

3. Hintergrund

3.1 Lipopolysaccharide als Bestandteile gramnegativer Bakterien

3.1.1 Vorkommen und Funktion

Gramnegative Bakterien sind von einem einschichtigen Mureinsacculus (Peptidoglycan, Abb.1) umgeben, dem eine zweite Lipiddoppelschicht aus Lipopolysacchariden (LPS) und Phospholipiden aufgelagert ist.

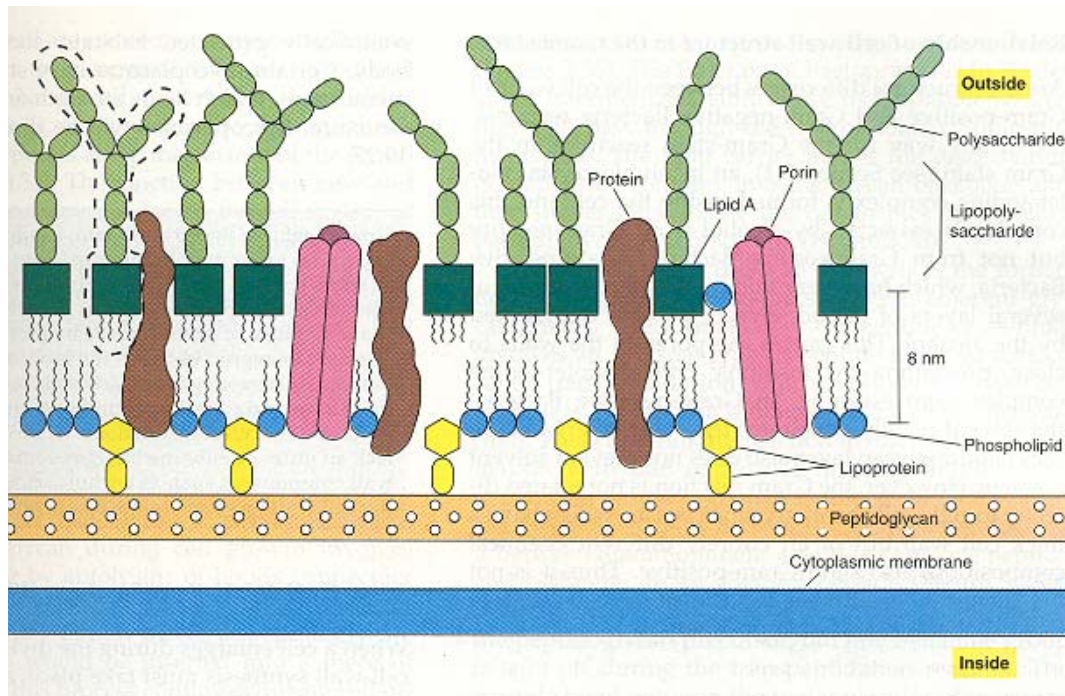


Abb. 1: Schematische Zeichnung der Zellmembran von gramnegativen Bakterien und Darstellung des LPS (eingekreiste Region).

(Aus: Thomas D. Brock: Biology of Microorganisms; 7. Edition)

LPS ist als Endotoxin ein potentes Antigen und kann innerhalb kurzer Zeit eine Inflamationsreaktion auslösen ¹⁰. Dabei führt nicht, wie zunächst angenommen, die Toxizität des LPS, sondern die aktive zelluläre Immunreaktion, unter anderem die Sekretion von TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-10, die LPS auslöst, zur nachfolgenden Organschädigung ¹¹. Geraten die pro- und antiinflammatorischen

Reaktionen aus einem schützenden Gleichgewicht, ist insbesondere TNF α ein wesentlicher Mediator der Verbrauchskoagulopathie und des Multiorganversagens.

3.1.2 Struktur von LPS

Chemisch setzt sich LPS aus einer O-spezifischen Kette, einem Kernanteil aus Oligosacchariden und einem Lipidanteil, dem so genannten Lipid A, zusammen (Modell eines LPS Moleküls: Abb. 2) . Die O-spezifische Kette besteht aus 1 - 8 verschiedenen Glukoseresten, die in unterschiedlicher Reihenfolge aneinander gereiht sind (repeating units). Sie ist so von großer Varianz.



Abb. 2: Modell eines E. coli LPS Moleküls.

