

I EINLEITUNG

1 Problemfall Sepsis

Immer noch stellt die Sepsis ein großes Problem in der klinischen Medizin dar. Obwohl die Mortalitätsrate der Sepsis abnimmt, steigt die Inzidenz und die Gesamtzahl der an Sepsis verstorbenen Patienten (Martin et al., 2003). Die Inzidenz schwankt stark zwischen einzelnen Krankenhäusern, abhängig vom Patientengut, wird aber durchschnittlich auf etwa 2 % der Neuaufnahmen geschätzt (Sands et al., 1997). Auf Intensivstationen findet sich eine noch höhere Inzidenz mit bis zu 9 % der Aufnahmen (Brun-Buisson et al., 1995). Die angegebenen Mortalitätsraten schwanken zwischen 34 % (Sands et al., 1997) und etwa 55 % (Brun-Buisson et al., 1995; Alberti et al., 2002). Eine retrospektive Arbeit, die 131 Sepsis-Studien auswertete, kam auf eine Gesamtmortalitätsrate von 50 % (Friedman et al., 1998). Anfällig für eine Sepsis sind ältere Menschen und Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie Tumorerkrankungen, chronischen Leber- und Nierenerkrankungen, Immunsuppression, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit und parenteralem Drogenabusus. Eintrittspforten für Erreger bilden häufig chirurgische Eingriffe oder andere invasive medizinische Techniken wie der Einsatz von Beatmungsgeräten, Dialyseanlagen, Herz-Lungen-Maschinen sowie zentrale Venen- und Blasenkatheter. Traumen und Verbrennungen bewirken eine Schwächung der Erregerabwehr des Organismus und bergen das Risiko, eine Sepsis nach sich zu ziehen. Weiterhin können auch entzündliche Darm- und Lebererkrankungen eine Sepsis hervorrufen, da Darmbakterien durch die geschädigte Darmwand hindurchtreten können (Fink, 1996). Gram-positive Bakterien sind mit 28 % die häufigsten Auslöser einer Sepsis (Sands et al., 1997), gefolgt von gram-negativen Bakterien, wobei oft auch Mischinfektionen vorliegen. Auch Pilze, Parasiten und Viren können eine Sepsis verursachen (Fink, 1996). Die hohe Inzidenz und Mortalität der Sepsis verdeutlichen die dringende Notwendigkeit, die Sepsistherapie zu optimieren. Voraussetzung dafür ist ein grundlegendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis, die als Überstimulation des angeborenen Immunsystems durch Erregerbestandteile

aufgefaßt werden. Daher ist es nützlich, die Interaktionen zwischen Mikroorganismen und dem angeborenen Immunsystem genau zu betrachten.

2 Angeborene Immunität

Bei Wirbeltieren, zu denen auch der Mensch gehört, finden sich zwei verschiedene Immunsysteme: die angeborene und die erworbene Immunität. Beide Abwehrsysteme haben zahlreiche Verbindungen und ergänzen sich. Die angeborene Immunität stellt eine erste Barriere gegen eindringende Krankheitserreger dar. Sie ist unspezifisch, besitzt kein immunologisches Gedächtnis und schützt den Organismus durch eine Begrenzung der Infektion 4 bis 5 Tage lang, bis die Lymphozyten in das Geschehen eingreifen. Ebenso wie bei der erworbenen Immunität unterscheidet man auch bei der angeborenen Immunität einen humoralen und einen zellulären Anteil, wobei das Komplementsystem einen wichtigen Teil der humoralen angeborenen Abwehr darstellt. Monozyten und polymorphkernige Granulozyten bilden die zelluläre Komponente der unspezifischen Immunität. Ihre Aufgabe besteht darin, Mikroorganismen als Krankheitserreger zu erkennen, zu phagozytieren, Antigene den Lymphozyten zu präsentieren und Zytokine freizusetzen (Johnston, 1988). Durch diese werden Entzündungsvorgänge in Gang gesetzt, weitere immunkompetente Zellen aktiviert und in den Infektionsbereich gelockt. Weiterhin sind Zytokine verantwortlich für die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen aus der Leber, zu denen beispielsweise das C-reaktive-Protein (CRP) und auch das Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP) gehören (Schumann et Zweigner, 1999). Die angeborene Abwehr, die ohne Induktion direkt auf den Krankheitserreger einwirkt, beginnt die Verteidigung gegen eindringende Keime und aktiviert dabei die erworbene Immunität, welche dann mit Hilfe von Lymphozyten und Antikörpern eine spezifische Antwort auf die betreffenden Mikroorganismen ermöglicht. Charakteristisch für die angeborene Immunität ist, daß sie pathogene Mikroben erkennt, indem sie mittels sogenannter Muster-Erkennungs-Rezeptoren („pattern recognition receptors“) bestimmte molekulare Strukturen identifiziert, die essentiell sind für das Überleben der Mikrobe. Solche Strukturen unterliegen keiner Variation, da eine Mutation in diesem

Bereich tödlich ist für den Keim. Sie wurden während der Evolution konserviert und finden sich bei einer großen Gruppe von Mikroben (Medzhitov et al., 2000). Ein solches Muster stellt das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien dar, das einen ausgesprochen potenten Auslöser von Entzündungsreaktionen darstellt. Da LPS bei allen gram-negativen Bakterien vorkommt, erlaubt ein Rezeptor, der den konservierten Lipid A-Teil von LPS erkennt, die Anwesenheit jedes gram-negativen Bakteriums zu bemerken. Durch diesen Mechanismus der Muster-Erkennungs-Rezeptoren ist es dem Wirt möglich, durch eine begrenzte Anzahl an Rezeptoren eine große Bandbreite an pathogenen Keimen zu erkennen (Medzhitov et al., 1997). Auch für die immunologische Unterscheidung von Selbst und Fremd spielt die Erkennung von bestimmten Mustern eine große Rolle (Medzhitov et al., 2002). Es wundert nicht, daß es sich bei diesem Mechanismus um ein System handelt, das man in verschiedener Ausformung bei Pflanzen, Wirbellosen und Wirbeltieren findet (Janeway et al., 1998).

