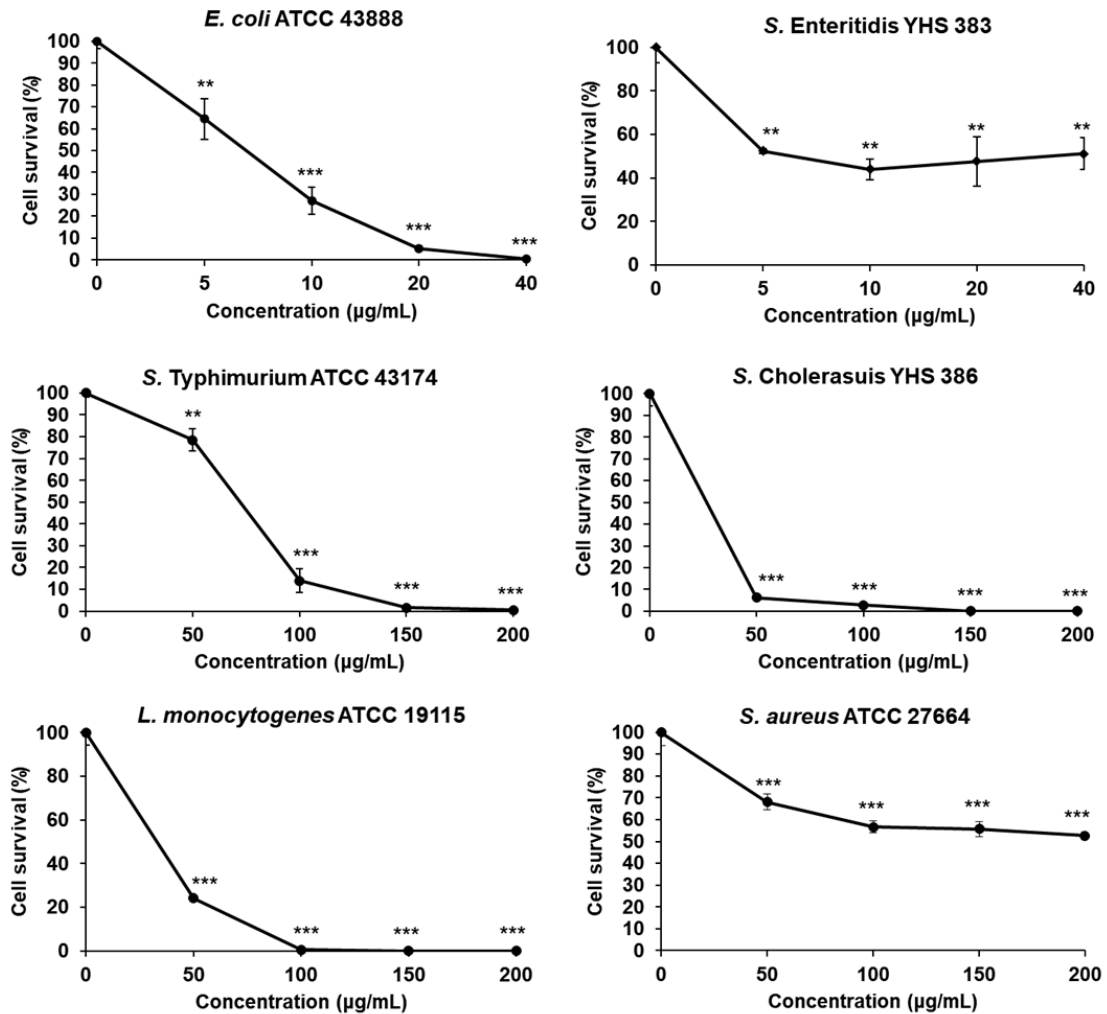


Fig. 5. Antibacterial activity of cpNK-a2. The pathogens were incubated with cpNK-derived cpNK-a2 peptide for 4 h at 37°C. Cell survival (%) was calculated as (surviving CFU/negative control CFU)×100. Each data point is the mean±SEM (** $P<0.01$ and *** $P<0.001$).

에서는 0.9%의 생존율을 보였다.

