

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Synthetische LPS-bindende Peptide
in vitro Untersuchungen zur Peptid-LPS-LBP-Interaktion

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Mirjam R. Büttner
geboren am 9.3.1978 in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ralf. R. Schumann

2. Prof. Dr. rer. Nat. U. Seydel

3. Prof. Dr. R. Jack

Datum der Promotion: 24.01.2005

Abstract deutsch

Die meisten Lebewesen nutzen zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen u.a. ein weites Spektrum von antimikrobiellen, oft kationischen Peptiden. Etliche dieser natürlichen und künstlichen Peptide sind in der Lage, Bakterienprodukte wie das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien zu binden. LPS ist als potenter Stimulator des Immunsystems ein bedeutender Faktor bei der Entstehung von Infektion und Entzündung. LPS-bindende kationische Peptide, zu denen auch von der LPS-Bindungssequenz des Limulus-anti-LPS-Faktors (LALF) abgeleiteten Ringpeptide gehören, wirken synergistisch zu den klassischen Antibiotika, ohne jedoch wie diese zu einer vermehrten LPS-Freisetzung zu führen. LALF-Peptide zeigten in bisher veröffentlichten Versuchen vielversprechende Ergebnisse bei der Bindung von LPS und in murinen Sepsismodellen. In der vorliegenden Arbeit wird in Versuchen mit humanen Monozyten und murinen Makrophagen gezeigt, dass neuartige LALF-Peptide eine durch LPS induzierte Ausschüttung des Zytokins TNF-alpha und des vasoaktiv wirksamen Stickstoffoxids wirkungsvoll unterdrücken können. Ferner wird in LPS-Bindungsassays nachgewiesen, dass dies durch eine Blockierung der LPS-Erkennung durch das LPS bindende Protein (LPB) verursacht wird. Die Verwendung von D-Aminosäuren verspricht dabei in ersten in vitro Experimenten eine Optimierung der Peptideigenschaften. Die Entschlüsselung der Wirkmechanismen dieser neuartigen Peptide könnte Auswirkungen auf die Entwicklung neuer therapeutischer Interventionsstrategien bei Infektion und Sepsis haben.

Schlagworte:

Peptide

LALF

LPS

Sepsis

Therapie

Abstract English

In host defense against pathogenic microorganisms most organisms employ a broad spectrum of antimicrobial, often cationic peptides. Several of these natural or synthetic peptides are able to bind bacterial products like Lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria. As a potential stimulator of the immune system LPS is an important pathogenetic factor for infection and inflammation. Cationic LPS-binding peptides like cyclic peptides corresponding to the LPS-binding domain of the Limulus-anti-LPS-factor (LALF) have been shown to act synergistic to classic antibiotics. An advantage of these compounds, however, may be their lack of induction of LPS release. In previous studies LALF-peptides have shown promising results for binding LPS, and in murine sepsis models. Here we show in experiments with human monocytes and murine macrophages that novel LALF-derived peptides are able to effectively block the LPS-induced release of the cytokine TNF-alpha and of the vasoactive nitric oxide. In addition it is shown here by employing an LPS-binding assay that this activity is caused by inhibition of LPS-recognition brought about by the LPS binding protein (LBP). In first in vitro experiments the use of D-amino acids looks promising as they improve peptide quality. To further elucidate the mode of action of these novel peptides could lead to the development of new therapeutic strategies against infection and sepsis.

Keywords:

peptides

LALF

LPS

sepsis

therapy

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1	Abwehrmechanismen des Körpers	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.2	Das erworbene Immunsystem	1
1.3	Mechanismen der angeborenen Immunität	2
1.4	Zytokine – Mediatoren des Immunsystems	3
1.4.1	Proinflammatorische Zytokine	3
1.4.2	Zytokine mit antiinflammatorischer Wirkung	4
1.5	Die Akutphase-Reaktion	4
2	Sepsis – Pathogenese, Definition, Epidemiologie und Lethalität	7
2.1	Neue Therapieansätze	9
3	Struktur der Lipopolysaccharide	10
4	Erkennung von LPS durch das angeborene Immunsystem	12
4.1	Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP).....	13
4.2	Die Familie der Lipidtransfer/LPS-bindenden Proteine	14
4.3	CD14	15
4.4	Toll-like-Rezeptoren.....	16
4.5	Lipopolysaccharid-abhängige intrazelluläre Signaltransduktion.....	16
4.6	Weitere Lipopolysaccharid-bindende Proteine	17
5	Das LALF-Protein	17
5.1	Die LPS-Bindungsregion von LALF, LBP und BPI.....	18
6	Peptide in der Medizin	19
7	Zielsetzung der Arbeit.....	20
II.	Material und Methoden	22
1	Peptide	22
2	Chemikalien.....	24
3	Materialien	24
4	LPS-ELISA	24
5	Zellkultur	26
5.1	Zell-Linie RAW 264.7	26

5.2	Monozyten	26
5.3	Zellstimulation.....	27
6	Toxizitätstest.....	27
7	Assays zur Ermittlung der Stärke der Zellstimulation.....	28
7.1	NO-Konzentrationsbestimmung.....	28
7.2	TNF- α -ELISA.....	28
7.2.1	Bestimmung von murinem TNF- α	29
7.2.2	Ermittlung der hTNF- α -Konzentration	29
8	pp38- und pp42/44-Kinase-Assay.....	30
8.1	Zellstimulation und Proteingewinnung	31
8.2	p42/44-Kinase-Assay.....	31
8.3	Elektrophorese und p38/pp38-Western-Blot.....	32
9	Statistische Auswertung	33
III.	Ergebnisse.....	34
1	Peptid-LBP-Kompetition an immobilisiertem LPS	34
2	Einfluss der Peptide auf die Stimulation von RAW Zellen und Monozyten	37
2.1	Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Synthese bei RAW Zellen	37
2.2	Beeinflussung der NO-Synthese LPS stimulierter RAW Zellen	39
2.3	Einfluss der Peptide auf die TNF- α -Freisetzung LPS-stimulierter humaner Monozyten	41
3	Einfluss der Inkubationsdauer von LPS und Peptiden auf die TNF- α -Ausschüttung humaner Monozyten	43
4	Ausschluss toxischer Effekte der untersuchten Peptide auf die RAW-Zellen bzw. Monozyten.....	44
5	Einfluss einzelner Peptide auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38- und p42/44-MAP Kinasen von RAW Zellen	45
5.1	p42/44-MAP-Kinase-Assay.....	45
5.2	p38-Western-Blot.....	46
IV.	Diskussion	48
1	Interaktion von LPS mit LALF und mit davon abgeleiteten Peptiden	48

2	Einfluss von LALF und LALF-Peptiden auf die LPS-induzierte Mediatorsynthese von Immunzellen	50
3	Die intrazelluläre Signaltransduktion.....	51
4	Die Rolle von LBP bei der Inhibition von LPS-Effekten durch LALF-Peptide...	51
5	Einfluss struktureller Veränderungen auf die Funktion der LALF-Bindungsregion für LPS.....	52
6	Die zeitliche Wirkung von LALF und LALF-Peptiden auf LPS und Immunzellen..	56
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	57
V.	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	62
	Anhang.....	78
	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	78
	Danksagung	79
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Eidesstattliche Erklärung.....	80

I. Einleitung

1 Abwehrmechanismen des Körpers

Zum Schutz vor Krankheitserregern haben mehrzellige Organismen verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt mit dem Ziel, Pathogene zu zerstören bzw. zu neutralisieren. Im Falle des Eindringens pathogener Mikroorganismen in den Körper wird zu diesem Zweck ein komplexes System aus zellulären und humoralen Bestandteilen aktiviert, welche das Immunsystem darstellen. Bei höheren Lebewesen lässt sich hier zwischen einer angeborenen und einer erworbenen Komponente unterscheiden (Medzithov und Janeway 1997 und 1998).

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene oder unspezifische Immunsystem ist in der Lage, pathogene Strukturen bereits beim ersten Kontakt mit Hilfe sogenannter keimbahnkodierter Rezeptoren („pattern recognition receptors“ – PRRs) zu erkennen, die an konservierte Bestandteile von Mikroorganismen binden. Diese „pathogen assoziierten Strukturen“ („pathogen-associated molecular patterns“-PAMPs) wie z.B. DNA, Doppelstrang-RNA, Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren sind für das Überleben der Mikroorganismen von essentieller Bedeutung (Janeway 1989, Medzithov und Janeway 1997). Die PRRs sind in zellständiger oder sezernierter Form nach Erkennung der PAMPs und der darauf folgenden Signaltransduktion an Phagozytose, proinflammatorischer Zytokinausschüttung, Opsonierung und an der Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskaden beteiligt (Medzithov und Janeway 2000, Janeway und Medzithov 2002).

1.2 Das erworbene Immunsystem

Reichen die Mechanismen des angeborenen Immunsystems allein zur Abwehr nicht aus, wird zusätzlich das erworbene oder spezifische Immunsystem aktiviert. Dieses erkennt seine Liganden über spezifische Antigenrezeptoren, die während der Onto-

genese durch somatische Rekombination und klonale Selektion entstehen, wodurch jede Zelle nur einen einzigen Antigenrezeptortyp ausbildet. Zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems sind kostimulatorische Signale der angeborenen Immunität erforderlich (Fearon und Locksley 1996, Medzithov und Janeway 1997, Janeway et.al. 1999).

1.3 Mechanismen der angeborenen Immunität

Pathogene Organismen aktivieren nach ihrem Eindringen in den Wirtsorganismus als erstes die humoralen und zellulären Mechanismen der angeborenen Immunität. Zu den humoralen Faktoren gehören Opsonine, wie das CRP und Mannan-bindende Proteine, Sauerstoffradikale, Enzyme wie Proteasen und Lysozym, antimikrobielle Peptide, Elemente und Aktivatoren von Komplement- und Gerinnungssystem und Mediatoren wie Chemokine und Zytokine (Nathan 1987, Bone 1991, Schumann et. al. 1994, Janeway und Medzithov 2002).

Die Hauptzellen des unspezifischen Immunsystems sind Makrophagen und Granulozyten. Makrophagen gehen aus den im Blut zirkulierenden Monozyten hervor. Nach Verlassen der Blutbahn differenzieren sich diese zu spezialisierten gewebsständigen Zellen wie z.B. den Kuppfer-Zellen der Leber, Peritonealmakrophagen oder Dendritischen Zellen. Die Zellen der angeborenen Immunität bekämpfen Krankheitserreger direkt durch rezeptorvermittelte Phago- und Endozytose oder indirekt über die Sezernierung antimikrobieller und proinflammatorischer Stoffe (Schumann et. al. 1994, Medzithov und Janeway 2000). Letztere können neben einer lokal begrenzten Entzündungsreaktion auch eine systemische Antwort des Organismus hervorrufen, die Akutphase-Reaktion genannt wird (Baumann und Gauldie 1994, Gabay und Kushner 1999). Monozyten und Makrophagen sind der Hauptsyntheseort proinflammatorischer Zytokine und spielen so eine zentrale Rolle in der Entstehung der Akutphase-Reaktion und der Sepsis (Nathan 1987).

Neben den eigentlichen Immunzellen sind auch andere Zellarten in das Geschehen der Abwehr involviert, wie z.B. Endothelzellen durch Expression von Adhäsionsmolekülen und glatte Muskelzellen durch Regulation des Gefäßtonus im Entzündungsgebiet (Haziot et. al. 1993, Loppnow et. al. 1995).

1.4 Zytokine – Mediatoren des Immunsystems

Als Zytokine bezeichnet man Stoffe, die der Kommunikation und Interaktion von Zellen dienen und die somit bei der Induktion und Regulation von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen. Zytokine werden bei Stimulierung des Immunsystems, beispielsweise durch LPS, vermehrt synthetisiert. Sie vermitteln ihr Signal über spezifische Rezeptoren und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben (Nathan 1987, Vilcek und Lee 1991).

1.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Der Tumornekrosefaktor-(TNF) α dient in niedrigen Konzentrationen der autokrinen und parakrinen Regulation von Entzündungszellen im Gewebe. Mittels der durch TNF- α initiierten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Aktivierung eingewanderter Leukozyten kommt es zur weiteren Zytokinausschüttung und zur Akkumulation von Entzündungszellen am Ort der Inflammation (Vasalli 1992).

Wird TNF- α in größeren Mengen freigesetzt, kann es in den Blutkreislauf gelangen und so systemisch wirksam werden. Dies führt u.a. durch Temperatursollwertverstellung im Hypothalamus zur Fieberinduktion, zur Ausschüttung weiterer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 und synergistisch mit diesen zu veränderter Proteinsynthese in den Hepatozyten der Leber. Weiterhin beeinflusst TNF- α die Gerinnung, bewirkt eine katabole Stoffwechsellage und führt direkt - oder indirekt durch Induktion von Mediatoren wie Stickstoffoxid (NO) - über die Reduktion des Gefäßmuskeltonus und der Myokardkontraktilität zur Abnahme des Blutdrucks. Bei massiver TNF- α -Ausschüttung kann es so zu verminderter Gewebepfusion und zu schweren metabolischen und Gerinnungsstörungen bis hin zum Multiorganversagen und Schock kommen (Vasalli 1992, Parrillo 1993, Hack et. al. 1997).

IL-1 wirkt mit seinen beiden funktionell ähnlichen Unterformen IL-1 α und - β synergistisch mit TNF- α und verstärkt dessen Effekte auf Zellmetabolismus, Gerinnung, Fieberinduktion, Expression von Adhäsionsmolekülen und Synthese von Entzündungsmediatoren wie IL-6, NO, PAF und von sogenannten Akutphase-Proteinen. Weiterhin stimuliert IL-1 die Hämatopoese und die Ausreifung von Lymphozyten (Dinarello und Wolff 1993, Dinarello 2000).

IL-6 ist der wichtigste Mediator für die Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber. Die Synthese von IL-6 wird durch TNF- α und IL-1 induziert und IL-6 selbst unterdrückt im Sinne eines Negativ-Feedbacks die IL-1-Synthese. IL-6 ist ein wichtiger Differenzierungsmarker für hämatopoetische Stammzellen und es aktiviert u.a. Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Gauldie et. al. 1990, Akira et. al. 1993).

1.4.2 Zytokine mit antiinflammatorischer Wirkung

Die antiinflammatorischen Zytokine wirken einer übermäßigen Stimulation des Immunsystems entgegen. Zu ihnen zählen u.a. IL-4, IL-10 und IL-13. Sie hemmen die Aktivierung von Entzündungszellen und vermindern die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Moldawer 1994, van der Poll und van Deventer 1999). IL-4 fördert außerdem die Proliferation und Reifung von B-Lymphozyten und erhöht die Expression von MHC-II-Molekülen auf diesen Zellen (Hart et. al. 1992, Baumann und Gauldie 1994). IL-10 hemmt die T-Zell-Funktion und reduziert die Zahl der exprimierten MHC-II-Moleküle auf Monozyten (Moore et. al. 1993).

1.5 Die Akutphase-Reaktion

Auf eine Gewebeschädigung durch z.B. Trauma, bakterielle Infektion oder Neoplasie antwortet der Körper mit einer komplexen Reaktion mit dem Ziel, eventuell eingedrungene Mikroorganismen zu beseitigen und geeignete Bedingungen für die Einleitung von Reparaturprozessen zu schaffen. Diesen Reaktionskomplex bezeichnet man als Akutphase-Reaktion (Baumann und Gauldie 1994). Die Akutphase-Reaktion wird durch proinflammatorische Zytokine hervorgerufen und geht sowohl mit lokalen Entzündungsprozessen als auch mit allgemeinen Symptomen wie Fieber und Krankheitsgefühl einher. Zu den systemischen Veränderungen zählen u.a. die Synthese von Akutphase-Proteinen, Leuko- und Thrombozytose durch beschleunigte Ausreifung und Freisetzung von Blutzellen, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Beeinflussung der Gerinnung, metabolische Umstellungen mit kataboler Bilanz und die Synthese weiterer Zytokine und Mediatoren (Kushner 1993, Baumann und Gauldie 1994, Moldawer 1994).

Zu den Akutphase-Proteinen zählt man Serumproteine, deren Konzentration während der Akutphase um mindestens 25% ansteigt oder abnimmt (Kushner und Mackiewicz 1987). Sie dienen u.a. der Abwehr und Wundheilung (Opsonine, Komplementfaktoren, Fibrinogen), dem Transport von z.B. Abbauprodukten zerstörter Zellen (Haptoglobin, SAP) und dem kontrollierten, gewebedestruktionsarmen Umbau extrazellulärer Matrix (Proteaseinhibitoren: α_1 -Antichymotrypsin) (Doolittle 1984, Baumann und Gauldie 1994, Steel und Whitehead 1994, Kalsheker 1996, Suffredini et.al. 1999).

Im Laufe der systemischen Akutphase kann es, besonders wenn es dem Körper nicht gelingt, eingedrungene Krankheitserreger zu eliminieren, durch langanhaltende Entzündungsreize zu überschießenden Reaktionen und zur Dysbalance pro- und antiinflammatorischer Prozesse kommen, die zur Schädigung von Organen und des gesamten Organismus bis hin zum Bild der Sepsis oder SIRS führen können (Parillo 1993, Hack et. al. 1997, Höflich und Volk 2002). Eine mögliche Ursache für eine solche Fehlreaktion ist die Einschwemmung von Bakterien oder deren Produkten, wie LPS, (Abbildung 1) in die Blutbahn (Glauser et. al. 1991).

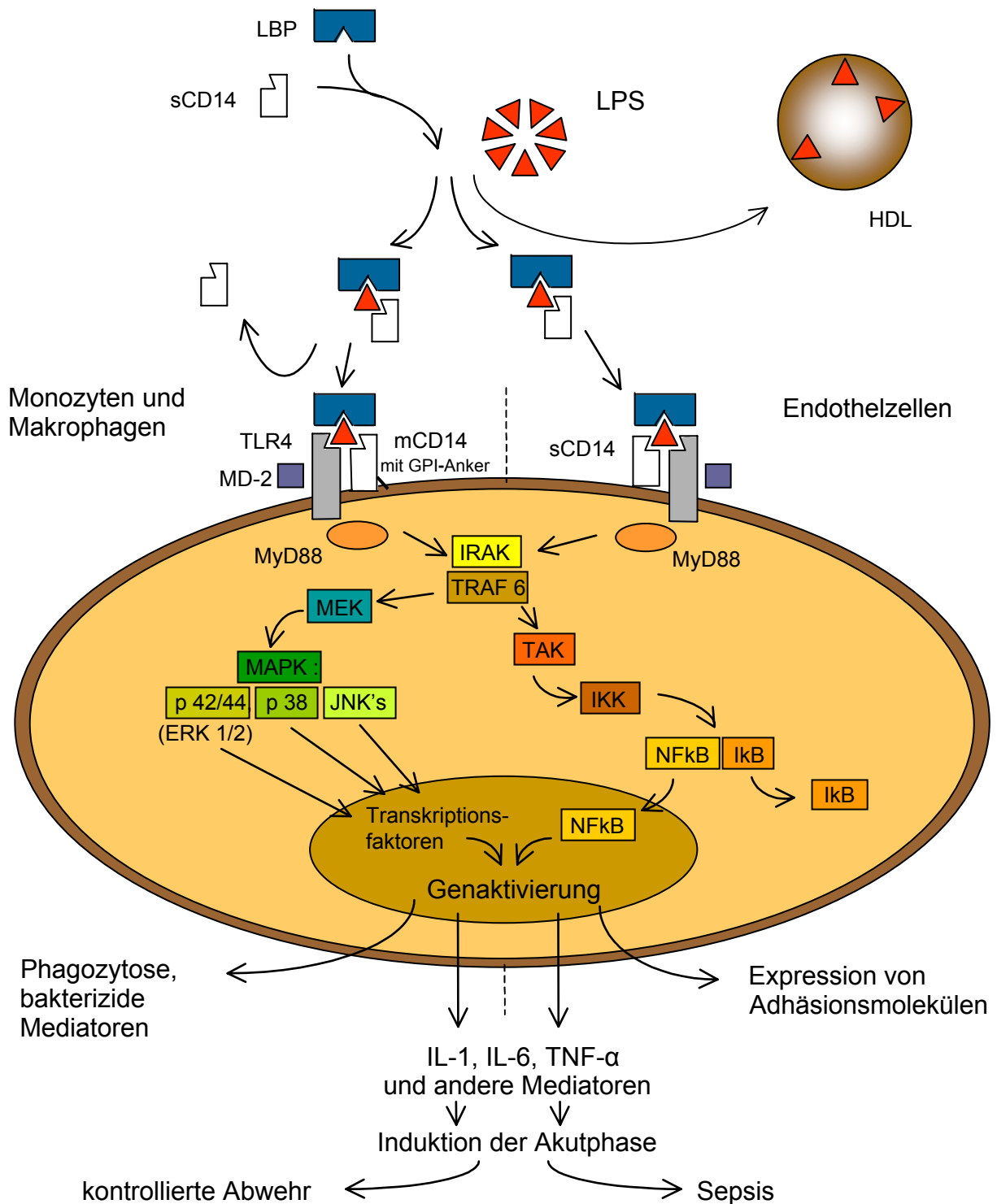


Abbildung 1: LPS-abhängige Induktion proinflammatorischer Abwehrmechanismen in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien wird durch das LPS bindende Protein (LBP) monomerisiert und von LBP und sCD14 zu seinem zellulären CD14/TLR4/MD2-Rezeptorkomplex transportiert. Das sCD14 ermöglicht die Stimulation CD14-negativer Zellen. Über die intrazelluläre Domäne von TLR4 kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die u.a. die Synthese proinflammatorischer Zytokine bewirken. Die systemische Wirkung dieser Zytokine zieht im Körper die Akutphase nach sich. Sie dient unter anderem der antimikrobiellen Abwehr. Bei einer zu starken oder unbalancierten Zytokinausschüttung kann es jedoch durch die Überstimulation des Immunsystems zu fehlerhaften Reaktionen bis hin zur Sepsis kommen.

2 Sepsis – Pathogenese, Definition, Epidemiologie und Lethalität

Die Akutphase-Reaktion als Teil der Immunantwort dient der Schaffung optimaler Bedingungen zur Bekämpfung von Krankheitserregern und anschließender Reparaturprozesse durch mediatorvermittelte und –regulierte systemische Reaktionen. Diese Phase ist unter normalen Umständen zeitlich begrenzt (Baumann und Gauldie 1994). Besonders bei immungeschwächten Personen und bei genetisch oder durch Vorerkrankungen prädisponierten Patienten und bei Persistenz der Erreger kann es jedoch – vermutlich durch Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren – zur Fehlregulation dieses Systems kommen mit der Folge von SIRS oder Sepsis (Glauser et. al. 1991, Parillo 1993).

Diese systemische Folgereaktion auf eine Vielzahl von Ereignissen wie Polytrauma, Tumorerkrankung, Pankreatitis oder Infektion wird laut der Vereinbarung einer Konsensuskonferenz von 1991 als „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) bezeichnet. Für die Diagnose SIRS müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein: Körpertemperatur $> 38\text{ °C}$ oder $< 36\text{ °C}$, Herzfrequenz $> 90/\text{Minute}$, Atemfrequenz $> 20/\text{Minute}$ oder $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mmHg}$ und Leukozyten $> 12/\mu\text{l}$ oder $< 4/\mu\text{l}$ oder $> 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten (Bone 1991, Bone et. al. 1992). Ist bei diesem Krankheitsbild ein Erreger nachweisbar oder besteht der Verdacht auf eine infektiöse Ursache, so bezeichnet man dies als Sepsis. Es wurde in den letzten Jahren häufig über die Gültigkeit dieser Kriterien und über die Notwendigkeit weiterer klinischer, hämodynamischer oder Labor-Parameter diskutiert, bisher jedoch ohne abschließendes Ergebnis (Matot und Sprung 2001). Kommt es neben den oben genannten Faktoren zusätzlich zu Hypotonie, Organfunktions- oder Perfusionsstörungen, spricht man von einer schweren Sepsis. Durch erhöhte Gefäßpermeabilität und Tonusverlust der Gefäßmuskulatur kann es zum massiven Blutdruckabfall kommen. Ist dieser trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr nicht kontrollierbar, handelt es sich um das Bild eines septischen Schocks. Als Folge von Volumenfehlverteilung, Störungen des Gerinnungssystems mit dissiminerter intravasaler Gerinnung (DIC) und Verbrauchskoagulopathie, kardiopulmonaler Insuffizienz und daraus folgenden Mikro- und Makrozirkulationsstörungen kann es zum Multiorganversagen kommen (Cohen und Glauser 1991, Glauser et. al. 1991, Bone et. al. 1992). Oft kann im Verlauf der Sepsis zwischen einer anfänglichen hyperdynamischen Phase mit überschießender Aktivierung und einer späten hypodynamischen Phase, im schwersten Fall mit einem Zusammenbruch des

Immunsystems (Immunparalyse), unterschieden werden, da es durch eine systemische Überstimulation des Immunsystems gegenregulatorisch zu einer Hemmung des Immunsystems kommt. Ein Umschlagen einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) in eine antiinflammatorische Phase wird hierbei als CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) bezeichnet. Beide Krankheitsbilder können sich jedoch auch überlagern (Kox et. al. 2000, Volk et. al. 2000, Hotchkiss und Karl 2003).