3 Struktur des LPS

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein hitzestabiles, amphiphiles Glykolipid, das sich aus einem hydrophoben Lipidanteil und einer kovalent gebundenen hydrophilen Polysaccharidregion zusammensetzt. Es ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und bildet eine für die Stabilität der Bakterienzelle essentielle Permeabilitätsbarriere. Im Gegensatz zu sezernierten bakteriellen Exotoxinen wird LPS aufgrund seiner Eigenschaft als Membranbaustein auch als Endotoxin bezeichnet. Die folgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die Struktur von LPS.

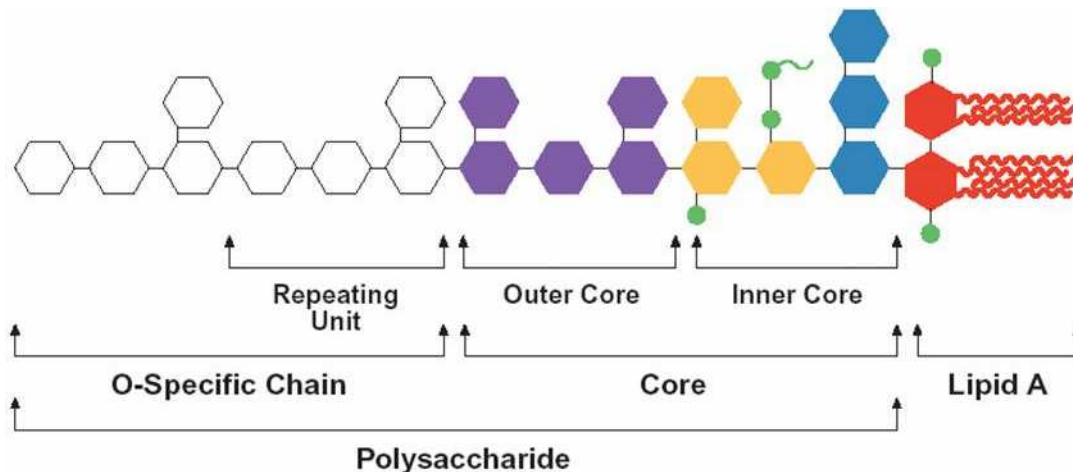


Abbildung 1: Struktur des LPS

Die Abbildung zeigt schematisch die Struktur des Lipopolysaccharids (LPS). Es besteht aus dem Lipid A-Teil und dem Polysaccharidteil. Letzterer wird unterteilt in Kernregion (core) mit innerem und äußerem Kern (inner und outer core) und O-Antigen (O-specific chain). Das O-Antigen ist zusammengesetzt aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten (repeating units). Die Abbildung wurde entnommen aus Rietschel et al., 1985.

Es lassen sich drei Regionen des Moleküls voneinander abgrenzen (Alexander et al., 2001; Heine et al., 2001):

3.1 O-Antigen

Das O-Antigen ist zusammengesetzt aus einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen einer Oligosaccharideinheit, die aus 2 bis 8 Zuckermonomeren besteht. Es besteht eine große Variationsbreite in Beschaffenheit und Länge bei verschiedenen Bakterienstämmen, die die Möglichkeit bietet, unterschiedliche Spezies anhand ihres O-Antigens serologisch zu klassifizieren. Dabei stellen die Bezeichnungen der Bakterienstämme immunologische Klassifizierungen dar, die angeben, welcher Antikörper welchen Stamm erkennt. Zwar benötigen Bakterien für das Überleben *in vivo* ein O-Antigen, *in vitro* dagegen können sie auch ohne überleben. Varianten mit kurzem O-Antigen werden als rauhe Form („rough“) bezeichnet, diejenigen mit langen O-spezifischen Seitenketten als glatte Form („smooth“), weil glänzende Oberflächen ihre Kolonien kennzeichnen. Das lange O-Antigen der glatten Form stellt einen potenten Virulenzfaktor dar, der Resistenz

gegen Komplementfaktoren vermittelt (McCallum et al., 1989). Das O-Antigen ist allerdings nicht notwendig für die Entzündungsaktivität des LPS.

3.2 Kern-Polysaccharid

Wie das O-Antigen ist auch das Kern-Polysaccharid nicht notwendig für die entzündungsfördernde Eigenschaft von LPS. Es besteht aus 10 oder mehr unterschiedlichen Zuckermolekülen und einer variablen Anzahl an Phosphat- und Ethanolamin-Resten. Es liegt zwischen dem O-Antigen und dem Lipid A. Kernregion und O-Antigen bilden den hydrophilen Teil des amphiphilen Lipopolysaccharids.

3.3 Lipid A

Lipid A ist verantwortlich für die biologische Wirkung des LPS (Rietschel et al., 1985 & 1987) und dient als Anker, um das LPS-Molekül in der äußeren Bakterienmembran zu befestigen. Es ist zusammengesetzt aus zwei Glucosamin-Phosphat-Resten, an denen meistens sechs Fettsäureketten gebunden sind, die eine Länge von etwa 12 bis 14 C-Atomen aufweisen. Diese Region und auch die Enzyme seiner Biosynthese sind bei Enterobacteriaceae hoch konserviert. Mutationen sind in den meisten der Lipid-A-Biosynthese-Genen tödlich (Onishi et al., 1996). Für die endotoxische Aktivität des Lipid A spielt neben der Anzahl, Position und der Kettenlänge der Fettsäuren auch die Form des Lipid A eine entscheidende Rolle (Somerville et al., 1996). So zeigt konisch oder konkav geformtes Lipid A mit einer längeren hydrophoben als hydrophilen Region eine starke IL-6-Stimulation, während zylindrisch geformtes Lipid A mit antagonistischer LPS-Aktivität korreliert (Schromm et al., 2000). LPS ist negativ geladen und als membranbildendes Lipid amphiphil, wobei die Fettsäureketten der Lipid-A-Region den hydrophoben, die Zucker- und Phosphatreste der anderen Regionen den hydrophilen Teil bilden. Als Monomer besitzt LPS in wässrigem Medium eine schlechte Löslichkeit und lagert sich daher zu Aggregaten zusammen in Form von Membranen oder Mizellen. Auch

diffundiert LPS nicht spontan von einer Membran zu einer anderen. Dafür benötigt es die Unterstützung von Lipid-Transfer-Proteinen.