13개의 아미노산으로 구성된 cpNK-a2를 *E. coli*에 처리시 5 µg/mL부터 생존율이 유의적으로 감소하였으며, 40 µg/mL에는 0.5%의 생존율이 측정되었다 (Fig. 5). *S. Enteritidis*는 5~40 µg/mL의 cpNK-a2에 의해 44.0에서 52.4% 사이의 생존율을 보였다. cpNK-a2를 *S. Typhimurium*에 처리시, 50 µg/mL에서 생존율 78.5%로 유의적으로 감소하였으며, 200 µg/mL에서는 0.5%의 생존율로 나타났다. *S. Choleraesuis*는 50 µg/mL의 cpNK-a2에 의해 생존율이 6.2%로 감소하였으며, 150 µg/mL부터는 0%로 측정되었다. *L. monocytogenes*는 50 µg/mL의 cpNK-a2에서 생존율이 24.1%였으며, 150 µg/mL부터는 0%였다. *S. aureus*는 50 µg/mL의 cpNK-a2에 의해 68.0%로 생존율이 감소하였으며, 200 µg/mL에서는 52.6%

로 측정되었다.

따라서 27개의 아미노산인 cpNK 펩타이드로부터 변형된 21개의 아미노산의 cpNK-a1는 그람음성균과 양성균에서 모두 좋은 항균효과를 보였으며, 40 µg/mL의 농도에서는 100%에 가까운 항균효과를 보여주었다. 13개의 아미노산으로 구성된 cpNK-a2는 cpNK-a1에 비해 낮은 항균효과를 나타냈으며, 100 µg/mL 이상의 농도에서 높은 항균효과를 나타내었다.

고찰

항균펩타이드는 선천성 면역에서 중요한 역할을 하는 펩

타이드로서 숙주가 병원균에 감염이 되었을 때, 직접적으로 병원균을 사멸시키거나 면역반응을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Kang, Kim, Seo and Park, 2017). 본 연구에서는 닭과 돼지의 항균펩타이드 NK-lysin의 한 부분인 NK-2를 조합한 chimeric 펩타이드 (cpNK)의 항균효과를 측정하였다. cpNK는 *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 같은 병원균과 메티실린 항생제 내성균에 대한 항균효과를 보였다.

항균펩타이드는 α -helix와 β -sheets 등의 구조를 갖고 있는데, 특히 α -helix 구조가 항균효과에 큰 영향을 미친다 (Jenssen, Hamill and Hancock, 2006; Kang, Kim, Seo and Park, 2017). α -helices를 갖는 항균펩타이드는 박테리아의 세포막에 잘 결합하여 “Carpet” 또는 “Barrel-Stave” 메커니즘을 통해 세포막을 파괴할 수 있다 (Zelezetsky and Tossi, 2006; Huang et al., 2010). NK-2는 NK-lysin의 5개의 α -helix 구조 중 helix 3에서 5를 포함하는 부분이다 (Lee et al., 2013). 닭과 돼지의 NK-2를 조합한 cpNK chimeric 펩타이드의 구조를 예측한 결과 역시 α -helix 구조를 나타냈으며, 강력한 항균효과를 나타내었다 (Figs. 1 and 2). 또한 펩타이드의 charge값은 양전하 아미노산은 +1을 하고 음전하 아미노산은 -1을 함으로서 계산되었는데, 돼지의 NK-2와 cpNK의 charge 값은 +9로 가장 높게 나타났다. 이를 통해 음전하를 띠는 LPS와 lipoteichoic acids에 대한 항균펩타이드의 결합력이 증가하므로 항균효과 또한 증가할 것으로 예상된다.

본 연구에서 사용된 *E. coli* ATCC 43888은 *E. coli* O157:H7로 알려져 있으며, Shiga toxin을 생성하여 사람에게서 출혈성대장염 (hemorrhagic colitis)과 용혈성요독증후군 (hemolytic uremic syndrome)을 일으키는 박테리아이다 (Lim et al., 2010). *S. Enteritidis*는 사람에게서 식중독을 일으키는 주요 박테리아이며 *S. Enteritidis*에 감염된 닭으로부터 사람에게 전달될 수 있다 (Vaz et al., 2020). *S. Typhimurium* 역시 식중독을 일으키는 박테리아로서 살모넬라증 (Salmonellosis)의 99%를 차지한다 (Lamas et al., 2018). *S. Choleraesuis*는 주로 돼지에서 파리티푸스 (paratyphoid)를 일으키며, 사람에게 감염될 경우 장염 및 폐혈증을 유발할 수 있다 (Chiu et al., 2004). *L. monocytogenes*는 주로 반추동물에 감염 시 리스테리아증 (listeriosis)을 일으키며 사람에게 감염이 일어날 경우, 패혈증, 뇌수막염 등을 일으킨다 (Lecuit, 2020). *S. aureus*는 사람에게 감염 시 entotoxin을 생성하여 식중독을 일으킬 수 있으며, 그 밖에 여러 감염과 연관된 증상을 일으킨다 (Madahi et al., 2014). 위와 같이 사람 및 가금류에서

질병을 일으키는 병원균에 대하여 cpNK 펩타이드는 강력한 항균효과를 보여주었으며, 뿐만 아니라 메티실린 내성균인 *S. aureus* MW2와 USA300에서도 항균효과를 보여주어 항생제 대체제로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

cpNK 펩타이드는 그람 양성균보다 음성균에서 더 높은 항균효과를 보여주었는데, 그람 양성균의 두꺼운 peptidoglycan은 항균펩타이드와 세포막의 결합을 방해할 수도 있다 (Malanovic and Lohner, 2016). 이로 인해서 그람 음성균과 양성균에서 항균효과 차이를 보이는 것으로 생각된다.