In nur etwa 50 % der vermuteten Sepsisfälle gelingt ein Erregernachweis mittels Blutkultur. Hierbei zeigen sich in letzter Zeit in jeweils etwa gleich vielen Fällen Gram-negative und Gram-positive Bakterien, nachdem die Zahl der Gram-positiven Infektionen in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat. In einem geringen Prozentsatz sind Mischinfektionen oder Pilze als Verursacher nachweisbar (Friedmann et. al. 1998, Brun-Buisson 2000, Martin et. al. 2003). Vom klinischen Bild lassen sich Gram-positive und Gram-negative Infektionen nicht unterscheiden. Es wird jedoch vermutet, dass bei vielen negativen Kulturergebnissen und auch in einem Teil der Gram-positiven Fälle intermittierend aus dem Darm ins Blut übergetretenes LPS für einen Großteil der Symptome verantwortlich ist, da in Studien in mehr als der Hälfte der Fälle des septischen Schocks im Plasma LPS nachweisbar war – unabhängig vom Blutkulturergebnis (Danner 1991, Hewett und Roth 1993, Parillo 1993).

Trotz hochwirksamer Antibiotika und großer Fortschritte in der Intensivtherapie ist die Sepsis nach wie vor ein problematisches Krankheitsbild mit hoher Inzidenz und Sterblichkeit. Durch die steigende Zahl der in Folge von Hochdosis-Chemotherapie, Transplantationsmedizin und AIDS immunsupprimierten Menschen und die Möglichkeiten der modernen Medizin, auch schwerstkranke Patienten am Leben zu erhalten, gibt es eine große Zahl von Personen, die vermehrt für bakterielle Infektionen anfällig sind (Matot und Sprung 2001).

In den letzten Jahren lag die allgemeine Inzidenz der Sepsis in westeuropäischen und nordamerikanischen Krankenhäusern bei 1-2 %, auf Intensivstationen mit 10-15 % jedoch deutlich höher. Die Mortalität wird für die Sepsis mit 10-25 %, für Fälle von schwerer Sepsis mit 20-40 % und beim septischen Schock mit 40-80 % angegeben, wobei diese Zahlen bei schweren Vorerkrankungen noch höher liegen können (Rangel-Frausto et. al. 1995, Friedmann et. al. 1998, Brun-Buisson 2000, Matot und Sprung 2001). Eine neue Studie zur Epidemiologie der Sepsis in den USA bestätigte diese

Zahlen und zeigte trotz fallender relativer Mortalitätsrate eine Verdreifachung der absoluten Todesfälle durch einen Anstieg der Inzidenz von Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock (Martin et. al. 2003).

Neben der grundlegenden symptomatischen Behandlung, die hauptsächlich der Erhaltung der Kreislauffunktionen dient, waren kausale Therapieansätze bisher wenig erfolgreich. Die Gabe von Antibiotika zur Bekämpfung der Infektion ist zur Zeit nicht zu ersetzen, sie kann jedoch zur vermehrten Freisetzung von LPS und anderen immunogenen Bakterienbestandteilen führen (Lepper et. al. 2002). Eine wesentliche Rolle zur Reduktion der Mortalität von schwerstkranken Patienten scheint neben der Sicherstellung einer suffizienten Gewebepfusion und -oxigenierung - durch frühzeitige Volumensubstitution, Einsatz von Katecholaminen und Bereitstellung eines ausreichenden Sauerstoffangebotes - die konsequente Einstellung des Blutzuckers auf niedrigem Niveau zu spielen (Rivers et. al. 2001, Dellinger 2003). Bei Studien auf Intensivstationen profitierten besonders Patienten mit gesichertem septischen Fokus von einer intensiven Insulintherapie und die strenge Einstellung des Blutzuckers bei ITS-Patienten auf Werte unter 110 mg/dl senkte deutlich die Inzidenz von Septikämien (van der Berghe et. al. 2001).

2.1 Neue Therapieansätze

Die Forschungsergebnisse der letzten Zeit haben viele Einblicke in mögliche Ursachen und die Pathogenese der Sepsis erbracht. Diese Erkenntnisse wurden für die Entwicklung und Erprobung neuer Therapiestrategien genutzt. Deren Mehrzahl brachte jedoch bisher noch nicht die gewünschten klinischen Ergebnisse.

Als bisher einziges Medikament zur kausalen Therapie der Sepsis wurde 2001 das aktivierte Protein (APC), ein Protein des Gerinnungssystems mit antiinflammatorischen Eigenschaften, in den USA zugelassen. Der Einsatz von APC ist jedoch aufgrund unterschiedlicher Effektivität je nach Schweregrad der Sepsis und dem Risiko erhöhter Blutungsneigung auf schwere Erkrankungsfälle (APACHE II-Score > 24) beschränkt (Bernard et. al. 2001, Matthay 2001, Warren et. al. 2002).

Trotz vielversprechender Vorstudien brachten Phase-III-Studien der meisten potentiellen Therapiekandidaten wie z.B. verschiedener anti-Lipid-A-Antikörper, löslicher

TNF- α -Rezeptoren, anti-TNF- α -Antikörper, IL-1ra, Prostaglandin- und Bradikininantagonisten, PAF-Antagonisten und Hochdosis-Glukokortikoide keine Verbesserung der Mortalität. In einigen Fällen war diese sogar erhöht (Nathanson et. al. 1994, Zeni et. al. 1997, Vincent 1998, David 2001). Lediglich rBPI₂₁, ein Protein, das von dem in Granulozyten vorkommenden BPI abgeleitet ist (siehe I.4.2.), zeigte bisher positive Ergebnisse in einer ersten Phase-III-Studie bei Kindern (Levin et. al. 2000). Es liegen jedoch bisher keine Ergebnisse eventuell neuerer Studien vor.

Das Regelwerk der Mediatoren des Immunsystems ist ein komplexes, bisher nur teilweise verstandenes System von zahlreichen pro- und antiinflammatorischen Gegenspielern, von denen im Laufe einer Infektion oder Immunantwort gegensätzliche Anteile zu verschiedenen Zeitpunkten dominieren können (hyperimmune Phase versus „Immunparalyse“). Die einzelnen Mediatoren können hierbei sowohl Vor- als auch Nachteile bringen (Höflich und Volk 2002, Hotchkiss und Karl 2003, Vincent 2002). Erfolgreiche Eingriffe in dieses System erfordern daher ein vollständiges Verständnis der ablaufenden Prozesse, was bisher leider nicht gegeben ist. Auch ist bei der Abstimmung der Therapie zu beachten, in welcher „Phase“ der Sepsis sich der Patient befindet. Daher wird eine einzelne Therapiemethode nicht ausreichen, um für sich allein und bei allen Patienten, oder selbst bei einem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung, ausreichend wirksam zu sein. Eine Kombination mehrerer Strategien dürfte daher die meisten Aussichten auf Erfolg bieten (Vincent 2002).

Eine mögliche Strategie stellt hierbei die direkte Neutralisation von LPS durch den Einsatz effektiver LPS-bindender Substanzen dar, die LPS als „erstes Glied der Kette“ zum Teil dem Zugriff des Abwehrsystems entziehen. So wird die Aktivierung von Immunzellen inhibiert, um eine Überstimulation zu verhindern.

3 Struktur der Lipopolysaccharide

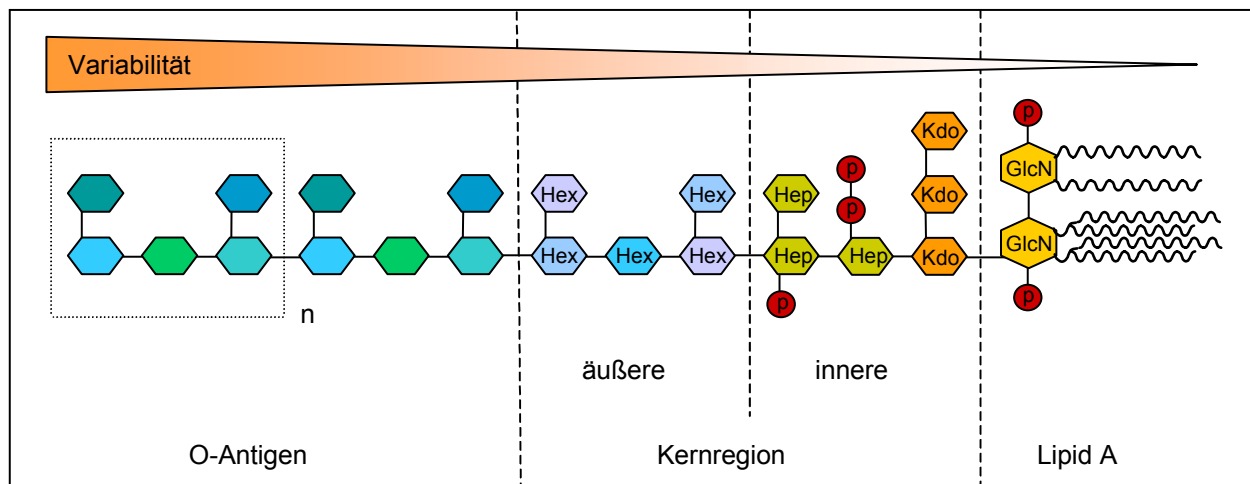
Lipopolysaccharide (LPS, Abbildung 2) werden bei einem Großteil der Sepsisfälle als mögliches auslösendes Agens angesehen. Auch als Endotoxine bezeichnet, bilden sie den Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien und sind essentiell für deren Integrität. Endotoxine sind amphiphile Stoffe bestehend aus einem lipophilen Anteil, dem Lipid A, und einer hydrophilen Region aus Polysacchariden (Raetz 1990, Rietschel et. al. 1994). Die LPS-Moleküle sind mit ihrem Lipid-A-Teil in der

Membran verankert und rufen bei Freisetzung im Wirtsorganismus – z.B. bei der Zellteilung oder dem Untergang von Bakterien – eine starke Immunreaktion hervor. LPS zählt zu den potentesten bekannten Immunstimulatoren (Rietschel et. al. 1996, Medtithov und Janeway 1998).

Das Lipid A ist der am höchsten konservierte Teil des Endotoxins und wurde als stärkster immunstimulatorischer Anteil identifiziert (Rietschel et. al. 1987). Strukturelle Veränderungen in diesem Bereich führen zu verminderter oder fehlender Toxizität (Krauss et. al. 1989). Das Lipid-A-Molekül besteht aus zwei aneinander gekoppelten D-Glukosaminen mit je einer Phosphatgruppe in den Positionen 1 und 4' und meist 6 Fettsäuren mit 10 bis 22 Kohlenstoff-Atomen Länge, von denen vier primär mit den Zuckern verknüpft sind. Das Lipid A ist in sich amphiphil, wobei die Fettsäuren den hydrophoben Teil darstellen und das Disaccharid mit den beiden Phosphatgruppen den hydrophilen Kopf bildet (Rietschel et. al. 1987, Raetz 1990, Alexander und Rietschel 2001).

Der mittlere Teil des LPS, die R- oder Kern-Region, wird in einen inneren und einen äußeren Anteil untergliedert, bei dem die interspezifische Variabilität von innen nach außen zunimmt. Charakteristische Zucker des inneren Anteils sind die 2-keto-3-desoxy-D-manno-Octansäure (Kdo), welche mit dem Lipid A verknüpft ist, und L- oder D-glycero-D-manno-heptosen, während die äußere Kern-Region überwiegend aus Hexosen wie D-Glukose, D-Galaktose oder N-acetyl-D-Glukose aufgebaut ist (Raetz 1990, Holst und Brade 1992).

Das O-Antigen, der äußerste Teil des LPS, ist aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Oligosaccharide aufgebaut, die für jede Bakterienspezies spezifisch sind, antigenen Charakter besitzen und bei einigen Stämmen auch ganz fehlen (sogenanntes rough-LPS) (Raetz 1990). Der Lipid-A-Teil mit seinen anionischen Gruppen bildet zusammen mit der inneren Kern-Region einen stark negativ geladenen Bereich und bietet so einen Angriffspunkt für zahlreiche natürliche und synthetische Peptide und Proteine (David 2001).



Modifiziert nach Alexander und Rietschel 2001

Abbildung 2: Schematische Struktur der Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxine). Der in der Zellwand Gram-negativer Bakterien verankerte Lipid-A-Teil ist aus einem biphosphorylierten Disaccharid aus Glucosaminen (GlcN) und meist 6 Fettsäuren aufgebaut und besitzt die größten immunstimulatorischen Eigenschaften im LPS-Molekül. Der kovalent an das Lipid A gebundene Polysaccharidanteil ragt aus der Bakterienhülle heraus und enthält in der inneren Kernregion den Zucker Kdo sowie L- oder D-glycero-D-manno-heptosen (Hep) und weitere Phosphatgruppen. Die äußere Kernregion besteht vorwiegend aus Hexosen (Hex). Das O-Antigen ist aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten aufgebaut, die in Anzahl und Aufbau zwischen den einzelnen Bakterienspezies stark variieren oder auch ganz fehlen können.

Endotoxine bilden als amphiphile, kegelförmige Moleküle im wässrigen Milieu Micellen. In dieser polymeren Form ist LPS nur gering immunogen. Nur monomeres LPS ist in der Lage, auch in geringen Konzentrationen eine Antwort des Immunsystems hervorzurufen. Eine spontane Diffusion einzelner LPS-Moleküle aus den Micellen erfolgt jedoch nur sehr langsam. In seine potentiell toxische Form wird LPS aber durch Serumproteine gebracht, die in der Lage sind, einzelne Moleküle aus den Micellen herauszulösen und zu ihren zellulären Rezeptoren zu transportieren, was im Falle signaltransduzierender Rezeptoren zur Zellaktivierung und Induktion proinflammatorischer Zytokine führt (Seydel et. al. 1993, Hailmann et. al. 1994, Takayama et. al. 1994).

4 Erkennung von LPS durch das angeborene Immunsystem

Zur Erkennung von und Reaktion auf bakterielle Bestandteile wie LPS haben höhere Organismen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, an denen Serumproteine und zelluläre Rezeptoren maßgeblich beteiligt sind. Für die Vermittlung der zellulären Antwort auf LPS spielen die löslichen Faktoren LBP und sCD14 als Transportproteine und die membranständigen Rezeptoren mCD14 und TLR4 die Hauptrolle. Mit ihrer Hilfe

wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die zur Synthese und Freisetzung von Mediatoren des Immunsystems führt (Schumann et. al. 1990, Wright et. al. 1990, Cow et.al. 1999). Daneben gibt es eine Reihe von Serumproteinen und Rezeptoren (auf die später exemplarisch eingegangen wird), die LPS zwar binden, aber nicht zur Zellstimulation führen und deren Rolle in Bezug auf LPS z.T. noch unklar ist.

4.1 Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP)

Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP) von 58 kDa Größe zählt zu den Akutphase-Proteinen und ist beim Gesunden mit 5-10 µg/ml im Serum nachweisbar, wo es größtenteils mit Lipoproteinen assoziiert vorliegt. Während der Akutphase kann seine Konzentration auf bis zu 100-300 µg/ml ansteigen. LBP bindet LPS mit hoher Affinität und katalysiert dessen Monomerisierung und Transfer zu zellulären und löslichen Akzeptoren. Beim Transport von LPS zu mCD14 verstärkt es die immunstimulatorischen Effekte des LPS um den Faktor 100-1000, so dass bereits 1 µg/ml ausreichen, um eine Zytokinausschüttung zu initiieren (Hailmann et. al. 1994, Schumann et. al. 1990 und 1996). Neben seiner Fähigkeit, die Wirkung von LPS auf das Immunsystem zu verstärken, zeigt LBP jedoch in hohen Konzentrationen im Tiermodell auch protektive Eigenschaften (Lamping et. al. 1996).

Neben der Stimulation von Zellen via TLR4/MD-2 kann die Bindung von LPS an LBP und CD14 auch zur Detoxifizierung von LPS führen. Bei der Bindung großer LPS-Komplexe an mCD14 kommt es zur Internalisation und Neutralisation dieser ohne Aktivierung der Zelle (Wright et. al. 1990, Gegner et. al. 1995, Hamann et. al. 2001). Daneben vermittelt LBP nicht nur den Transport von LPS an seine zellulären Rezeptoren, sondern auch die Detoxifikation von LPS durch dessen Transfer in Lipoproteine, die dann von verschiedenen Zelltypen internalisiert werden. Dieser Vorgang wird durch sCD14 um den Faktor 30-50 verstärkt. An HDL gebundenes LPS verliert seine immunstimulatorischen Eigenschaften, da sein Lipid-A-Teil in die Phospholipidoberfläche des Lipoproteins eingelagert wird und somit Immunrezeptoren nicht mehr zugänglich ist (van Lenten et. al. 1986, Wurfel et. al. 1994 und 1995). Eine LPS-neutralisierende Wirkung wurde neben HDL auch für LDL, VLDL und Chylomikronen nachgewiesen (Harris et. al. 1990). Der Vorgang der Neutralisierung von LPS durch den Transfer in Lipoproteine läuft insgesamt eher langsam ab, er könnte jedoch durchaus für den

protektiven Effekt von hohen LBP-Konzentrationen vor größeren LPS-Mengen verantwortlich sein (Netea et. al. 1998).

4.2 Die Familie der Lipidtransfer/LPS-bindenden Proteine

Ein weiteres Protein, das in der Lage ist LPS zu binden, jedoch im Gegensatz zu LBP rein LPS-neutralisierend und bakterizid wirkt und nicht zur Zellstimulation via CD14 führt, ist das BPI (bactericidal/permeability increasing protein), welches aus den Granula neutrophiler Granulozyten stammt (Elsbach und Weiss 1993, Weiss 2003). Im Serum Gesunder ist es nur in geringen Mengen von weniger als 1 ng/ml nachweisbar. Bei Infektionen steigt es jedoch auf rund 8 ng/ml an und erreicht am eigentlichen Infektionsherd weit höhere Konzentrationen (Opal et. al. 1994). Der Vergleich des 1997 kristallographierten Proteins mit anderen Proteinen einer Datenbank führte zur Aufstellung einer neuen Proteinfamilie, zu der außer BPI und LBP auch die beiden Serumproteine Phospholipid-Transferprotein (PLTP) und Cholesterinester-Transferprotein (CETP) gezählt werden (Beamer et. al. 1997, Kirschning et. al. 1997, siehe Tabelle 1). Diese beiden Proteine binden an Lipidstrukturen wie Phospholipide (PLTP), Cholesterinester und Triglyceride (CETP) und katalysieren deren Transport und Austausch (Tall 1995). PLTP katalysiert auch den Transfer von LPS zu HDL. Inwiefern es jedoch in vivo für dessen Detoxifizierung oder stimulatorischen Eigenschaften eine Rolle spielt, ist bislang unklar (Hailmann et. al. 1996). LBP weist gegenüber diesen Proteinen eine Sequenzübereinstimmung auf Aminosäureebene von 44 % für BPI (58 % auf DNA-Ebene), 25 % für PLTP und 23 % für CETP auf (Drayna et. al. 1987, Gray et. al. 1989, Day et. al. 1994, siehe Tabelle 1). Für LBP selbst ist ebenfalls die Fähigkeit nachgewiesen, Phospholipide zu transportieren. Es wird für deren Bindung jedoch eine andere Bindungsstelle als für LPS postuliert (Hailmann et. al. 1996, Yu et. al. 1997).

Aufgrund der großen Anzahl konservierter Aminosäuren konnte nach der Computeranalyse eines kristallographierten BPI-Moleküls ein Homologiemodell für LBP erstellt werden. Die Proteine haben eine boomerangförmige Struktur mit zwei apolaren Bindungstaschen (Beamer et. al. 1998).

Tabelle 1: Familie der Lipidtransfer/LPS-bindenden Proteine. LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein), BPI (bactericidal/permeability increasing protein), PLTP (Phospholipid-Transfer-Protein), CETP (Cholesterinester-Transfer-Protein).

Peptid	Funktion	Homologie zu LBP
LBP	Bindung und Transfer von LPS	-
BPI	Neutralisation von LPS	44 %
PLTP	Bindung und Transfer von Phospholipiden und LPS	25 %
CETP	Bindung und Transfer von Cholesterinestern und Triglyceriden	23 %

4.3 CD14

CD14 ist als Rezeptor für Endotoxin wirksam, wobei es nicht nur monomeres LPS, sondern auch LPS-tragende Partikel, LPS-LBP-Komplexe und Gram-negative Bakterien bindet (Wright et. al. 1990). Als membranständiger Rezeptor wird mCD14 vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert, in geringerem Ausmaß aber auch auf Granulozyten und Lymphozyten. Das 55 kDa große Glykoprotein ist mit einem GPI-Anker an der Zellmembran befestigt. Es besitzt jedoch selbst keinen transmembranären Anteil, so dass für die Signalübertragung in die Zelle ein weiterer Rezeptor nötig ist (Haziot et. al. 1988, Wright et. al. 1990). Dieser wurde mit TLR4 nicht nur auf CD14-positiven, sondern auch auf CD14-negativen LPS-sensitiven Zellen wie Endothel- und Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten identifiziert (Pugin et. al. 1993, Alexander und Rietschel 2001).

Im Serum mit 2-6 µg/ml vorhandenes lösliches sCD14 ist maßgeblich am Transport von LPS im Serum und an der Stimulierung dieser Zellen beteiligt (Frey et. al. 1992). Das lösliche CD14 stammt aus verschiedenen Quellen. Es wird entweder direkt ins Blut sezerniert oder enzymatisch durch LPS-ausgelöstes sogenanntes „shedding“ vom GPI-Anker abgespalten. Der Mechanismus des „shedding“ spielt möglicherweise eine Rolle beim Schutz CD14-positiver Zellen vor Überstimulation, da hierdurch die Rezeptordichte auf der Zelle verringert wird (Bazil und Storminger 1991, Durieux et. al. 1994). LPS kann so jedoch auch vermehrt durch sCD14 zu CD14-negativen Zellen transportiert werden und diese stimulieren. Neben dem Transfer von LPS und LPS-LBP-

Komplexen zu CD14-positiven und –negativen Zellen verstärkt sCD14 auch den Transport dieser zu Lipoproteinen (Wurfel et. al. 1995).

4.4 Toll-like-Rezeptoren

Die vor kurzem entdeckte Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLR's) weist große strukturelle Ähnlichkeiten der intrazellulären Domäne zum IL-1-Rezeptor und zum *Drosophila*-Toll-Protein (dToll) auf. Diese werden deshalb zu einer gemeinsamen Proteinfamilie gezählt. Das Toll-Gen der Fruchtfliege *Drosophila* ist bedeutend für deren Ontogenese und mikrobielle Abwehr (Lemeitre et. al. 1996 und 1997). Die durch Toll-Gene kodierte Proteinfamilie der dToll, TLR's und IL-1-Rezeptoren weist eine Leucin-reiche extrazelluläre Domäne und ähnliche intrazelluläre Anteile auf, dient der Abwehr und induziert eine Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt (Belvin und Anderson 1996, Rock et. al. 1998).

Als erstes Toll-Äquivalent wurde 1997 TLR4 entdeckt. Mittlerweile sind bereits neun weitere Mitglieder der TLR-Familie beschrieben (Medzithov et. al. 1997, Akira 2003, Takeda et. al. 2003). Primär wurde TLR2 als CD14-Corezeptor für die Erkennung von LPS postuliert (Kirschning et. al. 1998). Inzwischen gilt aber als sicher, dass diese Funktion TLR4 zufällt. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im TLR4-Gen bei Mäusen zur LPS-Hyposensibilität führen und es gibt Hinweise darauf, dass dies auch beim Menschen der Fall ist (Poltorak et. al. 1998, Chow et. al. 1999, Arbour et. al. 2000). Für die Erkennung von LPS und die daraus resultierende Zellstimulation wurde mit MD-2 noch ein weiteres Molekül entdeckt, das an die extrazelluläre Domäne von TLR4 bindet und die Signaltransduktion verstärkt (Shimazu et. al. 1999).

4.5 Lipopolysaccharid-abhängige intrazelluläre Signaltransduktion

Die Aktivierung der Signalkaskade über die intrazelluläre Domäne von dToll, IL-1-Rezeptor und TLR führt zu einer raschen Induktion des Transkriptionsfaktors NF κ B. Dieser reguliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, deren Produkte an Abwehr- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Als erstes wurde diese Signaltransduktionskaskade für den IL-1-Rezeptor beschrieben. Inzwischen wurden die einzelnen Komponenten dieser Kaskade auch für die TLR-Signalwege nachgewiesen (Ghosh et. al.

1998, Zhang et. al. 1999). Nach der Bindung von LPS an den CD14/TLR4/MD-2-Komplex wird über die zytoplasmatischen Moleküle MyD88, IRAK, TRAF6, TAK1 und IKK's das im Zytosol an I κ B gebundene NF κ B freigesetzt und anschließend durch dessen Wanderung in den Zellkern eine Reihe von Genen aktiviert, die z.B. die Synthese von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen kontrollieren (Karin und Ben-Neriah 2000, Medzithov und Janeway 2000).

Weiterhin kommt es durch die LPS-induzierte Signalkaskade in der Zelle zur Aktivierung sogenannter Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPKs) wie p38, p42/44 (=ERK1/2) und JNKs. Diese haben ebenfalls Einfluss auf eine Reihe von Transkriptionsfaktoren bei der Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α und auf zellregulatorische Proteine (Alexander und Rietschel 2001, Guha et. al. 2001).

