

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

**Inhibition Endotoxin-induzierter Effekte  
durch LPS-bindende Peptide *in vitro* und *in vivo***

Silke Bettina Ruml

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin  
(Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke  
2. Univ.-Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 25.07.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2007 angenommen.



Meiner Familie in großer Dankbarkeit gewidmet



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I-IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V-VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII-X</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	
<b>1.1 Die Bedeutung des Immunsystems in der Krankheitsabwehr</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Sepsis</b>	<b>1</b>
1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund	1
1.2.2 Definition	3
1.2.3 Epidemiologie und Erregerspektrum	5
1.2.4 Pathophysiologische Schritte bei der Sepsisentstehung	7
1.2.4.1 Charakterisierung des Endotoxins	7
1.2.4.2 Die LPS-Erkennung <i>in vivo</i> – Interaktion zwischen Lipid A, LBP, CD14 und TLR 4	10
1.2.4.3 Pro- und antiinflammatorische Immunantwort und ihre Wirkung auf den Organismus	13
<b>1.3 Therapeutische Strategien in der Sepsisbehandlung</b>	<b>15</b>
1.3.1 Konventionelle Behandlung	15
1.3.2 Experimentelle Therapieansätze	16
1.3.2.1 Neutralisation proinflammatorischer Mediatoren	16
1.3.2.2 Blockade von LPS-Rezeptoren und Signaltransduktion	18
1.3.2.3 Bindung und Neutralisation von Endotoxin	20

---

<b>1.4</b>	<b>LPS-inhibierende Peptide</b>	<b>24</b>
1.4.1	Charakterisierung der LPS-Bindungsdomänen von LALF, LBP, BPI und PMB	24
1.4.2	Aufbau und Eigenschaften der synthetischen Peptide	26
1.4.3	Toxizität und biologische Stabilität der Peptide	29
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Bezugsquellennachweis</b>	<b>32</b>
3.1.1	Versuchstiere	32
3.1.2	Chemische Reagenzien	32
3.1.3	ELISA-Kits	35
3.1.4	Verbrauchsmaterial	35
3.1.5	Geräte	35
3.1.6	Software	36
<b>3.2</b>	<b>Medien</b>	<b>36</b>
3.2.1	Grundmedium und Zusätze	37
3.2.2	„Lowtox“-Medium 10% für ANA 1-Zellkultur	37
3.2.3	„Lowtox“-Medium 10% für MonoMac 6-Zellkultur	38
3.2.4	„Lowtox“-Medium 10% für humane periphere mononukleäre Blutzellen	38
3.2.5	Einfriermedium für murine und humane Zellen	38
<b>3.3</b>	<b>LPS-inhibierende Peptide</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math>-ELISA</b>	<b>43</b>
3.4.1	Stammlösungen und Puffer	43
3.4.2	TNF- $\alpha$ -Messung in murinen Proben	44
3.4.3	TNF- $\alpha$ -Messung in humanen Proben	46

---

<b>3.5</b>	<b>MTT-Assay</b>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b><i>in vitro</i>-Modelle</b>	<b>49</b>
3.6.1	ANA 1-Zellkultur	49
3.6.2	MonoMac 6-Zellkultur	49
3.6.3	Humane periphere mononukleäre Blutzellen	50
3.6.4	Versuchsaufbau	51
<b>3.7</b>	<b><i>in vivo</i>-Modelle</b>	<b>54</b>
3.7.1	Versuchsaufbau für Inhibitionsexperimente	55
3.7.2	Versuchsaufbau für Überlebensversuche	56
3.7.3	<i>Colon ascendens</i> Stent Peritonitis (CASP)-Modell	57
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>LPS-inhibierende Peptide reduzieren die Endotoxin-induzierte TNF-<math>\alpha</math>-Freisetzung stimulierter Makrophagen <i>in vitro</i></b>	<b>58</b>
4.1.1	ANA 1-Zellkulturmodell	58
4.1.2	Untersuchung humaner Zellen	64
4.1.2.1	MonoMac 6-Zellkulturmodell	64
4.1.2.2	Humane periphere mononukleäre Blutzellen	66
<b>4.2</b>	<b>LPS-inhibierende Peptide supprimieren die TNF-<math>\alpha</math>-Sekretion <i>in vivo</i></b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Das Peptid LL 10-H 14 erhöht die Überlebensrate im Endotoxin/D-GalN-Modell</b>	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Im CASP-Modell bringt LL 10-H 14 leichte Verbesserung der Überlebensrate</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Problematik der adäquaten Sepsistherapie</b>	<b>73</b>
<b>5.2</b>	<b>LPS-inhibierende Peptide</b>	<b>73</b>
5.2.1	Die Identifizierung LPS-bindender Abschnitte	73
5.2.2	Die Bedeutung der räumlichen Konformation	77

---

5.2.3 Funktionelle Aktivität, Kinetik und Toxizität der Peptide	83
5.2.4 Optimierungsoptionen	84
<b>5.2 Klinische Implikationen der Ergebnisse</b>	<b>86</b>
<b>5.3 Ausblick</b>	<b>86</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>89</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>Danksagung</b>	<b>110</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1.1	Zellwandaufbau gramnegativer Bakterien	8
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung des Lipid A	9
Abbildung 1.3	Übersicht zur Endotoxin-induzierten Immunantwort	12
Abbildung 1.4	Antikörper gegen proinflammatorische Mediatoren	17
Abbildung 1.5	Blockade von Oberflächenrezeptoren und Signaltransduktion	19
Abbildung 1.6	Bindung und Neutralisation von Endotoxin	20
Abbildung 1.7	Limulus polyphemus	22
Abbildung 1.8	Die LPS-Bindedomäne des LALF	25
Abbildung 1.9	Schematische Darstellung der Polymyxin B-Struktur	26
Abbildung 1.10	Lineare LPS-bindende Peptide	27
Abbildung 1.11	Zyklische LPS-bindende Peptide	27
Abbildung 1.12	Das dimere Peptid LL 10-H 14	28
Abbildung 3.1	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	50
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls	53
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für <i>in vivo</i> - Inhibitionsexperimente	55
Abbildung 3.4	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für <i>in vivo</i> - Überlebensexperimente	56

---

Abbildung 4.1	Untersuchung LPS-bindender Peptide im ANA-1-Zellkulturmodell	59
Abbildung 4.2	Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im ANA-1-Zellkulturmodell	61
Abbildung 4.3	Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im MonoMac-6-Zellkulturmodell	65
Abbildung 4.4	Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im PBMC-Modell	66
Abbildung 4.5	Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im Maus-Inhibitionsmodell	68
Abbildung 4.6	Evaluation der funktionalen Aktivität des Peptids LL 10-H 14 <i>in vivo</i>	69
Abbildung 4.7	Überlebenswahrscheinlichkeit im D-GalN-Modell	71

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1.1	Serumhalbwertszeiten LPS-bindender Peptide	30
Tabelle 3.1	Lineare und zyklische LALF-Peptide	40
Tabelle 3.2	LBP-Peptide	41
Tabelle 3.3	BPI-Peptid	41
Tabelle 3.4	Polymyxin B-Peptide	41
Tabelle 3.5	D-Aminosäuren-Peptide	42
Tabelle 3.6	Multimere und hybride Peptide	42
Tabelle 3.7	Artifizielle Kontrollpeptide	43
Tabelle 4.1	Statistische Auswertung der Inhibitionswerte ausgewählter LPS-bindender Peptide	63
Tabelle 5.1	Übersicht über LPS-bindende Peptide anderer Autoren	79

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäure
ARDS	<i>Adult Respiratory Distress Syndrome</i> („Schocklunge“)
BPI	<i>Bactericidal/Permeability increasing Protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C5a	aktivierter Komplementfaktor 5
CAP	<i>cationic antibacterial protein</i>
CARS	<i>compensatory antiinflammatory response syndrom</i>
CASP	<i>Colon-ascendens-Stent-Peritonitis</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Klassifizierungssystem für Oberflächenrezeptoren)
d	Tag(e)
DAP12	<i>DNAX-activating protein of 12 kDa</i>
D-GalN	D-Galaktosamin N
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung ( <i>coagulation</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
ENP	Endotoxin-neutralisierendes Protein
Fmoc	N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl
g	Gramm; Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
gr.	griechisch
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1 protein</i>
i.p.	intraperitoneal
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IU	Internationale Einheiten
kD	Kilo-Dalton
KDO	Keto-desoxy-octonat

---

kg	Kilogramm
l	Liter
LALF	<i>Limulus</i> -Anti-LPS-Faktor
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid (synonym Endotoxin)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MD-2	Lymphozytenantigen 96
MDO	<i>membrane-derived oligosaccharides</i>
mEq	Milliequivalent
mg	Milligramm
MIF	Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor
Min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOV	Multiorganversagen
NK	natürliche Killerzelle
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation protein 88</i>
nm	Nanometer
NO	Nitritoxidase; Stickstoff
OD	optische Dichte
OP	Operation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck
pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
PMB	Polymyxin B

paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion bei Beatmung
rLALF	rekombinantes LALF-Protein
RT	Raumtemperatur
sCD14	lösliche CD14-Rezeptormoleküle
SAEP	synthetisches Anti-Endotoxin-Peptid
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
TALF	<i>Tachypleus</i> -Anti-LPS-Faktor
TGF-β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue-factor-pathway inhibitor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TREM	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
u.a.	unter anderem, und andere
UpM	Umdrehungen pro Minute
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Bedeutung des Immunsystems in der Krankheitsabwehr

Konfrontiert mit der allgegenwärtigen Präsenz von Mikroorganismen haben deren Wirte im Laufe der Evolution wirkungsvolle Strategien zur Abwehr von Krankheitserregern entwickelt. Das Immunsystem bewerkstelligt die Erkennung pathogener Keime sowie deren toxischer Produkte und ist damit für das Überleben des Organismus bei Infektionskrankheiten von elementarer Bedeutung (Ulevitch, 1993; Ulevitch und Tobias, 1995). Physiologischerweise wird die Integrität des Makroorganismus durch die Elimination eingedrungener Erreger gesichert beziehungsweise wiederhergestellt. Das Wirtsimmunsystem bedient sich dabei verschiedener Abwehrmechanismen wie der Phagozytose, der Aktivierung des Komplementsystems und der Rekrutierung spezifischer Immunzellen (Dustin und Springer, 1991), sowie eines komplexen Kommunikationssystems, an dem beispielsweise Zytokine beteiligt sind. Das komplizierte Zusammenspiel der einzelnen Komponenten ist trotz intensiver Forschung in vielen Details noch nicht verstanden.

Neben der physiologischen Funktion können jedoch auch pathologische Reaktionen des Immunsystems auftreten: hierzu zählen zum Beispiel Allergien, die eine weit verbreitete Störung darstellen. Dabei werden Immunzellen durch eigentlich unschädliche Substanzen stimuliert. Die Immunreaktion selbst kann eine erhebliche Beeinträchtigung des Organismus nach sich ziehen (z.B. allergischer Schock).

Auch durch den Kontakt mit pathogenen Bakterien beziehungsweise ihren Toxinen können überschießende Immunreaktionen induziert werden, was zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern wie der schweren Sepsis und dem septischen Schock führen kann. Diese schwerwiegenden Komplikationen einer Infektion stellen die moderne Medizin trotz deutlicher Verbesserungen auf den Gebieten der Diagnostik und Therapie noch immer vor größte Probleme. So liegt auch in Zeiten optimaler intensivmedizinischer Versorgung und moderner Antibiotikatherapie die Mortalitätsrate seit Jahren auf nahezu unverändert hohem Niveau (Neugebauer et al., 1995; Hardaway, 2000). Bevor jedoch näher auf aktuelle Bezüge eingegangen wird, soll zunächst ein kurzer Exkurs Einblick in die historische Entwicklung des Sepsisbegriffs geben.

## 1.2 Die Sepsis

### 1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Obwohl der Begriff „Sepsis“ eng mit der modernen Intensivmedizin verknüpft ist, handelt es sich tatsächlich um einen sehr alten medizinischen Terminus. Er wurde bereits von Hippokrates (zirka 460-370 v. Chr.) eingeführt und leitet sich von dem griechischen σήψις ("Fäulnis") ab. Diese „Wundfäule“ wurde infolge des mangelnden Wissens um hygienische Maßnahmen lange Zeit für Wundinfektionen in der Chirurgie verantwortlich gemacht. Auf Ibn Sina (979-1037) geht die Beobachtung zurück, dass die „Fäulnis des Blutes“ (Septikämie) mit Fieber einhergeht (Kreyman und Wolf, 1996).

Der in der Antike eingeführte Sepsis-Begriff wurde bis in das 19. Jahrhundert in dieser Form angewendet. Pathophysiologische Überlegungen gab es dagegen nur wenige. So wurde von vielen Wissenschaftlern postuliert, dass die Sepsis durch schädliche Substanzen aus der Luft verursacht würde. Eine moderne Sicht entwickelte sich erst aufgrund der Arbeiten von Ignaz Semmelweis (1818-1865), der als Gynäkologe in Wien tätig war. Durch Einführung einfacher hygienischer Maßnahmen wie Händewaschen konnte er die Mortalität des damals häufig auftretenden Kindbettfiebers deutlich reduzieren (Lenhartz, 1903). Louis Pasteur (1822-1895) entdeckte kleinste einzellige Lebewesen, die er als „Bakterien“ beziehungsweise „Mikroben“ bezeichnete. Er vermutete bereits richtig, dass es sich bei diesen um Krankheitserreger handeln könnte.