강력한 항균효과를 갖는 cpNK 펩타이드의 핵심 부위를 찾고, 펩타이드의 길이를 줄여 합성 비용을 절감하면서 cpNK와 비슷한 항균효과를 나타내는 부분을 찾기 위해 21aa의 cpNK-a1과 13aa의 cpNK-a2의 항균효과를 측정할 결과, cpNK-a1이 cpNK-a2보다 더 좋은 항균효과를 보였으며, cpNK 보다는 낮은 항균효과를 보여주었다. 이전 연구에 의하면 길이가 짧은 항균펩타이드의 경우 세포막의 길이보다 짧아 막을 파괴하기 어렵다는 결과가 있었다 (Gagnon et al., 2017). 이에 따라 cpNK-a1과 a2는 cpNK보다 길이가 짧아 박테리아 세포막을 커버하는 범위가 cpNK보다 적을 것이라고 예상할 수 있으며, 또는 짧은 펩타이드 길이 때문에 α -helix 구조가 잘 형성되지 않았을 것으로 예상된다.

본 연구에서 *in vitro* 항균효과를 나타낸 cpNK, cpNK-a1, cpNK-a2 펩타이드가 항생제 대체제로서 활용되기 위해선 *in vivo* 실험이 추후 필요할 것으로 예상된다. *In vitro*와 다르게 *in vivo* 실험을 진행할 경우, 이미 숙주의 면역계에 의해 발현되는 다양한 항균펩타이드들의 효과가 동반되기 때문에 cpNK, cpNK-a1, cpNK-a2 펩타이드의 항균활성 농도 범위가 달라질 수 있다. 또한 항균펩타이드를 가축사료첨가제로서 사용할 경우, 가축의 소화기관에서 펩타이드의 안전성을 확보해야 하며, 감염된 목적 기관으로 효율적으로 전달될 수 있어야 하므로 전달 매개체에 대한 연구가 필요하다.

결론적으로, 이번 연구에서는 닭과 돼지의 NK-lysin에서 항균효과를 보이는 부분인 NK-2를 조합한 펩타이드의 항균효과를 확인하였다. 그 결과, cpNK는 *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*에 대해 강력한 항균효과를 보여주었으며 그 밖에 메티실린 내성균인 MRSA MW2와 USA300에 대해서도 항균효과를 나타내었다. 이를 통해 cpNK를 항생제 대체제로서 활용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었으며, 효율적인 펩타이드 생산과 효과적인 숙주 내 전달 방법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

가축에서 항생제의 남용은 항생제 내성균의 발생을 유도하므로 가축과 사람의 건강을 위협할 수 있다. 이에 따라 항생제를 대체할 수 있는 물질 중 하나로 항균펩타이드(antimicrobial peptides)가 연구되고 있다. 항균펩타이드는 12-50개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 숙주에 감염된 다양한 박테리아를 사멸시키고 면역작용을 조절하는 등 선천성 면역에 중요한 물질이다. 본 연구에서는 닭과 돼지의 NK-2를 조합하여 cpNK라는 chimeric 펩타이드를 합성하였으며 이것의 항균효과를 검증하였다. 그 결과, cpNK는 그람 음성균인 *E. coli*와 *Salmonella* spp. 그리고 그람 양성균인 *L. monocytogenes*과 *S. aureus*를 사멸시켰으며, cpNK는 그람 음성균에서 더 강력한 살균효과를 보였다. 특히, cpNK는 메티실린 내성 황색포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 대해서도 항균효과를 보여주었다. 또한, 27aa인 cpNK의 크기를 줄인 21aa의 cpNK-a1과 13aa의 cpNK-a2를 합성하여 마찬가지로 항균효과를 측정할 결과, cpNK보다는 약한 항균효과를 보였지만 여러 병원균의 생존율을 감소시켰다. 따라서 본 연구를 통해 우수한 항균효과를 갖는 cpNK와 cpNK로부터 유도된 펩타이드들을 항생제 대체제로 사용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. (색인어: 닭, 돼지, 항균펩타이드, NK-lysin, NK-2)

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ015612)의 지원에 의해 이루어진 것임.