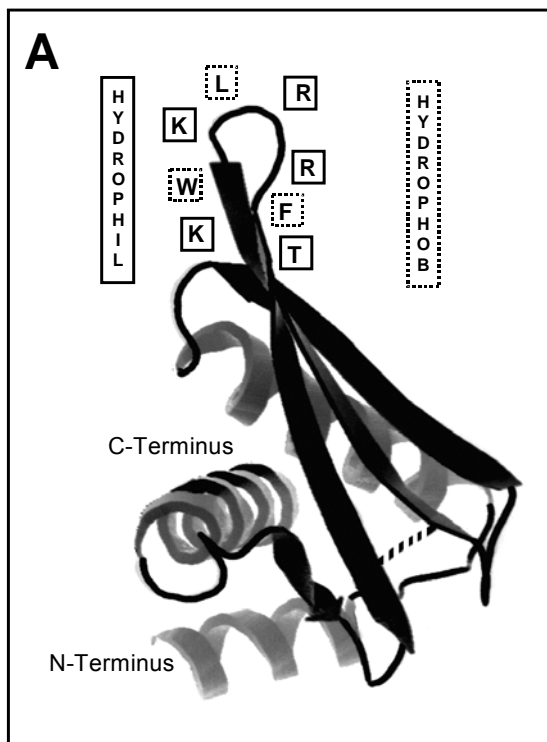
4.6 Weitere Lipopolysaccharid-bindende Proteine

Für eine Reihe weitere Serumfaktoren und Rezeptoren ist die Fähigkeit nachgewiesen worden, an LPS zu binden. Ihre Rolle in der LPS-Organismus-Interaktion ist jedoch nur zum Teil geklärt. Die Bindung des Komplementrezeptors 3 (=CD11/18) an LPS auf der Oberfläche intakter Bakterien führt zu deren Phagozytose (Wright und Jong 1986). Der Scavenger-Rezeptor vermittelt die Internalisation und Detoxifizierung von einer Vielzahl Liganden u.a. auch von LPS (Kodama et. al. 1990). Das kationische Peptid CAP18 ist ein typischer Vertreter antimikrobieller Peptide, die LPS binden und neutralisieren (Larrick et. al. 1991). Auch Transferrin, CRP, Lysozym, Lactoferrin, α_2 -Makroglobulin und SAP sind in der Lage, LPS zu binden und seine Effekte abzuschwächen (Takada et. al. 1994, Appelmelk et. al. 1994, Berger und Beger 1987, de Haas et. al. 1998, Janeway und Medzithov 2002).

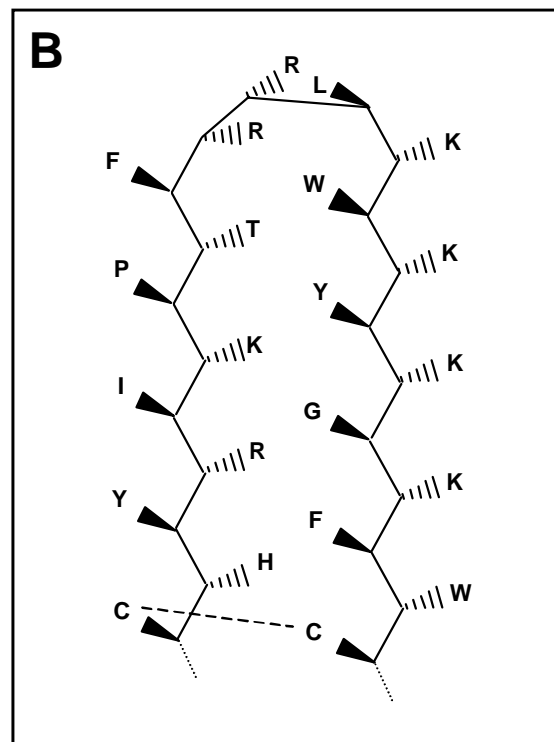
5 Das LALF-Protein

In den Blutzellen des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* wurde ein weiteres Protein identifiziert, das über eine ähnliche Bindungsregion wie LBP und BPI hochaffin an LPS binden kann und zusätzlich das Wachstum Gram-negativer Bakterien hemmt (Warren et. al. 1992, Hoess et. al. 1993). Dieses Protein – als Limulus-anti-LPS-Faktor (LALF) oder Endotoxin-neutralisierendes-Protein (ENP) bezeichnet (Abbildung 3) –

inhibiert in vivo eine durch LPS ausgelöste Gerinnungskaskade und ist die Grundlage des LAL-Assays zur Detektion von LPS (Levin et. al. 1972, Tanaka et. al. 1982).



Modifiziert nach Hoess et. al. 1993



Modifiziert nach Ried et. al. 1996

Abbildung 3: Röntgenstrukturanalyse des Limulus-anti-LPS-Faktors (LALF) und schematische Struktur der LPS-Bindungsdomäne. Die einer Publikation von Hoess entnommene und modifizierte Abbildung A des LALF-Proteins wurde von Norbert Lamping zur Verfügung gestellt und weiter bearbeitet. Abbildung B wurde nach einer Publikationsabbildung von Ried gefertigt. Die im 3D-Modell der Röntgenstrukturanalyse nach oben weisende „Schleifenstruktur“ der LPS-Bindungsregion des LALF ist aus einer Serie alternierender hydrophober und hydrophiler Aminosäuren aufgebaut, deren Reste wie in Abbildung B dargestellt in entgegengesetzte Richtungen der Haarnadelschleife weisen.

5.1 Die LPS-Bindungsregion von LALF, LBP und BPI

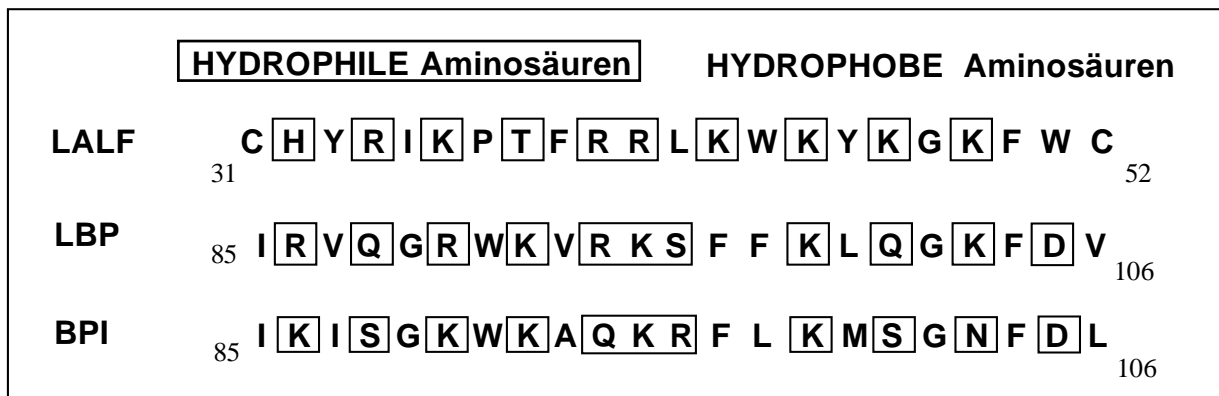
Sowohl LBP und BPI als auch LALF sind in der Lage, effektiv LPS zu binden. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der LPS-Bindungsstellen, fällt auf den ersten Blick keine Übereinstimmung auf. Bei genauer Analyse lässt sich jedoch ein gemeinsames Muster aus alternierenden hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren feststellen (Abbildung 4).

Im LALF-Protein bildet die 1993 von Hoess postulierte LPS-Bindungsregion eine exponierte schleifenförmige Struktur. Durch die abwechselnde Ausrichtung der hydrophilen

und hydrophoben Aminosäurereste zu beiden Seiten der Bindungsschleife wird dieser ein in sich amphiphiler Charakter verliehen (Abbildung 3).

Bei LBP und BPI bilden eine Reihe positiv geladener Aminosäuren, die im Wechsel mit hydrophoben Aminosäuren angeordnet sind, an einer exponierten Stelle der N-terminalen Region des boomerangförmigen Proteins einen Bereich, der über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen phosphorylierten Zucker des Lipid A-Teils von LPS bindet (Beamer et. al. 1998, Lamping et. al. 1996).

Die postulierten Bereiche der Proteine konnten in Versuchen mit synthetischen Peptiden dieser Regionen als LPS-Bindungsstelle nachgewiesen werden und sind zwischen den drei Proteinen austauschbar, ohne dass hierdurch die ursprüngliche Funktion der Proteine wesentlich beeinflusst wird (Battafarno et. al. 1995, Schumann et. al. 1997).



modifiziert nach Lamping

Abbildung 4: Aminosäuresequenz der LPS-Bindungsdomäne des LALF-Proteins und der Familie der Lipidtransfer/LPS-bindenden Proteine. Dargestellt ist die alternierende Folge hydrophiler und hydrophober Aminosäuren der LPS-Bindungssequenz der Proteine LALF (Limulus-anti-LPS-Faktor), LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) und BPI (bactericidal/permeability increasing protein).

6 Peptide in der Medizin

Zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen nutzten die meisten höheren Lebewesen neben vielen anderen Abwehrmechanismen sogenannte antimikrobielle Peptide. Meist handelt es sich hierbei um kleine, 12-50 Aminosäuren lange, kationische Peptide, typischerweise mit α -helikaler-, β -Faltblatt- oder Schleifenform. Bisher konnten mehr als 500 solcher „cationic peptides“ identifiziert werden, so z.B. Defensine, Bactericin, Indolicin, CAP 18 oder Nisin (Hancock 1997, Hancock und Scott 2000).

Auch in der Medizin spielen – z.T. synthetisch hergestellte und veränderte – Peptide eine Rolle. Diese werden u.a. als Antibiotika eingesetzt, wie z.B. Bacitracin, Ramoplanin und die Glycopeptide Vancomycin und Teicoplanin, welche jedoch nur bei Gram-positiven Infektionen wirksam sind (McCafferty et. al. 2002). Das als Goldstandard zur Detektion und Quantifizierung von LPS eingesetzte Decapeptid Polymyxin B wird u.a. zur Lokalthherapie Gram-negativer Infekte besonders in der Ophthalmologie verwendet. Es ist aufgrund seiner Toxizität jedoch nicht systemisch einsetzbar (David 2001, Robert und Adenis 2001).

Die Herstellung solcher Peptide kann relativ kostspielig sein. Mit standardisierten Verfahren (wie der für die hier untersuchten Peptide verwendeten Festphasen-Synthese) können jedoch einfach strukturierte Peptide schnell in größeren Mengen produziert werden und sie sind im Vergleich zu z.B. rekombinant hergestellten Peptiden oder Proteinen einfach zu modifizieren, wodurch ihre biologische Aktivität leicht optimiert werden kann. Die resultierenden Peptide können so z.T. weitaus effektiver sein als ihre natürlichen Vorbilder. Bei kurzen Peptiden mit einfacher räumlicher Struktur ist zudem keine aufwendige „Nachbearbeitung“ nötig. So zählt z.B. das durch Festphasen-Synthese hergestellte Polymyxin B zu den preiswertesten lokal eingesetzten Antibiotika in der Ophthalmologie (Robert und Adenis 2001, de Visser et. al. 2003).

7 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Infektion eines Organismus mit Gram-negativen Bakterien kommt es zur Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS) aus der äußeren Zellwand der Bakterien. Die LPS-Moleküle lagern sich in wässrigem Milieu zu Micellen zusammen, die wenig immunstimulatorisch sind. Der Wirtsorganismus ist jedoch in der Lage, LPS über verschiedene humorale und zelluläre Faktoren zu erkennen und durch Aktivierung des Immunsystems darauf zu reagieren. Dabei spielen das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP) und sCD14 eine wichtige Rolle, indem sie LPS aus den Micellen monomerisieren, zu seinen zellulären Rezeptoren transferieren und so die immunogene Wirkung von LPS verstärken. Die LBP- und sCD14-vermittelte Bindung von LPS an den mCD14/TLR4-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen

führt über die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade zur Aktivierung der Zelle und zur Ausschüttung von Mediatoren der Abwehr. Eine übermäßige Stimulierung des Immunsystems durch LPS mit überschießender Produktion proinflammatorischer Zytokine kann zu dem in der Klinik gefürchteten Bild der Sepsis führen.

Ein Protein des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*, der Limulus-anti-LPS-Faktor (LALF), ist in der Lage, LPS hochaffin zu binden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss synthetischer, von der LPS-Bindungssequenz des LALF-Proteins abgeleiteter Peptide auf die Stimulation des Immunsystems durch LPS untersucht werden. Hierzu soll mit Hilfe eines Bindungsassays zuerst ermittelt werden, ob die Peptide spezifisch mit LBP um die gleiche Bindungsstelle am LPS-Molekül kompetitieren und es soll die LPS-Bindungsfähigkeit anhand der Struktur der Peptide analysiert werden. Weiterhin soll nachgewiesen werden, ob die Peptide in der Lage sind, die LPS-abhängige Aktivierung von Zellen der murinen Makrophagenlinie RAW 264.7 und isolierter humaner Monozyten zu inhibieren und deren Ausschüttung von Tumornekrosefaktor-(TNF)- α bzw. Stickstoffoxid (NO) zu hemmen.

II. Material und Methoden

1 Peptide

Die in den Versuchen auf ihre LPS-Bindungsfähigkeit hin untersuchten zyklischen Peptide wurden freundlicherweise von Dr. Enrique Pérez-Payá (Universität Valencia, Spanien) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Es wurden zwei Peptide entworfen, welche mit 8 bzw. 12 Aminosäuren Länge die schleifenförmige Bindungssequenz des LALF-Proteins für LPS repräsentieren (LALF 38-45: Aminosäuren 38-45; LALF 36-47: Aminosäuren 36-47). Um die Peptide mittels Disulfidbrücke in eine Ringform überführen zu können, wurden am N-terminale Ende die Aminosäuren Glycin und Cystein und am C-terminale Ende Cystein und Glycin hinzugefügt. Weitere vier Peptide (LALF 36-47p39, -p41, -p42 und -p43) besitzen den gleichen Grundaufbau wie LALF 36-47, jedoch wurde an unterschiedlichen Stellen die D-Aminosäure Prolin (p) eingeführt, um die Bindungseigenschaften der Peptide zu modifizieren. Die Peptide D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 bestehen komplett aus D-Aminosäuren und entsprechen in ihrer Sequenz den jeweiligen nicht-D-Peptiden. Zusätzlich wurden zwei weitere Peptide (DB1 und DB2) aus einer Peptid-Bibliothek synthetisiert, deren Struktur anhand eines Screening-Programms der konformationsorientierten Proteindatenbank ermittelt wurde und nicht mit der des LALF-Proteins verwandt ist (Abbildung 5).

Die Herstellung der Peptide wurde mit Hilfe eines automatisierten Festphasen-Peptid-Synthetisierers (ABI 433A) unter Nutzung eines Standardprotokolls zum Schutz der Amino-Gruppe der einzelnen Aminosäuren durch eine Fmoc-(9-fluorenylmethoxycarbonyl-)Gruppe durchgeführt. Die Synthese erfolgte linear, die einzelnen Aminosäuren wurden nach Entfernung der schützenden Fmoc-Gruppe und Aktivierung der Carboxyl-Gruppe nacheinander aneinander gekoppelt. Die vollständige Aminosäurekette wurde anschließend durch „reverse-phase high pressure liquid chromatography“ (r-HPLC) gereinigt, mittels Laser-Massen-Spektroskopie charakterisiert und durch 24-stündige Inkubation in 15 % DMSO in Ringform gebracht. Danach wurden die nun zyklischen Peptide erneut mittels analytischer r-HPLC auf ihre Reinheit überprüft und im Anschluss für Lagerung und Transport lyophilisiert. Hier im Labor wurden die Peptide in sterilem Aqua dest. wieder gelöst und bei 4 °C gelagert.

Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz	Labor-Nr.											
LALF 38-45	C-TFRRLLKWK-C	CMT 34#1	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td>R</td><td>R</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>			R	R						
		R	R										
LALF 36-47	C-KPTFRRLKWKYK-C	CMT 34#2	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>R</td><td>R</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				R	R					
			R	R									
D-LALF 36-47	c-k p t f r r l k w k y k -c	D-CMT 34#2	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>r</td><td>r</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				r	r					
			r	r									
LALF 36-47p39	C-KPTFpRRLKWKYK-C	CMT 48#2	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>p</td><td>R</td><td>R</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				p	R	R				
			p	R	R								
LALF 36-47p41	C-KPTFRRLpLKWKYK-C	CMT 48#4	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>R</td><td>R</td><td>p</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				R	R	p				
			R	R	p								
LALF 36-47p42	C-KPTFRRLpKWKYK-C	CMT 48#5	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>R</td><td>R</td><td>p</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				R	R	p				
			R	R	p								
LALF 36-47p43	C-KPTFRRLpWKYK-C	CMT 48#6	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>R</td><td>R</td><td>p</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				R	R	p				
			R	R	p								
D-LALF 36-47p43	c-k p t f r r l k p w k y k -c	D-CMT 48#6	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td>r</td><td>r</td><td></td><td>p</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>				r	r		p			
			r	r		p							
DB1	C-RGKWTYNGITYEGR-C	CMT 49#12											
DB2	C-RGKWTYNGHTYEGR-C	CMT 49#15											

Originalsequenz LALF ...ECHYRI KPTFRRLKWKYK GKFWCP...

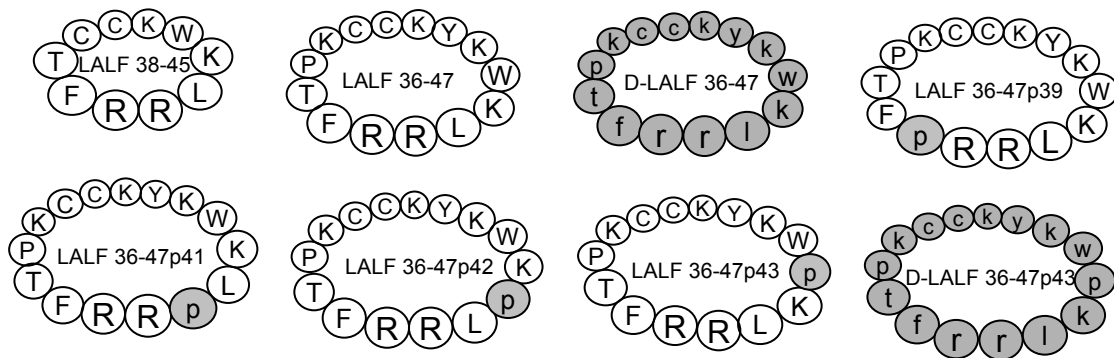


Abbildung 5: Aminosäuresequenz und Schema der synthetisierten zyklischen Peptide. Die dritte bis zehnte Aminosäure des Peptides LALF 38-45 bzw. die dritte bis zwölfte Aminosäure von LALF 36-47 entsprechen der LPS-Bindungsstelle des LALF-Proteins. Bei den Peptiden LALF 36-47p39, -p41, -p42 und -p43 ist in die Sequenz des Peptides LALF 36-47 zusätzlich die D-Aminosäure Prolin (durch den kleinen Buchstaben p repräsentiert) an verschiedenen Stellen des Peptides eingefügt. Die Peptide D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 bestehen komplett aus D-Aminosäuren (durch kleine Buchstaben dargestellt). Die Aminosäuresequenz der Peptide DB1 und DB2 entstammt einer Proteindatenbank. Die angegebene Originalsequenz LALF zeigt die Aminosäuren 30 bis 53 des LALF-Proteins, die in LALF 36-47 verwendeten Aminosäuren sind unterstrichen. Darunter ist schematisch die Ringstruktur der von LALF abgeleiteten Peptide dargestellt.

Dargestellte Aminosäuren

C	Cys	Cystin	hydrophob	L	Leu	Leucin	hydrophob
F	Phe	Phenylalanin	hydrophob	P	Pro	Prolin	hydrophob
G	Gly	Glycin	hydrophob	R	Arg	Arginin	hydrophil
H	His	Histidin	hydrophil	T	Thr	Threonin	hydrophil
I	Ile	Isoleucin	hydrophob	W	Tpr	Tryptophan	hydrophob
K	Lys	Lysin	hydrophil	Y	Tyr	Tyrosin	hydrophob

2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Puffergrundsubstanzen, Lösungsmittel, weitere Laborchemikalien und Grundsubstanzen zur Zellkultur von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Life Technologies Ltd (Praisley, UK), PAA (Linz, Österreich), Pharmingen (Hamburg), PAN (Aidenbach), Gibco Life Technologies (Eggenstein) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

3 Materialien

Verwendete Plastikmaterialien stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Falcon (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen) und Sigma (Deisenhofen).

4 LPS-ELISA

Zum Nachweis der Bindung der zu untersuchenden Peptide an LPS und ihre Konkurrenz mit LBP um die Bindungsstelle am LPS wurde ein modifizierter LPS-ELISA verwendet, der ursprünglich der Quantifizierung von LBP-Konzentrationen diente. Hierfür wurde vor Zugabe einer bekannten Menge von murinem oder humanem LBP die mit LPS (*Salmonella minnesota* Re 595) beschichtete ELISA-Platte mit den Peptiden vorinkubiert, so dass ein Teil der Bindungsstellen für LBP an den LPS-Molekülen durch die Peptide blockiert wurde. Die – in Abhängigkeit von der Affinität der Peptide zum LPS – dennoch gebundene LBP-Menge wurde mit Hilfe polyklonaler Antikörper markiert, mit Streptavidin-Peroxidase detektiert und durch die enzymatische Umwandlung von o-PD in einen photometrisch quantifizierbaren Farbstoff sichtbar gemacht. Der Versuch wurde in verschiedenen Ansätzen mit murinem (im eigenen Labor hergestellt) und humanem LBP (Xoma) durchgeführt. Der Versuchsablauf blieb dabei grundlegend unverändert.

Pufferlösungen:

Coating-Puffer: 100 mM Na₂CO₃; 20 mM EDTA; mit HCl auf pH 9,6 eingestellt

Inkubationspuffer (IK): 0,05 M HEPES; 0,15 M NaCl; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

Blockierungspuffer: IK mit 5 % BSA

Verdünnungs- und Waschpuffer: IK mit 0,1 % BSA

Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurden diese mit 100 µl LPS-Lösung je Vertiefung/„well“ (LPS *Salm. m.* 3 µg/ml in Coating-Puffer) für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal gründlich mit Aqua dest. gewaschen, über Nacht an der Luft getrocknet und dann bei Raumtemperatur gelagert. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Platte mit 200 µl Blockierungspuffer je well bei 37 °C im Schüttelinkubator für 30 Minuten inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten unter gleichen Bedingungen. Nach Ausklopfen der Flüssigkeit aus der Platte wurden die Peptide in 50 µl Verdünnungspuffer (bzw. 50 µl Verdünnungspuffer ohne Peptid als Kontrollreihe) in die wells pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des in Verdünnungspuffer auf eine Konzentration von 0,4 µg/ml (murin) bzw. 0,8 µg/ml (human) verdünnten LBP mit weiteren 50 µl pro well und erneute zwei-stündige Inkubation. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je zwei Minuten bei 37 °C wurde ein biotinylierter anti-m- bzw. anti-hLBP-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Carroll, XOMA Corp., Berkley, CA, USA) mit 0,5 µg/ml zugegeben und unter bereits beschriebenen Bedingungen für eine Stunde inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde die Platte für eine weitere Stunde mit Streptavidin-Peroxidase (1 µg/ml) inkubiert und erneut dreimal gewaschen, bevor 100 µl des Farbstoffes o-PD zugegeben wurden. Der Umsatz des Substrates in ein detektierbares Farbprodukt erfolgte unter lichtgeschützten Bedingungen und wurde mit 50 µl 2M Schwefelsäure gestoppt. Die Farbstoffkonzentration wurde abschließend bei 490 nm im ELISA-Reader (SpectraFluor Plus, Tecan) gemessen.

5 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Zellkulturbänken mit laminarer Strömung durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien bzw. Flüssigkeiten vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

5.1 Zell-Linie RAW 264.7

Die Zellen der adhärenenten Mausmakrophagen-Linie RAW 264.7 wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C unter 5 % CO₂ kultiviert. Konfluente Zellen wurden zur Passage mit PBS gewaschen und mit einer der Zellkulturflasche angepassten Menge 2,5 %-igem Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach dreiminütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Vorgang durch Zugabe von FCS-haltigem Medium beendet. Die Zellen wurden anschließend für 7 Minuten bei 167xG und 20 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in einer hierfür benötigten Menge Medium resuspendiert. Für die Stimulationsversuche wurden 2,5 Mio. Zellen pro ml in einer 96-Loch-Kulturplatte mit 100 µl je well ausgesät und bis zur Stimulation am nächsten Morgen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

5.2 Monozyten

Zur Isolation von humanen Monozyten wurde das periphervenös entnommene und heparinisierte Blut gesunder Probanden mit einer gleichen Menge auf 20 °C erwärmten RPMI Medium verdünnt. In 50 ml Plastikröhrchen wurden je 15 ml Pancoll (Lymphoprep) mit 30 ml des Blut-Medium-Gemisches überschichtet und bei 20 °C und 300xG (ohne Bremse) für 15 Minuten zentrifugiert. Im Trennmedium im unteren Teil des Gefäßes sammelten sich hierbei die Erythrozyten, das Serum verblieb darüber im oberen Gefäßbereich. Die Interphase zwischen Serum und Trennmedium, in der sich neben Granulozyten und Lymphozyten auch die Monozyten anreichern, wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein neues Röhrchen überführt und mit RPMI Medium auf 50 ml aufgefüllt. Zur Reinigung wurde die Zellsuspension zwei mal bei 300xG für 5 Minuten zentrifugiert, jeweils der Überstand dekantiert und die Zellen in

50 ml Medium resuspendiert. Eine dritte Zentrifugation für 15 Minuten bei 117xG diente der Entfernung verbliebener Thrombozyten, die mit dem Überstand verworfen wurden. Das Zellpellet wurde mit einer geringen Menge RPMI Medium erneut resuspendiert, die Zellen im Lichtmikroskop mittels Zählkammer gezählt und die Zellsuspension anschließend mit einer Menge Medium verdünnt, die eine Anzahl von ca. 2,7 Mio. Zellen pro ml ergab. Die Zellen wurden nun analog zu den RAW-Zellen in 96-Loch-Kulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Nicht adhärente Zellen, wie Granulo- und Lymphozyten, wurden vor Versuchsbeginn durch Waschen mit Medium entfernt.