Hugo Schottmüller (1867-1936) schließlich legte 1914 den Grundstein für eine moderne Sepsisdefinition: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ (Schottmüller, 1914). Damit war erstmals die Bedeutung eines Infektionsherdes als fundamentaler Bestandteil der Sepsis formuliert. Schon damals äußerte er „eine Therapie hätte sich also nicht gegen die im Blute kreisenden Bakterien, sondern gegen die ... frei werdenden Bakterien-Toxine zu richten...“ und griff seiner Zeit damit weit voraus.

Die Einführung antiseptischer Verfahren wie der Sterilisation bedeutete zwar einen großen medizinischen Durchbruch, jedoch verstarb nach wie vor eine große Anzahl von Patienten infolge einer Sepsis. Da man bei diesen Patienten häufig eine ausgeprägte Hypotonie feststellte, bezeichnete man den Zustand als „septischen Schock“. Erst mit der Einführung der Antibiotika Mitte des vergangenen Jahrhunderts verzeichnete man eine deutliche Reduktion der Mortalität. Mit dem nun einsetzenden technischen Fortschritt in der Medizin begann auch die Entwicklung der Intensivmedizin. 1967 wurde von Ashbough und Mitarbeitern bei intensivmedizinischen Patienten eine schwere Lungenerkrankung beschrieben, die aus schwerer Atemnot, Verlust der Lungendehnbarkeit und Flüssigkeitseinlagerung bestand. Diese Erkrankung wurde als „*Adult Respiratory Distress Syndrome*“ (ARDS) bezeichnet und führte häufig zum Tod. Besonders häufig trat diese Komplikation bei Sepsispatienten auf. Es zeigte sich, dass die Entwicklung des ARDS Folge einer Entzündungsreaktion ist und somit durch körpereigene Substanzen ausgelöst wird. Schließlich entdeckte man, dass diese Entzündungsreaktion nicht auf die Lunge beschränkt ist sondern vielmehr der gesamte Organismus involviert wird. Daraus ergab sich die Folgerung, dass die Reaktion der körpereigenen Immunabwehr auf eine Infektion eine wichtige Rolle spielt. Der Intensivmediziner Roger C. Bone (1941-1997) legte dies 1989 in der noch heute gültigen Sepsisdefinition dar: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ (Bone et al., 1989).

## 1.2.2 Definition

Im Rahmen der Sepsis kommt es zu einer hochkomplexen, systemischen Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus auf eine Infektion. Die Ausprägung und Schwere der Erkrankung ist variabel und wird durch eine Vielzahl von Faktoren -wie zum Beispiel Vorerkrankungen des betroffenen Patienten- beeinflusst. Es handelt sich um ein progredientes Krankheitsbild, bei dem leichtere Formen jederzeit in fortgeschrittene Stadien übergehen können. Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der Inzidenz von Organdysfunktionen und Letalität (ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992).

Die Diagnosestellung von Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock erfolgt anhand von Vitalparametern (Kreislauf, Atmung, Temperatur), Laboranalysen, mikrobiologischen Untersuchungen und klinischem Bild. Dabei ist die Bewertung aller verfügbaren Daten im Zusammenhang wichtig, da eine korrekte Diagnosestellung anhand *einzelner* Parameter nicht möglich ist (Dellinger et al., 2004).

Die oben erwähnte, 1989 von Bone veröffentlichte Definition des Sepsis-Begriffs wurde später von einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* weitergeführt. Einige medizinische Begriffe wurden in diesem Zusammenhang neu eingeführt beziehungsweise neu definiert mit der Zielsetzung, das Augenmerk mehr auf das klinische Bild zu richten (ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992; Bone, 1995). Darüber hinaus wurde von der Konsensuskonferenz ein Katalog mit den diagnostischen Kriterien der Sepsis erstellt, der von der Arbeitsgruppe Sepsis der *European Society of Intensive Care Medicine* überarbeitet und modifiziert wurde:

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
Bakteriämie	Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut
Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion auf einen unspezifischen Insult (z.B. Infektion, Verbrennung, Trauma, OP) mit $\geq 2$ der genannten Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypo- (<math>&lt; 36^{\circ}\text{C}</math>) oder Hyperthermie (<math>&gt; 38^{\circ}\text{C}</math>)</li> <li>• Tachykardie (<math>&gt; 90/\text{Min}</math>)</li> <li>• Tachypnoe (<math>&gt; 20/\text{Min}</math>) und/oder arterieller <math>\text{pCO}_2 &lt; 33 \text{ mmHg}</math> und/oder maschinelle Beatmung</li> <li>• Leukozytose <math>&gt; 12.000/\mu\text{l}</math> oder Leukopenie <math>&lt; 4.000/\mu\text{l}</math> und/oder Linksverschiebung <math>&gt; 10 \%</math> im Differentialblutbild</li> </ul>

Sepsis	SIRS bei vermuteter oder nachgewiesener Infektion
Schwere Sepsis	<p>Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion (<math>\geq 1</math> der genannten):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute Enzephalopathie (reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Delir ohne Beeinflussung durch Psychotropika)</li> <li>• Thrombozytopenie (Thrombozyten <math>&lt; 100.000/\mu\text{l}</math> oder Thrombozytenabfall <math>&gt; 30\%</math> in 24 h ohne Blutverlust als Ursache)</li> <li>• Arterielle Hypoxämie (<math>\text{paO}_2 &lt; 75 \text{ mmHg}</math> unter Raumluft, <math>\text{paO}_2/\text{FiO}_2 &lt; 250 \text{ mmHg}</math> ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache)</li> <li>• Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck <math>&lt; 90 \text{ mmHg}</math> oder mittlerer arterieller Blutdruck <math>&lt; 70 \text{ mmHg}</math> über mind. 1 h trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)</li> <li>• Renale Dysfunktion (Oligurie <math>&lt; 0,5 \text{ ml/kg/h}</math> über mind. 1 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins)</li> <li>• Metabolische Azidose (Basendefizit <math>&gt; 5,0 \text{ mEq/l}</math>)</li> </ul>
Septischer Schock	<p>Sepsis mit Schockzeichen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arterielle Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie ohne andere Ursachen (systolischer Blutdruck <math>&lt; 90 \text{ mmHg}</math> oder mittlerer arterieller Blutdruck <math>&lt; 70 \text{ mmHg}</math> für mind. 2 h bzw. Einsatz von Vasopressoren erforderlich)</li> </ul>

Die Dauer der einzelnen Phasen dieses sequenziellen Geschehens kann patientenabhängig stark variieren. Entsprechend schwierig gestaltet sich mitunter die klinische Diagnosestellung und damit der frühzeitige Beginn der Therapie, der jedoch wiederum für die Prognose ausschlaggebend ist. Abwehrgeschwächte Patienten auf Intensivstationen sind besonders anfällig gegenüber schweren und schwersten Verläufen bakterieller Infektionen. Immunsuppression ihrerseits kann Folge einer vorbestehenden Grunderkrankung, einer Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten oder eines operativen Traumas sein. Chirurgische Tumorpatienten sind daher zur Entwicklung eines septischen Krankheitsbildes besonders prädisponiert. Da die Fortschritte in der Medizin oftmals auch ein

aggressiveres und invasiveres Vorgehen bedingen, ist ein Anstieg der potenziellen Sepsispatienten zu erwarten.

Entsprechend der geringen Spezifität der Kriterien für das SIRS ist die Inzidenz auf chirurgischen Intensivstationen mit bis zu 93 % überaus hoch (Pittet et al., 1995). Die Letalität von etwa 7 % wird dabei in erster Linie durch die Grundkrankheit bedingt (Rangel-Frausto et al., 1995). Nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen entwickeln 9-12 % der Patienten eine postoperative abdominale Sepsis (Bartels und Siewert, 1991). Diese stellt aufgrund der Letalität von etwa 16 % und der schwierigen Therapierbarkeit ein klinisches Problem dar (Rangel-Frausto et al., 1995). Eine schwere Sepsis ist bereits mit einer Letalität von etwa 35 % assoziiert und im Zustand des septischen Schocks wird sie sogar mit 46-82 % angegeben (Cohen und Glauser, 1991; Salvo et al., 1995).

Die Sepsis-Definitionen und -Diagnosekriterien haben sich seit ihrer Festlegung 1991 durchaus bewährt. Eine Schweregradeinteilung im Sinne eines Stagings, die -vergleichbar dem Vorgehen bei onkologischen Erkrankungen- eine feinere Unterteilung der Patienten mit besser abstimmbaren Therapieoptionen bietet, ist damit jedoch kaum möglich. Unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse zur Pathophysiologie wurde daher vor einigen Jahren auch ein Staging-Konzept für septische Krankheitsbilder entwickelt, das sich aus den Kriterien *Prädisposition*, *Infektion*, *Immunantwort (Response)* und *Organdysfunktion* zusammensetzt. Ziel des sogenannten **PIRO-Konzepts** ist es, Sepsispatienten anhand der vorgegebenen Kriterien genauer zu charakterisieren und nach Schweregraden einzuteilen, um klinisch relevante Untergruppen als Grundlage für aussagekräftige Therapiestudien zu definieren. Derzeit hat dieses Staging allerdings noch keine praktische Bedeutung (Tsiotou et al., 2005; Trappe und Riess, 2005).

### 1.2.3 Epidemiologie und Erregerspektrum

Im Jahre 1990 erlagen in den USA rund 198.000 Patienten den Folgen eines septischen Schocks (Parrillo et al., 1990; Hardaway, 2000). Nach einer neueren Untersuchung an insgesamt über 6,5 Millionen Patienten erkrankten in den USA jährlich zirka 751.000 Menschen an einer Sepsis, von diesen versterben etwa 215.000. Die Mortalitätsrate von 28,6 % liegt auf dem Niveau der Sterblichkeit nach einem Myokardinfarkt. Bemerkenswert ist der deutliche Anstieg der Inzidenz sowie der Mortalität mit zunehmendem Alter (Angus et al., 2001).

Anhand dieser Daten muss festgehalten werden, dass sich die Befürchtung einer zunehmenden Zahl von Sepsiserkrankungen und damit assoziierten Todesfällen zu bestätigen scheint. Vielerlei Ursachen sind daran beteiligt: Zum einen beobachtet man seit Jahren gerade im Krankenhausbereich und auf Intensivstationen Resistenzentwicklungen von Mikroorganismen gegen verfügbare Antibiotika. Zum zweiten trägt die sich ändernde Situation der Intensivpatienten selbst dazu bei, da im Zuge verbesserter Behandlungsmöglichkeiten auch Patienten mit gravierenden Vorerkrankungen und ungünstiger Prognose therapiert werden, die aufgrund ihres supprimierten Immunsystems für eine Sepsis extrem anfällig sind (Allen und Weiner, 1981; Varty et al., 1994). Zu dieser Risikogruppe zählen ebenso Patienten, die mit immunsupprimierenden Maßnahmen behandelt werden (z.B. Zytostatika, Cyclosporin, Kortison, Radiatio) wie auch Menschen, die unter Immunschwächeerkrankungen (z.B.

AIDS) leiden. Zum dritten nimmt in den Industrienationen der Anteil der älteren Bevölkerung kontinuierlich zu, bei der -wie oben erwähnt- eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber septischen Erkrankungen besteht.

Erwähnenswert ist weiterhin, dass dem Krankheitsbild durchaus auch eine erhebliche gesundheitsökonomische Bedeutung zukommt. Die geschätzten Behandlungskosten in den USA liegen bei rund 17 Milliarden Dollar jährlich (Angus et al., 2001). Sie resultieren hauptsächlich aus den langen Liegezeiten auf Intensivstationen, die nicht zuletzt deshalb erforderlich sind, weil für die Therapie der Sepsis bis heute keine spezifischen Medikamente zur Verfügung stehen.

Antibiotika spielen seit ihrer Entdeckung eine sehr wichtige Rolle in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Heinzel und Root, 1991) und die Sepsis-Sterblichkeit konnte mit ihrer Hilfe bereits deutlich verringert werden; so sank beispielsweise nach der Einführung von Penicillin im Jahr 1947 die Letalität der *Staphylococcus aureus*-Sepsis von 47 % auf 19 %. Eine weitere Reduktion ist allerdings trotz der Einführung neuer, hochwirksamer Antibiotika und neuer Therapiekonzepte sowie der Verbesserung intensivmedizinischer Maßnahmen noch nicht gelungen.

Der Entstehung einer septischen Erkrankung liegt die Immunantwort eines Wirtsorganismus zugrunde, der von Mikroorganismen infiziert wird. Unerheblich ist dabei zunächst, ob diese Infektion bakterieller, viraler, fungaler oder parasitärer Natur ist, denn alle diese Erreger sind prinzipiell in der Lage, eine Sepsis zu induzieren. Die am häufigsten aus Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock isolierte Erregergruppe stellt jedoch *Escherichia coli* zusammen mit anderen gramnegativen Keimen (hauptsächlich *Klebsiella species*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa*). Auch *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* werden häufig als Auslöser gefunden (Sands et al., 1997; Tsiotou et al., 2005). In Studien konnte die traditionelle Meinung widerlegt werden, dass durch gramnegative Bakterien ausgelöste Infektionen häufiger mit Sepsis assoziiert seien und eine schlechtere Prognose hätten; vielmehr zeigte sich, dass die Mortalität vom Erregertyp unabhängig ist (Glauser et al., 1991).