4 Erkennung von LPS

LPS wird in erster Linie erkannt von phagozytosefähigen Monozyten und Gewebsmakrophagen, welche die membranständige Form des CD14-Antigens (mCD14) sowie TLR2 und TLR4 exprimieren. Mit Hilfe der löslichen Form des CD14-Antigens (sCD14) kann LPS in Verbindung mit LBP auch CD14-negative Zellen wie Endothelzellen oder Fibroblasten zur Sekretion von Zytokinen bewegen (Schumann et al., 1994; Pugin et al., 1993). Nach den derzeitigen Vorstellungen von der Zellaktivierung durch LPS werden LPS-Monomere aus Aggregaten herausgelöst durch das Lipopolysaccharid-Binde-Protein (LBP) und dem CD14 präsentiert. CD14 selbst besitzt keine transmembranäre Domäne, die eigentliche Signaltransduktion vermittelt TLR4, das zur Gruppe der Toll-like-Rezeptoren gehört (Tapping et al., 2000). Bisher wurden beim Menschen elf verschiedene Toll-like-Rezeptoren entdeckt. Ihr Name kommt daher, daß sie dem Rezeptor Toll aus *Drosophila melanogaster* ähneln (Kopp et Medzhitov, 1999). Der Rezeptor TLR-4 gilt als der eigentliche LPS-Rezeptor der Säugetiere (Poltorak et al., 1998). Er ist der primäre Sensor des angeborenen Immunsystems, der als Muster-Erkennungs-Rezeptor („pattern recognition receptor“) die Anwesenheit gram-negativer Bakterien dem Organismus mitteilt (Beutler, 2000; Beutler et al., 2003). Für die LPS-Signaltransduktion ist noch ein weiteres Protein namens MD-2 notwendig (Shimazu et al., 1999), das in Assoziation mit TLR4 gefunden wurde und auch allein in der Lage zu sein scheint, LPS zu binden (Viriyakosol et al., 2001). Offenbar bilden die drei Proteine CD14, TLR4 und MD-2 einen Membran-Rezeptor-Komplex, an den LPS direkt bindet (da Silva Correia et al., 2001). Die intrazelluläre Signalaktivierungsdomäne des TLR führt zur Aktivierung mehrerer Signalwege (Triantafilou et Triantafilou, 2002), wobei dem Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle zuzukommen scheint. Im Endeffekt führt die Zellaktivierung dann zur

Exprimierung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, welche die Immunantwort auslösen und modulieren (Krutzik et al., 2001).

5 Biologische Wirkungen von LPS

5.1 Lokale Entzündungsreaktion

Bei lokalen Entzündungsprozessen findet man als vorherrschende Zelltypen neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie deren Vorläuferzellen, die Monozyten. Auswirkungen von LPS sind auf neutrophile Granulozyten, Monozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, auf das Komplementsystem und auf das Gerinnungssystem bekannt.

LPS wird von neutrophilen Granulozyten aufgenommen und aktiviert diese. Daraufhin produzieren sie Adhäsionsmoleküle und bilden Aggregate. Auch Endothelzellen bilden bei Kontakt mit LPS Adhäsionsmoleküle und Gewebsthromboplastin. Es kommt so zur Adhäsion zirkulierender Immunzellen an die Gefäßwand. Außerdem stimuliert Endotoxin Granulozyten, Endothelzellen und Monozyten zur Exprimierung proinflammatorischer Zytokine (Rietschel et al., 1996; Glauser et al., 1991). Als bedeutendster Entzündungsmediator wird Tumornekrosefaktor- α (TNF α) angesehen (Fink, 1996), insgesamt kommt es durch LPS aber zur Sekretion zahlreicher Entzündungsmediatoren, zu denen verschiedene Interleukine, wie IL-1 (Schumann et al., 1998), IL-6, IL-8, Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Interferon- γ , zytotoxische Produkte wie Superoxidradikale und lysosomale Enzyme, Adhäsionsmoleküle und koloniestimulierende Faktoren zählen (Nathan, 1987). Dadurch kommt es zu Chemotaxis, lokalen vasoaktiven Effekten, erhöhter Kapillardurchlässigkeit und so zur lokalen Entzündung. Zudem ruft LPS die Synthese vasodilatativer Substanzen hervor, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), Kallikrein, verschiedener Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. In der Folge kommt es zu einer Erweiterung der lokalen Blutgefäße und einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwände (Glauser et al., 1991). Viele dieser Entzündungsmediatoren fungieren auch als endogene Pyrogene und erzeugen Fieber. Auch führen sie zu metabolischen und hormonalen Veränderungen erstens durch

Erhöhung von Stresshormonen wie Cortisol und ACTH und zweitens durch Auslösung einer Akute-Phase-Reaktion (Silverman et al., 1999).

Eine weitere Zellpopulation, die auf LPS reagiert, sind die Lymphozyten. So wurden bei B-Lymphozyten eine Stimulation der Proliferation und der Antikörperproduktion durch LPS nachgewiesen. T-Zellen werden durch Endotoxin angeregt, Zytokine zu sezernieren, und T-Suppressor-Zellen werden herunterreguliert (Rietschel et al., 1996).

Auch auf das Komplementsystem zeigt LPS Wirkung. Durch Endotoxin wird die Komplementkaskade aktiviert und es werden große Mengen der Anaphylatoxine C3a und C5a produziert. Dies führt zur Degranulation und Aktivierung neutrophiler und basophiler Granulozyten und Mastzellen und dadurch zu verschiedenen Entzündungsvorgängen wie Vasodilatation, erhöhter Kapillardurchlässigkeit, und Aggregation von Plättchen und Granulozyten (Roitt et al., 1998).

Da das angeborene Immunsystem mit dem Gerinnungssystem vielfach verbunden ist, betreffen Entzündungsprozesse auch immer die Koagulation (Opal, 2003). Über die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII (Hageman-Faktor) durch Endotoxin wird sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Gerinnungskaskade ins Rollen gebracht. Zusätzlich werden Endothelzellen und Makrophagen durch den Hageman-Faktor zur Produktion von Gewebsthromboplastin (Faktor III) angeregt (Glauser et al., 1991). Ein weiterer Effekt des Hageman-Faktors ist die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein. Dieses wiederum bildet aus Kininogen die sogenannten Kinine (Bradykinin und Kallidin), die die Blutgefäße erweitern, die Kapillarpermeabilität erhöhen und die Leukozytenmigration fördern (Löffler, 1997). Durch diese zahlreichen immunologischen Wirkungen von LPS bilden sich schließlich die typischen klinischen Entzündungszeichen: Röte, Wärme, Schwellung und Schmerz. Weitere Leukozyten werden zum Infektionsherd gelockt und treiben die Auflösung der Infektion voran. Eine unverzügliche lokale Entzündung ist eine für den Organismus vorteilhafte Reaktion.