(aus E.T. Rietschel et al: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. 1994: The FASEB Journal, Vol. 8, 217-225)

Der Kernanteil ist ein Heterooligosaccharid, das formell in einen inneren und einen äußeren Teil unterschieden wird. Verschiedene Serotypen können sich in ihren Kernanteilen unterscheiden.

Das Lipid A setzt sich zusammen aus einer hydrophilen Gruppe (phosphoriliertes D-Glukosamin Disaccharid) und einer hydrophoben Region (Acyl-Gruppe). Sie ist für die Zellaktivierung verantwortlich¹² und ist gleichzeitig die Region, die CD14 bindet (chemische Struktur von LPS: Abb. 3)^{13,14}.

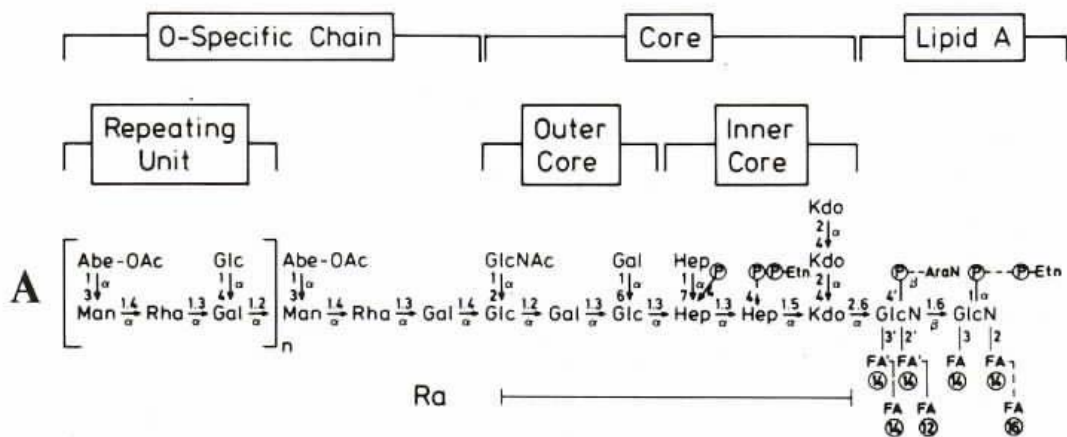


Abb. 3: Chemische Struktur von LPS.

(aus E.T. Rietschel et al: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. 1994: The FASEB Journal, Vol. 8, 217-225)

3.2 CD14

3.2.1 Struktur und Funktion

CD14 ist ein 55 kDa schweres Glukoprotein, das mit seiner Glykosylphosphatidylinositol-Gruppe (GPI) außen an der Zellmembran verankert ist. Zunächst wurde es als Monozyten-spezifischer Marker angesehen, inzwischen ist bekannt, dass es auch etwa 100 Mal geringer auf Granulozyten^{12,15-17} und auf B-Lymphozyten exprimiert wird¹⁸⁻²⁰. Der Ligand von CD14 ist unter anderem das bakterielle Endotoxin LPS. Die Affinität von CD14 zu LPS wird deutlich erhöht, wenn LPS zuvor mit dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP), einem von Hepatozyten synthetisierte Akut Phase Protein, einen Komplex bildet²¹. Eine

Stimulation der Leukozyten mit LPS führt in weniger als einer Stunde zu einer erhöhten Expression von CD14^{22,23}. Aber auch Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane, als Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien, können CD14 binden und zu einer Zellstimulation führen.^{24,25}

3.2.2 Signaltransduktion

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der entstandene Komplex aus Ligand und CD14 zusätzlich einen oder mehrere Toll Proteine besitzt und wahrscheinlich auch das Sekretionsprotein MD-2^{26,27}. Toll-Rezeptoren wurden zunächst in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben und sind ein interessantes Bindeglied der angeborenen Immunität zwischen Insekten und Menschen.