Eine entscheidende Rolle für eine suffiziente Behandlung spielt die Identifikation des Sepsisherds. Einerseits kann dieser gegebenenfalls durch therapeutische Intervention saniert werden, andererseits ist es möglich, aus Gewebe- oder Flüssigkeitsproben Erreger zu isolieren, wodurch die antibiotische Therapie optimiert werden kann. Die Suche nach dem Ausgangspunkt der Sepsis wurde durch moderne bildgebende Verfahren wie die Computertomographie wesentlich verbessert. Trotzdem kann er bei 20-30 % der Patienten nicht eindeutig gefunden werden (Tsiotou et al., 2005). Nach abdominalchirurgischen Eingriffen finden sich häufig septische Peritonitiden im Zusammenhang mit einer Anastomoseninsuffizienz oder intestinalen Leckage. Eine weitere wichtige Infektionsquelle stellt die mechanische Ventilation über einen längeren Zeitraum dar, da sie oftmals Pulmonitiden zur Folge hat. Infektionen der Lunge sind nach neueren Untersuchungen häufiger Ausgangspunkt für eine Sepsis, ebenso der Urogenitaltrakt (Angus et al., 2001; Alberti 2002).

### 1.2.4 Pathophysiologische Schritte bei der Sepsistentstehung

Trotz der hohen Komplexität der Vorgänge, die im Organismus im Rahmen der Immunantwort ablaufen, konnten viele pathophysiologische Mechanismen der Sepsis in den vergangenen Jahren aufgeklärt werden (Parrillo, 1993; Fey und Fuller, 1987; Baumann et al., 1993). Dabei wurde deutlich, dass entgegen früher vertretener Ansichten die Veränderungen in erster Linie nicht unmittelbar durch die eingedrungenen Mikroorganismen hervorgerufen werden. Auch die toxischen Wirkungen von bakteriellen Endo- und Exotoxinen selbst scheinen nicht für die Schädigung des Organismus verantwortlich zu sein. Vielmehr geht man inzwischen davon aus, dass die Toxin-induzierte Abwehrreaktion entgleist und es zu einer massiven Freisetzung von Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukinen und Prostaglandinen sowie hochreaktiven Radikalen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Stickoxid kommt, welche die Pathophysiologie der Sepsis wesentlich bestimmt. Die genauen Ursachen für diese überschießende Reaktion sind zurzeit noch nicht bekannt (Trappe und Riess, 2005).

Die initialen Ereignisse, die im Rahmen einer nicht (mehr) lokalisierten und kontrollierten Infektion zur systemischen Immunreaktion führen, differieren abhängig vom auslösenden Mikroorganismus sowie der Reaktionslage des Patienten. Als Mediatoren kommen beispielsweise immunstimulierende Toxine wie das Endotoxin (synonym Lipopolysaccharid, LPS) in Betracht. Als Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien kommt es bei einer Infektion mit diesen Erregern in großer Menge im Organismus vor. Die Pathophysiologie der gramnegativen Sepsis ist inzwischen gut untersucht und modellhaft verstanden. Aber auch Toxine grampositiver Bakterien oder Pilze können vergleichbare Immunreaktionen auslösen. Im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke kommt es als Reaktion des Organismus zum systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), das je nach Ausprägung seiner Komponenten und der Reaktionsbereitschaft des Patienten bis hin zu (Multi-) Organdysfunktion, Schock und Tod führen kann.

Als erste wesentliche Substanz, die Veränderungen im Rahmen einer Sepsis hervorrufen kann, wurde das Endotoxin identifiziert. Im folgenden Abschnitt sollen zum besseren Verständnis dessen Eigenschaften genauer betrachtet werden.

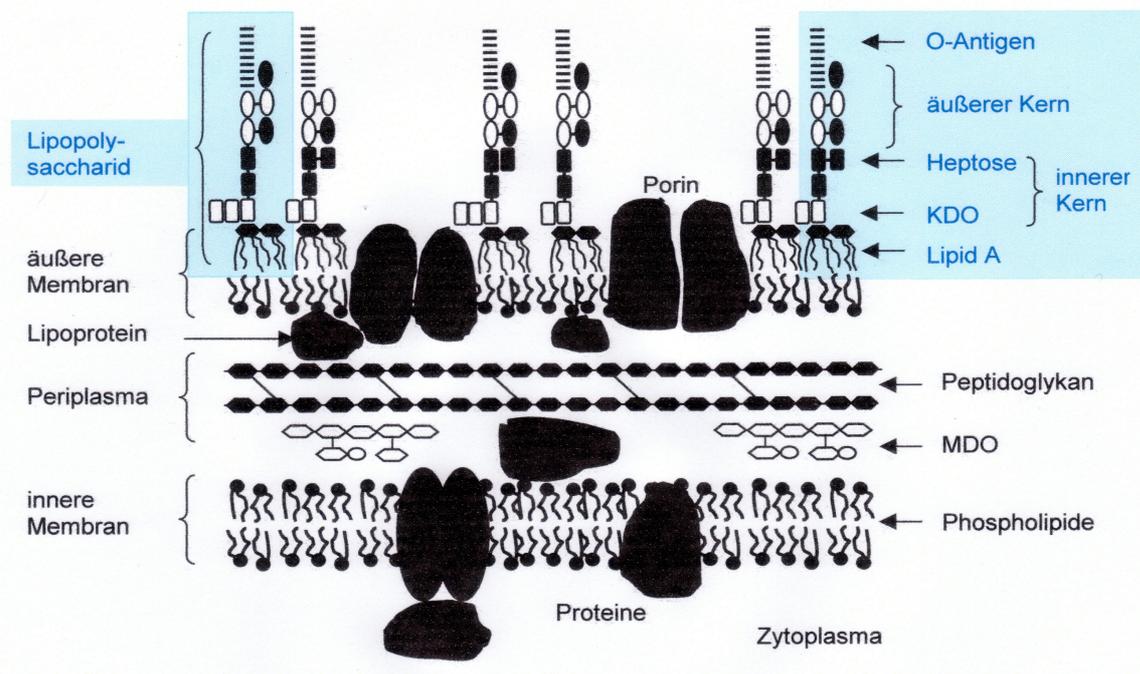
#### 1.2.4.1 Charakterisierung des Endotoxins

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gelang der Nachweis, dass bakterielle Toxine verantwortlich für die Wirtsreaktion bei Infektionskrankheiten sind. Zunächst wurden von den Mikroorganismen sezernierte und als Exotoxine bezeichnete Proteine als Auslöser identifiziert. Später wurde in *Vibrio cholerae* aber neben dem hitzelablen Exotoxin noch eine weitere toxische Substanz entdeckt: Diese Komponente war hitzeresistent und wurde von lebenden Bakterien nicht freigesetzt, sondern entwickelte ihre Toxizität erst nach deren Absterben (Pfeiffer, 1892; Rietschel et al., 1994). Man nahm daher an, dass sich dieses Toxin *innerhalb* des Erregers befinde und bezeichnete es demnach als **Endotoxin** (gr. ενδον innen). Wie sich herausstellte, handelt es sich dabei um einen gemeinsamen Bestandteil der Zellhülle aller gramnegativen Bakterien (Raetz, 1990; Rietschel und Brade, 1992). Diese besteht aus zwei zweilagigen Membranen (siehe Abbildung 1.1), von denen die innere aus Phospholipiden aufgebaut ist, während die äußere eine asymmetrische Organisation aufweist (Raetz, 1990). Die Innenseite der äußeren Membran

besteht wiederum aus Phospholipiden, die außen liegende Schicht dagegen aus Endotoxin. Die Integrität dieser Membranarchitektur ist lebensnotwendig für die Bakterien, da sie unter anderem eine entscheidende Rolle im Nahrungsmitteltransport spielt (Rietschel et al., 1994). Auch für das Wachstum der Mikroorganismen sind zumindest bestimmte Anteile des Endotoxins essentiell (beispielsweise bei *E. coli* Lipid A und zwei KDO-Moleküle) (Raetz, 1990).

Im Zusammenhang mit der chemischen Analyse des Endotoxins, die als Bestandteile Lipide und Polysaccharide identifizierte, wurde der Begriff **Lipopolysaccharid (LPS)** geprägt. Beide Bezeichnungen werden seither synonym verwendet.

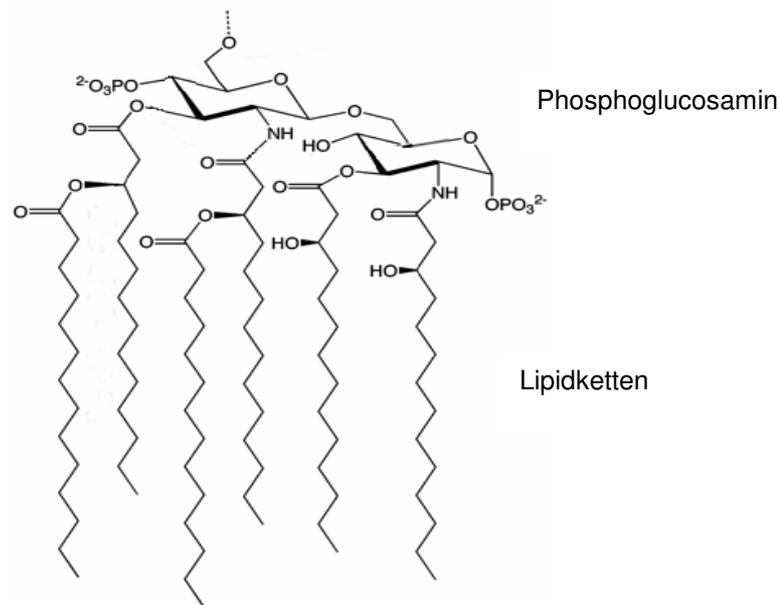
LPS wird nach Abtötung und Lyse der Bakterien im Wirtsorganismus freigesetzt. Es fungiert als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), das von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt wird und diesen die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen signalisiert. Kleinere Mengen aktivieren Immunozyten, die proinflammatorische Mediatoren freisetzen und so die Immunantwort in die Wege leiten. Hohe Konzentrationen dagegen können dramatische pathophysiologische Effekte hervorrufen (siehe auch Punkt 1.2.4.3).



### Abbildung 1.1 Zellhüllenaufbau gramnegativer Bakterien

Die Abbildung gibt schematisch den Aufbau der Zellhülle gramnegativer Bakterien wieder. Diese setzt sich zusammen aus einer inneren Membran, die aus Phospholipiden aufgebaut ist, sowie einer äußeren Membran, welche aus Phospholipiden besteht und zur äußeren Seite hin Lipopolysaccharide trägt.

Blau hinterlegt dargestellt ist der Aufbau des LPS. Innere und äußere Membran sind durch den periplasmatischen Raum getrennt, in dem Peptidoglykan enthalten ist. In beide Membranen sind Proteine eingelagert. MDO: Membrane-derived oligosaccharides; KDO: Keto-desoxy-octonat



**Abbildung 1.2. Schematische Darstellung des Lipid A**

Beispielhaft dargestellt ist hier die Lipid A-Einheit von *E.coli*. Lipid A besteht aus zwei Phosphoglucosaminen, an die Lipidketten angeheftet sind. Die Lipid A-Einheiten unterschiedlicher Bakterienarten besitzen nur eine geringe Variabilität, sie divergieren lediglich in der Länge, der Verteilung und der Anzahl der Lipidketten.

Mitte der 50er Jahre gelang es, die membranverankerte Untereinheit des LPS, die als Lipid A bezeichnet wird, zu charakterisieren (Westphal et al., 1978). Lipid A (Abbildung 1.2) vermittelt die meisten biologischen Aktivitäten des LPS und stellt auch dessen für den Menschen toxische Komponente dar (Galanos et al., 1984; Galanos et al., 1985). In natürlicher Form kommt es nicht als isoliertes Molekül vor. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein ungewöhnliches Phosphoglykolipid mit einer in der Natur einzigartigen Architektur (Rietschel et al., 1987; Rietschel et al., 1994). Zusammen mit der inneren Kernregion ist es die am höchsten konservierte Einheit aller LPS-Formen. Die Lipid A-Komponenten verschiedener Bakterienstämme weisen untereinander eine sehr große Ähnlichkeit auf. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Feinstruktur, zum Beispiel der Länge und Anzahl der Lipidketten.

Neben dem Lipid A-Anteil gibt es zwei weitere Einheiten des LPS-Moleküls, die als O-Antigen und als Kernregion bezeichnet werden (Abbildung 1.1). Diese enthalten stark verzweigte Polysaccharide, welche je nach Bakterienstamm unterschiedliche Länge und Zusammensetzung aufweisen und so eine Differenzierung und Klassifizierung von Serotypen ermöglichen. Die Länge der Zuckerreste bestimmt außerdem das Aussehen von Bakterienstämmen auf festen Kulturmedien. Bakterien, die ein O-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, bilden bei Anzucht auf Nährstoffagar sogenannte S-Formen (engl.: *smooth* = glatt), Mutanten ohne O-Antigen hingegen R-Formen (engl.: *rough* = rau).

Das O-Antigen repräsentiert die am stärksten exponierte Komponente des LPS. Es weist in seiner Zusammensetzung eine äußerst große Heterogenität und strukturelle Variabilität auf und kann aus bis zu 50 Oligosaccharid-Einheiten zusammengesetzt sein. Die serologische Spezifität eines Bakterienstammes kann so anhand des O-Antigens bestimmt werden. Nicht eindeutig geklärt ist die biologische Wirkung.