5.2 Systemische Reaktion - Sepsis

Ein stark erhöhter systemischer LPS-Spiegel im Blut kann beim Menschen zu einer unkontrollierten, extremen Aktivierung von Entzündungsmediatoren führen. Dies setzt eine Mediatorkaskade in Gang, die zur Sepsis führen kann (Remick, 1995; Bone, 1991). Zytokine sind vorteilhaft für den Organismus, solange sie in geringen Ausmaßen und begrenzt auf einen lokalen Entzündungsherd sezerniert werden. Dann stimulieren sie das Abwehrsystem dazu, eindringende Krankheitserreger zu zerstören. Bei der Endotoxinämie werden sie aber systemisch ausgeschüttet und bergen so das Risiko, die Homöostase des Organismus schwer zu stören. Die Sepsis ist definiert durch eine Infektion oder einen Infektionsverdacht und das gleichzeitige Vorliegen einer systemischen Entzündungsreaktion mit mindestens zwei der folgenden Kriterien: Fieber oder Hypothermie, Leukozytose oder Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe (Shah, 2001).

Die kritische Rolle der Zytokine bei der Sepsis wird durch folgende Beobachtungen gestärkt: Erstens korrelieren höhere Zytokinspiegel zum Teil mit schlechterem Krankheitsverlauf (Gardlund et al., 1995, Cavaillon et al., 2003), zweitens verbessert eine Hemmung der Zytokine das Überleben im Tiermodell, drittens sind die Wirkungen von rekombinanten Zytokinen den pathophysiologischen Veränderungen bei der Sepsis ähnlich (Remick, 1995). Man kann eine Sepsis also als Überstimulation der physiologischen Entzündungsreaktion auffassen. Diejenigen Reaktionen, welche bei der lokalen Entzündung vorteilhaft für die Bekämpfung der Infektion waren, stellen sich systemisch als Nachteil heraus: Vasodilatation und erhöhte Kapillarpermeabilität verursachen Hypovolämie und Hypotension und in Folge einen septischen Schock. Gerinnungsfördernde Substanzen, die systemisch in großer Menge ausgeschüttet werden, können eine Verbrauchskoagulopathie hervorrufen. Durch pyrogen wirkende Zytokine entsteht mitunter hohes Fieber. Durch die systemische Endotoxinämie gelangen aktivierte neutrophile Granulozyten auch in Gewebe, das nicht infiziert ist, und können so einerseits gesundes Gewebe schädigen und andererseits durch ihre Aggregation Mikroembolien verursachen (Roitt et al., 1998). Es kommt so zu Störungen der Mikrozirkulation mit folgender Gewebshypoxie. Der daraus eventuell resultierende Kreislaufschock kann in

Verbindung mit der Verbrauchskoagulopathie über Multiorgandysfunktion bis zu Multiorganversagen und Tod führen. Der septische Schock als Folge einer Sepsis entsteht bei jedem dritten Patienten (Baenkler, 1999).

Allerdings ist zu beachten, daß nach Streßsituationen auch antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden. Bei manchen Patienten wurde als Folge von stark belastenden Ereignissen wie Trauma, Verbrennung oder Wiederbelebung eine Hyporeaktivität zirkulierender Leukozyten und somit eine Immundefizienz festgestellt, die ebenfalls die Entwicklung einer Sepsis unterstützen kann. Dies wird der übermäßigen Ausschüttung antiinflammatorischer Mediatoren zugeschrieben, es scheint sich dabei aber um kein generelles Phänomen zu handeln. Das Verhältnis von pro- zu antiinflammatorischen Zytokinen im Rahmen der Sepsis ist noch nicht abschließend geklärt (Cavaillon et al., 2003).

6 CD14

CD14 (CD=Cluster of differentiation), ein Glykoprotein mit einer Masse von etwa 55 kDa, ist ein Differenzierungsantigen monozytärer Zellen und dient als Rezeptor für Komplexe aus LPS und LBP (Wright et al., 1990). Es konnte unter anderem gezeigt werden, daß CD14-Transfektion in CD14-negative prä-B-Zellen diese wesentlich sensibler gegenüber LPS macht (Lee et al., 1992). Monoklonale Antikörper gegen CD14 reduzierten die LPS-induzierte Interleukin-Produktion von Monozyten (Weidemann et al., 1994). Ähnlich wie bei LBP steigt auch die Konzentration von CD14 im Serum während einer Sepsis an (Schütt et al., 1993) und zeigt ein konzentrationsabhängiges Aktivitätsprofil, indem es in niedrigen Konzentrationen LPS-Wirkungen an CD14-negativen Zellen verstärkt (Frey et al., 1992) und in hohen Konzentrationen LPS-Effekte inhibiert (Stelter et al., 1998) und infolgedessen bei Versuchen mit Mäusen, die mit rekombinantem sCD14 behandelt wurden, bei LPS-Belastung die Mortalität senken konnte (Haziot et al., 1995). Für CD14-defiziente Mäuse wurde eine hohe Resistenz gegen Schock durch LPS-Belastung oder lebende gram-negative Bakterien beschrieben (Haziot et al., 1996). CD14 kommt in zwei Formen vor, nämlich membranständig („membrane CD14“ =