5.3 Zellstimulation

Nach zweimaligem Waschen der Zellen und Entfernung des zum Waschen verwendeten Mediums (RPMI ohne weitere Zusätze) aus den Wells wurden in jede Vertiefung 50 µl eines mit 4 % FCS (RAW-Zellen) bzw. 4 % ABS (Monozyten) angereicherten RPMI-Mediums gegeben, was im Gesamtvolumen von 100 µl nach Zugabe des Stimulationsmediums eine Konzentration von 2 % FCS bzw. ABS ergab. Im Anschluss wurden je Well 50 µl eines Stimulationsmediums zugegeben, in dem zuvor 5 ng/ml LPS (*Salmonella minnesota* Re 595, Sigma) und verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Peptide bei 37 °C vorinkubiert wurden. Die Zellkulturplatten wurden nun für 4 bzw. 20 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend die Überstände der RAW-Zellen und Monozyten zur sofortigen Bestimmung von TNF- α - oder LDH-Konzentration nach jeweils 4 h bzw. für die Stickstoffoxid (NO)-Messung nach 20 h abgenommen und auf entsprechend vorbereitete Platten übertragen.

6 Toxizitätstest

LDH-Bestimmung: Zur Feststellung eventueller Toxizität der verwendeten Stimulanzen auf die Zellen wurden nach 4 Stunden Inkubation mit den maximal verwendeten Peptid- und LPS-Konzentrationen die Laktatdehydrogenase-Menge in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines kommerziellen Testkits (Cytotoxicity Detection Kit, Boehringer, Mannheim) ermittelt. Durch Extinktionsmessung der bei der Farbreaktion entstandenen Absorptionsunterschiede bei 492 nm wurde die LDH-Konzentration semiquantitativ be-

stimmt. Da LDH in allen Zellen vorkommt und nur bei Schädigung dieser in nennenswerten Mengen nach außen abgegeben wird, ist LDH ein guter Parameter für eine Zellschädigung.

7 Assays zur Ermittlung der Stärke der Zellstimulation

Das Ausmaß der Stimulierung der Zellen durch LPS bzw. die Abschwächung dieser Stimulation durch den Einsatz der Peptide wurde über die Bestimmung der Konzentration von TNF- α und Stickstoffoxid (NO) ermittelt.

7.1 NO-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Stickstoffoxid (NO) in den Kulturüberständen der RAW-Zellen wurde nach 20-stündiger Inkubation mit Hilfe eines Farbreaktionstests bestimmt. Hierzu wurde in der Platte durch serielle Verdünnung einer NO-haltigen Lösung bekannter Konzentration mit Kulturmedium eine Standardreihe (Doppelwerte) erstellt. In die übrigen Wells der Messplatte wurden die Kulturüberstände der Versuche überführt und anschließend in jedes well 50 μ l Griess-Reagent (SIGMA, Deisenhofen) zugegeben. Nach 15-minütiger Farbreaktion wurden die Extinktionen der Proben bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen und anhand der Standardkurve die NO-Konzentrationen in μ mol/l ermittelt.

7.2 TNF- α -ELISA

Die TNF- α -Konzentrationen in den Kulturüberständen der RAW-Zellen und Monozyten wurden mit Hilfe von „Sandwich-Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assays“ (Sandwich-ELISA) bestimmt. Hierzu wurden rekombinante Antikörper verwendet, von denen der jeweils erste zur Bindung selbst geringer TNF- α -Mengen an die ELISA-Platte dient, während der zweite, biotinylierte Antikörper den Nachweis des auf der Platte immobilisierten TNF- α erlaubt. An den zweiten Antikörper gebunden befindet sich Streptavidin (proportional zur vorhandenen TNF- α -Menge), an welches Streptavidin-Peroxidase gekoppelt wird. Das Enzym katalysiert die Umwandlung des Substrates Ortho-Penylen-

dihydrid-Dihydrochlorid (o-PD, Sigma) in einen photochemisch quantifizierbaren Farbstoff.

7.2.1 Bestimmung von murinem TNF- α

Pufferlösungen:

Waschpuffer: PBS, 0,05 % Tween20

Blockierungspuffer: PBS, 0,05 % Tween20, 10 % FCS

Die ELISA-Platten für die mTNF- α -Bestimmung wurden über Nacht bei 4 °C mit 3 μ g/ml anti-mTNF- α -Antikörpern (Pharmingen, Heidelberg) in 50 μ l Na₃PO₄ je well beschichtet. Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer die freien Bindungsstellen auf der Platte mit 200 μ l Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und anschließend die Platte erneut dreimal gewaschen. Durch serielle Verdünnung wurde in der Platte aus mTNF- α -Standards bekannter Konzentration (R&D Systems, Wiesbaden) eine Eichreihe in Doppelwerten erstellt und die Kulturüberstände der stimulierten RAW-Zellen 1:10 mit Blockierungspuffer verdünnt aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Platte viermal gewaschen und 100 μ l des biotinylierten Antikörpers (0,5 μ g/ml, Pharmingen) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und 5-maligem Waschen wurde der zweite Antikörper mit Hilfe von 100 μ l/well Streptavidin-Peroxidase (1 μ g/ml) während einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur detektiert. Unmittelbar nach weiteren 5 Waschschrritten wurde durch Zugabe des in Aqua dest. gelösten o-PD-Substates die Farbreaktion gestartet und je nach Farbtintensität nach 30 bis 60 Minuten durch Zugabe von 50 μ l 2M H₂SO₄ abgestoppt. Die Extinktion wurde im Anschluss bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen und die Konzentrationen anhand der Standardkurve ermittelt.

7.2.2 Ermittlung der hTNF- α -Konzentration

Pufferlösungen:

Waschpuffer: PBS, 0,05 % Tween20

Blockierungspuffer: PBS, 10 % FCS

Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte analog zum mTNF- α -ELISA über Nacht bei 4 °C mit 2 μ g/ml des ersten Antikörpers (Pharmingen), anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 μ l/well Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreifachem Waschen wurde eine Eichreihe durch serielle Verdünnung eines hTNF- α -Standards (Pharmingen) erstellt, in die restlichen wells die Proben der stimulierten Monozyten 1:2 mit Blockierungspuffer verdünnt von den Zellkulturplatten übertragen und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach vier Waschschritten wurden 100 μ l des biotinylierten 2. Antikörpers (Pharmingen) mit 2 μ g/ml für 45 Minuten zugegeben und die Platte danach fünfmal gewaschen. Im Anschluss wurde die Platte mit 100 μ l/well Streptavidin-Peroxidase (1 μ g/ml) weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten 5 Waschschrritten wurde die Farbreaktion wie bei der mTNF- α -Bestimmung beschrieben durchgeführt.

8 pp38- und pp42/44-Kinase-Assay

Pufferlösungen:

Lysispuffer: 20 mM Tris Acetat [pH 7,5], 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na-o-Vandat, 10 mM Na₂-o-Glycerophosphat, 50 mM NaF, 5 mM Na-Pyrophosphat, 1 % Triton X-100, 1 mM Benzamidin, 0,27 M Saccharose, 1 mM PMSF und 20 μ M Leupeptin

Loadingpuffer: 200 mM Tris-HCl [pH 6,8], 400 mM DTT, 8 % SDS, 40 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau

Laufpuffer: 25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS

Transpuffer: 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycerol, 20 % Methanol

Waschpuffer: PBS, 0,1 % Tween20

Blockierungspuffer/ Verdünnungspuffer: PBS, 0,1 % Tween20, 5 % Trockenmilchpulver

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, 100 mM Mercaptoethanol, 2 % SDS

8.1 Zellstimulation und Proteingewinnung

Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der p38- und p42/44-Kinasen in RAW-Zell-Lysaten wurden für beide Versuche jeweils die RAW 264.7 Zellen mit 2,5 Mio. Zellen pro ml in 12-well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 eine dreistündige Inkubation in FCS-freiem Medium (RPMI) und anschließend die Stimulation mit LPS (*E. coli* 0111 B4) in RPMI mit 2 % FCS. Bestimmte LPS-Verdünnungen wurden vor der Stimulation mit den zu untersuchenden Peptiden für 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Nach 20-minütiger Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (1 mM Na-o-Vandat) gewaschen. Zur Gewinnung der Zelllysatüberstände wurden die Zellen für 15 Minuten mit 50 µl Lysispuffer bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und die Zellsuspension für 30 Minuten bei 217xG zentrifugiert. Die Überstände, in denen u.a. die nukleären Proteine enthalten sind, wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und dabei aliquotiert. In jeweils einer Probenportion pro Well wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (Bio-Rad-Protein-Assay, Bio Rad, München) mittels Extinktionsmessung bei 595 nm und Konzentrationsberechnung anhand einer Eichreihe bestimmt. Die restlichen Probenportionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.2 p42/44-Kinase-Assay

Die Bestimmung der Aktivierung der p42/44-MAP-Kinasen in den RAW-Zelllysatüberständen erfolgte mittels modifiziertem p42/44-Kinase-Assay (Kit von Amersham Life Science, Buckinghamshire, England). Durch Stimulation über ligandenbindende Rezeptoren aktivierte p42/44-Kinasen katalysieren den Transfer der γ -phospho-Gruppe von ATP auf die Threonin-Gruppe spezifischer Proteine der Zelle. Im Amersham-Kinase-Assay wird radioaktives ³²P von [³²P]-ATP selektiv und im gemessenen Bereich linear zur Kinasen-Aktivität auf ein synthetisches Peptid übertragen. Hierzu wurden 5 µg der Proteinproben und zwei Kontrollansätze ohne Protein ad 15 µl Lysispuffer mit 10 µl Peptid-Substratlösung kurz zentrifugiert und danach durch Zugabe von 5 µl ATP-Mix zu jedem Ansatz die Reaktion gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C

wurden jeweils 10 µl Stopplösung zugegeben und die Ansätze nochmals kurz zentrifugiert. Anschließend wurden je 30 µl der Lösungen auf Peptid-bindendes Filterpapier getropft, kurz antrocknen gelassen und dann das Papier erst zweimal für 2 Minuten in 1 %-igem Essigwasser und danach zweimal für zwei Minuten in Aqua dest. gewaschen, um nicht-peptidgebundenen 32 P zu entfernen. Die feuchten Filterpapierplättchen wurden nun in zuvor mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllte Messröhrchen gegeben und die Menge des gebundenen 32 P per Szintillationszählung in counts per minute gemessen.

8.3 Elektrophorese und p38/pp38-Western-Blot

Die Bestimmung der Phosphorylierung der p38-Kinasen erfolgte mittels Elektrophorese und Western-Blot-Technik. Je 30 µg der Proteinproben und eine Markerprobe wurden in Loadingpuffer für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend mit Laufpuffer in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dann wurde das Gel kurz mit Methanol gespült und zusammen mit einer mit Methanol benetzten Hybond-C-Membran (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) für 10 Minuten in einem Transpuffer inkubiert und danach beide für 90 Minuten in eine Blotting-Apperatur (Hözel GmbH, Dörfen) gegeben und die Proben bei 12-14 V vom Gel auf die Membran übertragen.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer blockiert. Im Anschluss wurde nach drei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer ein 1:1000 in Verdünnungspuffer verdünnter Kaninchen-anti-Phospho-p38-Antikörper (Biolabs) zugegeben, bei 4 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen nach erneuten drei Waschschritten der erste Antikörper mit Hilfe eines zweiten, peroxidase-konjugierten und 1:10000 in Verdünnungspuffer verdünnten anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (Sigma, Deisenhofen) durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur detektiert. Nach erneuten drei Waschschritten (2x mit Waschpuffer, 1x mit PBS) wurde nun die Membran mit einem ECL-Lösungssystem (Amersham Life Science) nach den Angaben des Herstellers behandelt und anschließend damit ein Hyperfilm-ECL-Film belichtet.

Als Ladekontrolle wurden danach auf der selben Membran die p38-Kinasen semiquantitativ ermittelt. Hierzu wurde nach Auswaschen der Antikörper mit Stripping-Puffer für 20

Minuten bei 50 °C ein p38-Western-Blot in Analogie zur pp38-Bestimmung durchgeführt.

9 Statistische Auswertung

Die in den Abbildungen 6 bis 13 dargestellten Ergebnisse entsprechen – wenn nicht anders angegeben – den Mittelwerten und Standardabweichungen von 4-fach-Ansätzen eines repräsentativen Versuches von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils nahezu identischen Ergebnissen. Die Berechnung erfolgte mittels Excel 2000 (Version 9.0, Microsoft Corp. Redmont, Ca. USA).

III. Ergebnisse

1 Peptid-LBP-Kompetition an immobilisiertem LPS

LBP katalysiert den Transfer von LPS-Monomeren aus LPS-Aggregaten zu den endotoxinerkennenden Rezeptoren von Zellen. Um zu prüfen, ob die von LALF abgeleiteten Peptide spezifisch mit LBP um die gleiche Bindungsstelle am LPS-Molekül konkurrieren, wurde deren Konkurrenz um die Bindung an immobilisiertem LPS untersucht. Dieser Versuch wurde in Form eines Bindungsassays für m- und hLBP mit leichten Modifikationen eines im Labor etablierten ELISA-Protokolls für mLBP durchgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurde LBP hier in einer festgelegten Konzentration eingesetzt, um so indirekt die Peptide auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, die Bindung von LBP an LPS zu beeinträchtigen. Die Peptide wurden in Verdünnungsreihen von 5 bis 100 µg/ml für 30 Minuten bei 37 °C in LPS-beschichteten Mikrotiterplatten vorinkubiert und anschließend LBP in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml (murin) bzw. 0,4 µg/ml (human) zugegeben. Die Platten wurden dann für weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, gewaschen und anschließend das in Konkurrenz zu den Peptiden an LPS gebundene LBP mit biotinylierten Antikörpern detektiert. Als Kontrolle wurde jedes Peptid nochmals ohne LBP untersucht und in gleicher Weise behandelt wie die mit LBP inkubierten Proben. Weiterhin wurden zur Quantifizierung des Konkurrenzeffekts LBP-Proben ohne Peptid inkubiert.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, zeigen die Peptide LALF 38-45, LALF 36-47 und LALF 36-47p39-p43 eine konzentrationsabhängige Verdrängung des mLBP vom immobilisierten LPS, während DB1 keine Aktivität in diesen Assay aufwies. Es ist zu sehen, dass die Peptide LALF 36-47 und LALF 36-47p43 die verhältnismäßig stärkste Aktivität bei der Bindung von LPS zeigten. Sie vermindern die Bindung von mLBP um 78,5 % bzw. 66,9 %.

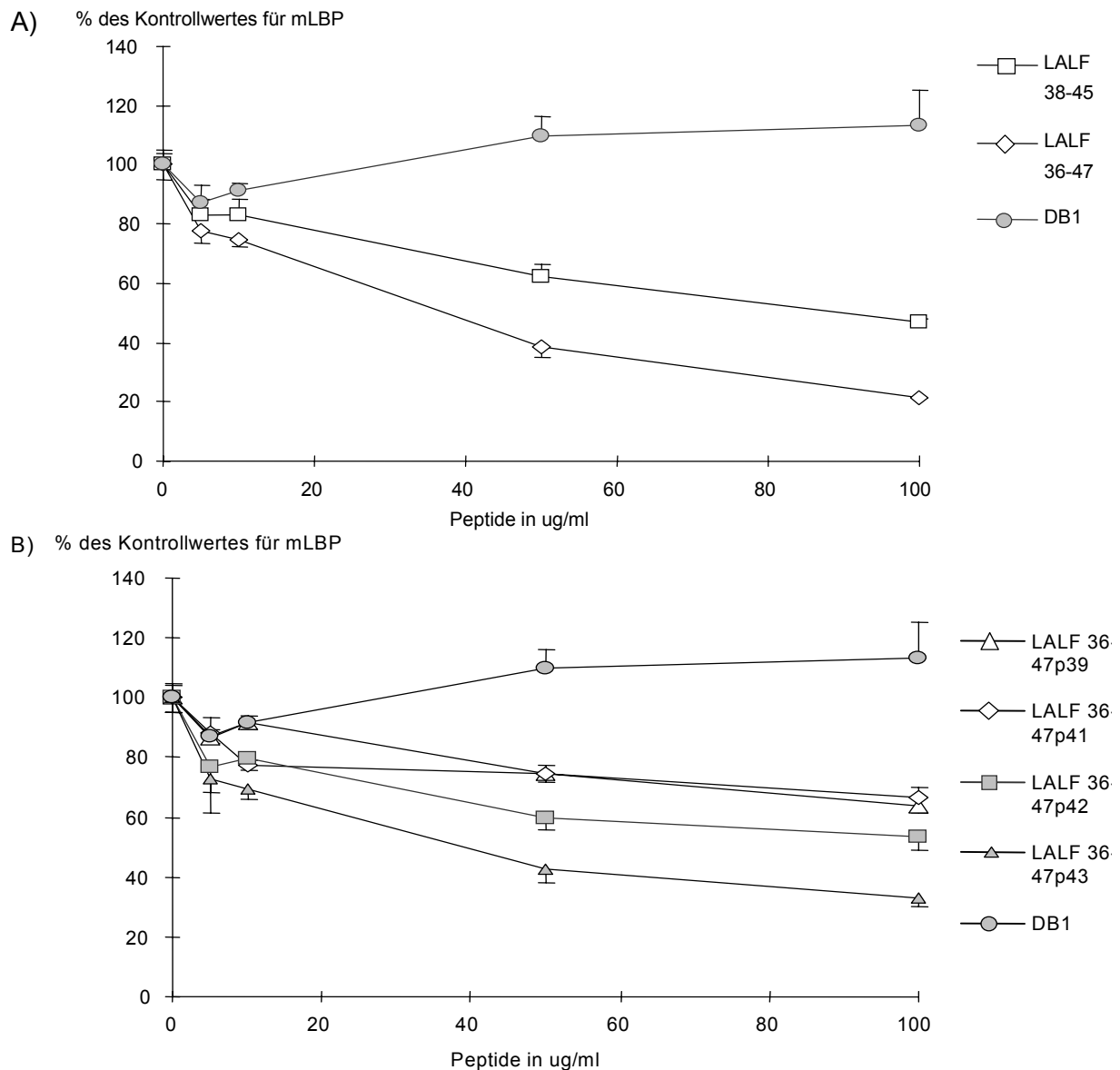
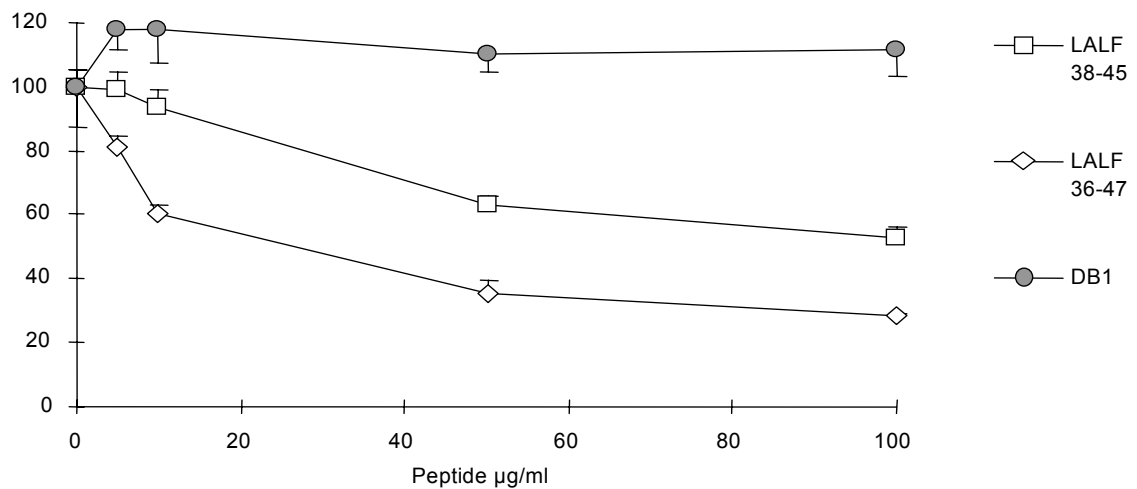


Abbildung 6: Beeinflussung der Bindung von LBP an immobilisiertes LPS durch die untersuchten Peptide. Peptide steigender Konzentration wurden in LPS-beschichteten Mikotiterplatten für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 0,2 µg/ml mLBP zugegeben und beides für weitere 2 h inkubiert. In Konkurrenz zu den Peptiden gebundenes LBP wurde mit einem polyklonalen anti-LBP-Antikörper und einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Als Kontrolle wurde mLBP ohne Peptid verwendet und gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5-fach-Werten, in Abbildung A) für die Peptide LALF 38-45, LALF 36-47 und DB1 und in Abbildung B) für LALF 36-47p39, -p41, -p42, -p43 und DB1.

Ähnliche Resultate zeigt Abbildung 7 für die Konkurrenz der Peptide mit hLBP. Auch hier blockierten die verschiedenen Peptide in höheren Konzentrationen in unterschiedlich starkem Ausmaß die Bindung von LBP an LPS. Am wirksamsten war auch hier LALF 36-47, welches die LPS-LBP-Interaktion um 71,5 % reduziert. Das Peptid DB1 zeigte auch in diesem Ansatz keinerlei LPS-bindende Aktivität, hier erreichte LBP seine volle Bindungskapazität an das LPS.

A) % des Kontrollwertes für hLBP



B) % des Kontrollwertes für hLBP

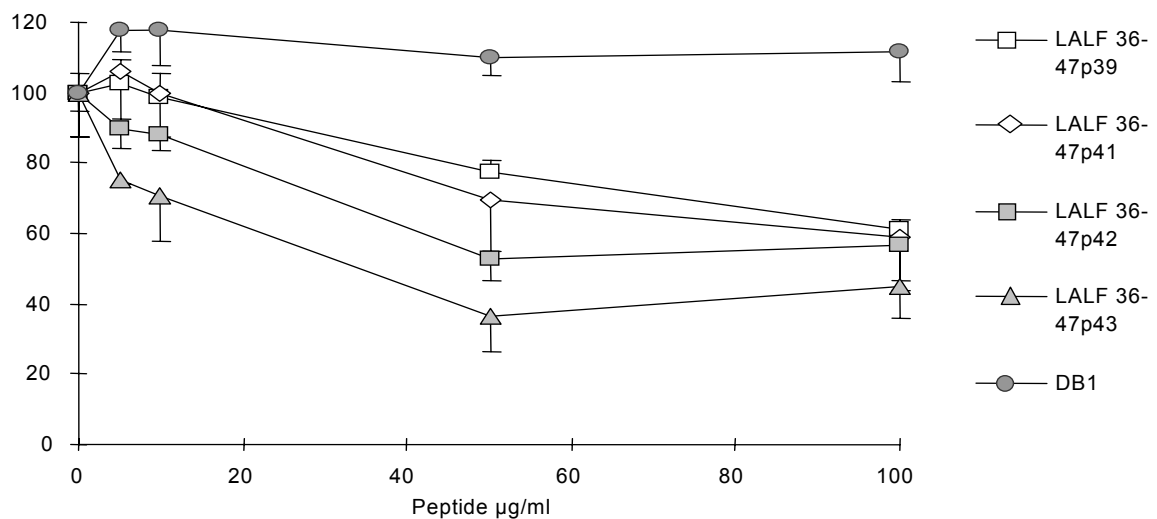


Abbildung 7: In Konkurrenz zu den Peptiden an immobilisiertes LPS gebundenes LBP. Analog zu Abb. 6 wurden Verdünnungsreihen der Peptide in LPS-beschichteten Mikrotiterplatten für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,4 µg/ml hLBP erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h. In Konkurrenz zu den Peptiden an LPS gebundenes hLBP wurde mit einem hLBP-Antiserum detektiert und mittels Farb-reaktion nachgewiesen. Als Vergleich wurde LBP ohne Peptid inkubiert und der Mittelwert gleich 100% gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte von 5-fach-Ansätzen für die Peptide LALF 38-45, LALF 36-47 und DB1 in Abbildung A) und für LALF 36-47p39-p43 und DB1 in Abbildung B).

Die Werte der nur mit Peptid ohne LBP-Zusatz inkubierten Proben lagen um den Leerwert, was eine Bindung der Antikörper an die Peptide ausschließt (Ergebnisse nicht abgebildet).