O-Antigene scheinen für das bakterielle Wachstum nicht essentiell zu sein, erhöhen jedoch die Widerstandskraft unter ungünstigen Bedingungen und können die Virulenz (z.B. bei *H. influenzae*) erhöhen (Moxon, 1992; Hood et al., 1996)

Die Kernregion des LPS setzt sich aus zwei Einheiten zusammen, die als innere und äußere Kernregion bezeichnet werden. Diese bestehen aus verzweigten Heteropolysacchariden und besitzen bei den meisten gramnegativen Bakterienstämmen eine größere strukturelle Ähnlichkeit als die O-Seitenketten (Glauser et al., 1991). Die wichtigsten Komponenten der äußeren Region sind Heptosen, Glucosen und Galaktosen. Die innere Region enthält dagegen die für die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien charakteristische Zuckereinheit Keto-desoxy-octonat (KDO) (Brade und Rietschel, 1986), über die sie direkt mit dem Lipid A verknüpft ist. Die Struktur des KDO ist ähnlich wie die des Lipid A hochkonserviert. LPS mit intaktem KDO ist für das Überleben der Bakterien essentiell und scheint die biologische Aktivität des Lipid A modulieren zu können (Vaara und Nikaido, 1984).

Endotoxin ist in der Lage, im Menschen bereits in geringsten Mengen fatale Effekte hervorzurufen (siehe auch Punkt 1.2.4.3). Viele der im Wirtsorganismus ablaufenden Schritte konnten durch intensive Forschung in den vergangenen Jahren aufgeklärt werden. Die wichtigsten sollen im folgenden Abschnitt orientierend erläutert werden.

#### 1.2.4.2 Die LPS-Erkennung *in vivo* - Interaktion zwischen Lipid A, LBP, CD14 und TLR 4

Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen spezifisch mikrobielle Strukturen, die als Pathogen-assoziierte Muster (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um Moleküle, welche hochkonserviert in Mikroorganismen, nicht jedoch in normalem Wirtsgewebe vorhanden und für diese von essenzieller Bedeutung sind. Hierzu zählen beispielsweise bakterielle DNA, Peptidoglykane und auch Endotoxin. Phagozyten und NK exprimieren spezielle Rezeptoren, die diese Muster erkennen, binden und teilweise Signaltransduktionswege aktivieren (*pattern recognition receptors, PRR*). Zur Gruppe der signalisierenden Rezeptoren gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Diese phylogenetisch hochkonservierten Moleküle bilden einen wichtigen Kommunikationsweg zwischen natürlicher und adaptiver Immunität (Medzhitov et al., 1997; Medzhitov und Janeway, 2000). TLR 4 fungiert als spezifischer Rezeptor für LPS (Poltorak et al., 1998a; Beutler et al., 2001). Im Zusammenspiel mit dem membranständigen LPS-Rezeptor CD14 erfolgt nach Bindung von Endotoxin die Aktivierung der Zelle. CD14 ist unter anderem auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen lokalisiert (Wright et al., 1990). Lange Zeit wurde angenommen, dass CD14 der wichtigste LPS-Rezeptor sei, jedoch blieb unklar, wie die Signaltransduktion durch ein Molekül erfolgen konnte, das keine transmembranen Anteile besitzt (Cohen, 2002). Diese Lücke wurde durch die Entdeckung der TLR und ihrer Bedeutung geschlossen. **Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP)** ist ein von Hepatozyten synthetisiertes Akute-Phase-Protein, das spezifisch an die Lipid A-Einheit bindet (Wright et al., 1989; Schumann et al., 1990; Glauser et al., 1991; Gallay et al., 1993a; Schumann et al., 1994a; Schumann et al., 1994b; Tobias et al., 1994; Taylor et al., 1995; Lamping et al., 1996). Die entstehenden LBP-Lipid A-Komplexe katalysieren die Bindung von LPS an CD14 und TLR 4 (Tobias

et al., 1994; Beutler et al., 2001; Cristofaro und Opal, 2003). Infolge der Erkennung des Pathogens kommt es zur Signaltransduktion unter Beteiligung von MD-2, MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*), IRAK (IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase), TRAF6 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6) und MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) mit NFκB-Translokation in den Nukleus (Han et al., 1994; Hardaway, 2000; Trappe und Riess, 2005). Konsekutiv wird die Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 und TNF-α hochreguliert (Wright et al., 1990; Cohen, 2002; Opal, 2003; van der Poll und Opal, 2008). Die daraus entstehenden Produkte führen zu den charakteristischen Entzündungssymptomen am Ort der Infektion wie Rötung, Schwellung und Schmerzen und vermitteln weitere, sehr komplexe Zellreaktionen, die im nächsten Punkt genauer erläutert werden (siehe zur schematischen Übersicht auch Abbildung 1.3).

Die Beteiligung von LBP und CD14 in der Übermittlung der LPS-Toxizität wurde unter anderem anhand von Tiermodellen demonstriert, in denen die Signaltransduktion durch LBP- beziehungsweise CD14-neutralisierende Antikörper inhibiert werden konnte (Gallay et al., 1993a; Grunwald et al., 1993; Haziot et al., 1993). Bemerkenswert ist der Befund, dass LBP nicht nur zellstimulierende Aktivitäten durch die Bindung von LPS an CD14 besitzt, sondern zusammen mit löslichem CD14 (sCD14) LPS in vitro durch Transport in Lipoproteinkomplexe detoxifizieren kann (Wurfel et al., 1994; Wurfel et al., 1995). Des Weiteren ist LBP an der Aufnahme von LPS-Aggregaten durch Phagozyten beteiligt, ohne dass dies zu einer Zellstimulation führt (Gegner et al., 1995).

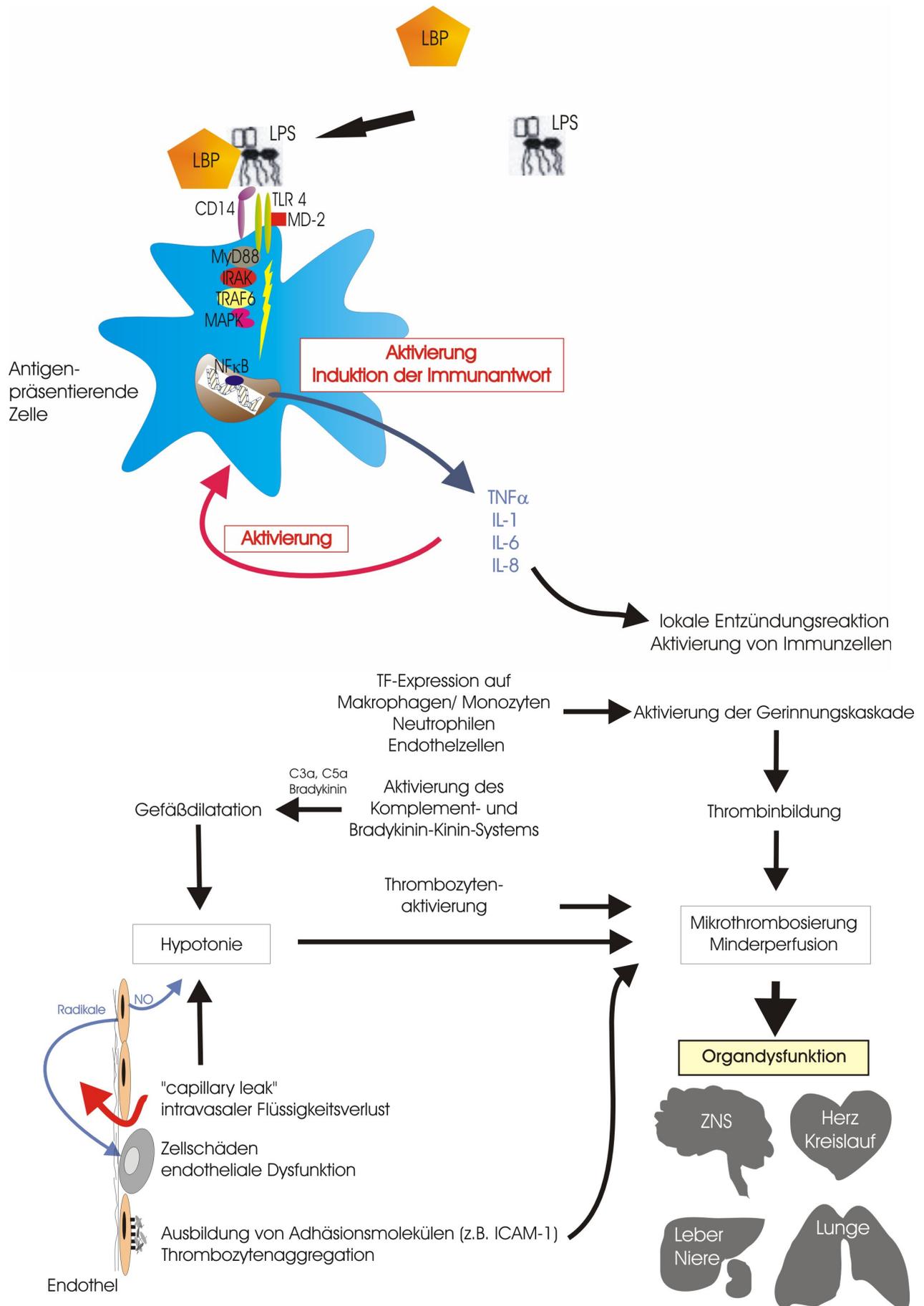


Abbildung 1.3: Übersicht zur Endotoxin-induzierten Immunantwort (Abkürzungen siehe Text)

### 1.2.4.3 Pro- und antiinflammatorische Zytokinantwort und ihre Wirkung auf den Organismus

#### Zytokine

Durch die Bindung von LPS werden immunkompetente Zellen - in erster Linie Makrophagen und Monozyten, aber auch neutrophile Granulozyten - aktiviert (Evans, 1996). In der Folge kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, wobei zunächst die *proinflammatorischen* Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 sezerniert werden (Waage und Espevik, 1988; Girardin et al., 1988; Debets et al., 1989; Damas et al., 1989; Dinarello, 1989; Waage et al., 1989; Calandra und Glauser, 1990; Offner et al., 1990; Calandra et al., 1991; Halstensen et al., 1993; Dinarello und Wolff, 1993; Aldridge, 1993; Tracey und Cerami, 1994; van Deuren, 1994; Calandra et al., 2002). Die genannten Zytokine modulieren zum einen die Synthese und Expression verschiedener Mediatoren und aktivieren zum anderen ihrerseits weitere Leukozyten, was schließlich das Ansteigen der Zytokinspiegel (u.a. IFN- $\gamma$  und IL-2) im Blut bedingt. In Tierversuchen zeigte sich, dass beispielsweise TNF- $\alpha$  innerhalb einer Stunde nach LPS-Applikation freigesetzt wird und der maximale Serumspiegel innerhalb eines Zeitraums von 1-2 Stunden nach der Stimulation liegt. Danach erfolgt allmählich die Elimination aus dem Kreislauf, wobei die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Blut noch für mehrere Tage erhöht sein kann (Beutler et al., 1985; Michie et al., 1988; Cannon et al., 1990; Glauser et al., 1991). Anhand der Konzentration diverser Zytokine kann die Prognose des septischen Geschehens abgeschätzt werden (Casey et al., 1993; Pinsky et al., 1993; Marty et al., 1994).

Im weiteren Verlauf kommt es im Sinne einer Kompensation auch zum verzögerten Anstieg *antiinflammatorischer* Substanzen (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, IL-1 Rezeptorantagonisten) im Serum (Bone, 1996; van der Poll, 2001). Diese Abfolge von hyper- und hypoinflammatorischer Phase kann dazu führen, dass sich wieder ein Gleichgewicht einstellt (*compensatory antiinflammatory response syndrom*, CARS) (Bone, 1996; Trappe und Riess, 2005). Häufig resultieren daraus jedoch Imbalancen. Ein deutliches Überwiegen antiinflammatorischer Zytokine, die sogenannte Immunparalyse, verzögert und verkompliziert die suffiziente Abwehr der Krankheitserreger (Volk et al. 2000; van der Poll, 2001). Welche Auswirkungen das Zusammenspiel pro- und antiinflammatorischer Mechanismen auf den klinischen Verlauf hat, ist derzeit noch nicht geklärt.

#### Thrombozyten

Die in der Initialphase der schweren Sepsis auftretende Thrombozytopenie ist ein typischer Befund, der zurückgeführt wird auf die direkte Interaktion der Plättchen mit Mikroorganismen beziehungsweise mit deren Toxinen. Aktivierte Thrombozyten setzen vasoaktive, prokoagulatorische und fibrinolysehemmende Mediatoren frei. Auf der Plättchenoberfläche werden Adhäsionsmoleküle exprimiert, was die Interaktion mit ebenfalls aktivierten Leukozyten und Endothelien forciert und die Bildung von Mikrothromben begünstigt (Trappe und Riess, 2005).

## Endothel

Durch die Stimulation durch Endotoxin, TNF- $\alpha$  oder aktivierte Komplementfaktoren (C3a, C5a) verliert das Endothel weitgehend seine antikoagulatorischen und zelladhäsionshemmenden Eigenschaften (Glauser et al., 1991; Hack und Zeerleder, 2006). Es kommt zur Expression von *tissue factor* (TF) (Maynard et al., 1977) und Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen (Dustin und Springer, 1991) sowie ICAM-1 auf der Oberfläche sowie zur Synthese proinflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren (Haziot et al., 1993). Dies ermöglicht die Migration weiterer Zellen -in erster Linie Lymphozyten- aus der Zirkulation in das Gewebe, was die Ausbreitung des Pathogens eindämmen und seine Eliminierung aus dem Organismus unterstützen soll. Leukozyten werden durch Kontakt mit der veränderten Endothelzelloberfläche aktiviert. Sie sezernieren daraufhin zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> („*respiratory burst*“), die neben ihrer antimikrobiellen Wirkung auch Endothelzellen schädigen (Fink, 2002). Infolge der prolongierten Aktivierung und dem Einwirken toxischer Zellprodukte kann eine so genannte endotheliale Dysfunktion entstehen; dabei lösen sich Endothelzellen von der Basalmembran und sterben ab. Diese Endothelschädigung trägt neben der Bildung mikrovaskulärer Thromben entscheidend zur Perfusionsstörung im Bereich der Mikrozirkulation bei. Im Zusammenhang mit der generalisierten intravaskulären Entzündungsreaktion kommt es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität („*capillary leakage*“) mit Austritt intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium. Die dadurch entstehende, mitunter ausgeprägte Hypovolämie aggraviert wiederum die Minderperfusion des Gewebes.