mCD14) und löslich („soluble CD14“ = sCD14). Die lösliche Variante findet man im Blut in einer Konzentration von etwa 6 - 10 µg/ml, die membranständige ist mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in den Oberflächen von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten verankert. LBP und CD14 haben keinerlei Sequenzhomologie und benutzen wahrscheinlich verschiedene Mechanismen, um LPS zu binden. Außerdem werden die beiden Proteine auf unterschiedliche Weise in das Serum freigesetzt: Als Akute-Phase-Protein wird die LBP-Synthese über die Transkription reguliert (Schumann et al., 1996). CD14 dagegen gelangt durch Abwerfen („shedding“) des membranständigen Proteins in die Blutbahn (Bazil et al., 1991). Sowohl die lösliche als auch die membranständige Form des CD14 haben die gleiche Funktion: Sie binden mit Hilfe von LBP Endotoxine und fügen sie, ebenfalls mit Unterstützung von LBP, in die Zellmembran immunkompetenter Zellen ein, um eine Immunantwort auszulösen. Dabei bindet ein CD14-Molekül jeweils ein LPS-Monomer. CD14 ist aber auch an der Internalisierung von LPS-Aggregaten beteiligt (Vasselon et al., 1999). Offenbar ist CD14 aber mehr als ein Katalysator für die LPS-Bindung, denn es scheint direkt teilzuhaben an dem Rezeptor-Komplex, der das LPS-Signal in das Zellinnere überträgt (Hamann et al., 2000). CD14 selbst besitzt aber keine transmembranäre Domäne. Für die biologischen LPS-Wirkungen des CD14 sind nur die N-terminalen 152 Aminosäuren notwendig, wie Untersuchungen mit trunkierten Proteinen (Juan et al., Januar 1995) und Proteinchimären (Viriyakosol et al., 1996) offenbaren konnten. Weitere Analysen brachten die LPS-Bindungsstelle des CD14 an den Aminosäuren 57 bis 64 zu Tage (Juan et al., März 1995) und auch eine weitere Region an den Positionen 7 bis 10, die für die Zellaktivierung wesentlich ist (Juan et al., Juli 1995). Außer Endotoxinen kann CD14 auch andere amphiphile Moleküle binden, wie beispielsweise Peptidoglycan (Gupta et al., 1996), Lipoteichonsäure, Lipoarabinomannan und Phospholipide. Aufgrund dieser wichtigen Rolle bei der Zellaktivierung durch diverse Bestandteile gram-negativer und gram-positiver Bakterien und auch Mykobakterien wird CD14 als „pattern recognition receptor“ angesehen (Pugin et al., 1994).

7 Funktionen von LBP

Lipopolysaccharid-Binde-Protein (LBP) spielt in Verbindung mit CD14 eine wichtige Rolle bei der Erkennung von LPS durch das angeborene Immunsystem (Schumann et al., 1990; Ulevitch et al., 1999). LBP ist ein Akute-Phase-Protein, das von den Hepatozyten der Leber synthetisiert und in das Blutplasma sezerniert wird (Ramadori et al., 1990; Kirschning et al., 1997). Als Akute-Phase-Protein zeigt LBP ein typisches Muster der Transkriptionsaktivierung: Bei Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6, TNF α und auch durch Dexamethason zeigten Hepatom-Zelllinien unter experimentellen Bedingungen eine starke Aktivierung der Transkription des LBP-Gens (Schumann et al., 1996; Kirschning, Fiedler et al., 1997; Grube et al., 1994). Auch intestinale Epithelzellen sind unter Einfluß von entsprechenden Zytokinen in der Lage, im Rahmen lokaler Immunreaktionen LBP zu sezernieren (Vreugdenhil et al., 1999). Weiterhin wurde LBP in niedriger Konzentration in der bronchoalveolären Lavage normaler Lungen gefunden, stieg dort im Fall akuter Lungenverletzungen an und verstärkte die LPS-stimulierte TNF α -Expression in Alveolarmakrophagen (Martin et al., 1992). Die Konzentration von LBP im Serum beträgt 5-10 μ g/ml, kann aber 24 Stunden nach Auslösung einer Akute-Phase-Reaktion bis 200 μ g/ml ansteigen (Tobias et al., 1992). LBP und CD14 sind notwendig für die prompten systemischen Reaktionen auf bakterielles Lipopolysaccharid. Ihre Aufgabe ist es, in wäßriger Lösung schlecht lösliche LPS-Monomere zu transferieren und dadurch die Fähigkeit des Wirts, LPS zu erkennen, in einer frühen Phase der Infektion zu verstärken (Schumann et al., 2000).

7.1 LPS-Transfer zum CD14

LBP bindet an dem Lipid A-Teil von LPS (Tobias et al., 1989). Dann löst es aus LPS-Aggregaten einzelne LPS-Monomere aus dem Verband und überträgt sie an eine Bindungsstelle an löslichem CD14 (Schumann 1992). In Abwesenheit von CD14 kann LBP zwar an Endotoxin-Mizellen zu binden, ob jedoch LBP ohne CD14 im Stande ist, LPS zu disaggregieren, darüber gibt es unterschiedliche Meinungen:

So stellten Yu et al. (1996) in Fluoreszenzversuchen mit BODIPY-LPS keine effektive Disaggregation von LPS durch LBP fest, während Tobias et al. (1997) in Light-Scattering-Experimenten eine Verkleinerung des Radius von LPS-Aggregaten durch Zugabe von LBP ausmachten. Anscheinend wird die Katalyse durch LBP benötigt, da LBP dem LPS eine Möglichkeit bietet an CD14 zu binden, ohne daß die amphiphilen LPS-Monomere gänzlich der wäßrigen Lösung ausgesetzt werden (Tobias et al., 1995). Es ist erwähnenswert, daß LBP Lipopolysaccharid-Monomere wechselseitig mit Phospholipid-Molekülen austauscht. Die Bindung eines Lipids ist funktionell gekoppelt mit der Abgabe eines anderen. Daher wird LBP als Lipid-Austausch-Protein angesehen (Yu et al., 1997). LPS-CD14-Komplexe sind wichtige Vermittler für sensitive Reaktionen auf LPS, die Aufgabe von LBP liegt im wesentlichen in der Beschleunigung und der Verstärkung der Ausbildung von LPS-CD14-Komplexen, die eine schnelle Immunantwort hervorrufen (Hailman et al., 1994). An der eigentlichen Auslösung der Immunreaktion ist LBP nicht beteiligt (Hailman, Vasselon et al., 1996). Bei kurzen Inkubationszeiten kann LBP die Reaktion CD14-positiver Zellen wirksam verstärken (Heumann et al., 1992; Mathison et al., 1992), bei längeren Inkubationszeiten hat es kaum Effekt, denn bei ausreichender Zeit kommt es zur spontanen Diffusion von LPS zum CD14, wodurch ein Katalysator nicht länger notwendig ist (Wright, 1999). Es wurde beobachtet, daß Monozyten auch in völliger Abwesenheit von Serumproteinen auf LPS reagieren können (Lynn et al., 1993). Allerdings konnte die Wichtigkeit einer Beschleunigung der Immunantwort durch LBP und CD14 unter anderem in einem Modell intraperitonealer *Salmonella typhimurium*-Infektionen bei der Maus gezeigt werden. Es stellte sich dabei heraus, daß sich bei LBP- oder CD14-defizienten Mäusen keine lokale Entzündungsreaktion entwickelte und die Migration neutrophiler Granulozyten in das Peritoneum verzögert war, so daß die Mäuse der Infektion erlagen (Jack et al., 1997; Yang et al., 2002). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Zytokinausschüttung durch LPS in Blutproben von LBP-defizienten Tieren stark vermindert war (Wurfel, Monks et al., 1997). Dazu passen Befunde von Mäusen, die nach Vorbehandlung mit Antikörpern gegen LBP oder