Es besteht Grund zu der Annahme, dass der Toll Like Receptor-4 (TLR-4) für die transmembranöse Signalübermittlung nach der Bindung von LPS an CD14 zuständig ist^{28,29}. Bezüglich der intrazellulären Signalweiterleitung gibt es noch eine Reihe offener Fragen. Beteiligt sind unter anderem das Adapterprotein MyD88³⁰, die Mitogen Aktivierende Protein Kinase p38, sowie der Transkriptionsfaktor NFκB^{31,32} (Abb. 4). Ein wichtiger Effekt dieser Zellaktivierung ist die Zytokinsekretion, unter anderem von TNFα und Interleukinen. Zusätzliches Interesse erhielt CD14 als bekannt wurde, dass der Komplementrezeptor CD11b abhängig ist von CD14.³³

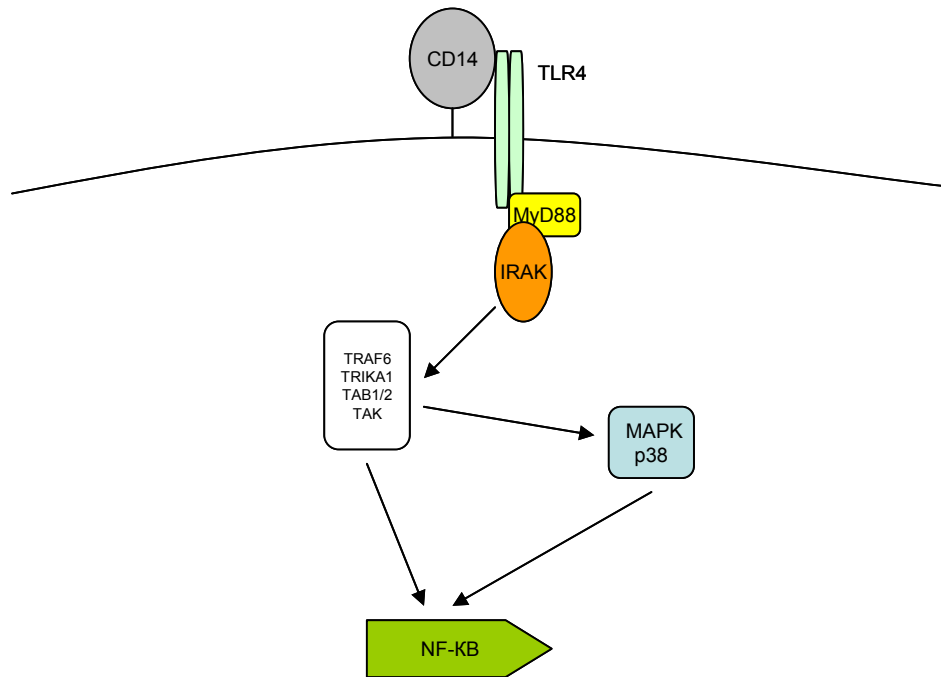


Abb. 4: Schematisches Modell der Signaltransduktion von CD14

3.3 CD11b

3.3.1 Struktur und Funktion

CD11b ist ein β -2 Integrin, das unter anderem auf Monozyten, PNG und Natural Killer Zellen zu finden ist. Als Adhäsionsmolekül spielt es eine wichtige Rolle bei der Verlangsamung (slow down) der zirkulierenden Leukozyten und Vorbereitung der Migration in das entzündete Gewebe. Eine Vielzahl von Liganden wurden beschrieben, unter anderem interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs), der Komplementfaktor iC3b, Fibrinogen und LPS^{34,35}.

Die molekulare Struktur von CD11b setzt sich aus zwei nicht kovalent gebundenen Peptidketten α und β mit einem Molekulargewicht von 165 kDa zusammen. Die α Untereinheit hat eine lange extrazelluläre sowie eine kurze zytoplasmatische

Domäne. Die β -2 Untereinheit besteht aus einer cysteinreichen Region, die dem Molekül eine stabile Tertiärstruktur verleiht (Abb. 5).

In PNG wird CD11b in großen intrazellulären Pools gespeichert und kann innerhalb von 5 bis 30 Minuten an die Zelloberfläche transportiert werden ^{16,36}.

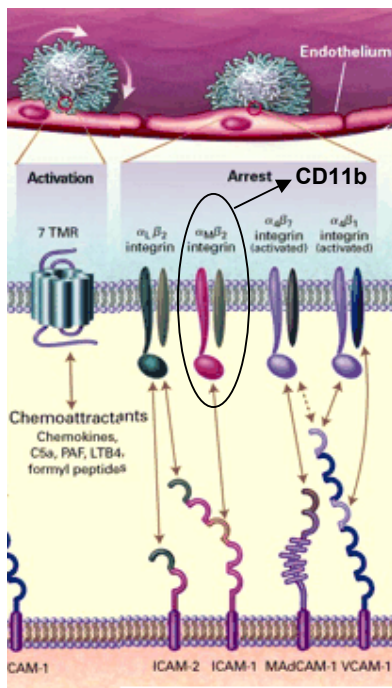


Abb. 5: Schematische Darstellung von β -2 Integrinen und ihren Liganden (aus: von Andrian UH et al.: T-cell function and migratin: two sides of the same coin. 2000: New England Journal of Medicine, 343: 1020-34).