## Kreislauf

Für die hypotone Kreislagsituation sind -neben dem Volumenmangel- auch vasoaktive Mediatoren des Bradykinin-Kinin- und Komplementsystems (Bradykinin; C3a, C5a) sowie die induzierbare NO-Synthetase verantwortlich (Haeney, 1998). Letztere wird in Anwesenheit von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  vermehrt in Endothelzellen und Makrophagen induziert, wodurch große Mengen des vasodilatatorisch wirksamen Stickoxids entstehen (Palmer et al., 1987; Proud und Kaplan, 1988; Glauser et al., 1991; Vincent et al., 2000). Die hieraus resultierende arterielle Hypotension ist ein charakteristisches Symptom beim septischen Schock. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass NO außerdem Hepatozyten beeinträchtigt, was sich in Form von Leberfunktionsstörungen manifestieren kann (Billiar et al., 1989). Es kommt zur Akute-Phase-Reaktion (Berczi, 1998; Tracey, 2002) sowie zur verminderten Synthese von Gerinnungsinhibitoren wie Antithrombin, wodurch wiederum die Thrombusbildung begünstigt wird.

## Gerinnungssystem

Die Zytokin-induzierte Expression von TF auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen führt zu einer intravasalen Aktivierung der *extrinsischen* Gerinnungskaskade. Auch TNF- $\alpha$  fungiert als Aktivator des extrinsischen Wegs (Glauser et al., 1991). Hohe Endotoxinkonzentrationen und Bradykinin aktivieren zusätzlich die *intrinsische* Gerinnungskaskade.

Da gleichzeitig physiologische Antikoagulantien wie Antithrombin III, Protein C/Protein S-System und tissue factor pathway inhibitor in ihrer Wirkung gehemmt werden, kommt es zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (Levi und ten Cate, 1999; Hardaway, 2000). Aus dem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, –inhibitoren und Thrombozyten resultiert eine Verbrauchskoagulopathie, die einerseits das Blutungsrisiko erhöht. Andererseits wird infolge der intravasalen Gerinnung vermehrt Fibrin gebildet, was die Entstehung disseminierter Mikrothromben in der Endstrombahn fördert (ten Cate, 2000). Im Zuge der Mikrozirkulationsstörung kommt es zur Minderperfusion der Organe mit konsekutiver Dysfunktion. Betroffen sind vor allem Lunge, Leber, Niere, ZNS sowie Herz und Kreislaufsystem mit charakteristischer Symptomatik (z.B. ARDS, Kardiomyopathie) (Court et al., 2002; Strassburg, 2003).

## **Darm**

Die Hypoxie der Darmmukosa bedingt einen Zusammenbruch ihrer Barrierefunktion und damit die Translokation von Keimen aus dem Darmlumen in die Blutbahn. Die persistierende Septikämie aggraviert die Infektion weiter und führt zum prolongierten Schock (Swank und Deitch, 1996; Hassoun et al., 2001). Häufig entwickelt sich aus diesem Circulus Vitiosus ein Multiorganversagen, an dem der Patient schließlich verstirbt, wobei die Mortalität sowohl von der Anzahl der betroffenen Organe als auch von deren Schädigungsgrad abhängt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivierung von Leukozyten durch Mikroorganismen oder ihre Bestandteile im Rahmen des septischen Geschehens einen entscheidenden Schritt darstellt. Über Zytokine werden weitere Entzündungszellen, Endothelzellen und Thrombozyten sowie Komplement-, Gerinnungs- und Kinin-Bradykininsystem aktiviert. Die Freisetzung toxischer Sauerstoffradikale und einer Vielzahl von Mediatoren (z.B. Arachidonsäure, PAF, Leukotriene, PG, Thromboxan und Prostacyclin aus dem Membranphospholipid-Stoffwechsel) führt ihrerseits zur Stimulation von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (Trappe und Riess, 2005). Generalisierte Vasodilatation und erhöhte vaskuläre Permeabilität mit Verlust von Plasmavolumen begünstigen das Eintreten in den Schockzustand. Hypovolämie und Mikrothrombosierung infolge der disseminierten intravaskulären Koagulation bedingen Durchblutungsstörungen wichtiger Organe. Dadurch kann es zu Dysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen kommen (Morrison und Ryan, 1987).

## **1.3 Therapeutische Strategien in der Sepsisbehandlung**

### **1.3.1 Konventionelle Behandlung**

Entscheidend beim Management einer septischen Erkrankung ist die frühzeitige Diagnosestellung, um schnellstmöglich eine suffiziente Therapie einleiten und die weitere Progression unterbrechen zu können. Kann ein Sepsisherd identifiziert werden, steht die umgehende chirurgische Fokussanierung im Vordergrund. Hinzu kommen die Verabreichung geeigneter Antibiotika zur Elimination einer Bakteriämie, die intensivmedizinische Kompensation ausgefallener Organsysteme (z.B. mechanische

Ventilation, Dialyse) sowie gegebenenfalls eine differenzierte Schockbehandlung mit dem Ziel der hämodynamischen Stabilisierung (Dellinger et al., 2004).

Trotz der stetigen Verbesserung auf diesem Gebiet ist es jedoch bisher nicht gelungen, die Letalität vor allem der schweren Sepsis und des septischen Schocks entscheidend zu senken (Neugebauer et al., 1995). Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass der Einsatz der erwähnten therapeutischen Maßnahmen meist erst zu einem Zeitpunkt erfolgen kann, an dem das septische Geschehen klinisch evident wird. Die Therapie „hinkt“ also sozusagen den pathophysiologischen Abläufen im Organismus „hinterher“. Wesentlich effektiver dürfte ein Behandlungsansatz sein, der bereits in die ersten Stadien der Sepsisentstehung eingreift und die Kaskade unterbricht. In den zurückliegenden Jahren konnten durch zahlreiche klinische und grundlagenwissenschaftliche Arbeiten wichtige Erkenntnisse zur Pathophysiologie der schweren Sepsis gewonnen werden. Es wurden einige „Schlüsselmoleküle“ identifiziert, die entscheidende Schritte vermitteln und somit als Ziele neuer therapeutischer Konzepte dienen könnten, welche die konventionelle Behandlung sinnvoll ergänzen.

### 1.3.2 Experimentelle Therapieansätze

Ausgehend von den pathophysiologischen Abläufen ergeben sich diverse Ansatzpunkte für eine Intervention. Mikrobielle Bestandteile wie LPS könnten ebenso als Zielmoleküle für potenzielle Medikamente fungieren wie Bindungsproteine, Rezeptoren oder im Rahmen der Immunantwort freigesetzte Mediatoren wie beispielsweise TNF- $\alpha$  oder Interleukine (Abbildung 1.3).

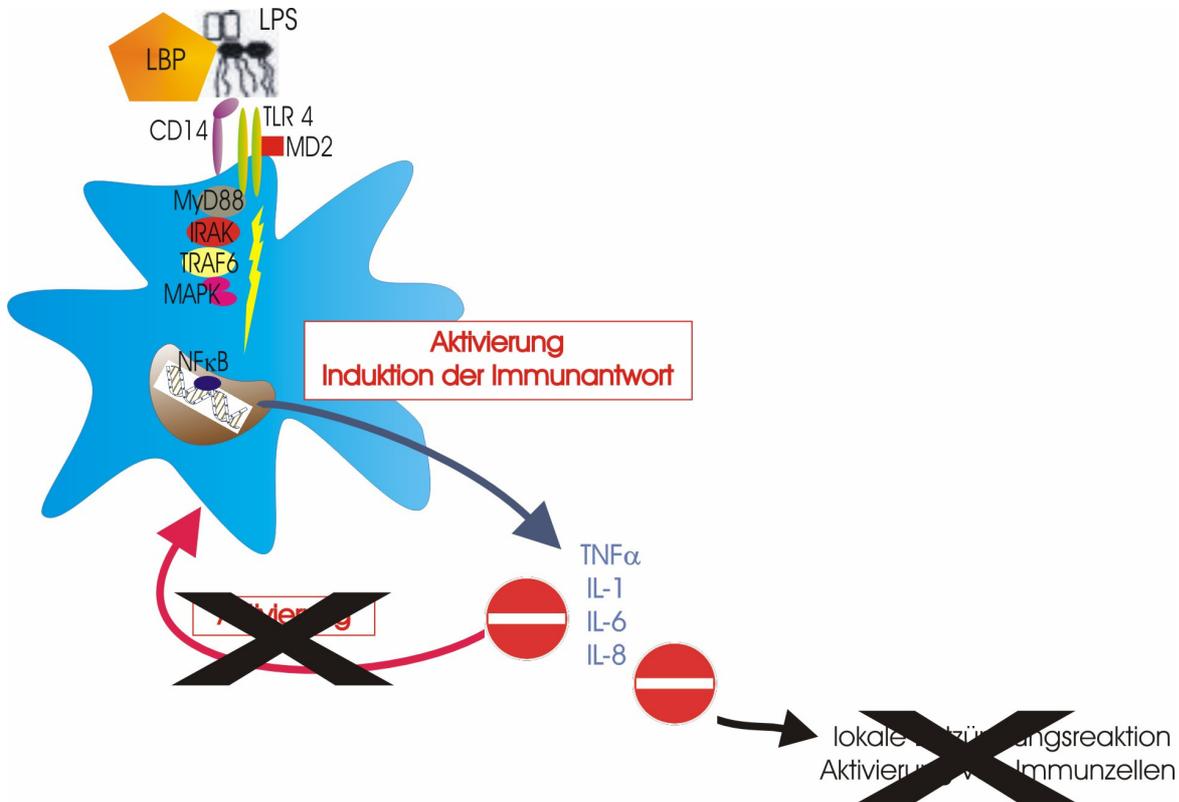
Die Suche nach klinisch einsetzbaren Substanzen ist daher Gegenstand intensiver Forschung. Aus der Fülle der möglichen Strategien können hier nur einige wenige aufgegriffen und in den nächsten Abschnitten genauer beleuchtet werden: es handelt sich um diejenigen, die gegen frühe Ereignisse der Sepsis – LPS-Bindung und Zytokinausschüttung – gerichtet sind. Als potenzielle Medikamente kommen Substanzen mit den folgenden Angriffspunkten in Betracht:

- Bindung und Neutralisation von Endotoxin
- Blockade von Oberflächenrezeptoren und Signaltransduktion
- Neutralisation proinflammatorischer Mediatoren

#### 1.3.2.1 Neutralisation proinflammatorischer Mediatoren

Symptome und Verlauf des septischen Schocks können im Tiermodell durch parenterale Applikation von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  induziert werden. Hieraus ergab sich Grund für die Annahme, durch selektive Blockade und/oder Neutralisation eine Protektion vor dem septischen Geschehen erreichen zu können. Dies führte zur Entwicklung von Anti-Zytokin-Strategien (siehe Abbildung 1.4). Ihr Ziel ist die Neutralisation früher proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 durch Antikörper (Emerson et al., 1992; Pennington, 1993) beziehungsweise mittels Blockade ihrer membranständigen Rezeptoren auf den Zielzellen (z.B. durch anti-p55 TNF-Rezeptor-Antikörper, anti-IL-1 Rezeptor-

Antikörper) (McNamara et al., 1993; Russell und Thompson, 1993; Jin et al., 1994). Auf die gegen TNF- $\alpha$  gerichteten Antikörper soll im Folgenden genauer eingegangen werden.



**Abbildung 1.4: Antikörper gegen proinflammatorische Mediatoren**

Sie wurden bereits in verschiedenen Studien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Die TNF- $\alpha$ -Blockade wurde dabei mit Antikörpern und Immunoadhäsinen bestehend aus dem löslichen extrazellulären Teil der TNF-Rezeptoren p55 oder p75 durchgeführt. Durch die Bindung dieser spezifischen Antikörper konnten die Zytokin-vermittelten Effekte verhindert oder zumindest abgeschwächt werden (Emerson et al., 1992; Pennington, 1993). Bei prophylaktischer Gabe in Tiermodellen erreichten sie eine Reduktion der Sepsis-assoziierten Mortalität (Beutler et al., 1985; Tracey et al., 1987; Galloway et al., 1991; Glauser et al., 1991; Nassif et al., 1992; Fiedler et al., 1992). Experimente mit Affen deuten darauf hin, dass das p55-TNFR-Immunoadhäsिन möglicherweise bessere Eigenschaften als das p75-TNFR-Immunoadhäsिन besitzt (van Zee et al., 1996). In klinischen Untersuchungen konnte jedoch die Letalität von Sepsispatienten nicht signifikant gesenkt werden, vielmehr ergab sich sogar eine höhere Mortalität in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe (p75-TNFR-Immunoadhäsिन) (Eskandari et al., 1992; Wherry et al., 1993; Russell und Thompson, 1993; Fisher, Jr. et al., 1996).