CD14 mit *Klebsiella pneumoniae* infiziert wurden und innerhalb von 24 h an der Infektion starben (Le Roy et al., 2001).

Da LBP die LPS-induzierte Zytokinausschüttung verstärkt, die als wichtiger pathogenetischer Mechanismus der Sepsis angesehen wird, blieb lange Zeit unklar, warum bei einer Sepsis eine hohe Serumkonzentration an LBP zu finden ist. Dieser Widerspruch wird durch die Beobachtung geklärt, daß LBP in hohen Konzentrationen anders wirkt als in niedrigen, denn in Untersuchungen mit Akute-Phase-Serum septischer Patienten stellte sich heraus, daß hohe LBP-Konzentrationen LPS-Effekte inhibieren (Zweigner et al., 2001). Auch in einem murinen Sepsismodell konnte gezeigt werden, daß niedrige LBP-Konzentrationen (bis 1 µg/ml) die LPS-Aktivität verstärken, während höhere Konzentrationen (10µg/ml), die eher einem Anstieg in der akuten Phase entsprechen, eine Hemmung bewirken. In dieser Untersuchung blieb der inhibitorische Effekt von LBP auf LPS allerdings auf den Peritonealraum der Maus beschränkt und wurde bei i.v.-Applikation nicht beobachtet (Lamping et al., 1998). Die Tatsache, daß LBP einmal LPS aktiviert und ein andermal neutralisiert, forderte weitere Beobachtungen zur Erklärung dieser bipolaren Natur der LBP-Funktion. Der Unterschied scheint davon abzuhängen, ob sich LBP im Serum befindet oder in Zellmembranen von Monozyten interkaliert ist. So fanden Gutschmann, Muller et al. (2001) heraus, daß membranassoziiertes LBP LPS-Aggregate bindet und dadurch eine Zellaktivierung hervorruft. Wenn jedoch freies LBP mit LPS komplexiert wird, resultiert daraus eine Neutralisierung von Endotoxin.

7.2 LPS-Transfer in Phospholipid-Membrane und HDL

LBP transferiert LPS-Monomere in Phospholipid-Membranen (Schromm et al., 1996). Dieser langsam und inkomplett ablaufende Vorgang kann durch Zusatz von sCD14 beschleunigt und vervollständigt werden (Wurfel, Wright et al., 1997). Auch an rekonstituiertes High Density Lipoprotein (R-HDL) wird Lipopolysaccharid durch LBP übertragen. Zur Aufnahme von LPS ist die Phospholipid-Komponente der R-HDL-Partikel notwendig, die reine Proteinkomponente apoA-I kann kein LPS

binden. Durch den Transfer von LPS an R-HDL bewirkt LBP eine Neutralisierung der Fähigkeit von LPS, Entzündungszellen zu stimulieren (Wurfel et al. 1994; Wurfel, Wright et al., 1997). LBP katalysiert aber nicht nur den Transfer von LPS-Monomeren aus LPS-Mizellen, sondern auch aus LPS-CD14-Komplexen an R-HDL (Wurfel et al., 1995; Yu et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, daß das gesamte Plasma-LBP gebunden ist an Komplexe aus Protein und Phospholipiden, die als FALP (FHRP-associated lipoprotein particles) bezeichnet werden und sich zusammen setzen aus FHRP (Factor H related protein), LBP, ApoAI, Phospholipiden und dem Fragment D des Fibrinogens (Park et al., 1996 & 2000).

7.3 Phospholipid-Transfer

Als Lipid-Austausch-Protein bewegt LBP nicht nur LPS, sondern auch Phospholipide. Sie werden aus Phospholipid-Vesikeln durch LBP in LPS-Mizellen und in R-HDL-Partikel transferiert. Dieser Vorgang wird durch sCD14 verstärkt. Den etwas umständlicheren Weg über sCD14 kann LBP schneller katalysieren als den direkten Weg vom Phospholipid-Vesikel zum R-HDL. Wenn das sCD14 vorher mit LPS beladen wurde, wird die Bindung des Phospholipids an das sCD14 erleichtert. Auch dieser gekoppelte Lipidaustausch wird durch LBP katalysiert (Yu et al., 1997). Umgekehrt können auch Phospholipide die Bindung von LPS an mCD14 und die LPS-induzierte Stimulation von Monozyten blockieren, wie am Beispiel des Phosphatidylinositols gezeigt wurde (Wang et al., 1998; Akashi et al., 2000). Aus diesen Beobachtungen wird ein modulierender Einfluß der Phospholipide auf die Zellaktivierung *in vivo* als wahrscheinlich erachtet.