2 Einfluss der Peptide auf die Stimulation von RAW Zellen und Monozyten

Zellen der murinen Makrophagenlinie RAW 264.7 reagieren auf die Stimulation durch LPS u.a. mit der Ausschüttung von TNF- α und NO. Humane Monozyten lassen sich ebenfalls durch LPS zu einer TNF- α -Synthese stimulieren, sie produzieren jedoch keine im Versuchsaufbau nachweisbaren Mengen an Stickstoffoxid (NO). Im Folgenden wurde der Einfluss der synthetisierten Peptide auf die Stimulation der RAW-Zellen und Monozyten durch LPS anhand der gebildeten TNF- α - bzw. NO-Menge untersucht. Für den Versuch wurden die Zellen mit 5 ng/ml LPS stimuliert, das z.T. zuvor mit steigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Peptide für 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wurde. Die Zellen wurden mit LPS bzw. den LPS-Peptid-Gemischen für 4 Stunden inkubiert, die Zellkulturüberstände abgenommen und anschließend die h- bzw. mTNF- α -Konzentration darin mittels ELISA ermittelt. Zur NO-Konzentrationsbestimmung wurden die Kulturüberstände der RAW-Zellen nach 20-stündiger Inkubation abgenommen und die gebildete NO-Menge mit Hilfe einer Farbreaktion quantifiziert. Zusätzlich zu den im LPS-Assay verwendeten Peptiden wurden für die Zellversuche von den beiden im LPS-Assay effektivsten Peptiden (LALF 36-47 und LALF 36-47p43) zwei komplett aus D-Aminosäuren bestehende Äquivalente synthetisiert.

2.1 Hemmung der LPS-induzierten TNF- α -Synthese bei RAW Zellen

Bei den RAW 264.7-Zellen lag die TNF- α -Konzentration des Kontrollansatzes ohne Peptid durchschnittlich bei 5,2 ng/ml. Da die Absolutwerte jedoch z.T. von Versuchsansatz zu Versuchsansatz variierten, wurden im Folgenden die jeweiligen Mittelwerte der nur mit LPS stimulierten Zellen gleich 100 % gesetzt und die übrigen Werte in Bezug auf diesen Wert ebenfalls in %-Zahlen umgerechnet. Soweit es nicht anders angegeben ist, gilt dies für alle folgenden Versuche. Die Zugabe der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43, D-LALF 36-47p43, LALF 36-47p39, LALF 36-47p41 und LALF 36-47p42 zu LPS führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der mTNF- α -Produktion (Abbildung 8). Zwischen den verschiedenen Peptiden konnten jedoch große Unterschiede bezüglich ihres LPS-neutralisierenden Potentials festgestellt werden. Bereits bei Zugabe von 1 μ g/ml der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 kommt es zu einer deutlichen Verminderung der gebildeten TNF- α -

Menge um 28,4 % (LALF 36-47), 35,6 % (D-LALF 36-47) bzw. 38,7 % (D-LALF 36-47p43) (Abbildung 8A). Diese Reduktion ließ sich durch Zugabe höherer Peptid-Mengen noch erheblich verstärken. Bei der höchsten verwendeten Peptidkonzentration von 20 µg/ml, in der neben den oben genannten auch die restlichen Peptide eingesetzt wurden (Abbildung 8B), liegt die TNF- α -Konzentration nur noch bei 12,1 % (D-LALF 36-47) bis 75,7 % (LALF 36-47p39) der ursprünglichen Menge. Für die Peptide DB1 und DB2 hingegen weichen die TNF- α -Werte nicht relevant vom Kontrollwert ab. Das ganz aus D-Aminosäuren bestehende Peptid D-LALF 36-47 zeigte in diesem Assay die stärkste Aktivität. Die bereits hohe Fähigkeit des Peptids LALF 36-47, die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung zu blockieren, wurde durch die Verwendung von D-Aminosäuren noch erheblich gesteigert.

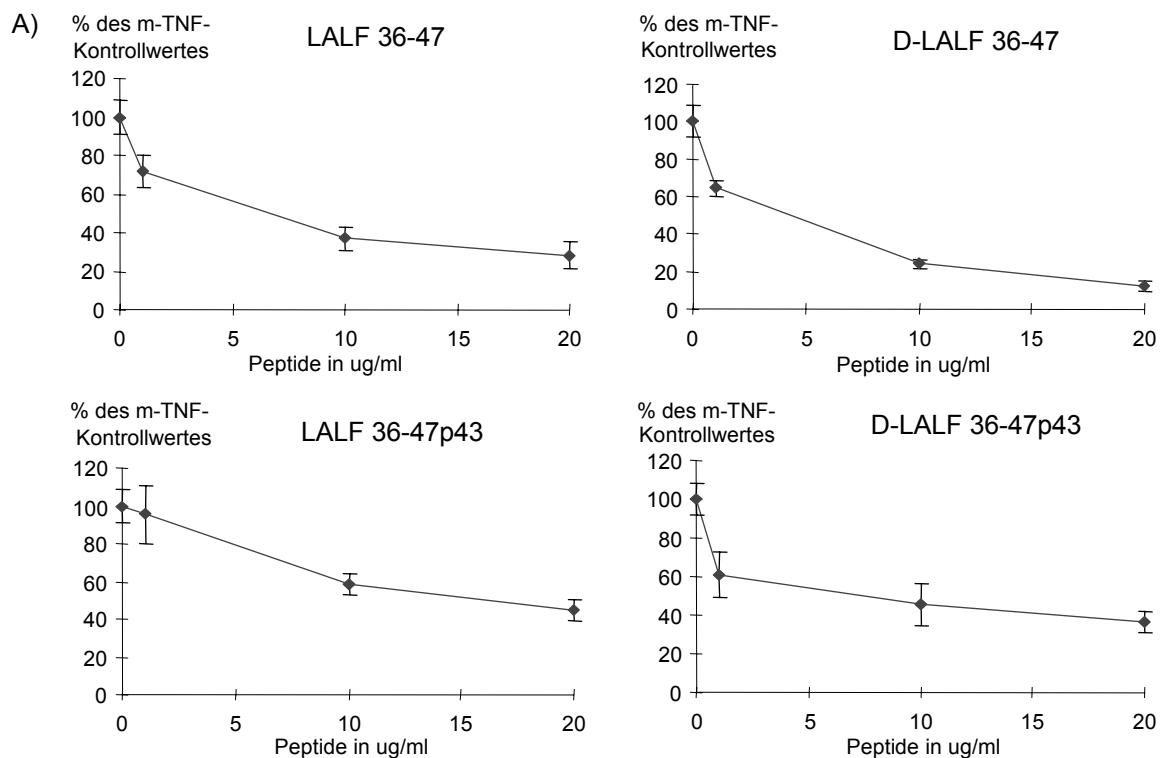


Abbildung 8 A: Einfluss der zyklischen Peptide auf die TNF- α -Sekretion von RAW Zellen. RAW 264.7 Zellen wurden mit zuvor für 5 min vorinkubierten LPS-Peptid-Gemischen verschiedener Peptidkonzentration der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43 und D-LALF 36-47p43 oder LPS (5 ng/ml) allein in Gegenwart von 2 % FCS stimuliert. Nach 4 h wurde die mTNF- α -Konzentration in den Überständen mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4-fach-Werten eines repräsentativen Versuches, der insgesamt dreimal mit nahezu identischen Ergebnissen wiederholt wurde. Der Mittelwert der nur mit LPS stimulierten Zellen wurde als Kontrollwert gleich 100 % gesetzt.

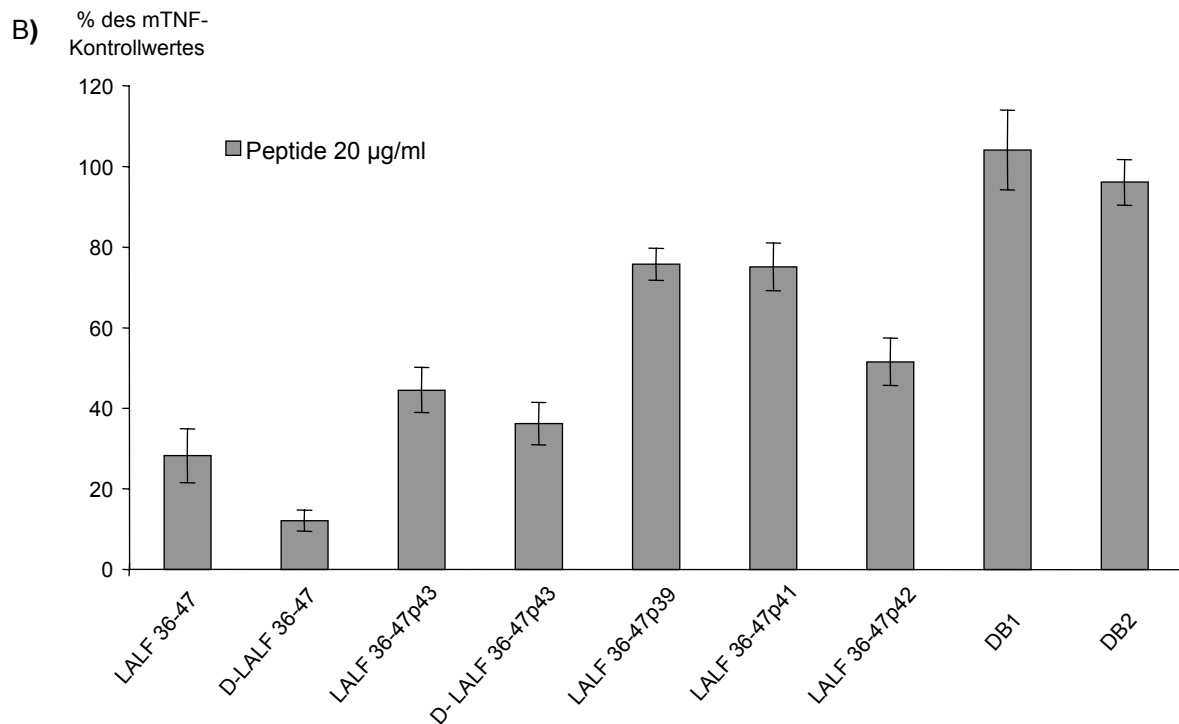


Abbildung 8 B: Einfluss der zyklischen Peptide auf die TNF- α -Sekretion von RAW Zellen. RAW 264.7 Zellen wurden mit zuvor für 5 min vorinkubierten LPS-Peptid-Gemischen (LPS 5 ng/ml, Peptide 20 μ g/ml) oder LPS allein in Gegenwart von 2 % FCS stimuliert. Auswertung und Darstellung erfolgte wie in Abb.8 A beschrieben.

2.2 Beeinflussung der NO-Synthese LPS stimulierter RAW Zellen

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, zeigte sich bei der NO-Produktion der RAW-Zellen eine ähnliche Effektivitätsverteilung der verschiedenen Peptide wie bei der TNF- α -Reduktion. Die NO-Werte der Kontrollstimulation ohne Peptid schwanken hier um 14,5 μ mol/l. Die Peptide D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 vermochten bei einer Konzentration von 20 μ g/ml die NO-Ausschüttung um 92,7 % bzw. 87,6 % zu senken. Auch die Peptide LALF 36-47 und LALF 36-47p43 waren in der Lage die NO-Konzentration um 76,6 % und 63,4 % zu reduzieren, allerdings ist ihr Effekt, ebenso wie der der Peptide LALF 36-47p39, -p41 und -p42 schwächer als bei den D-Peptiden. DB1 und DB2 zeigten auch hier keine erkennbare Hemmung der Zellstimulation durch LPS. Aktivstes Peptid in der NO-Blockade war erneut D-LALF 36-47, das bereits bei einer Konzentration von lediglich 1 μ g/ml die LPS-induzierte NO-Synthese um über 50 % blockieren konnte (Abbildung 9A).

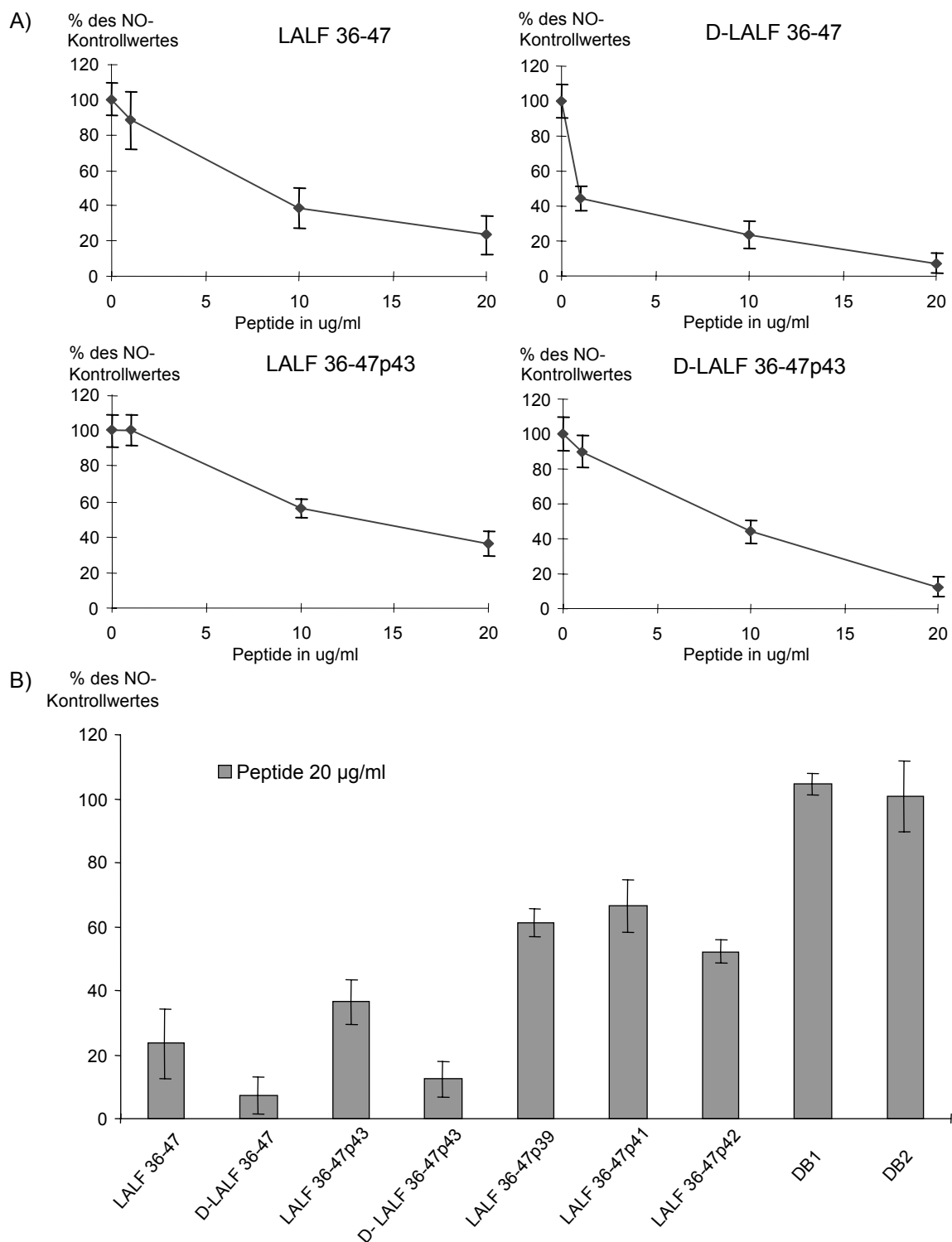


Abbildung 9: Einfluss der zyklischen Peptide auf die NO-Ausschüttung LPS-stimulierter RAW Zellen. RAW 264.7-Zellen wurden mit zuvor für 5 min mit den Peptide vorinkubiertem LPS (5ng/ml) stimuliert. Die NO-Konzentration in den Überständen wurde mittels Farbreaktion nach Griess bestimmt und der Mittelwert der nur mit LPS stimulierter Zellen gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse wurden in 4-fach-Werten in drei unabhängigen Versuchen für jedes Peptid ermittelt. Die abgebildeten Werte (Mittelwert und Standardabweichung) entsprechen einem repräsentativen Versuch. A) Hemmung der LPS-vermittelten NO-Ausschüttung durch steigende Konzentrationen der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43 und D-LALF 36-47p43 bei RAW-Zellen. B) Unterschiede der NO-Freisetzung LPS-stimulierter RAW-Zellen durch Zugabe von 20 µg/ml der LPS-bindenden Peptide.

2.3 Einfluss der Peptide auf die TNF- α -Freisetzung LPS-stimulierter humaner Monozyten

Nachdem für die als sehr LPS-sensitiv bekannte murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 sehr eindrucksvolle Ergebnisse für die untersuchten Peptide erzielt worden waren, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau für frisch isolierte humane Monozyten entwickelt. Aus dem Blut freiwilliger Spender isolierte Monozyten wurden in Gegenwart von 2 % AB-Serum mit LPS, welches zuvor mit den hier untersuchten Peptiden vorinkubiert war, zur TNF- α -Synthese angeregt. Auch in diesem Versuch war die LPS-neutralisierende Wirkung der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43 und D-LALF 36-47p43 am stärksten (Abbildung 10). Alle vier Peptide hemmten bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ die hTNF- α -Ausschüttung der Monozyten in ähnlich starkem Ausmaß (LALF 36-47 um 86,9 %, D-LALF 36-47 um 98,3 %, LALF 36-47p43 um 93,7 % und D-LALF 36-47p43 um 97,7 %). Die Peptide LALF 36-47p39-p42 zeigten zwar ebenfalls eine leichte Reduktion der TNF- α -Werte in den Überständen, jedoch war diese wesentlich schwächer ausgeprägt als die der vorgenannten Peptide. Für die Peptide DB1 und DB2 liegen die Werte auch in diesem Versuch um den Kontrollwert, der durchschnittlich ca. 4,6 ng/ml betrug. Die Diskrepanz zwischen den hochaktiven Peptiden LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43 und D-LALF 36-47p43 auf der einen Seite und den weniger aktiven restlichen Peptide auf der anderen erscheint im Versuch mit humanen Monozyten deutlich stärker ausgeprägt als bei Verwendung der murinen Zelllinie. Die D-Peptide scheinen hier lediglich bei Verwendung der höchsten Konzentrationen eine Aktivitätssteigerung gegenüber den Peptiden aus L-Aminosäuren zu bieten.

Da der Verlauf der Messwerte bei steigender Konzentration der Peptide bis zu 20 $\mu\text{g/ml}$ auch bei noch höheren Konzentrationen keinen wesentlich stärkeren Hemmeffekt mehr erwarten lässt und eine probeweise durchgeführte Erhöhung der Konzentration der Peptide D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 auf 500 $\mu\text{g/ml}$ keine weitere relevante Senkung der synthetisierten TNF- α -Menge mehr zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde für die folgenden Zellversuche eine Maximalkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ als ausreichend erachtet.

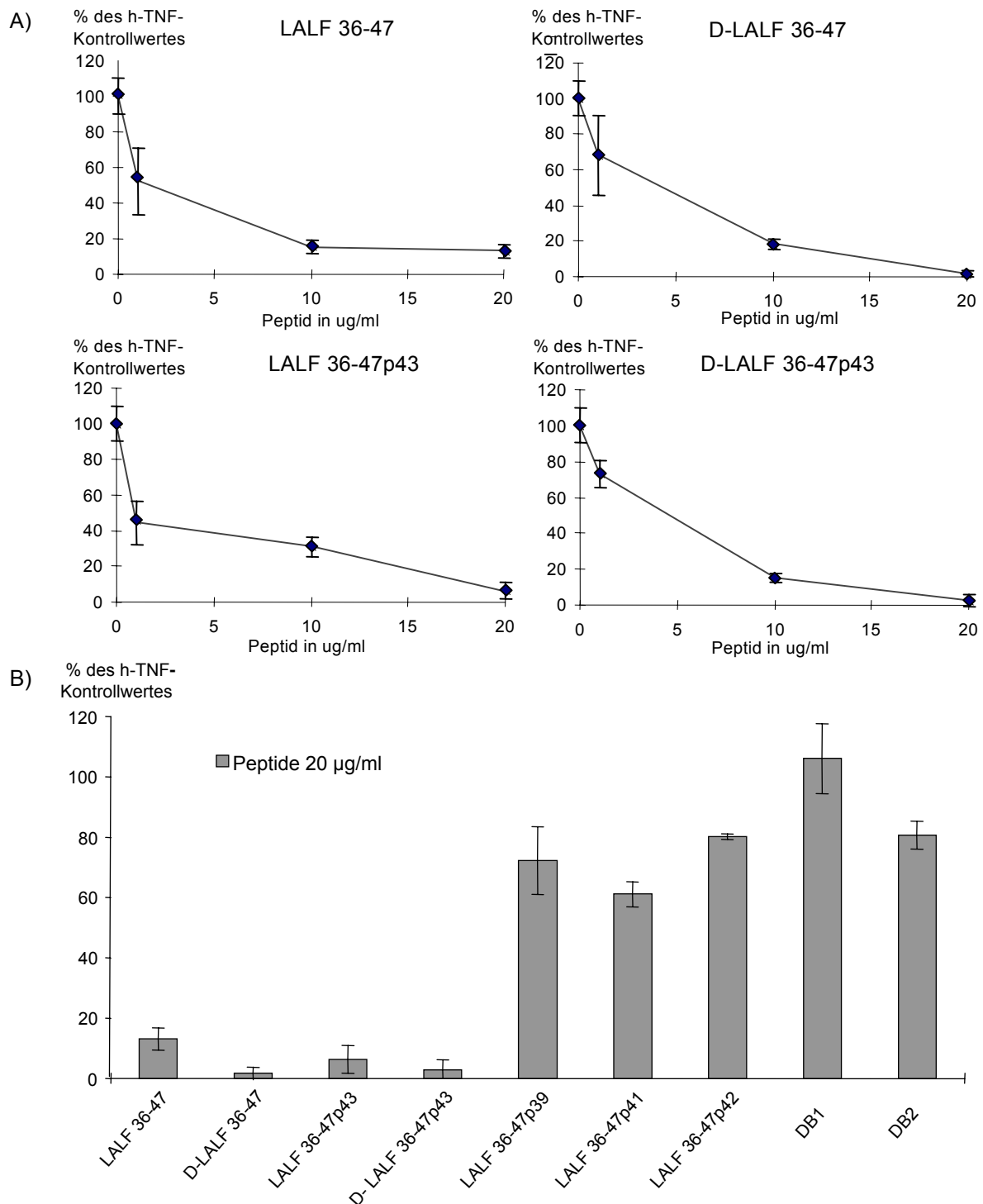


Abbildung 10: Einfluss der zyklischen Peptide auf die TNF- α -Synthese mit LPS stimulierter humaner Monozyten. Die Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen nach 5-minütiger Vorinkubation mit 5 ng/ml LPS (ABS 2 %) humanen Monozyten zugesetzt. Die Bestimmung der TNF- α -Ausschüttung erfolgte nach 4 h Stimulation mittels ELISA. Nur mit LPS stimulierte Zellen dienen als Kontrolle, deren mittlere TNF- α -Ausschüttung gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Die Ergebnisse wurden in 4-fach-Werten in drei unabhängigen Versuchen für jedes Peptid ermittelt, die abgebildeten Werte entsprechen einem repräsentativen Versuch. A) Inhibition der LPS-vermittelten TNF- α -Ausschüttung durch steigende Konzentrationen der Peptide LALF 36-47, D-LALF 36-47, LALF 36-47p43 und D-LALF 36-47p43 bei humanen Monozyten. B) Unterschiede der TNF- α -Freisetzung LPS-stimulierter humaner Monozyten durch Zugabe von 20µg/ml der LPS-bindenden Peptide.

Um auszuschließen, dass die Peptide selbst einen stimulierenden Einfluss auf die Zellen haben, wurden alle Peptide zum Vergleich in einer Konzentration von 20 µg/ml ohne LPS mit den Zellen inkubiert. Hierbei ergaben sich in allen Fällen Werte, die um den Wert von unstimulierten Zellen lagen (Daten nicht gezeigt). Ein eigenstimulatorischer Effekt ist somit auszuschließen.

3 Einfluss der Inkubationsdauer von LPS und Peptiden auf die TNF- α -Ausschüttung humaner Monozyten

In den bisherigen Versuchen wurden die verwendeten Peptide jeweils für 5 Minuten mit LPS vorinkubiert. Um zu untersuchen, ob eine längere Vorinkubation die Hemmung der LPS-Wirkung verstärken konnte, wurde im folgenden Versuch die Dauer der Inkubation der Peptide mit LPS variiert. LPS wurde in einer Konzentration von 5 ng/ml entweder zeitgleich mit den Peptiden D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 oder nach einer Vorinkubation mit diesen Peptiden von 5, 30 oder 120 Minuten Dauer zu den Monozyten zugegeben und die Stimulation der Zellen anhand der TNF- α -Freisetzung ermittelt (Abbildung 11). Die Peptide wurden in Konzentrationen von 1, 10 und 20 µg/ml verwendet. Als Vergleich wurden die Zellen mit 5 ng/ml LPS ohne Peptidzusatz stimuliert. Wurden LPS und Peptid ohne Vorinkubation den Monozyten zugefügt, ergab sich eine Reduktion der gebildeten TNF- α -Menge um maximal 56,7 % für D-LALF 36-47 und 32,7 % für D-LALF 36-47p43. Bereits bei einer 5-minütigen Vorinkubation sank die TNF- α -Ausschüttung für 20 µg/ml Peptid fast bis auf die Ausgangswerte unstimulierter Zellen ab und führte auch bei 10 µg/ml Peptid zu einer 81,7 %-igen (D-LALF 36-47) bzw. 85,7 %-igen (D-LALF 36-47p43) LPS-Neutralisation. Bei 30-minütiger Vorinkubation zeigt sich nur für die 1 µg/ml-Werte und bei 10 µg/ml D-LALF 36-47 noch eine weitere Reduktion der TNF- α -Menge. Eine längere Vorinkubation über 30 min hinaus brachte keine weiteren Vorteile.