Die alleinige Therapie mit Antikörpern gegen den proinflammatorischen Mediator TNF- $\alpha$  scheint also aufgrund der bisherigen klinischen Erfahrungen keine ausreichende therapeutische Alternative zu den konventionellen Verfahren zu sein, wenn auch die Effektivität der Substanzen sicherlich außer Frage

steht. So wurden anti-TNF-Antikörper in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis erfolgreich in klinischen Studien getestet (Lorenz et al., 1996; Paleolog et al., 1996). Die Ursachen sind eher an anderer Stelle zu suchen. Zum einen besteht eine große Diskrepanz zwischen den experimentellen Sepsismodellen und der klinischen Situation des Patienten. TNF- $\alpha$  wird beim septischen Geschehen - anders im Tiermodell- nicht zu einem definierten Zeitpunkt freigesetzt, sondern kontinuierlich und über einen längeren Zeitraum hinweg (Michie et al., 1988). Die Neutralisation proinflammatorischer Mediatoren ist aber nur innerhalb eines begrenzten zeitlichen Fensters relativ zur Gabe bakterieller Toxine oder zu Bakterieninfusionen wirksam. Der optimale Zeitpunkt der Applikation des Antikörpers ist daher sehr schwierig zu definieren, zumal sich hyper- und hyporeaktive Phasen der Immunreaktion abwechseln. Gemäß der kontinuierlichen Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren müssten Antikörper ebenfalls längerfristig dem Organismus zugeführt werden. Dieser Umstand trägt wohl dazu bei, dass TNF- $\alpha$ -Antikörper auch in subakuten Modellen letztlich nicht überlebensverbessernd waren (Bagby et al., 1991). Zum zweiten sind in die pathophysiologischen Abläufe wie erwähnt eine Vielzahl weiterer Zytokine involviert, die teilweise synergistische Wirkungen entfalten (Glauser et al., 1991). Durch das Ausschalten eines singulären Zytokins kann zwar möglicherweise dessen unmittelbare Wirkung auf den Organismus beeinflusst werden, wohl kaum aber die Effekte der übrigen Mediatoren. Jedoch zeigte sich auch in Untersuchungen zur *kombinatorischen* anti-Zytokinstrategie, dass eine Mixtur aus anti-TNF (TNFR-Immoadhäsion) und anti-IL 1 (IL-1RA) eine höhere Mortalität (100 %) verursacht als die einzeln verwendeten Substanzen (Opal et al., 1996).

Als weiteren Aspekt sollte die physiologische Funktion von TNF- $\alpha$  bedacht werden, der eine wichtige Rolle unter anderem bei der Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen spielt. Bestimmte Mengen scheinen für das Überleben von Infektionen sogar essentiell zu sein, da TNF- $\alpha$  in physiologischen Konzentrationen die Entzündungsreaktion koordiniert. Es gibt Hinweise darauf, dass eine totale Blockade dieses Mediators sogar negative Folgen haben könnte für den Organismus, der eingedrungene Erreger bekämpft (Echtenacher et al., 1990; Glauser et al., 1991). Darüber hinaus werden in Tiermodellen nach Injektion von Endotoxin oder gramnegativen Bakterien wesentlich höhere Mediatorkonzentrationen erreicht als bei der humanen Sepsis, so dass in den *in vivo*-Versuchen möglicherweise toxische Zytokinwirkungen überwiegen.

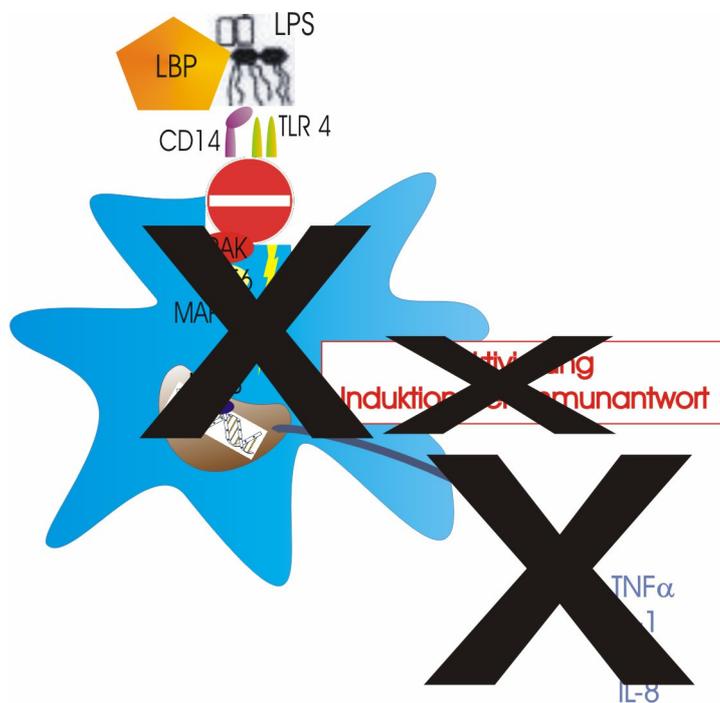
Somit sind berechtigte Zweifel angebracht, ob die Neutralisation einzelner Zytokine einen geeigneten und effektiven Weg darstellt, um die Entwicklung der Sepsis zu unterbrechen. Die singuläre Blockade eines Mediators erscheint aus den angeführten Gründen wenig sinnvoll und ineffektiv. Wie sich gezeigt hat, bringt ein Eingriff in das komplexe Zusammenspiel ohne sichere Diagnostik keinen Vorteil sondern birgt sogar die Gefahr einer erhöhten Mortalität für den Sepsispatienten. Möglicherweise könnten derartige Substanzen aber als additive Maßnahmen zum Einsatz kommen.

### 1.3.2.2 Blockade von LPS-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Bindung von LPS an spezifische Rezeptoren hat die Aktivierung der Zielzelle zur Folge und führt damit zur Signaltransduktion und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. **CD14** ist als membranständiger Rezeptor unter anderem auf Monozyten und Makrophagen lokalisiert und wesentlich

an der Endotoxin-Bindung beteiligt (Wright et al., 1990). **Toll-like-Rezeptoren** (TLRs) werden als so genannte **Pattern-Recognition-Rezeptoren** (PRR) variabel auf diversen Zelltypen wie zum Beispiel Neutrophilen und dendritischen Zellen exprimiert (Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998b, Beutler et al., 2001). Als der auf die Erkennung von Endotoxin spezialisierte Rezeptor wurde TLR 4 identifiziert (Poltorak et al., 1998a; Beutler et al., 2001).

Die Kontrolle, Modifikation oder Blockade der Rezeptorfunktion beziehungsweise der Signaltransduktion könnte einen möglichen Ansatzpunkt bei der Sepsistherapie bieten (siehe Abbildung 1.5) (Cristofaro und Opal, 2003; Tsiotou et al., 2005).

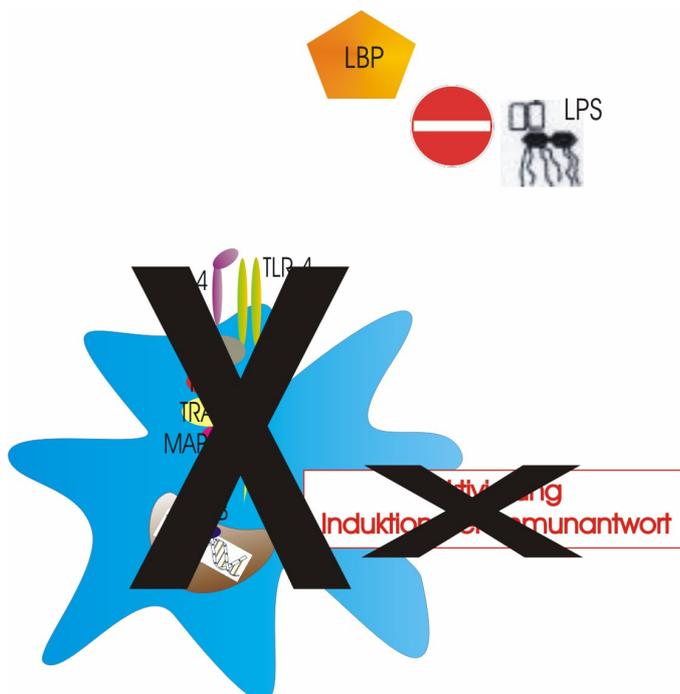


**Abbildung 1.5: Blockade von Oberflächenrezeptoren und Signaltransduktion**

Untersuchungen an Primaten zeigten einen protektiven Effekt von CD14-Antikörpern im Endotoxin-induzierten Schockmodell (Leturcq et al., 1996). Im Rahmen aktueller klinischer Studien werden gegen TLR 4 gerichtete Substanzen getestet. In ersten Analysen konnte keine Verbesserung durch die Behandlung nachgewiesen werden, jedoch sollen weitere Testreihen folgen. Die Wirksamkeit kann daher zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden (van der Poll und Opal, 2008).

### 1.3.2.3 Bindung und Neutralisation von Endotoxin

Die unzureichenden Erfolge der Anti-Zytokinstrategien lenkten die Aufmerksamkeit auch auf das Pathogen (gramnegative Bakterien beziehungsweise LPS) als Target. Lipopolysaccharide spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Immunreaktion (Raetz, 1990; Rietschel und Brade, 1992). Bei einer Infektion mit gramnegativen Keimen werden diese Bestandteile der äußeren Membran in großen Mengen im Wirtsorganismus freigesetzt. Die Bindung von LPS an Rezeptoren auf immunkompetenten Zellen bedingt die Signaltransduktion und Aktivierung (Wright et al., 1990; Ulevitch und Tobias, 1995; Medzhitov et al., 1997). Die Kaskade der Immunreaktion nimmt hier ihren Ausgang. Wirkstoffe mit Endotoxin-bindenden und -neutralisierenden Eigenschaften besitzen einen Vorteil gegenüber Substanzen, die gegen Mediatoren gerichtet sind, da sie nicht nur eine einzelne Komponente der Kaskade neutralisieren, sondern die überschießende Aktivierung von Immunozyten und damit die exzessive Zytokinfreisetzung *a priori* verhindern könnten. Zusätzlich könnten derartige Medikamente gefährdeten Patienten *prophylaktisch* vor dem Auftreten manifester klinischer Symptome verabreicht werden, was eine entscheidende Verbesserung der Therapie bedeuten würde. Substanzen, die in der Lage sind, Endotoxin zu binden und zu neutralisieren, gelten daher als überaus geeignete Kandidaten zur Therapie der gramnegativen Sepsis (siehe Abbildung 1.6). Derartige Medikamente sollten idealerweise eine spezifische Wirkung aufweisen und daher nahezu nebenwirkungsfrei sein. Denkbar sind bei der Neutralisation von Endotoxin mehrere Optionen, die nachstehend erläutert werden sollen.



**Abbildung 1.6: Bindung und Neutralisation von Endotoxin**

## Antikörper gegen Endotoxin

LPS dient aufgrund seiner Schlüsselposition als wichtiges Zielmolekül für die Entwicklung potenzieller neuer Medikamente. In der Vergangenheit wurde eine Reihe polyklonaler und monoklonaler LPS-bindender Antikörper erforscht. Antikörper gegen das immunogene O-Antigen des Endotoxins inhibieren zum einen die LPS-Wirkung, zum anderen erhöhen sie durch Opsonierung die Wahrscheinlichkeit der Phagozytose durch Immunozyten. Die klinische Anwendung ist allerdings aufgrund der hohen Spezifität der Antikörper limitiert, die wegen der großen Variabilität jeweils nur zum O-Serotyp eines Bakterienstammes passen (Cohen und Glauser, 1991). Sie kommen als Therapeutikum praktisch nicht in Frage, da der Erreger meist nicht (rechtzeitig) isoliert werden kann.

Zwar ist es gelungen, monoklonale Antikörper herzustellen, die an Lipid A beziehungsweise die Core-Region spezifisch binden und eine breite Kreuzreaktivität besitzen. Wie bereits erwähnt verfügt die Lipid A-Einheit über die biologische Aktivität und ist daher für die Toxizität des LPS verantwortlich, weshalb Lipid A-bindende und neutralisierende Moleküle geeignete Substanzen zur Entwicklung neuer Therapeutika für die Sepsisbehandlung wären. Ihr entscheidender Nachteil ist jedoch, dass sie die *innerhalb* des LPS-Moleküls liegenden Einheiten nicht erkennen und somit intaktes Endotoxin nicht suffizient neutralisieren können (Kuhn et al., 1992). Die monoklonalen anti-Lipid A-Antikörper HA-1A („Centoxin“) und E5 (Aldridge, 1993) sowie weitere Antikörper wurden in einer Vielzahl klinischer Studien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht (Ziegler et al., 1991; Baumgartner und Glauser, 1993; Di Padova et al., 1993; Mead et al., 1994; Christ et al., 1995). Die Sepsis-assoziierte Letalität konnte zum Teil signifikant reduziert werden. Allerdings waren einige der untersuchten Substanzen jeweils nur unter bestimmten Voraussetzungen bei einem selektierten Patientenkollektiv wirksam und sind aus diesem Grund für die prophylaktische Behandlung *aller* potenziellen Sepsispatienten nicht geeignet. Für andere Antikörper konnte die *in vitro*-Effektivität im Rahmen klinischer Untersuchungen nicht reproduziert werden, was teilweise auf die mangelnde Spezifität zurückgeführt wird (Wortel et al., 1992; Caplan, 1993; Rietschel et al., 1994).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die anti-LPS-Antikörper bisher zu keinem durchschlagenden Erfolg in der Sepsistherapie führten. Das Problem liegt aber nicht im Ansatz der anti-LPS-Strategie an sich, sondern -wie oben erläutert- eher in den untersuchten Substanzen. Bisher ist weder der genaue Wirkmechanismus der Antikörper bekannt, noch konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, tatsächlich Endotoxin zu neutralisieren (Cohen und Glauser, 1991; Baumgartner und Glauser, 1993). Die biologische Stabilität der Immunglobuline ist limitiert. Sie werden durch Serumproteasen abgebaut und eliminiert, während weiter Endotoxin freigesetzt wird. Erschwerend kommt hinzu, dass der Organismus beispielsweise gegen xenogene Immunglobuline häufig Antikörper bildet. Dies könnte gravierende Nebenwirkungen wie akute allergische Reaktionen zur Folge haben. Ein weiteres Argument gegen den klinischen Einsatz zur Vorbeugung der Sepsis sind die hohen Kosten, die die Herstellung verursacht.