8 Struktur des LBP

LBP ist ein glykosyliertes Protein mit einer Masse von etwa 58 kDa und gehört zur Familie der LPS-Bindungs- / Lipid-Transfer-Proteine (Tobias et al., 1986 & 1988). Zu dieser Gruppe zählen noch drei weitere Proteine: PLTP (Phospholipid-Transfer-Protein), BPI (Bactericidal/Permeability Increasing Protein) und CETP (Cholesterol-

Ester-Transfer-Protein). Die genomische Organisation dieser Proteine zeigt ein großes Ausmaß an Homologie, möglicherweise stammen sie von einem gemeinsamen Ursprungsgen ab (Hubacek et al., 1997). Als einziges Protein dieser Gruppe wurde bisher BPI kristallographisch dargestellt. BPI wurde als intrazelluläres Protein in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten gefunden und wirkt bakterizid gegen Gram-negative Bakterien, die endozytotisch von den Neutrophilen aufgenommen wurden. Im Blutstrom, wo BPI in geringen Konzentrationen auch vorkommt, kann es LPS binden und neutralisieren (Elsbach 1998). LBP zeigt nicht nur in der Funktion, sondern auch in der Sequenz eine starke Ähnlichkeit mit BPI: 45% der Aminosäuren sind identisch. Aufgrund dieser Übereinstimmung wurde auf der Basis der BPI-Struktur ein dreidimensionales Computermodell der LBP-Struktur entworfen (Beamer et al., 1998). Nach diesem Modell bildet LBP die Form eines Bumerangs, der durch zwei einander ähnliche Domänen (N- und C-terminal) gebildet wird, die wie Fässer geformt sind und daher auch als „barrel“ bezeichnet werden. Sie sind durch eine zentrale β -Faltblatt-Struktur miteinander verbunden. In der Kristallstruktur des BPI wurden zwei apolare Bindungstaschen entdeckt, die an der konkaven Seite des Bumerangs liegen und mit hydrophoben Aminosäureresten ausgekleidet sind, wobei jeweils eine Tasche in jeder Domäne in der Nähe der Verbindung zwischen Domäne und zentralem β -Faltblatt zu finden ist. Beide Taschen enthielten jeweils ein Molekül Phosphatidylcholin. Phosphatidylcholin gehört zur Gruppe der Phospholipide und macht den Hauptbestandteil an Phospholipiden in Zellmembranen und im HDL aus. Die Phospholipid-Moleküle tauchen mit ihren hydrophoben Fettsäureketten in die apolaren Bindungstaschen des BPI, während die hydrophilen Kopfgruppen an der Taschenöffnung liegen und mit der umgebenden wässrigen Lösung in Kontakt stehen. Das BPI-Molekül ist schematisch in der nächsten Abbildung dargestellt:

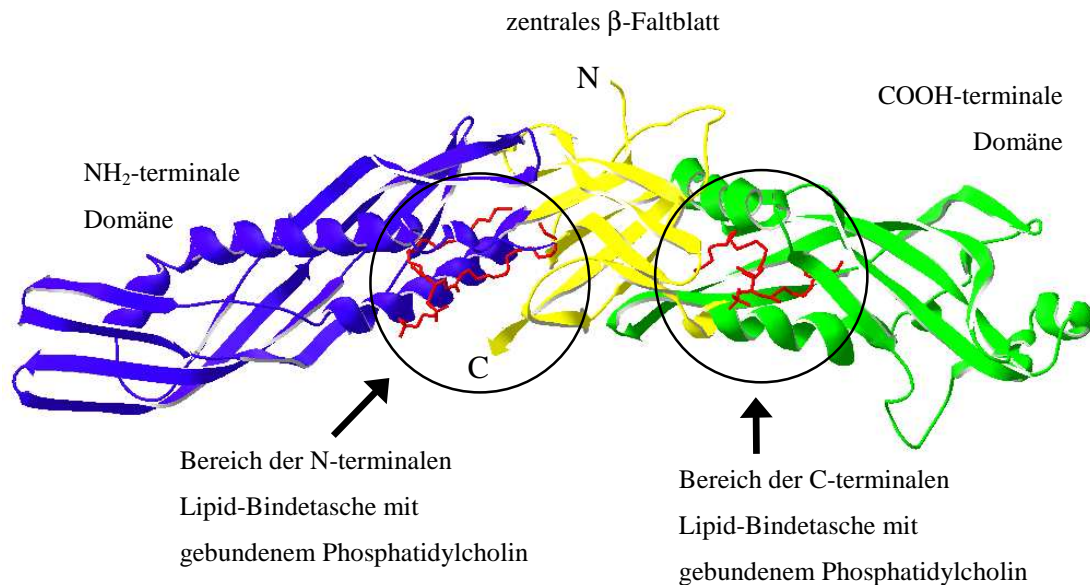


Abbildung 2: BPI – Schematische Darstellung der Struktur

Abgebildet ist die Sekundär- und Tertiärstruktur von BPI. Die N-terminale Domäne ist in blau dargestellt, die C-terminale in grün und das zentrale β -Faltblatt in gelb. An den konkaven Seiten des „Bumerangs“ finden sich zwei Moleküle Phosphatidylcholin, hier rot gefärbt, die bei der Kristallographie zufällig entdeckt wurden. Die Abbildung orientiert sich an der Abbildung 1 aus Beamer et al., 1997.

Auf Grund der großen Ähnlichkeit zwischen den LPS-Bindungs- / Lipid-Transfer-Proteinen wird vermutet, daß die Lipid-Bindungstaschen nicht nur beim BPI, sondern auch bei den drei anderen Proteinen dieser Familie zu finden sind und es ihnen ermöglichen, schlecht lösliche Lipidmoleküle durch die wäßrige Umgebung des Blutplasmas zu transportieren (Beamer et al., 1999). Die bekannten Liganden von CETP und PLTP (Cholesterylester, Triglyceride, Retinylester und Phospholipide) besitzen alle mindestens eine Akylkette, die in einer apolaren Tasche ähnlich wie im BPI binden könnte (Beamer et al., 1997). Von PLTP ist auch bekannt, daß es LPS binden, neutralisieren und an rekonstituiertes HDL, nicht aber an CD14 übertragen kann (Hailman, Albers et al., 1996). Beim Vergleich von 7 Proteinsequenzen von LBP und BPI von unterschiedlichen Säugetieren fiel auf, daß von den 456 Aminosäuren insgesamt 102 identisch waren. Diese konservierten Aminosäurereste finden sich gehäuft im zentralen Teil des Proteins, wo sich auch die