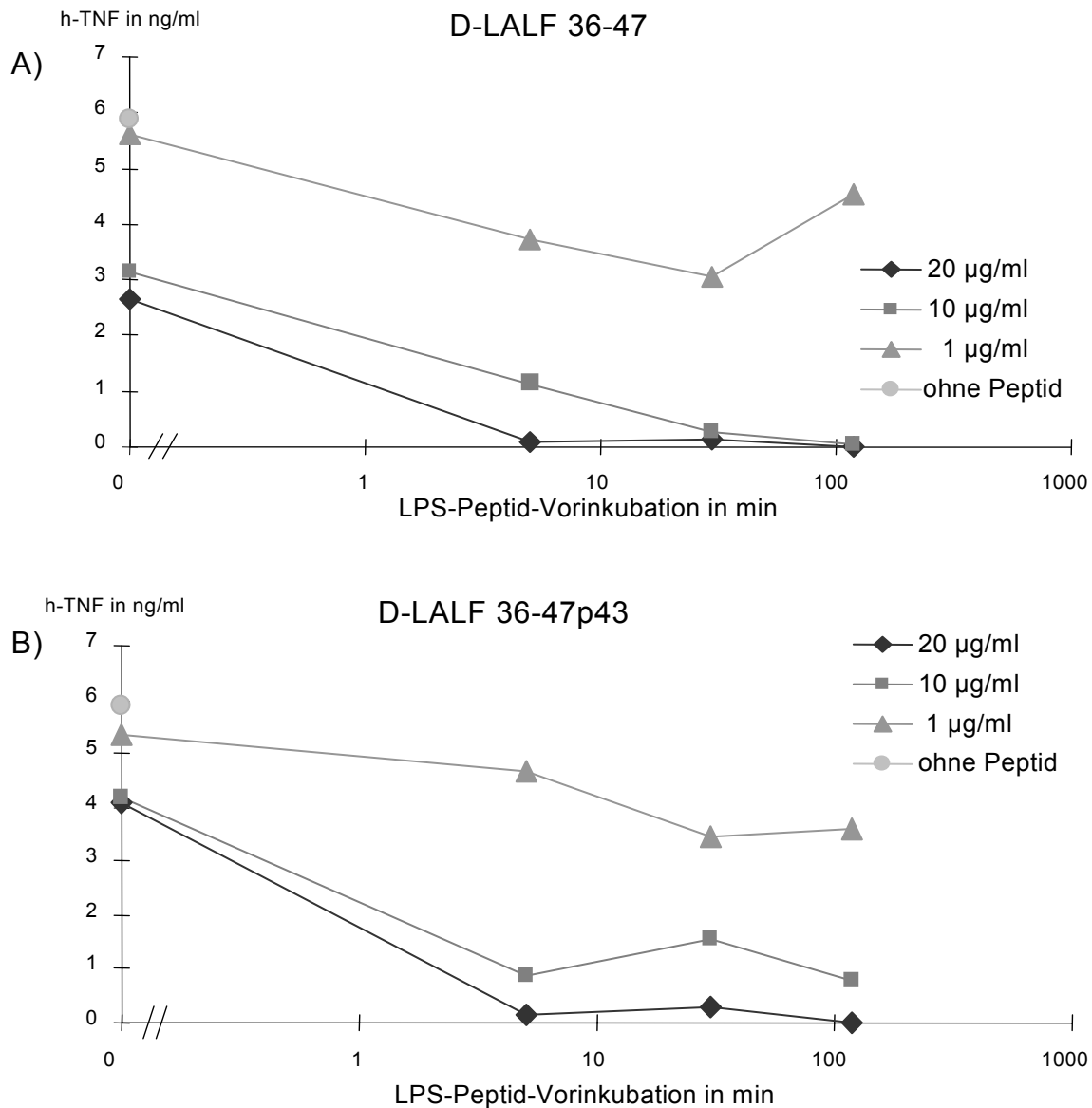


Abbildung 11: Einfluss der Vorinkubation der Peptide mit LPS auf die TNF- α -Ausschüttung humaner Monozyten. LPS-Peptidgemische mit 5 ng/ml LPS und steigender Konzentration der Peptide D-LALF 36-47 (A) und D-LALF 36-47p43 (B) wurden bei 37 °C für 120, 30 und 5 min vorinkubiert. Anschließend wurden humane Monozyten für 4h mit den Gemischen bzw. mit nicht vorinkubiertem LPS und Peptid oder mit LPS allein stimuliert. Die Werte ohne Peptid dienen als Kontrolle. Nach der Stimulation wurde die TNF- α -Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen (n=4).

4 Ausschluss toxischer Effekte der untersuchten Peptide auf die RAW-Zellen bzw. Monozyten

Da in den vorangegangenen Versuchen inhibitorische Aktivitäten der untersuchten Peptide auf die Stimulation von humanen Monozyten und RAW 246.7 Zellen durch LPS untersucht wurden, musste geklärt werden, ob die Reduktion der TNF- α - und NO-Frei-

setzung durch vermehrten Zelluntergang bedingt sein könnte. Hierzu wurde die LDH-Konzentration in den Zellkulturüberständen der stimulierten Zellen bestimmt und speziell die Werte unstimulierter bzw. nur mit LPS stimulierter Zellen mit den Werten der Zellen verglichen, denen die höchsten verwendeten Konzentrationen (10 und 20 µg/ml) der in den vorangegangenen Versuchen effektivsten Peptide zugegeben wurden. Anhand der gemessenen LDH-Konzentrationen waren keine zytotoxischen Wirkungen festzustellen (Daten nicht abgebildet). Die gemessenen LDH-Konzentrationen zeigten keinen Zusammenhang mit der TNF- α - oder NO-Ausschüttung, womit ein vermehrter Zelluntergang als Ursache für die beobachteten Effekte der Peptide auf die synthetisierte TNF- α - bzw. NO-Menge ausgeschlossen werden konnten.

5 Einfluss einzelner Peptide auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38- und p42/44-MAP Kinasen von RAW Zellen

Um zu untermauern, dass die vorangehend beschriebene Differenz der TNF- α - bzw. NO-Ausschüttungen tatsächlich auf einer verringerten Aktivierung der Zellen durch LPS basiert, wurde im Folgenden die Beeinflussung der Aktivität der p38- und p42/44-Kinasen, zweier zentraler Signalübertragungsmoleküle bei der LPS-Stimulation, durch LPS allein bzw. durch exemplarisch mit den Peptiden LALF 38-45, LALF 36-47 und LALF 36-47p41 vorinkubiertem LPS untersucht. Die Aktivierung der MAP-Kinasen wurde mittels spezifischer Assays in den nukleären Überständen stimulierter und anschließend lysierter RAW 246.7 Zellen bestimmt. Hierfür wurden die RAW-Zellen entweder mit 10 ng/ml LPS allein oder mit vorinkubierten LPS-Peptidmischungen (LPS 10 ng/ml, Peptide 20 und 1 µg/ml) stimuliert. Zur Kontrolle wurden RAW-Zellen in Medium ohne Stimulanzen inkubiert.

5.1 p42/44-MAP-Kinase-Assay

Abbildung 12 zeigt die Aktivität der p42/44-MAP-Kinasen in LPS-stimulierten RAW-Zellen ohne und mit Zugabe der LALF-Peptide 38-45, 36-47 und 36-47p41 in zwei Konzentrationen. Es ist zu erkennen, dass eine geringe Peptidkonzentration von 1 µg/ml fast keinen Einfluss auf die Aktivität der MAP-Kinasen hat. Bei hohen Peptid-

konzentrationen (20 µg/ml) zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion der LPS-induzierten p42/44-Kinase-Aktivität.

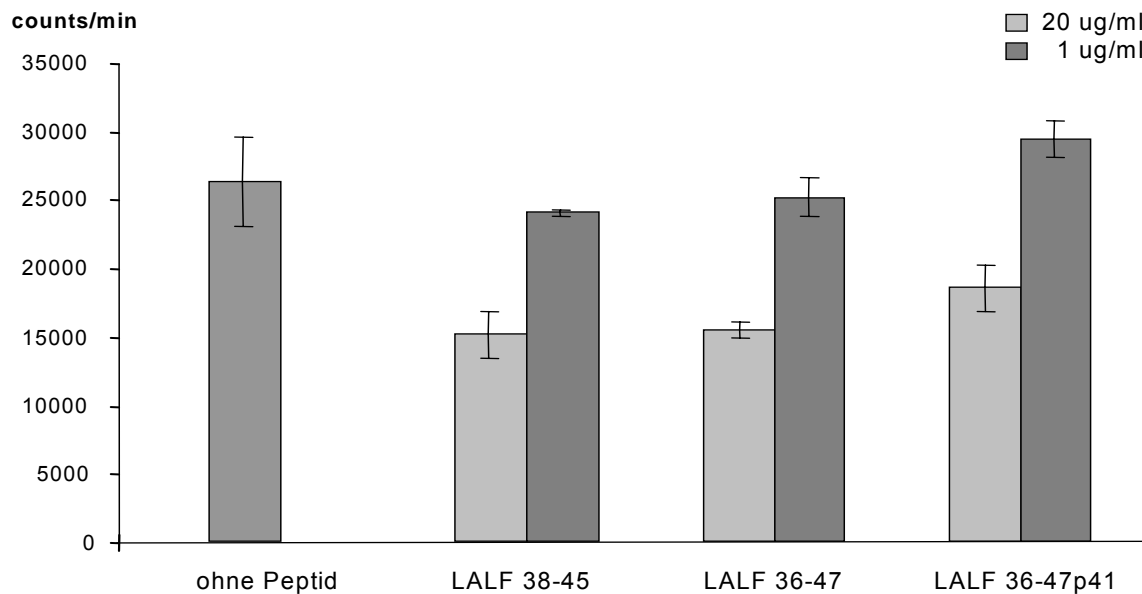


Abbildung 12: Beeinflussung der LPS-induzierten MAP-Kinasen-Aktivierung durch einzelne Peptide. RAW 264.7-Zellen wurden jeweils in doppelten Ansätzen mit LPS-Peptidgemischen, die zuvor für 5 min vorinkubiert wurden bzw. mit LPS ohne Peptid stimuliert (LPS 5 ng/ml, Peptide 1 und 20 µg/ml). Nach 20-minütiger Stimulation wurden die Zellen lysiert und in den nukleären Überständen die Aktivität der p42/44 MAPK mit Hilfe eines spezifischen p42/44 Kinase-Assays ermittelt. Im Assay proportional zur Aktivität gebundenes ³²P wurde per Szintillationszählung in „counts per minute“ gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

5.2 p38-Western-Blot

LPS induziert die Tyrosin-Phosphorylierung der p38-MAP-Kinasen, was mit einem Phospho-p38-Western-Blot untersucht werden kann. Die Bestimmung des Aktivierungsgrades der p38-MAP-Kinasen in LPS-stimulierten RAW-Zellen und der Einfluss der Ringpeptide auf diese Stimulation zeigt vergleichbare Ergebnisse wie im p42/44-Kinase-Assay (Abbildung 13). Auch hier bewirkt eine geringe Peptidkonzentration von 1 µg/ml keine hemmende Wirkung auf die Aktivität der MAP-Kinasen, während 20 µg/ml der Peptide LALF 36-47 und LALF 36-47p41 deren Aktivität fast bis auf den Ausgangswert unstimulierter Zellen reduzierten.

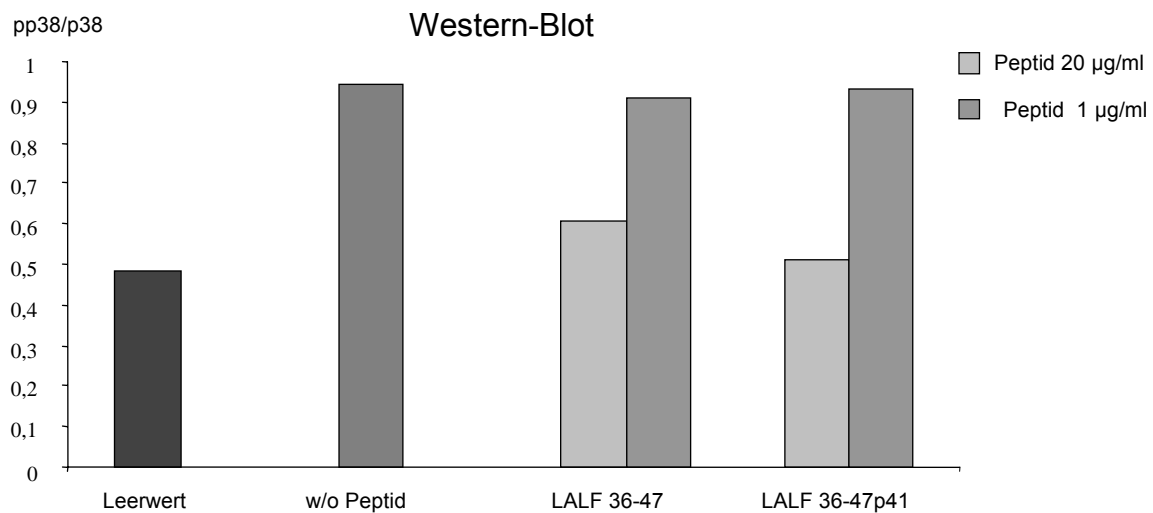
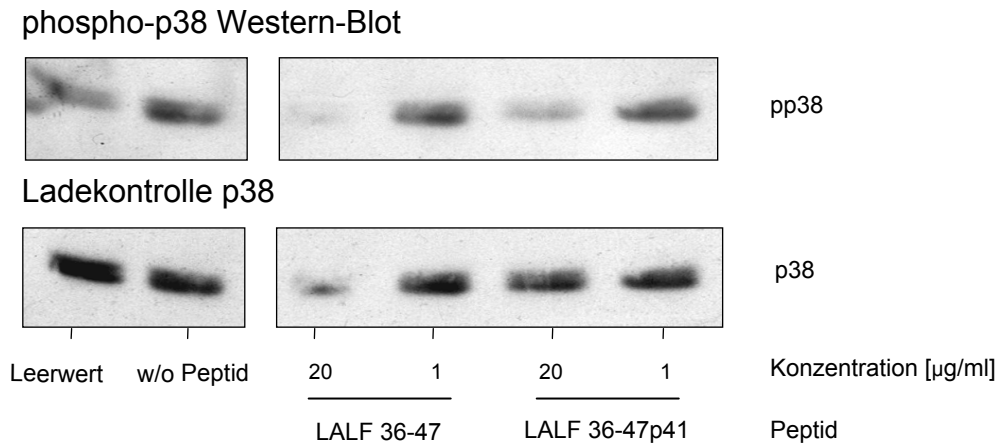


Abbildung 13: Einfluss der Peptide LALF 36-47 und LALF 36-47p41 auf die LPS-induzierte Aktivierung der p38-MAP-Kinasen. Nach Vorinkubation von 5 ng/ml LPS mit 1 und 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptid wurden RAW 264.7-Zellen mit LPS allein bzw. den LPS-Peptid-Gemischen für 20 min stimuliert und anschließend nach Lyse der Zellen die p38-Aktivität in den nukleären Überständen mittels Western-Blot-Technik bestimmt. Der ermittelte Wert der aktivierten phospho-p38-Kinasen wurde hierzu durch den Wert der p38-Ladekontrolle dividiert.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die vom LPS-Bindungsereich des LALF-Proteins abgeleitete zyklische Peptide in der Lage sind, LPS zu binden und dessen Einfluss auf Zellen zu inhibieren. Weiterhin wurde analysiert, welchen Einfluss Veränderungen der Peptidstruktur, insbesondere die Verwendung von D-Aminosäuren, auf die Effektivität der Peptide haben. Die Versuche sind noch einmal schematisch in Abbildung 14 zusammengefasst.

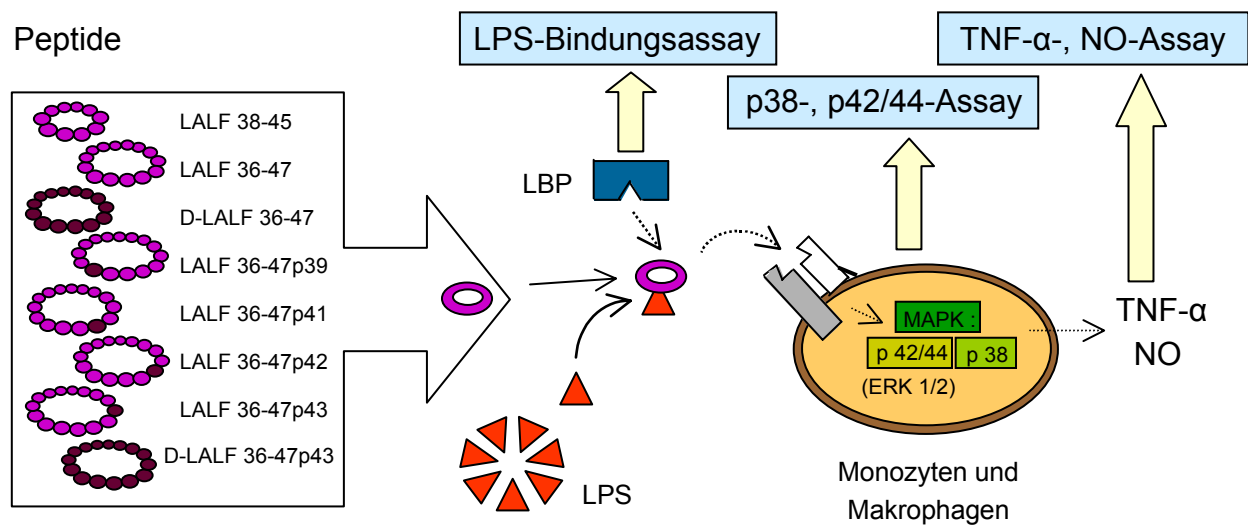


Abbildung 14: Peptid-LPS-Interaktion und verwendete Untersuchungsmethoden. Die von der LPS-Bindungsregion des LALF-Proteins abgeleiteten zyklischen Peptide wurden mittels LPS-Bindungsassay, Bestimmung der Aktivierung nukleärer Proteine LPS-stimulierter Zellen und durch TNF- α - bzw. NO-Assays auf ihre Fähigkeit hin untersucht, LPS zu binden und so die – durch LBP verstärkte – Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion via p38 / p42/44 und die daraus resultierende Ausschüttung der Mediatoren NO und TNF- α zu inhibieren.

1 Interaktion von LPS mit LALF und mit davon abgeleiteten Peptiden

Dem Lipopolysaccharid (LPS oder Endotoxin), einem Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, wird eine Schlüsselrolle in Pathogenerkennung und Induktion der angeborenen Immunität zugeschrieben. LPS liegt in wässriger Umgebung in micellärer Form vor und entwickelt seine immunstimulatorischen und toxischen Effekte erst durch die Interaktion mit den Serumproteinen LBP und sCD14 sowie dem zellulären CD14/TLR4/MD-2-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche von

Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten. Die Aktivierung dieser Zellen führt zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 (Chow et. al. 1999, Alexander und Rietschel 2001). Eine überschießende und unbalancierte Zytokinausschüttung kann möglicherweise an der Pathogenese von Sepsis und septischem Schock beteiligt sein (Glauser et. al. 1991, Hack et. al. 1997). Da für diese hochdramatischen Krankheitsbilder bisher keine effektive kausale Therapie zur Verfügung steht, besteht großes Interesse daran, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen.

Es wurden bisher zahlreiche natürliche und synthetische Proteine und Peptide beschrieben, die in der Lage sind, LPS oder Lipid A als dessen biologisch aktiven Teil zu binden. LBP, BPI, CAP 18, Polymyxin B und LALF weisen bezüglich der Ladungsverteilung strukturelle Ähnlichkeiten in der jeweiligen LPS-Bindungsregion auf, die zwischen den in Säugern vorkommenden Proteinen LBP und BPI und dem LALF-Protein des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* besonders auffallend sind (Dankesreiter et. al. 2000, Hoess et. al. 1993).

Im Pfeilschwanzkrebs führt LPS zur Aktivierung einer aus zahlreichen Proteinen bestehenden Koagulationskaskade. Der Limulus-anti-LPS-Faktor (LALF), auch Endotoxin-neutralisierendes Peptid (ENP) genannt, ist ein kleines basisches Protein von 101 Aminosäuren Länge und 12 kDa Größe, welches in vivo diese Gerinnungskaskade inhibiert und in der Lage ist, LPS hochaffin zu binden, dessen biologische Aktivität zu neutralisieren und das Wachstum Gram-negativer Bakterien zu hemmen (Tanaka et. al. 1982, Morita et. al. 1985, Muta et. al. 1987).

LALF wird in der Medizin schon seit längerer Zeit zur zuverlässigen Detektion geringer LPS-Mengen eingesetzt. Seine Fähigkeit, LPS zu binden und dessen Effekte in vitro und in vivo zu inhibieren, wurde eingehend untersucht und vor einigen Jahren wurde die LPS-Bindungssequenz identifiziert (Levin et. al. 1972, Warren et. al. 1992, Hoess et. al. 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde u.a. die LPS-Bindungsaffinität zweier von der LALF-Bindungssequenz für LPS abgeleiteter Peptide mit der von 1996 beschriebenen Peptiden gleicher Aminosäuresequenz verglichen (Ried et. al. 1996). Die dort erzielten Ergebnisse bezüglich der LPS-Neutralisierungsfähigkeit konnten hier bestätigt werden. Weiterhin wurde der Einfluss der Peptide auf die LPS-LBP-Interaktion und die LPS-

abhängige Stimulation von Immunzellen untersucht und die Auswirkungen von Veränderungen in der Aminosäuresequenz durch das Einfügen der D-Amino- (bzw. Imino-) säure Prolin auf die Struktur und Wirksamkeit der Peptide analysiert. Völlig neu im Vergleich mit anderen Arbeiten war auch die Verwendung von D-Aminosäuren für den Aufbau von zwei ausgewählten Peptiden, was sich als vorteilhaft für deren Aktivität erwies.

2 Einfluss von LALF und LALF-Peptiden auf die LPS-induzierte Mediator-synthese von Immunzellen

Nach der Postulierung der LPS-Bindungsregion des LALF-Proteins im Bereich einer exponierten Schleifenstruktur konnte die genaue Bindungssequenz durch synthetische Peptide dieser Region eingegrenzt werden. Battafarno konnte mit einem Peptid von 27 Aminosäuren Länge die TNF- α -Produktion LPS-stimulierter Makrophagen inhibieren und die bakterizide Wirkung des Peptides zeigen (Battafarno et. al. 1995). Kurz darauf gelang es, die minimale zur Bindung von LPS benötigte Sequenz auf 8 Aminosäuren (LALF-10 von Ried : AS 38-45) einzugrenzen. Es wurde jedoch festgestellt, dass Peptide mit etwas erweiterter Länge von 12 (LALF-14: AS 36-47) bzw. 20 Aminosäuren (LALF-22: AS 31-52) eine höhere Affinität zu Lipid A aufweisen. Es konnte durch den Vergleich von linearen und zyklischen Peptiden auch gezeigt werden, dass die räumliche Struktur entscheidend für die Bindungseigenschaften ist. Nur die zyklischen Peptide zeigten die gewünschte Affinität zu LPS und waren in ihrer Bindungsstärke vergleichbar mit Polymyxin B (PmB), einem ringförmigen Peptidantibiotikum mit hoher Affinität zu LPS. Das Peptid von 12 Aminosäuren Länge (LALF-14 = LALF 36-47) war weiterhin in der Lage, die LPS-induzierte TNF- α -Ausschüttung in Mäusen ähnlich stark zu unterdrücken wie PmB (Ried et. al. 1996, Vallespi et. al. 2000).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Peptid LALF 36-47 entspricht in seiner Aminosäuresequenz den Peptid LALF-14 von Ried und LALF 38-45 dem Peptid LALF-10. In den hier durchgeführten in vitro Versuchen konnte die starke inhibitorische Wirkung des Peptides LALF 36-47 auf die TNF- α -Ausschüttung LPS-stimulierter muriner Makrophagen bestätigt werden. Bei Experimenten mit aus Blut isolierten humanen Monozyten war dieser Effekt sogar noch stärker ausgeprägt als bei den Zellen der Mausmakrophagenlinie RAW 264.7. Im Gegensatz zu Beobachtungen an

nativen murinen Peritonealmakrophagen (Vallespi et. al. 2000) war hier das Peptid jedoch auch in der Lage, die Stickstoffoxid-(NO) Ausschüttung der Zellen der Makrophagenlinie ebenso stark wie deren TNF- α -Synthese zu reduzieren.

Dem Zytokin TNF- α wird in der Pathogenese der Sepsis eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Seine Synthese wird u.a. durch LPS induziert. Bei übermäßiger Produktion kann es starke systemische Reaktionen hervorrufen (s. Kapitel I.1.4.1.). NO wirkt im Organismus vasodilatierend und kardiodepressiv und kann im septischen Schock entscheidend zu Zirkulations- und Perfusionsstörungen beitragen (Vasalli 1992, Parillo 1993, Hack et. al. 1997).