## LPS-bindende Proteine

Ausgehend von der Charakterisierung natürlich vorkommender Proteine mit Endotoxin-neutralisierenden Eigenschaften bieten sich weitere Optionen, zu potenziellen Medikamenten zu gelangen (Tobias et al., 1988). Beim **Bactericidal/ Permeability Increasing Protein (BPI)** handelt es sich um ein intrazelluläres 55 kD-Protein, das in neutrophilen Granulozyten vorkommt (Weiss et al., 1978; Elsbach et al., 1979; Gray et al., 1989; Elsbach, 1998). Es verfügt über eine spezifisch gegen gramnegative Bakterien gerichtete antibakterielle Wirkung (Weiss et al., 1978; Ooi et al., 1987; Elsbach, 1998). Mit einer hohen Affinität bindet es an die Lipid A-Einheit des LPS und detoxifiziert sie sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* (Marra et al., 1990; Ooi et al., 1991; Marra et al., 1992; Santoro et al., 1992; Hoess et al., 1993; Larrick et al., 1994; Hoess et al., 1995;). Weiterhin findet sich im humanen Serum das Akute-Phase-Protein **LBP**, welches die Bindung von LPS an den Rezeptor CD14 auf der Makrophagenoberfläche katalysiert (Schumann et al., 1990; Wright et al., 1990). Die Bindungsdomänen für LPS und CD14 sind dabei auf unterschiedlichen Abschnitten des Proteins lokalisiert (Theofan et al., 1994). In Schockmodellen zeigte LBP protektive Effekte (Lamping et al., 1998). Interessant ist die ausgeprägte Sequenzhomologie zwischen BPI und LBP (Schumann et al., 1990; siehe Punkt 1.2.4.2). Wie gezeigt werden konnte, besitzen beide Proteine auch große Übereinstimmungen in den LPS-Bindedomänen (Hoess et al., 1993; Little et al., 1994; Hoess et al., 1995; Taylor et al., 1995; Lamping et al., 1996) und konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle des Endotoxins (Heumann et al., 1993). BPI wirkt aber im Gegensatz zu LBP ausschließlich LPS-neutralisierend und antibiotisch (Elsbach und Weiss, 1993).

In Untersuchungen am Gerinnungssystem des amerikanischen Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* (siehe Abbildung 1.7) zeigte sich, dass gramnegative bakterielle Infektionen in diesem Organismus zu einer fatalen intravaskulären Koagulation führen. Die Kaskade wird durch Interaktion von LPS mit *Limulus*-Gerinnungsfaktoren aktiviert (Levin und Bang, 1964; Iwanaga, 1993). 1982 beschrieben Tanaka und seine Mitarbeiter eine Komponente im Hämocytenlysat des Pfeilschwanzkrebse, welche in der Lage war, die Gerinnungsreaktion zu inhibieren (Tanaka et al., 1982). Da dieses Protein Endotoxin spezifisch binden konnte, wurde es als **Limulus-Anti-LPS-Faktor (LALF)** bezeichnet. Eine weitere Abwehrfunktion bietet LALF durch seine starke antibakterielle Wirkung auf gramnegative, insbesondere R-Typ-Bakterien (Morita et al., 1985).



Abbildung 1.7: *Limulus polyphemus*

*Limulus*-Anti-LPS-Faktor ist ein basisches, amphipathisches 12 kD-Protein mit einer Disulfidbrücke, das aus 101 Aminosäuren besteht (Aketagawa et al., 1986; Muta et al., 1987). Als besondere Eigenschaft besitzt es die Fähigkeit, LPS nicht nur zu binden sondern dessen toxische Wirkungen in tierischen Systemen auch zu neutralisieren (Morita et al., 1985; Wainwright et al., 1990; Alpert et al., 1992; Roth et al., 1998), weshalb es auch als "Endotoxin Neutralising Protein" (ENP) bezeichnet wurde (Garcia et al., 1994). A. Höß gelang zunächst die Kristallstrukturanalyse des Proteins (Hoess et al., 1993) und wenig später auch die Identifikation der LPS-bindenden Domäne (Hoess et al., 1995). Die genaue Funktion des Anti-LPS-Faktors im Pfeilschwanzkrebs ist bisher nicht geklärt. Es liegt aber nahe, dass er eine wichtige Rolle bei der Abwehr mikrobieller Infektionen spielt (Miyata et al., 1989). *In vitro* inhibiert LALF die LPS-vermittelte Aktivierung kultivierter humaner Zellen (Desch et al., 1989; Warren et al., 1992). Auch in Tierversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass LALF einen protektiven Effekt beim Endotoxinschock bietet (Desch et al., 1989; Alpert et al., 1992; Warren et al., 1992; Saladino et al., 1994; Garcia et al., 1994; Nelson et al., 1995; Roth et al., 1998). Daher kommt es als potenter Wirkstoff auch bei der Entwicklung von Medikamenten zur Neutralisation von LPS im menschlichen Organismus in Betracht.

**Polymyxin B** ist ein zyklisches, kationisches Lipopeptid-Antibiotikum aus *Bacillus polymyxa*, das nahezu alle Endotoxin-Formen binden und neutralisieren kann (siehe Abbildung 1.9). Seine Effektivität wurde mehrfach sowohl *in vitro* als auch in Tiermodellen nachgewiesen (Morrison und Jacobs, 1976b; Morrison und Ryan, 1987; Rustici et al., 1993). Der klinische Einsatz bei der Behandlung der Sepsis ist jedoch aufgrund seiner gravierenden Nebenwirkungen (u.a. Nephrotoxizität, neurotoxische Reaktionen) äußerst problematisch (Craig et al., 1974; Storm et al., 1977). Seine spezifische Bindungs- und Neutralisierungskapazität für LPS kann als Maßstab bei der Prüfung anderer Substanzen herangezogen werden. Nicht toxische Varianten von Polymyxin B zeigten zwar eine LPS-neutralisierende Wirkung, die aber weit weniger ausgeprägt war als die des nativen Moleküls (Vaara, 1992; Rustici et al., 1993).

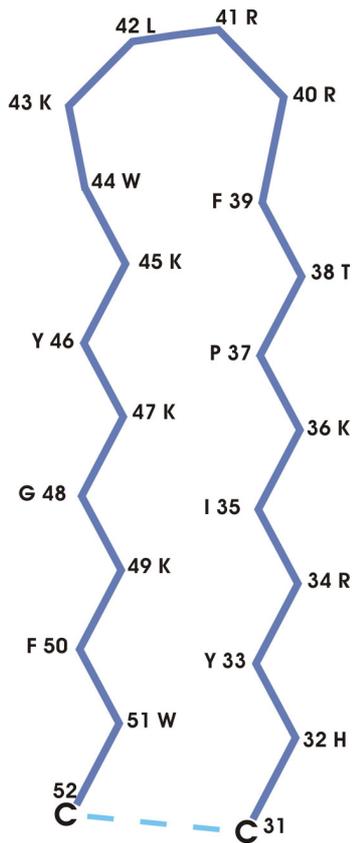
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bereits eine Reihe natürlich vorkommender Substanzen bekannt sind, die über LPS-bindende und -neutralisierende Eigenschaften verfügen und deren Bindungsdomänen charakterisiert wurden. Gegen ihren prophylaktischen Einsatz in der Sepsistherapie sprechen allerdings verschiedene Gründe: Die aufgeführten Substanzen sind für die klinische Anwendung entweder zu immunogen (LALF, TALF), zu toxisch (Polymyxin B), zu wenig effektiv (Polymyxin B-Derivate) oder zu teuer (Antikörper, rekombinante Proteine). Ein geeignetes Medikament sollte effiziente Wirkung mit guter Verträglichkeit kombinieren und gleichzeitig schnell und preiswert herzustellen sein. Eine derartige Option stellen synthetische Peptide dar, die von diversen Endotoxin-bindenden Molekülen abgeleitet wurden (Rustici et al., 1993; Kloczewiak et al., 1994; Little et al., 1994; Hirata et al., 1994; Larrick et al., 1994; Hoess et al., 1995; Taylor et al., 1995; Battafarano et al., 1995). Die Peptide, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren, wurden auf der Grundlage von LBP, BPI, LALF und Polymyxin B entwickelt. Ihre eingehende Beschreibung folgt im nächsten Abschnitt.

## 1.4 LPS-inhibierende Peptide

Eine Möglichkeit LPS-bindende Peptide zu charakterisieren bietet das „Scanning“ der gesamten Aminosäuresequenz von LPS-Bindeproteinen mit synthetischen Peptiden. Mit Hilfe dieser Technologie wurden beispielsweise die LPS-Bindedomänen des LBP (Taylor et al., 1995; Lamping et al., 1996), des BPI (Little et al., 1994) und des TALF (*Tachypleus*-Anti-LPS-Faktor; Kloczewiak et al., 1994) identifiziert. Die in dieser Arbeit untersuchten synthetischen Peptide basieren auf den bekannten Bindungsdomänen der erwähnten Endotoxin-neutralisierenden Proteine **LBP** und **BPI**, die im humanen Serum vorliegen, des aus dem amerikanischen Pfeilschwanzkrebs stammenden **LALF** sowie des Antibiotikums **Polymyxin B**. Zugrunde liegend war die Annahme, dass die Peptide durch ihre Bindung an Lipid A die Interaktion zwischen LPS und LBP blockieren, die Aktivierung der membranständigen Rezeptoren verhindern und damit am Ausgangspunkt der Kaskade ansetzen. Das Endotoxin-neutralisierende Potenzial einiger dieser Moleküle konnte bereits in vorausgegangenen Untersuchungen belegt werden (Weiss et al., 1992; Rustici et al., 1993; Little et al., 1994; Gray und Haseman, 1994; Hoess et al., 1995; Ried et al., 1996). Von A. Höß wurde zusätzlich eine Reihe von Peptiden mit unterschiedlichen Eigenschaften synthetisiert. Durch Variation der Länge, Konformation (lineare und zyklische Peptide) und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz (z.B. durch Austausch einzelner Aminosäuren) sowie Kombination unterschiedlicher Domänen wurde das Ziel verfolgt, ein möglichst potentes Molekül zu identifizieren, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* LPS-inhibierende Eigenschaften besitzt, und dieses weiter zu optimieren.

### 1.4.1 Charakterisierung der LPS-Bindungsdomänen von LALF, LBP, BPI und PMB

Bereits 1986 war die Aminosäuresequenz des *Limulus*-Anti-LPS-Faktors beschrieben worden (Aketagawa et al., 1986). Die Kristallstrukturanalyse lieferte entscheidende Informationen über den dreidimensionalen Aufbau des Moleküls und ermöglichte die Identifikation des LPS-bindenden Abschnitts (Hoess et al., 1995). Es handelt sich dabei um eine positiv geladene amphipathische Schleife, die aus 22 Aminosäuren (Position 31-52) besteht und durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird (siehe Abbildung 1.8). Bemerkenswert ist das abwechselnde Auftreten von basischen/neutralen oder hydrophoben/aromatischen Aminosäuren, die infolge der  $\beta$ -Faltblattstruktur in entgegengesetzte Richtungen weisen. Lediglich an der Spitze der Schleife wird diese abwechselnde Anordnung durch zwei aufeinander folgende Arginine (Position 40/41) unterbrochen. Diese zeigen aber zur gleichen Seite, wodurch die Amphipathizität wiederum gewahrt ist (Hoess et al., 1993). Diese Domäne erkennt und bindet die Lipid A-Einheit des LPS (Warren et al., 1992; Hoess et al., 1995).

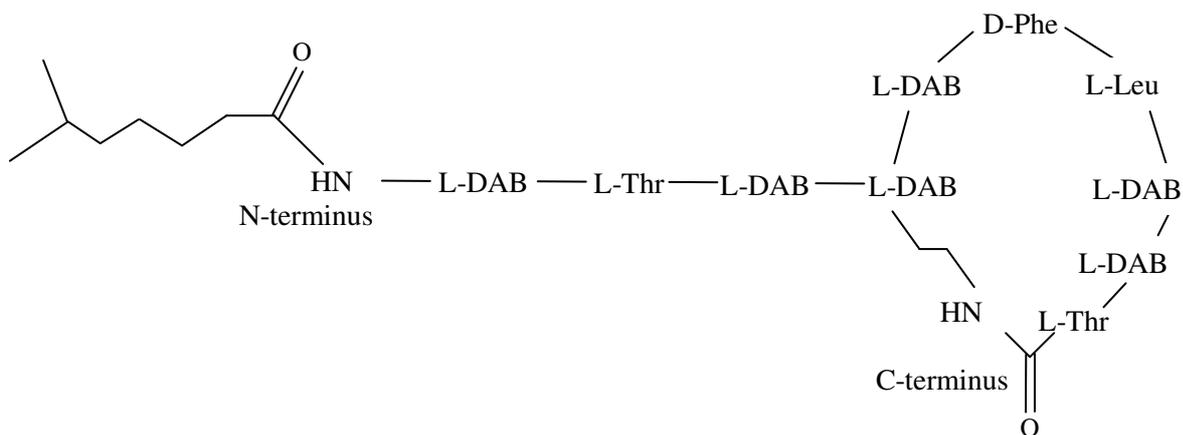


**Abbildung 1.8: Die LPS-Bindedomäne des LALF** Sie umfasst die Aminosäuren 31-52 und wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert.