3.3.2 Zusammenwirken von CD11b mit CD14

Da CD11b und CD14 für die Primärantwort der antimikrobielle Abwehr zuständig sind und hierin unabhängig von zuvor erfolgter Opsonierung sind, besteht eine funktionelle Ergänzung der beiden Rezeptoren.

Darüber hinaus ist eine Abhängigkeit CD11b's von CD14 bekannt ¹⁶. Unter Blockierung von CD14 nimmt auch die CD11b-Expression unter Stimulation nicht zu. Erst ab einer sehr hohen LPS Konzentration scheint es eine CD14-unabhängige Zunahme der CD11b-Expression zu geben.

Mit der LPS-Bindung an CD14 und der konsekutiven Hochregulation von CD11b hat eine Inflammationsreaktion begonnen, in deren Folge eine Reihe von Zytokinen sezerniert werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei IL-8.

3.4 Interleukin-8

3.4.1 Herkunft und Struktur

IL-8 ist ein Zytokin mit einem niedrigen Molekulargewicht (ca. 80 kDa), das von den meisten Zellen des Körpers synthetisiert wird, insbesondere von Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten nach Stimulation mit Endotoxin, IL-1 und TNF α ³⁷.

3.4.2 Funktion

IL-8 ist ein potenter Aktivator unterschiedlicher PNG-Funktionen (Degranulation, Ausschüttung freier Radikale, Chemotaxis)³⁸. Die systemische IL-8-Konzentration korreliert eng mit der Schwere der Infektion ³⁹. Die Sekretion von IL-8 nach LPS Stimulation scheint biphasisch zu verlaufen, mit einer ersten Spitze nach vier Stunden und einer zweiten nach 24 Stunden. Es gibt Grund zu der Annahme, dass die zweite Spitze die Reaktion auf die zuvor erfolgte IL-1 und TNF α Sekretion ist. ⁴⁰

3.5 Polymorphonuclear Leukocyte (PNG) -Elastase

3.5.1 Struktur und Vorkommen

PML-Elastase ist eine stark wirksame Serum Protease, die in Mengen von 1 – 4 μ g pro 1 Millionen Zellen vorkommt. Das stark kationische Glykoprotein wird gemeinsam mit anderen strukturell und funktionell verwandten Polypeptiden in der azurophilen Granula von PNG gespeichert und kann innerhalb einer Stunde in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden. Sowohl die primäre Aminosäuresequenz, als auch die Genstruktur sind bekannt und wurden beschrieben. ^{41,42}

3.5.2 Funktion

Die katalytisch wirksamen Untereinheiten der PML-Elastase können eine Reihe von Substraten spalten. Dazu gehört extrazelluläre Matrix, deren Spaltung den Weg während der PML-Migration frei macht⁴³. Neben der proteolytischen Aktivität bindet PML-Elastase den Komplement Rezeptor CR3 und reguliert darüber die Zelladhäsion⁴⁴. In einem Mäusemodell mit Mäusen, die keine Elastase synthetisieren (knock out mouse) konnte eindrucksvoll die Relevanz von Elastase bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden. PML-Elastase freie Mäuse waren besonders empfindlich gegenüber gramnegativen Infektionen⁴⁵. Dieser Effekt ist unabhängig von der TNF α -Konzentration⁴⁶.

3.6 N-Formyl-Met-Leu-Phe (FMLP), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) und Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)

Alle drei Substanzen besitzen eine ausgeprägte aktivierende Eigenschaft auf PNG, benutzen jedoch unterschiedliche Wege in der Signaltransduktion.

FMLP, beteiligt an der bakteriellen Proteintranslation, und TNF α binden jeweils einen eigenen, spezifischen Rezeptor, der das Signal der Leukozytenaktivierung in die Zelle weiterleitet.

PMA wirkt erst intrazellulär als direkter Aktivator der Protein Kinase C.

Alle drei Substanzen wirken in ihrer Zellstimulation unabhängig von CD14.