3 Die intrazelluläre Signaltransduktion

LPS aktiviert über den Rezeptorkomplex CD14/TLR4/MD-2 verschiedene intrazelluläre Signalwege, die über mehrere Zwischenstufen, wie der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1/2 = p44/42 MAPK), p38 MAP Kinasen und der cJun-N-terminal-Kinasen (JNK's), zur vermehrten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen führen (Liu et. al. 1994, van der Bruggen et. al. 1999). Die Beteiligung von p42/44 MAPK an der vollständigen Induktion der TNF- α -Gen-Expression konnte von Tsai et. al. nachgewiesen werden (Tsai et. al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch für die Peptide LALF 38-45, LALF 36-47 und LALF 36-47p41 mit Hilfe von Aktivitätsbestimmungen sowohl der p38- als auch der p42/44-MAPKinasen in LPS-aktivierten RAW-Zellen nachgewiesen, dass die verminderte TNF- α -Ausschüttung der Zellen bei der Zugabe von LPS zu den Zellen in Anwesenheit der Peptide im Vergleich zur Stimulation mit LPS allein tatsächlich auf eine verminderte Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion zurückzuführen ist.

4 Die Rolle von LBP bei der Inhibition von LPS-Effekten durch LALF-Peptide

Das Lipopolysaccharid bindende Protein (LBP) ist in der Lage, durch eine katalytische Reaktion einzelne LPS-Moleküle aus LPS-Aggregaten herauszulösen und zu seinen zellulären Rezeptoren zu transportieren, was zu einer Verstärkung der immunstimulatorischen Effekte des LPS um das 100- bis 1000-fache führt (Schumann et. al. 1990 und 1996). In zahlreichen Versuchen wurde die Affinität von LALF und von LALF

abgeleiteter Peptide zu Lipid A bzw. LPS untersucht (Wainwright et. al. 1990, Warren et. al. 1992, Ried et. al. 1996, Dankesreiter et. al. 2000, Weiss et. al. 2000). Es wurden jedoch bisher noch keine Ergebnisse über die Konkurrenz von LALF-Peptiden mit LBP um die Bindung am LPS veröffentlicht.

In einem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde LPS in Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung von LBP in Konkurrenz zu den Peptiden bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass LBP durch die einzelnen Peptide in unterschiedlich starkem Ausmaß und konzentrationsabhängig an der Interaktion mit LPS gehindert wurde. Dies lässt vermuten, dass die Peptide an die gleiche Stelle am LPS-Molekül binden wie LBP und somit den Transfer von LPS durch LBP zu den zellulären Rezeptoren und die daraus folgende Zellstimulation und Zytokinausschüttung verhindern.

Dankesreiter et. al. konnte zeigen, dass LALF-14 auch in der Lage ist, die Bindung von LPS an CD14 zu inhibieren, was ebenfalls zu einer verminderten Zellstimulation führt (Dankesreiter et. al. 2000). Nach Versuchen mit Mäusen, denen LPS und LALF injiziert wurde, vermutete Roth, dass LALF zwar die biologische Aktivität von LPS blockiert, jedoch nicht dessen beschleunigte Elimination aus dem Kreislauf bewirkt (Roth et. al. 1998). Dies würde durch eine „Blockierung“ von LPS für die Interaktion mit LBP und CD14 durchaus zu erklären sein.

5 Einfluss struktureller Veränderungen auf die Funktion der LALF-Bindungsregion für LPS

Erste Hinweise auf die genaue LPS-Bindungsstruktur brachte die 3-dimensionale Analyse von LALF durch Kristallographie (Hoess et. al. 1993). Hoess postulierte eine exponierte Schleifenstruktur als Bindungsdomäne für LPS. Die beiden Seiten der haarnadelförmigen Schleife werden durch eine β -Faltblattstruktur gebildet, die über die gesamte Länge des Moleküls verläuft. Diese ist aus einer alternierenden Serie von positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, deren Reste durch die β -Konformation der Schleife in entgegengesetzte Richtungen weisen. An ihrem unteren Ende sind die gegenläufigen Aminosäureketten mit einer Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cystein 31 und Cystein 52 verbunden und die exponierte Spitze der Schleife wird durch eine positiv geladene Typ-1-Biegung gebildet. Die Außenseite des β -Faltblatts und die eine Seite der Haarnadelschleife sind durch 10 basische Amino-

säuren (hauptsächlich Lysin und Arginin) positiv geladen, wohingegen die gegenüberliegende Seite der Schleife durch die Reste von Phenylalanin 39, Leucin 42 und Tryptophan 44 hydrophob ist. Durch die β -1-Biegung weisen die beiden nebeneinanderliegenden positiven Ladungen der basischen Aminosäuren Arginin 40 und 41 an der Spitze der Schleife in die selbe Richtung und verstärken den amphiphilen Charakter der Bindungssequenz (Abbildung 15 B).

Vergleiche der Aminosäuresequenz mit einer Datenbank erbrachten zwar keine genaue Sequenzübereinstimmung mit anderen Proteinen, es konnten jedoch mit LBP und BPI zwei Proteine gefunden werden, die ein ähnliches Muster aus alternierenden hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren aufweisen und von denen die Fähigkeit an LPS zu binden bekannt war. Ebenso wurde das Peptidantibiotikum Polymyxin B bei der Datenbankanalyse gefunden, welches LPS hochaffin bindet, therapeutisch jedoch wegen seiner Toxizität nicht systemisch verwendbar ist (Hoess et. al. 1993). Die identifizierten Bereiche der Proteine LALF, LBP und BPI konnten kurze Zeit später durch Versuche mit 27 Aminosäuren langen Peptiden dieser Regionen als LPS-Bindungsdomäne bestätigt werden (Battafarno et. al. 1995). Ried zeigte mit Hilfe von linearen Peptiden der Bindungsregion des LALF-Proteins für LPS und zyklischen Äquivalenten, die durch eine Disulfidbrücke zwischen den an Anfang und Ende der Peptidkette angehängten Cystein-Aminosäuren die Haarnadelschleife im LALF imitieren, die Bedeutung der Schleifenstruktur für die LPS-Bindung und er grenzte die Bindungssequenz auf die Aminosäuren 36 bis 47 ein. Als minimal benötigte Peptidlänge wurden die Aminosäuren 38 bis 45 festgestellt, jedoch zeigten Peptide mit 12 bzw. 20 Aminosäuren eine höhere Affinität zu LPS (Ried et. al. 1996).

A	HYDROPHILE Aminosäuren	HYDROPHOBE Aminosäuren
LALF	...C ³¹ H Y R I K P T F R R L K W K Y K G K F W C ...	52
LALF 38-45	C- ³⁸ T F R R L K W K ⁴⁵ -C	
LALF 36-47	C- ³⁶ K P T F R R L K W K Y K ⁴⁷ -C	
D-LALF 36-47	c- ³⁶ k p t f r r l k w k y k ⁴⁷ -c	
LALF 36-47p39	C- ³⁶ K P T F p R R L K W K Y K ⁴⁷ -C	
LALF 36-47p41	C- ³⁶ K P T F R R p L K W K Y K ⁴⁷ -C	
LALF 36-47p42	C- ³⁶ K P T F R R L p K W K Y K ⁴⁷ -C	
LALF 36-47p43	C- ³⁶ K P T F R R L K p W K Y K ⁴⁷ -C	
D-LALF 36-47p43	c- ³⁶ k p t f r r l k p w k y k ⁴⁷ -c	

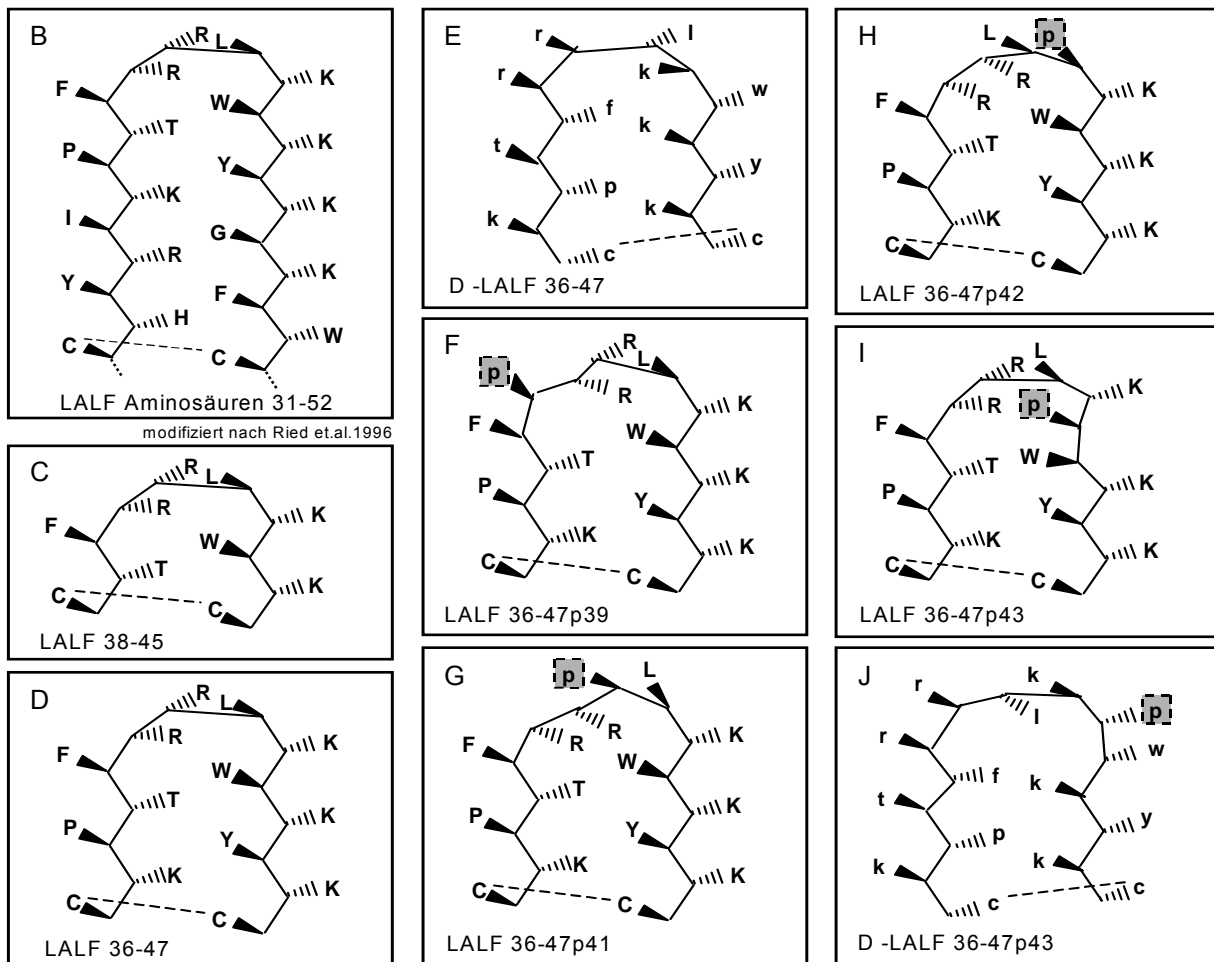


Abbildung 15: Aminosäuresequenz und schematische Darstellung der von LALF abgeleiteten Peptide. Die LPS-Bindungsregion des LALF-Proteins ist aus einer alternierenden Serie hydrophober und hydrophiler Aminosäuren aufgebaut, deren Reste in entgegengesetzte Richtungen der schleifenförmigen Struktur weisen (Abb. B). Diese Anordnung ist vermutlich auch in den ringförmigen Peptiden erhalten geblieben (Abb. C-D). Die Auswirkungen der D-Aminosäuren (durch kleine Buchstaben dargestellt und in Abb. A grau hinterlegt) auf die Struktur der Peptide kann jedoch nur vermutet werden, ebenso wie der Einfluss der in einigen Peptiden zusätzlich eingeführten D-Aminosäure Prolin (p) (Abb. E-J).

Bei den synthetisierten zyklischen Peptiden der LALF-Bindungsregion bleibt der amphiphile Charakter mit der gegensätzlichen Anordnung der basischen und hydrophoben Aminosäuren erhalten (Abbildung 15) und imitiert die Originalstruktur der LALF-Schleife erfolgreich genug, um LPS vergleichbar mit PmB zu binden. Das hier verwendete Peptid LALF 36-47 mit 12 Aminosäuren Länge war in der Lage, die Bindung von LBP an LPS und die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen um über 70% zu inhibieren. Das kürzere Peptid LALF 38-45 mit nur 8 Aminosäuren Länge zeigte hingegen eine deutlich geringere Effektivität bei der Konkurrenz mit LBP um LPS.

Um den Einfluss von Konformationsänderungen in der Schleifenstruktur zu untersuchen, wurde bei dem hier untersuchten Peptid LALF 36-47 an verschiedenen Stellen der Schleifenspitze die D-Iminosäure Prolin eingeführt (Abbildung 15 F-J), die durch ihren schwach basischen Charakter keinen großen Einfluss auf die Ladungsverteilung im Molekül haben sollte, jedoch ein Abknicken der Peptidkette bewirkt. Dies scheint zu einer für die Peptid-LPS-Interaktion ungünstigen Konformation zu führen, die bei den Peptiden LALF 36-47p39, -p41 und -p42 einen weitgehenden Verlust der LPS-Bindungs- und Neutralisationsfähigkeit zur Folge hat. Bei LALF 36-47p43 liegt das eingefügte D-Prolin etwas weiter vom Scheitelpunkt der Schleifenstruktur mit den beiden positiv geladenen Aminosäuren Arginin 40 und 41 entfernt. Hier hat anscheinend eine Änderung der räumlichen Anordnung der Aminosäurereste einen weniger störenden Einfluss auf die Peptidfunktion. Die Affinität zu LPS ist in diesem Fall nur gering beeinträchtigt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Anordnung der Ladungen im Bereich der Spitze der Schleife für die Interaktion von LALF mit LPS von besonderer Bedeutung ist.

Aufgrund der räumlichen Struktur der Bindungsschleife und der Verteilung der positiven Ladungen wird vermutet, dass LPS-bindende Proteine wie LALF, LBP, BPI und CAP 18 bzw. davon abgeleitete Peptide über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiven Aminosäureresten der Proteine und den negativ geladenen Phosphatgruppen des Disaccharids des Lipid A an LPS binden (Tobias et. al. 1988, Gazzano-Santoro et. al. 1992). Computerberechnungen für den α -helikalen LPS-Bindungsbereich von CAP 18, bei dem hydrophobe Aminosäurereste zur einen und hydrophile zur anderen Seite der Helix weisen, konnten zeigen, dass der Abstand der positiven Ladungen des Moleküls dem der beiden Phosphatgruppen im Lipid A entspricht (Chen et. al. 1995).

Die Bedeutung der positiven Ladungen für die Bindung von Proteinen oder Peptiden an LPS konnte anhand von LBP-Mutanten auf Proteinebene gezeigt werden, indem dort die positiven Aminosäuren Arginin und Lysin der Bindungsregion durch neutrale oder negative Aminosäuren ersetzt wurden. Dies führte zur Abschwächung bzw. zum Verlust der LPS-Bindungsfähigkeit (Lamping et. al. 1996). Weiterhin hat sich LPS, dem eine der beiden Phosphatgruppen fehlt, als biologisch inaktiv erwiesen (Heimann et. al. 1990), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass auch hier die Interaktion mit LBP gestört ist.

6 Die zeitliche Wirkung von LALF und LALF-Peptiden auf LPS und Immunzellen

Das LALF-Protein ist in in vivo Versuchen bei alleiniger Gabe nur für wenige Minuten im Plasma nachweisbar. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS ist es jedoch deutlich länger im Blutkreislauf anzutreffen (ca. zwei Stunden), eventuell in Form von LPS-LALF-Komplexen (Roth et. al. 1998).

Von LALF abgeleitete zyklische Peptide mit 10 bzw. 14 Aminosäuren Länge zeigten in vitro eine Serumhalbwertszeit von rund 80 Minuten (Ried et. al. 1996). Genaue Daten über die in vivo Halbwertszeit der hier verwendeten LALF-Peptide stehen derzeit nicht zur Verfügung, sie dürfte aufgrund der geringen Molekülgröße jedoch nicht sehr groß sein. Da Peptide, die aus D-Aminosäuren aufgebaut sind (Abbildung 15 E und J), in geringerem Ausmaß durch proteolytische Prozesse abgebaut werden als Peptide aus L-Aminosäuren, ist bei ihnen eine vergleichsweise längere Halbwertszeit anzunehmen, vielleicht sogar Werte wie bei dem im Körper nur langsam abbaubaren Glykopeptid Teicoplanin mit einer Halbwertszeit von 72 Stunden.

In Zellversuchen zeigten die Peptide D-LALF 36-47 und D-LALF 36-47p43 auch nach 120-minütiger Vorinkubation mit LPS noch ihre vollständige Wirkung bei der Unterdrückung der TNF- α -Induktion in humanen Monozyten. Bei gleichzeitiger Zugabe von LPS und Peptid zu den Zellen ist bei 10 $\mu\text{g/ml}$ D-LALF 36-47 bereits eine über 50 %-ige Neutralisation der LPS-Wirkung zu beobachten und nach Vorinkubation von 20 $\mu\text{g/ml}$ Peptid mit 5 ng/ml LPS für 5 Minuten ist das LPS fast vollständig neutralisiert.

Die Wirksamkeit von LALF und davon abgeleiteten Peptiden scheint jedoch über die halbwertszeit-abhängige Bindung von LPS hinauszugehen. Zum einen sind LALF und

LALF-22 (AS 31-52) auch bei der Gabe Stunden nach LPS oder ganzen Bakterien noch in der Lage, die Letalität bei Mäusen deutlich zu senken, auch wenn die TNF- α -Antwort ihren Maximalwert schon überschritten und die Clearance von LPS bereits eingesetzt hat (Roth et. al. 1998, Vallespi et. al. 2003). Zum anderen bewirkt eine prophylaktische Gabe von LALF-22 bereits 20 Stunden vor einer bakteriellen Sepsissimulation – also weit über die angenommene geringe Halbwertszeit des Peptides hinaus – eine höhere Überlebensrate und niedrigere TNF- α -Level bei Pseudomonas-infizierten Mäusen als bei unbehandelten Kontrolltieren (Vallespi et. al. 2000 und 2003).

Da sich LALF-14 (LALF 36-47) in seiner Fähigkeit, LPS zu binden und die TNF- α -Antwort in LPS-stimulierten Zellen zu unterdrücken, nicht wesentlich von LALF-22 unterscheidet, ist eine ähnliche in-vivo-Wirkung auch hier zu erwarten. Gleiche Effekte sind auch bei homologen Peptiden aus D-Aminosäuren anzunehmen. Roth vermutete, dass eine erhöhte Überlebensrate von Mäusen bei LALF-Gabe bis zu 24 Stunden nach LPS durch mehr als rein LPS-neutralisierende Effekte verursacht wird (Roth et. al. 1998). Vallespi et. al. konnten zeigen, dass eine prophylaktische Behandlung mit LALF-22 in vitro und in vivo zu einer veränderten Zytokinexpression führt. Es konnte eine vermehrte Synthese von IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-12 und IL-13, jedoch nicht von IL-4 und IL-10 gezeigt werden. Die Peptide scheinen so auch über ihre eigentliche Halbwertszeit hinaus immunmodulatorisch auf die Wirtsabwehr einzuwirken und antimikrobielle Prozesse zu aktivieren (Vallespi et. al. 2000 und 2003).

Ob vergleichbare oder wirksamere immunmodulatorische Effekte auch für die hier verwendeten Peptide nachweisbar sind, ist in weiterführenden in vitro und in vivo Versuchen zu prüfen.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Eine moderate Stimulation von Makrophagen durch Pathogene wie LPS führt zur Synthese und Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren mit dem Ziel, eindringende Mikroorganismen zu neutralisieren (Baumann und Gauldie 1994). Wenn es im Organismus zum Übertritt von LPS oder Bakterien ins Blut kommt, kann es zur Stimulation von Immunzellen im ganzen Körper und dadurch zur überschießenden Zytokinproduk-

tion kommen, was zur Sepsis führen kann (Glauser et. al. 1991, Parillo 1993, Abbildung 16).

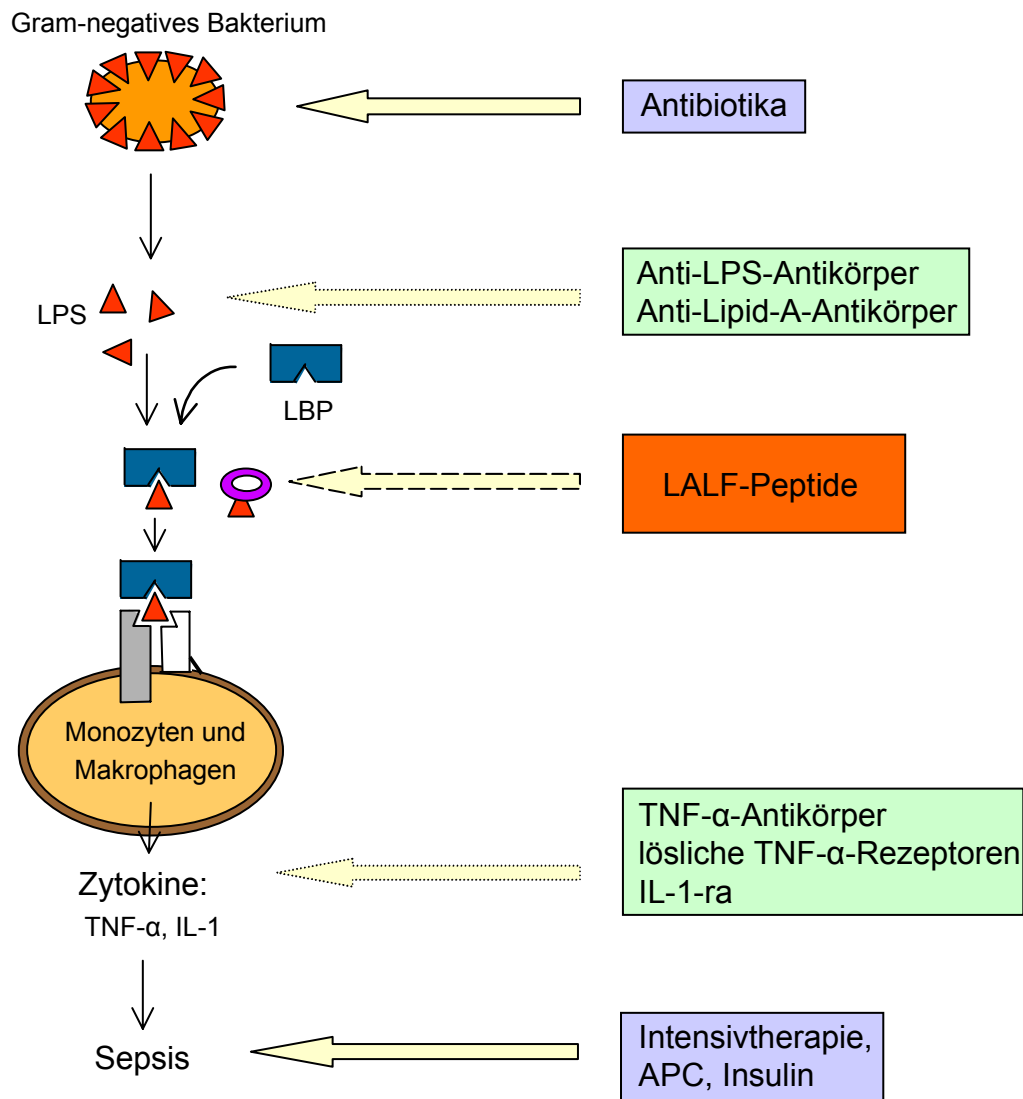


Abbildung 16: Therapieansätze zur Behandlung der Sepsis. Schematische Darstellung der Angriffspunkte ausgewählter bisheriger Therapiestrategien bei Sepsis (violett hinterlegt), ineffektiver Therapieversuche (grün hinterlegt) und des möglichen Einsatzes der von LALF abgeleiteten Peptide (rot hinterlegt).

Die Sepsis ist trotz potenter Antibiotika und bedeutender Fortschritte in der Intensivtherapie noch immer ein schweres klinisches Krankheitsbild mit hoher Sterblichkeit. Kausale Therapieversuche beschäftigen sich zum großen Teil mit den beiden am besten untersuchten Mediatoren in der Sepsispathogenese, dem TNF- α und IL-1. Versuche, durch Hemmung dieser Zytokine in den Verlauf der Sepsis einzugreifen, verliefen bisher enttäuschend, was z.T. darauf zurückzuführen ist, dass antiinflammation

torische Therapieansätze zwar in der hyperinflammatorischen Phase der Sepsis von Nutzen sein könnten, in der hypoinflammatorischen Phase jedoch nutzlos oder gar gefährlich sind und eine klinische Unterscheidung der beiden Phasen bisher selten erfolgte oder möglich war. Eine gezielte Blockade einzelner pro- oder antiinflammatorischer Mediatoren ist somit ein kompliziertes Unterfangen, da es ein genaues Verständnis der komplexen Vorgänge des Immunsystems voraussetzt (Zeni et. al. 1997, Vincent 1998, Kox et. al. 2000, Volk et. al. 2000).