Lipid-Binde-Taschen befinden. Neunzehn der 102 komplett konservierten Reste dienen unmittelbar der Bildung der apolaren Taschen. Außerdem sind die Regionen, in denen sich die Lipid-Bindungs-Taschen befinden, die am meisten strukturell konservierten Bereiche zwischen der amino- und der carboxyterminalen Domäne von BPI (Beamer et al., 1998). Beamer und Kollegen folgern aus dieser Übereinstimmung, daß die Lipid-Binde-Taschen große Bedeutung haben für die Funktion des Proteins und vermuten, daß die Fettsäureketten des Lipid A-Teils von LPS dort gebunden werden (Beamer et al., 1997 und 1998). Diese Vermutung wird nicht nur durch die hohe Konservierung der Lipid-Bindungs-Taschen unterstützt, sondern auch durch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Phospholipiden und der Lipid-A-Komponente des LPS: Beide besitzen negativ geladene Phosphatgruppen und Fettsäureketten, wobei Phospholipide zwei und Lipid A normalerweise sechs Fettsäureketten besitzt. Es ist vorstellbar, daß zumindest einige Akylreste des LPS in gleicher Weise an die Lipid-Bindungs-Taschen binden wie das kristallographisch entdeckte Phosphatidylcholin. Im Bereich des äußeren Endes der N-terminalen Hälfte des LBP wurden bisher zwei positiv geladene Aminosäuren (Arg 94 & Lys 95) entdeckt, deren Mutation Bindung, Transfer und Zellstimulation durch LPS stark beeinträchtigte. Es wird angenommen, daß diese Aminosäuren an negativ geladenen Phosphatgruppen des LPS binden (Lamping et al., 1996) und für die Bindung von LBP an LPS-Aggregate verantwortlich sind.

Im PLTP-Molekül wurden Mutationen im Bereich der apolaren Taschen bereits durchgeführt mit der Folge eines beeinträchtigten Phospholipid-Transfers und einer herabgesetzten Bindung an HDL (Huuskonen et al., 1999). Die große genetische Ähnlichkeit zwischen PLTP und LBP lassen auch Analogien der Funktionen der beiden Proteine vermuten (Kirschning, Au-Young et al., 1997). Einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit der Lipidbindetaschen geben Mutationen im Bereich der carboxyterminalen Region des CETP: Deletionen von Phenylalanin- und Leucin-Resten zwischen den Positionen 454 und 457 führten zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Cholesterolester- und Triglyzerid-Transfers. Die Autoren verweisen in dieser Arbeit ebenfalls auf die Sequenz-Homologie mehrerer Lipidbindeproteine – unter anderem LBP – und postulieren eine genetisch

konservierte Lipid-Binde-Sequenz (Au-Young et Fielding, 1992). Die nächste Abbildung zeigt ein Computermodell des Lipopolysaccharid-Binde-Proteins, das in Analogie zur kristallographisch entdeckten Form des BPI erstellt wurde:

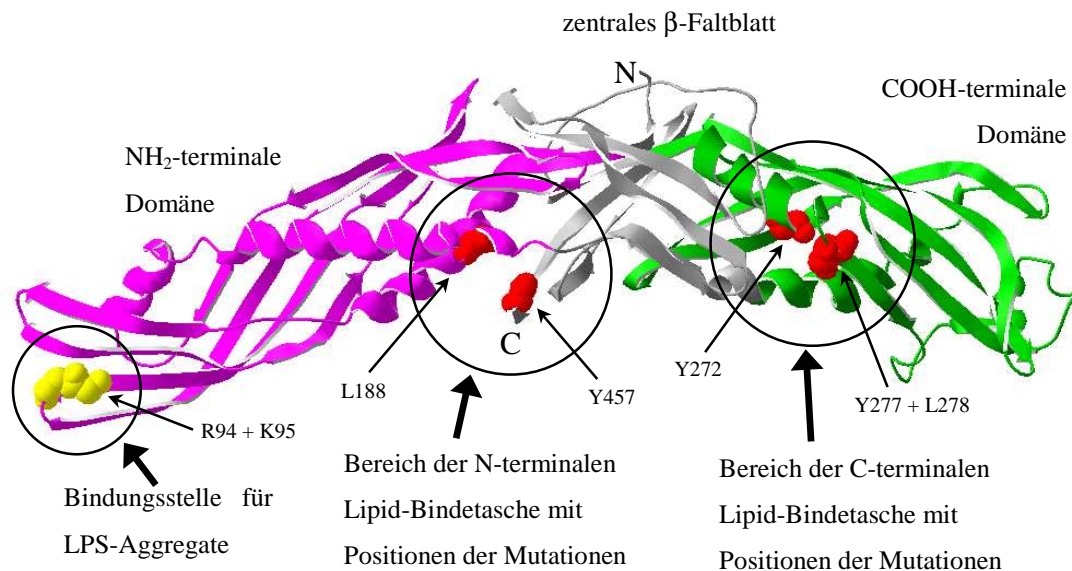


Abbildung 3: LBP – Schematische Darstellung der Struktur

Sekundär- und Tertiärstruktur des LBP-Moleküls sind schematisch abgebildet. Die N-terminale Domäne ist violett gefärbt, die C-terminale grün und das zentrale β -Faltblatt grau. Die für die Bindung von polymerem LPS entscheidenden Aminosäuren sind als gelbe Kugeln zu sehen, die Mutationen im Bereich der Lipid-Binde-Taschen, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, sind als rote Kugeln markiert.

9 Aufgabenstellung

Die hier vorliegende Dissertation soll die Frage klären, ob Mutationen im Bereich der hydrophoben Bindungstaschen des LBP die Bindung von LPS und Phospholipiden an LBP oder den Transfer von LPS an CD14 bzw. an Phospholipide beeinflussen können. Dazu wurden durch Mutagenese und anschließende Transfektion und Expression in CHO-Zellen fünf Mutanten von LBP hergestellt, die über jeweils eine ausgetauschte Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp verfügen. Mit ELISA wurde die Bindung der LBP-Mutanten an Aggregate von LPS und

Phospholipiden überprüft. Der Transfer von LPS-Monomeren an CD14 bzw. an Phospholipid-Mizellen durch die LBP-Mutanten wurde durch fluoreszenzkinetische Experimente untersucht. Als Positivkontrolle aller Versuche diente das unveränderte Wildtyp-LBP und als Negativkontrolle Kulturüberstand von CHO-Zellen, die mit Plasmid ohne LBP-Gen transfiziert worden waren.