ORCID

Yejin Hong <https://orcid.org/0000-0001-8071-8183>
 Gi-Yong Lee <https://orcid.org/0000-0001-5308-0065>
 Soo-Jin Yang <https://orcid.org/0000-0003-3253-8190>
 Hyun Soon Lillehoj <https://orcid.org/0000-0001-7755-6216>
 Yeong Ho Hong <https://orcid.org/0000-0002-4510-7851>

REFERENCES

- Andrá Jr, Koch MH, Bartels R, Brandenburg K 2004 Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5):1593-1599.
- Chiu CH, Su LH, Chu C 2004 *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 17(2):311-322.
- Gagnon MC, Strandberg E, Grau-Campistany A, Wadhvani P, Reichert J, Bürck J, Rabanal F, Auger MI, Paquin JF, Ulrich AS 2017 Influence of the length and charge on the activity of α -helical amphipathic antimicrobial peptides. *Biochemistry* 56(11):1680-1695.
- Hong Y, Lee J, Vu TH, Lee S, Lillehoj HS, Hong YH 2020a Chicken avian β -defensin 8 modulates immune response via the mitogen-activated protein kinase signaling pathways in a chicken macrophage cell line. *Poult Sci* 99(9):4174-4182.
- Hong Y, Lee J, Vu TH, Lee S, Lillehoj HS, Hong YH 2020b Immunomodulatory effects of avian β -defensin 5 in chicken macrophage cell line. *Res Vet Sci* 132:81-87.
- Hong YH, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Miska KB, Tuo W, Lee SH, Han JY, Lillehoj EP 2006 Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin. *Vet Immunol Immunopathol* 110(3-4):339-347.
- Huang Y, Huang J, Chen Y 2010 Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein Cell* 1(2):143-152.
- Jacobs T, Bruhn H, Gaworski I, Fleischer B, Leippe M 2003 NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(2):607-613.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE 2006 Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19(3):491-511.
- Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y 2017 The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol* 55(1):1-12.
- Kim WH, Lillehoj HS, Min W 2017 Evaluation of the immunomodulatory activity of the chicken NK-lysin-derived peptide cNK-2. *Sci Rep* 7(1):1-11.
- Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A 2018 A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res* 206:60-73.
- Lecuit M 2020 *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *Cell Microbiol* 22(4):e13186.

- Lee MO, Jang HJ, Han JY, Womack JE 2014 Chicken NK-lysin is an alpha-helical cationic peptide that exerts its antibacterial activity through damage of bacterial cell membranes. *Poult Sci* 93(4):864-870.
- Lee SH, Lillehoj HS, Tuo W, Murphy CA, Hong YH, Lillehoj EP 2013 Parasiticidal activity of a novel synthetic peptide from the core α -helical region of NK-lysin. *Vet Parasitol* 197(1-2):113-121.
- Lillehoj H, Lee K 2012 Immune modulation of innate immunity as alternatives-to-antibiotics strategies to mitigate the use of drugs in poultry production. *Poult Sci* 91:1286-1291.
- Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ 2010 A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20(1):5.
- Madahi H, Rostami F, Rahimi E, Dehkordi FS 2014 Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from chicken nugget in Iran. *Jundishapur J Microbiol* 7(8): e10237.
- Malanovic N, Lohner K 2016 Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals* 9(3):59.
- Martínez JL 2008 Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321(5887):365-367.
- Otvos L Jr 2016 Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiol Immunol Hung* 63(3):257-277.
- Schröder-Borm H, Bakalova R, Andrä J 2005 The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett* 579(27):6128-6134.
- Vaz CSL, Voss-Rech D, Alves L, Coldebella A, Brentano L, Trevisol IM 2020 Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Vet Microbiol* 240:108527.
- Wang J, Dou X, Song J, Lyu Y, Zhu X, Xu L, Li W, Shan A 2019 Antimicrobial peptides: promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Med Res Rev* 39(3):831-859.
- Wiesner J, Vilcinskas A 2010 Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1(5):440-464.
- Xiong YQ, Mukhopadhyay K, Yeaman MR, Adler-Moore J, Bayer AS 2005 Functional interrelationships between cell membrane and cell wall in antimicrobial peptide-mediated killing of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(8):3114-3121.
- Yeaman MR, Puentes S, Norman D, Bayer A 1992 Partial characterization and staphylocidal activity of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infect Immun* 60(3):1202-1209.
- Zelezetsky I, Tossi A 2006 Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure - activity relationship studies. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1758(9):1436-1449.
- Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM 2013 Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(9):3435-3440.