Das LPS Gram-negativer Bakterien ist der Hauptsimulator der Zytokinsynthese in der Pathogenese der Sepsis. Mit Hilfe von Antikörpern wurde versucht, LPS zu neutralisieren. O-spezifische Antikörper binden LPS zwar zuverlässig, sie sind jedoch spezifisch für das LPS einer Bakterienart und es müsste so vor einer Therapie mit diesen Antikörpern die jeweilige Spezies bekannt sein, der die Sepsis zugrunde liegt. Studien mit anti-Lipid-A-Antikörpern brachten nicht die gewünschten Erfolge und die Kernregion von LPS scheint wenig immunogen zu sein (Baumgartner et. al. 1990, Zeni et. al. 1997, Vincent 1998).

Da zur Zeit noch keine effektive kausale Therapie speziell der Gram-negativen Sepsis zur Verfügung steht, besteht großes Interesse daran, wirksame LPS-neutralisierende Substanzen zu finden. In diesem Zusammenhang könnten einzelne der hier untersuchten Peptide von Bedeutung sein. Da diese in der Lage sind, LPS hochaffin zu binden und dessen Effekte *in vitro* zu unterdrücken (Abbildung 16) und weiterhin in den verwendeten Konzentrationen keine toxischen Effekte auf die Zellen zeigten, ergeben sich Ansatzpunkte für deren Weiterentwicklung und mögliche prophylaktische oder therapeutische Nutzung. So könnten sie bei Patienten, die besonders gefährdet sind, an Sepsis zu erkranken, die Antwort des Immunsystems auf LPS reduzieren und so überschießende Reaktionen verhindern. Andererseits könnte sich auch der von Vallespi beschriebene immunmodulatorische Einfluss der von LALF abgeleiteten Peptide – so dieser auch bei den hier verwendeten Peptiden vorhanden ist – positiv bei Patienten in der antiinflammatorischen Phase auswirken (Vallespi et. al. 2003).

Hierfür sind jedoch weiterführende Versuche nötig, um die Effektivität und Sicherheit der Peptide auch *in vivo* zu prüfen, da *in vitro* Versuche die Reaktion im Organismus nur begrenzt widerspiegeln können.

V. Zusammenfassung

Das aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien freigesetzte Lipopolysaccharid (LPS) ist ein potenter Stimulator des Immunsystems. Das LPS bindende Protein (LBP) erkennt LPS und moduliert dessen Effekte, indem es den Transfer von LPS zu seinem zellulären Rezeptorkomplex CD14/TLR4/MD-2 bzw. in Lipoproteine katalysiert. Der LPS-Rezeptorkomplex wird hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert. Die Bindung von LPS an den Rezeptor bewirkt eine Aktivierung der Zelle mit darauf folgender Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor- $(\text{TNF-})\alpha$ und der Interleukine (IL-) 1 und 6. Die von diesen Mediatoren ausgelöste Entzündungsreaktion dient der Bekämpfung eingedrungener Mikroorganismen. Im Rahmen schwerer Infektionen und dem Übertritt von Bakterien oder LPS in die Blutbahn kommt es meist zu einer systemischen Immunantwort. Eine übermäßige zelluläre Stimulation kann hierbei zu einer überschießenden oder dysbalancierten Zytokinfreisetzung führen, was für die Entstehung der Sepsis als ursächlich angesehen wird. Durch eine von Mediatoren wie Stickstoffoxid (NO) vermittelten Vasodilation kann es dann zum septischen Schock mit schwer beherrschbarer Hypotonie und hoher Lethalität kommen, für die es noch immer keine effektive kausale Therapie gibt.

Der Limulus-anti-LPS-Faktor (LALF) des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* und von diesem abgeleitete Peptide sind in der Lage, LPS zu binden und zu neutralisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von strukturellen Veränderungen der LPS-Bindungsregion des LALF-Proteins mit Hilfe von synthetischen Peptiden analysiert. Hierzu wurde in die bekannte Bindungssequenz des Proteins an verschiedene Lokalisationen an der Spitze der schleifenförmigen Peptide die D-Aminosäure Prolin eingeführt. Dies führt zum Abknicken der Aminosäurekette und somit zu einer Änderung der räumlichen Konformation der Peptide. Zwei der Peptide wurden zusätzlich komplett aus D-Aminosäuren synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Peptide hinsichtlich ihrer Neutralisationsfähigkeit von LPS untersucht. In einem experimentellen Ansatz wurde zunächst der Einfluss der Peptide auf die Interaktion von LBP mit immobilisiertem LPS analysiert. Die Peptide waren in der Lage, die Bindung von LBP an LPS in unterschiedlich starkem Ausmaß zu hemmen. Die Einfügung des D-Prolins in die Spitze der Bindungsschleife führte hierbei zu einem deutlichen Effektivitätsverlust. In einem weiteren Versuchsansatz wurde außerdem anhand der Bestim-

mung der TNF- α -Freisetzung LPS-stimulierter humaner Monozyten und der TNF- α - und NO-Synthese muriner Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 die LPS-neutralisierenden Eigenschaften der zyklischen Peptide in vitro bestimmt. Die Stärke dieser Inhibition korrelierte mit der entsprechenden Wirksamkeit der Peptide im LPS-Bindungs-Assay. Die vollständig aus D-Aminosäuren aufgebauten Peptide waren dabei im Vergleich wirksamer als die Originalpeptide aus L-Aminosäuren. Mit Hilfe der Aktivitätsbestimmung der p38- und p42/44-MAP-Kinasen in RAW-Zellen konnte exemplarisch für drei bzw. zwei der Peptide die verminderte Aktivierung der Zellen durch LPS auch auf intrazellulärer Ebene gezeigt werden. Da sich die Peptide aus D-Aminosäuren als wirksamer erwiesen haben als ihre „natürlichen“ Korrelate und sie zudem Proteolyse-stabiler sind als diese, bietet sich hier ein neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung experimenteller Therapiemöglichkeiten der Sepsis.

Literaturverzeichnis

- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
- Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54, 1-78.
- Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7, 167-202.
- Appelmek, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J., and Nuijens, J. H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* 62, 2628-32.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., and Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25, 187-91.
- Battafaraono, R. J., Dahlberg, P. S., Ratz, C. A., Johnston, J. W., Gray, B. H., Haseman, J. R., Mayo, K. H., and Dunn, D. L. (1995). Peptide derivatives of three distinct lipopolysaccharide binding proteins inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in vitro. *Surgery* 118, 318-24.
- Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80.
- Baumgartner, J. D. (1990). Monoclonal anti-endotoxin antibodies for the treatment of gram-negative bacteremia and septic shock. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 711-6.
- Bazil, V., and Strominger, J. L. (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immuno* 147, 1567-74.
- Beamer, L. J., Carroll, S. F., and Eisenberg, D. (1998). The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 7, 906-14.
- Beamer, L. J., Carroll, S. F., and Eisenberg, D. (1997). Crystal structure of human BPI

and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* 276, 1861-4.

Belvin, M. P., and Anderson, K. V. (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 393-416.

Berger, D., and Beger, H. G. (1987). Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. *Clin Chim Acta* 163, 289-99.

Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F. (2001). Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344, 699-709.

Bone, R. C. (1991). The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115, 457-69.

Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., and Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-55.

Brun-Buisson, C. (2000). The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 26, 64-74.

Chen, C., Brock, R., Luh, F., Chou, P. J., Larrick, J. W., Huang, R. F., and Huang, T. H. (1995). The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Lett* 370, 46-52.

Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., and Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274, 10689-92.

Cohen, J., and Glauser, M. P. (1991). Septic shock: treatment. *Lancet* 338, 736-9.

Dankesreiter, S., Hoess, A., Schneider-Mergener, J., Wagner, H., and Miethke, T. (2000). Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- α production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J Immunol* 164, 4804-11.

Danner, R. L., Elin, R. J., Hosseini, J. M., Wesley, R. A., Reilly, J. M. and Parillo, J. E. (1991). Endotoxin in human septic shock. *Chest* 99, 169-75.

David, S. A. (2001). Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J Mol Recognit* 14, 370-87.

Day, J. R., Albers, J. J., Lofton-Day, C. E., Gilbert, T. L., Ching, A. F., Grant, F. J., O'Hara, P. J., Marcovina, S. M., and Adolphson, J. L. (1994). Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. *J Biol Chem* 269, 9388-91.

de Haas, C. J., van der Tol, M. E., Van Kessel, K. P., Verhoef, J., and Van Strijp, J. A. (1998). A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on amino acids 27- 39 of serum amyloid P component inhibits lipopolysaccharide-induced responses in human blood. *J Immunol* 161, 3607-15.

Dellinger, R. P. (2003). Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 31, 946-52.

De Visser, P. C., Kriek, N. M., van Hooft, P. A., Van Schepdael, A., Filippov, D. V., van der Marel, G. A., Overkleeft, H. S., van Boom, J. H. and Noort, D. (2003). Solid-phase synthesis of polymyxin B1 and analogues via a safety-catch approach. *J Pert Res* 61, 298-306.

Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-8.

Dinarello, C. A., and Wolff, S. M. (1993). The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 328, 106-13.

Doolittle, R. F. (1984). Fibrinogen and fibrin. *Annu Rev Biochem* 53, 195-229.

Drayna, D., Jarnagin, A. S., McLean, J., Henzel, W., Kohr, W., Fielding, C., and Lawn, R. (1987). Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature* 327, 632-4.

Durieux, J. J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Calzada-Wack, J., Munker, R., Schmidt, R. E., Lupker, J., Ferrara, P., Ziegler-Heitbrock, H. W., and et al. (1994). The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol* 24, 2006-12.

Elsbach, P., and Weiss, J. (1993). The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology* 187, 417-29.

Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-3.

Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B. B., and Wright, S. D. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176, 1665-71.

Friedman, G., Silva, E., and Vincent, J. L. (1998). Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 26, 2078-86.

Gabay, C. and Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-53.

Gauldie, J., Northemann, W., and Fey, G. H. (1990). IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J Immunol* 144, 3804-8.

Gazzano-Santoro, H., Parent, J. B., Grinna, L., Horwitz, A., Parsons, T., Theofan, G., Elsbach, P., Weiss, J., and Conlon, P. J. (1992). High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 60, 4754-61.

Gegner, J. A., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1995). Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane. CD14 *J Biol Chem* 270, 5320-5.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutio-

narily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.

Glauer, M. P., Zanetti, G., Baumgartner, J. D., and Cohen, J. (1991). Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338, 732-6.

Gray, P. W., Flagg, G., Leong, S. R., Gumina, R. J., Weiss, J., Ooi, C. E., and Elsbach, P. (1989). Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J Biol Chem* 264, 9505-9.

Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13, 85-94.

Guha, M., O'Connell, M. A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S. F., Stern, D., and Mackman, N. (2001). Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98, 1429-39.

Hack, C. E., Aarden, L. A., and Thijs, L. G. (1997). Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 66, 101-95.

Hailman, E., Albers, J. J., Wolfbauer, G., Tu, A. Y., and Wright, S. D. (1996). Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 271, 12172-8.

Hailman, E., Lichenstein, H. S., Wurfel, M. M., Miller, D. S., Johnson, D. A., Kelley, M., Busse, L. A., Zukowski, M. M., and Wright, S. D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179, 269-77.

Hamann, L., Stamme, C., Ulmer, A. J. and Schumann, R. R. (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 295, 553-60.

Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418-22.

Hancock, R. E. and Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8856-61.

Harris, H. W., Grunfeld, C., Feingold, K. R., and Rapp, J. H. (1990). Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest* 86, 696-702.

Hart, P. H., Jones, C. A. and Finlay, J. J. (1992). Interleukin-4 suppression of monocyte tumor necrosis-alpha production. Dependence on protein synthesis but not cyclic AMP production. *Immunology* 76, 560-5.

Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., and Goyert, S. M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 141, 547-52.

Haziot, A., Rong, G. W., Silver, J., and Goyert, S. M. (1993). Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol* 151, 1500-7.

Heiman, D. F., Astiz, M. E., Rackow, E. C., Rhein, D., Kim, Y. B., and Weil, M. H. (1990). Monophosphoryl lipid A inhibits neutrophil priming by lipopolysaccharide. *J Lab Clin Med* 116, 237-41.

Hewett, J. A., and Roth, R. A. (1993). Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol Rev* 45, 382-411.

Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R., and Liddington, R. (1993). Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *Embo J* 12, 3351-6.

Höflich, C. und Volk, H.-D. (2002). Immunmodulation in der Sepsis. *Chirurg* 73, 1100-4.

Holst, O., and Brade, H. (1992). Chemical structure of the core region of Lipopolysaccharides. In *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Volume 1, D. C. Morrison and J. L. Ryan, eds (Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Pres). 136-70.

Hotchkiss, R. S., and Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348, 138-50.

Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, 1-13.

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Copra, J. D. (1999). Immunobiology. The immune system in health and disease. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc. London.

Kalsheker, N. A. (1996). Alpha 1-antichymotrypsin. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 961-4.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-63.

Kirschning, C. J., Au-Young, J., Lamping, N., Reuter, D., Pfeil, D., Seilhamer, J. J., and Schumann, R. R. (1997). Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics* 46, 416-25.

Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., and Rothe, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188, 2091-7.

Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., and Krieger, M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343, 531-5.

Kox, W. J., Volk, T., Kox, S. N. and Volk, H.-D. (2000). Immunomodulatory therapies in Sepsis. *Intensiv Care Med* 26, 124-28.

Krauss, J. H., Seydel, U., Weckesser, J., and Mayer, H. (1989). Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. *Eur J Biochem* 180, 519-26.

Kushner, I. (1993). Regulation of the acute phase response by cytokines *Perspect. Biol Med* 36. 611-22.

Kushner, I., and Mackiewicz, A. (1987). Acute phase proteins as disease markers. *Dis Markers* 5, 1-11.

Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T. C., Kirschning, C. J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S. D., Herrmann, F., and Schumann, R. R. (1996). Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol* 157, 4648-56.

Larrick, J. W., Morgan, J. G., Palings, I., Hirata, M., and Yen, M. H. (1991). Complementary DNA sequence of rabbit CAP18--a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 170-5.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-83.

Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14614-9.

Lepper, P. M., Held, T. K., Schneider, E. M., Bolke, E., Gerlach, H., and Trautmann, M. (2002). Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 28, 824-33.

Levin, J., Poore, T. E., Young, N. S., Margolis, S., Zauber, N. P., Townes, A. S., and Bell, W. R. (1972). Gram-negative sepsis: detection of endotoxemia with the limulus test. With studies of associated changes in blood coagulation, serum lipids, and complement. *Ann Intern Med* 76, 1-7.

Levin, M., Quint, P. A., Goldstein, B., Barton, P., Bradley, J. S., Shemie, S. D., Yeh, T., Kim, S. S., Cafaro, D. P., Scannon, P. J. and Giroir, B. P. (2000). Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI2 meningococcal sepsis study group. *Lancet* 356, 961-7.

- Liu, M. K., Herrera-Velitz, P., Brownsey, R. W., and Reiner, N. E. (1994). CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 153, 2642-52.
- Loppnow, H., Stelter, F., Schonbeck, U., Schluter, C., Ernst, M., Schutt, C., and Flad, H. D. (1995). Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 63, 1020-6.
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. and Moss, M. (2003). Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546-54.
- Matot, I., and Sprung, C. L. (2001). Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 27, 3-9.
- Matthay, M. A. (2001). Severe sepsis : a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N Engl J Med* 344, 759-62.
- McCafferty, D. G., Cudic, P., Frankel, B. A., Barkallah, S., Kruger, R. G. and Li, W. (2002). Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics. *Biopolymers* 66:4, 261-84.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1998). An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 10, 12-5.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1998). Self-defense: the fruit fly style. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 429-30.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-7.

- Moldawer, L. L. (1994). Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. *Crit Care Med* 22, 3-7.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-90.
- Morita, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Tanaka, S., Iwanaga, S., Ohashi, K., and Niwa, M. (1985). Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *J Biochem (Tokyo)* 97, 1611-20.
- Muta, T., Miyata, T., Tokunaga, F., Nakamura, T., and Iwanaga, S. (1987). Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *J Biochem (Tokyo)* 101, 1321-30.
- Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79, 319-26.
- Nathanson, C., Hoffman, W. D., Suffredini, A. F., Eichacker, P. Q. and Danner, R. L. (1994). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanism of pathogenesis. *Ann Internal Med* 120, 771-83.
- Netea, M. G., Demacker, P. N., Kullberg, B. J., Jacobs, L. E., Verver-Jansen, T. J., Boerman, O. C., Stalenhoef, A. F., and Van der Meer, J. W. (1998). Bacterial lipopolysaccharide binds and stimulates cytokine-producing cells before neutralization by endogenous lipoproteins can occur. *Cytokine* 10, 766-72.
- Opal, S. M., Palardy, J. E., Marra, M. N., Fisher, C. J., Jr., McKelligon, B. M., and Scott, R. W. (1994). Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. *Lancet* 344, 429-31.
- Parillo, E. J. (1993). Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328, 1471-78.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-8.

Pugin, J., Schurer-Maly, C. C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S. (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2744-8.

Raetz, C. R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59, 129-70.

Rangel-Frausto, M. S., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C. S., and Wenzel, R. P. (1995). The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273, 117-23.

Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellnhofer, G., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., and Hoess, A. (1996). High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor. *J Biol Chem* 271, 28120-7.

Rietschel, E. T., Brade, H., Brade, L., Brandenburg, K., Schade, U., Seydel, U., Zahringer, U., Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O. (1987). Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Prog Clin Biol Res* 231, 25-53.

Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H., Schonbeck, U., Flad, H. D., Hauschildt, S., Schade, U. F., Di Padova, F., Kusumoto, S., and Schumann, R. R. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 216, 39-81.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8, 217-25.

Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, E. and Tomlanovich, M. (2001). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345, 1368-77.

Robert, P. Y. and Adenis J. P. (2001). Comparative review of the ophthalmic anti-bacterial preparations. *Drugs* 61:2, 175-85.

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 588-93.

Roth, R. I., Su, D., Child, A. H., Wainwright, N. R., and Levin, J. (1998). *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor prevents mortality late in the course of endotoxemia. *J Infect Dis* 177, 388-94.

Schumann, R. R., Kirschning, C. J., Unbehauen, A., Aberle, H. P., Knope, H. P., Lamping, N., Ulevitch, R. J., and Herrmann, F. (1996). The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 16, 3490-503.

Schumann, R. R., Lamping, N. and Hoess, A. (1997). Interchangeable endotoxin-binding domains in proteins with opposite lipopolysaccharide-dependent activities. *J Immunol* 159, 5599-605.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429-31.

Schumann, R. R., Rietschel, E. T. and Loppnow, H. (1994). The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol* 183, 279-97.

Seydel, U., Labischinski, H., Kastowsky, M., and Brandenburg, K. (1993). Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology* 187, 191-211.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-82.

Steel, D. M., and Whitehead, A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 81-8.

Suffredini, A. F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J. J., and O'Grady, N. P. (1999). New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol* 19, 203-14.

Takada, K., Ohno, N., and Yadomae, T. (1994). Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo. *Infect Immun* 62, 1171-5.

Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-76.

Takayama, K., Mitchell, D. H., Din, Z. Z., Mukerjee, P., Li, C., and Coleman, D. L. (1994). Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 269, 2241-4.

Tall, A. (1995). Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 64, 235-57.

Tanaka, S., Nakamura, T., Morita, T., and Iwanaga, S. (1982). *Limulus* anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of *Limulus* coagulation system. *Biochem Biophys Res Commun* 105, 717-23.

Tobias, P. S., Mathison, J. C., and Ulevitch, R. J. (1988). A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 263, 13479-81.

Tsai, E. Y., Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V., Barczak, A. K., Reimold, A. M., Glimcher, L. H., Fenton, M. J., Gordon, D. C., Dunn, I. F., and Goldfeld, A. E. (2000). A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* 20, 6084-94.

Vallespi, M. G., Alvarez-Obregon, J. C., Rodriguez-Alonso, I., Montero, T., Garay, H.,

Reyes, O., and Arana, M. J. (2003). A *Limulus* anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Int Immunopharmacol* 3, 247-56.

Vallespi, M. G., Glaria, L. A., Reyes, O., Garay, H. E., Ferrero, J., and Arana, M. J. (2000). A *Limulus* antilipopolysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 669-75.

Van den Berghe, G., Wouters, P., Weekers, F., Verwaest, C., Bruyninckx, F., Schetz, M., Vlasselaers, D., Ferdinande, P., Lauwers, P. and Bouillon, R. (2001). Intensive insulin therapy in critical ill patients. *N Engl J Med* 345, 1359-67.

van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaij, E., Verhoef, J., and van Asbeck, B. S. (1999). LPS-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* 67, 3824-9.

van der Poll, T., and van Deventer, S. J. (1999). Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 13, 413-26.

Van Lenten, B. J., Fogelman, A. M., Haberland, M. E., and Edwards, P. A. (1986). The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2704-8.

Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411-52.

Vilcek, J., and Lee, T. H. (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266, 7313-6.

Vincent, J. L. (1998). Search for effective immunomodulating strategies against sepsis. *Lancet* 351, 922-3.

Vincent, J. L., Sun, Q., and Dubois, M. J. (2002). Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis* 34, 1084-93.

Volk, H.-D., Reinke, P. and Docke, W. D. (2000). Clinical aspects: from systemic inflammation to ‚immunoparalysis‘. *Chem Immunol* 74, 162-77.

Wainwright, N. R., Miller R. J., and Paus, E. (1990). Endotoxin binding and neutralizing activity by a protein from *Limulus polyphemus*. In: Nowotny A., Spitzer J., Ziegler E. eds (Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions. Amsterdam: Elsevier) 315-25.

Warren, H. S., Suffredini, A. F., Eichacker, P. Q. and Munford, R. S. (2002). Risks and benefits of activated protein C treatment for severe sepsis. *N Engl J Med* 347, 1027-30.

Warren, H. S., Glennon, M. L., Wainwright, N., Amato, S. F., Black, K. M., Kirsch, S. J., Riveau, G. R., Whyte, R. I., Zapol, W. M., and Novitsky, T. J. (1992). Binding and neutralization of endotoxin by *Limulus* antilipoplysaccharide factor. *Infect Immun* 60, 2506-13.

Weiss, C. A., 3rd, Wasiluk, K. R., Kellogg, T. A., and Dunn, D. L. (2000). Bactericidal and endotoxin neutralizing activity of a peptide derived from *Limulus* antilipoplysaccharide factor. *Surgery* 128, 339-44.

Weiss, J. (2003). Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defense against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 31, 785-89.

Wright, S. D. and Jong, M. T. C. (1986). Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *E. coli* by binding to Lipopolysaccharide. *J Exp Med* 164, 1876-88.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-3.

Wurfel, M. M., Hailman, E., and Wright, S. D. (1995). Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 181, 1743-54.

Wurfel, M. M., Kunitake, S. T., Lichenstein, H., Kane, J. P., and Wright, S. D. (1994).

Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 180, 1025-35.

Yu, B., Hailman, E., and Wright, S. D. (1997). Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* 99, 315-24.

Zeni, F., Freeman, B., and Natanson, C. (1997). Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med* 25, 1095-100.

Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Mancinelli, R., Xu, X.-P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M. and Arditi, M. (1999). Bacterial Lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through Interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 274, 7611-4.

Anhang

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

ABS	AB-Serum, human
AS	Aminosäure
BPI	„bactericidal/permeability increasing protein“
CAP	„cationic antimicrobial protein“
CD14, m-, s-	„cluster of differentiation“, membranständig, löslich
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
ENP	Endotoxin-neutralisierendes Protein
ERK	extrazellulär regulierte Signalkinase
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
h; m	human; murin, Maus
HDL	„high density lipoprotein“
IL	Interleukin
JNK	„c-Jun NH ₂ -terminal kinase“
Kdo	2-keto-3-desoxy-D-manno-Octansäure
LALF	Limulus-anti-LPS-Faktor
LBP	LPS bindendes Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NO	„nitric oxide“, Stickstoffoxid
PAF	„platelets-activating-factor“
SAP	„serum-amyloid-protein“
SIRS	„systemic inflammatory response syndrom“
TLR	„toll-like-receptor“
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf R. Schumann für die Auswahl dieses äußerst interessanten Themas und für seine fachliche Betreuung bedanken.

Dr. Enrique Pérez-Payá danke ich für die Bereitstellung der von mir untersuchten Peptide.

Größten Dank schulde ich Dagmar Pfeil für die ausgezeichnete Einarbeitung im Labor, am Computer und in den Tiefen der Literaturdatenbanken, sowie für ihre Motivation und ihr Interesse an meinem Fortkommen zu Beginn der Arbeit. Leider konnte sie die Fertigstellung meiner Arbeit nicht mehr miterleben. Ebenso stand mir Kathrin Michelsen oft mit guten Ratschlägen zur Seite. Ich möchte mich auch sehr bei Norbert Lamping für seine hilfreichen Emails und die Überlassung von Abbildungen bedanken, auch wenn wir uns nicht persönlich kennengelernt haben.

Im Labor gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeitern der AG Schumann, insbesondere Werner und Nicolas und den stets geduldigen und selbstlosen TAs Fränzi, Nicole und Anja, nicht nur für ihre Hilfe im Labor, sondern auch für zahlreiche lustige Stunden und Erinnerungen an fröhliche Ausflüge.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für Geduld, Motivation und materielle Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Mirjam Büttner, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.