Die Endotoxin-bindenden Abschnitte der beim Menschen vorkommenden Proteine LBP und BPI (siehe Punkte 1.2.4.2 und 1.3.2.3) liegen ebenfalls in schleifenförmiger Konfiguration vor und weisen zueinander 44% Sequenzhomologie auf (Hoess et al., 1993; Little et al., 1994; Taylor et al., 1995). Wie der nachstehenden Gegenüberstellung zu entnehmen ist, besitzen sie zudem -obwohl keine phylogenetische Verwandtschaft besteht- deutliche Analogien mit dem LALF-Bindungsmotiv. Es konnte gezeigt werden, dass die LPS-bindenden Abschnitte der drei Proteine innerhalb von LBP nach Domänenaustausch funktionell aktiv sind (Schumann et al., 1997).

aa 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52	LALF ... C H Y R I K P T F R R L K W K Y K G K F W C ...	Bindungsdomäne aa31-52
aa 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101	LBP ... R W K V R K S F F K L Q ...	Bindungsdomäne des humanen LBP aa90-101
aa 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101	BPI ... K W K A Q K R F L K M S ...	Bindungsdomäne des humanen BPI aa90-101

Wie unter Punkt 1.3.2.3 erläutert kann Polymyxin B (PMB) ebenfalls mit hoher Affinität an Endotoxin binden. Es handelt sich dabei um ein positiv geladenes, amphipathisches Oligopeptid zyklischer Form, welches mit einer Lipidkette verknüpft ist (siehe Abbildung 1.9) (Morrison und Jacobs, 1976a; Storm et al., 1977). Strukturelle Ähnlichkeiten der LALF- und PMB-Bindedomänen wie auch die Konkurrenz beider Moleküle um die Bindung an Lipid A legen die Vermutung nahe, dass ein gemeinsames LPS-bindendes Epitop existiert (Hoess et al., 1993).



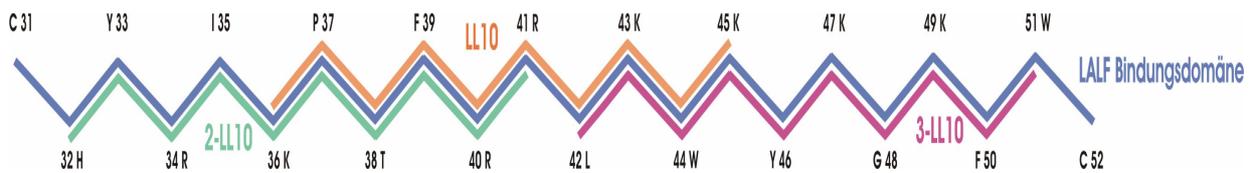
**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Polymyxin B-Struktur** (DBA = Diaminobutansäure)

## 1.4.2 Aufbau und Eigenschaften der synthetischen Peptide

### Lineare und zyklische LALF-Peptide

Ausgehend von der LPS-Bindedomäne des LALF wurden synthetische Peptide hergestellt, die unterschiedliche Abschnitte der Schleife enthalten, und deren Fähigkeit untersucht, Endotoxin zu binden und zu neutralisieren. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob die schleifenförmige Konfiguration einen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat. Zu diesem Zweck wurden sowohl lineare als auch zyklische Peptide synthetisiert, deren Länge zwischen 10 und 22 Aminosäuren lag.

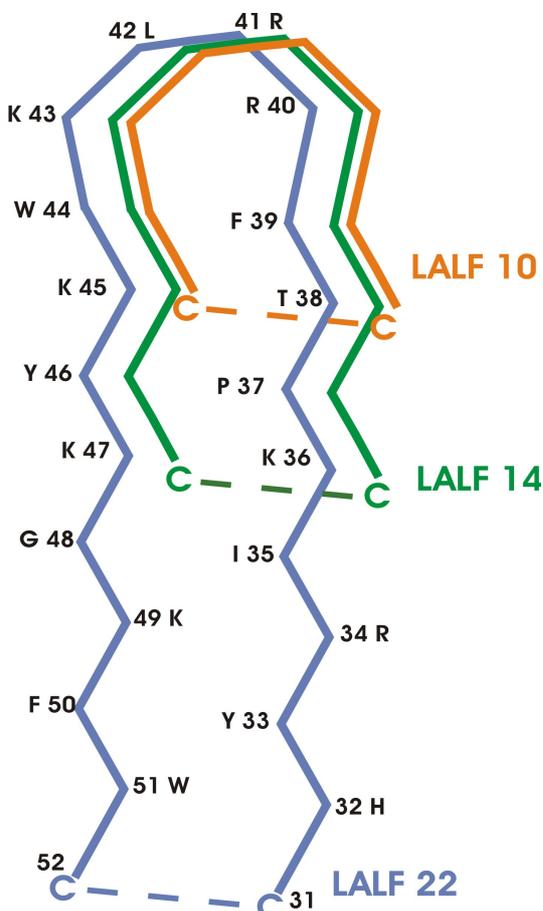
Abbildung 1.10 zeigt schematisch, welche Abschnitte der LALF-Bindedomäne in den linearen Peptiden enthalten sind: LL 10 umfasst die Aminosäuren 36-45, was nach Ried dem minimalen Bindungsabschnitt entspricht (Ried et al., 1996). 2-LL 10 besteht aus den Aminosäuren 32-41 und 3-LL 10 aus den Residuen 42-51. Nicht dargestellt ist das Peptid R-LL 10, das ebenfalls die Aminosäuren 36-45 enthält, jedoch in umgekehrter Reihenfolge synthetisiert wurde. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Ausmaß die Anordnung der Aminosäuren die LPS-Bindfähigkeit beeinflusst.



### Abbildung 1.10: Lineare LPS-bindende Peptide

Die LPS-Bindedomäne des LALF ist aus Gründen der Anschaulichkeit hier ebenfalls linear dargestellt. Die Zahlen hinter den Peptidbezeichnungen geben die Anzahl der Aminosäuren an.

Wie erwähnt liegt die Bindungsdomäne des LALF natürlicherweise in Schleifenform vor. Um eine authentische zyklische Konformation zu erhalten, wurden die Peptide daher mit zwei Cysteinen am N- und C-Terminus versehen und oxidiert. In Abbildung 1.11 ist dargestellt, welche Abschnitte der Bindungsschleife des LALF durch die zyklischen Peptide repräsentiert werden. LALF 10 enthält die Aminosäuren 38-45, LALF 14 die Aminosäuren 36-47. Das Peptid LALF 22 gibt das gesamte Bindungsmotiv (Aminosäuren 31-52) einschließlich der Disulfidbrücke wieder.



### Abbildung 1.11: Zyklische LPS-bindende Peptide

Die zyklische Konfiguration wurde durch Oxidation mit zwei Cysteinen erreicht. Die Zahlen hinter den Peptidbezeichnungen geben die Anzahl der Aminosäuren an.

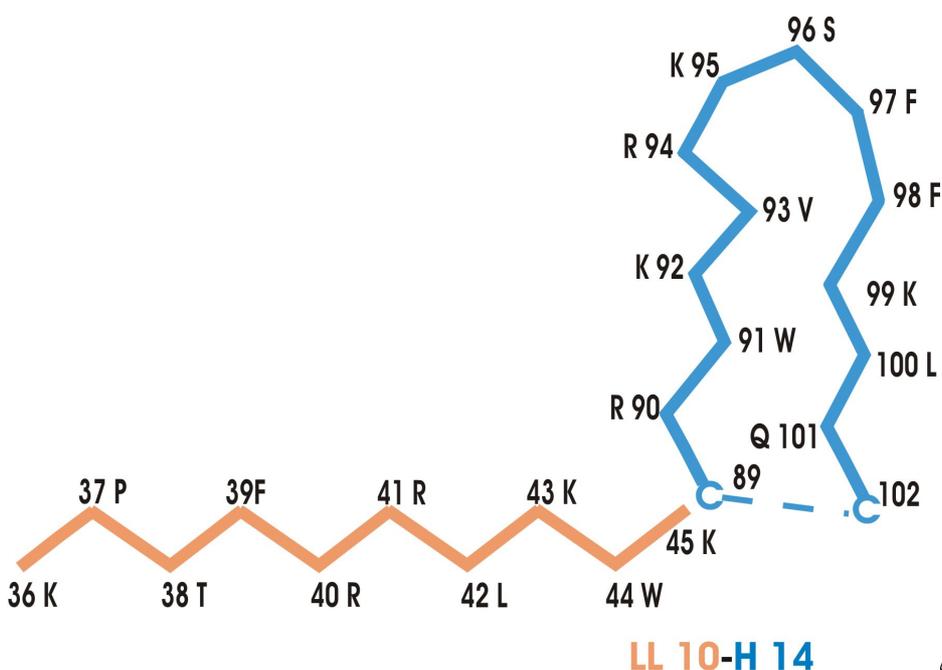
## LBP-, BPI- und PMB-Peptide

Basierend auf den Bindedomänen des LBP, BPI und PMB wurden ebenfalls Peptide synthetisiert, deren Eigenschaften hinsichtlich LPS-Bindung und –Neutralisation untersucht werden sollten. Für synthetische Peptide, die auf der Struktur des PMB basieren, wurde bereits früher gezeigt, dass sie mit hoher Affinität an LPS binden und die Mortalität im Tiermodell reduzieren (Rustici et al., 1993).

## Multimere Peptide

Es ist beschrieben worden, dass Endotoxin multimere Komplexe formt (Brandenburg et al., 1998). Unter der Annahme, dass hier durch die Kopplung mehrerer Bindemotive eine höhere LPS-Affinität erreicht und damit die Wirksamkeit optimiert werden könnte, wurden dimere und trimere Peptide hergestellt (vergleiche hierzu Gray und Haseman, 1994). Für das Design der Hybride war es wichtig, jene Peptide auszuwählen, die über eine hohe Endotoxin-Bindungskapazität verfügen und gleichzeitig aus möglichst wenigen Aminosäuren bestehen, da die Effizienz der Peptidsynthese mit der Länge der Peptidkette abnimmt. Lineare LALF-Peptide wurden entweder kombiniert mit zyklischen Anteilen des LALF (z.B. LL 10-L 14) oder des LBP (z.B. LL 10-H 14).

In Abbildung 1.12 ist die Struktur schematisch illustriert. Die Kombination eines linearen mit einem zyklischen Peptid erwies sich als sinnvoll, da die Fusion zweier zyklischer Peptide den Einsatz von vier Cysteinen erfordert, was die Herstellung deutlich verkompliziert.



**Abbildung 1.12: Das dimere Peptid LL 10-H 14**

ist zusammengesetzt aus einem linearen LALF- und einem zyklischen LBP-Peptidanteil

## **D-Aminosäurepeptide**

Bei der Überlegung, synthetische Peptide als Therapeutika im lebenden Organismus einzusetzen, müssen die dort herrschenden Gegebenheiten bedacht werden. Die Peptide besitzen bei Körpertemperatur im Blut eine relativ geringe Stabilität, da sie der proteolytischen Aktivität von Serumproteasen ausgesetzt sind. Während bereits durch die Zyklisierung die Serumhalbwertszeiten gesteigert werden konnten, wurde eine weitere Verbesserung der Stabilität durch die Synthese zyklischer LALF- und LBP-Peptide aus rechtsdrehenden Aminosäuren (D-Aminosäuren) erreicht. Der Grund hierfür liegt in der fehlenden Fähigkeit der Serumproteasen, D-Aminosäurepeptide zu erkennen und abzubauen. Zu bedenken ist dabei, dass rechtsdrehende Aminosäuren die Konfiguration der Peptide in gewisser Weise verändern und damit auch die Bindeaktivität beeinflussen könnten.

Um dem Rechnung zu tragen, wurden zyklische LALF- und LBP-Peptide in umgekehrter Richtung vom C- zum N-Terminus (Bild vom Spiegelbild) mit D-Aminosäuren synthetisiert. In der Tat zeigten sie im Vergleich zu „herkömmlichen“ Peptiden eine deutlich verbesserte Stabilität (siehe unten).

## **Kontrollpeptide**

Als Kontrollen dienten PA-10, ein hydrophobes Peptid mit willkürlicher Anordnung der Aminosäurereste 36-45 der LALF-Schleife (vergleiche LL 10) und positiver Gesamtladung, sowie NEU-10, welches eine neutrale Gesamtladung aufweist und in den vorausgegangenen Bindungsstudien nur in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Bindung an Lipid A zeigte (Ried et al., 1996).

Die Sequenzen aller untersuchten Peptide wurden in den Tabellen 3.1. bis 3.7 zusammengestellt.

### **1.4.3 Toxizität und biologische Stabilität der Peptide**

Ausschlaggebend für die potenzielle therapeutische Anwendung LPS-inhibierender Peptide ist neben ihrer spezifischen und hochaffinen Bindung an Endotoxin auch ihr Verhalten in biologischen Systemen. Probleme könnten sich in Tierversuchen wie beim Einsatz im Patienten durch die Toxizität der Substanz ergeben, wie dies beispielsweise bei Polymyxin B der Fall ist. In vorangegangenen Untersuchungen fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine wesentliche Toxizität der Peptide für eukaryote Zellen (Ried et al., 1996; Hoess 1997).

Auch eine geringe Halbwertszeit im Blutkreislauf kann dazu führen, dass die Substanz pharmakologisch unwirksam ist. Die Stabilität der Peptide wurde durch die Messung ihrer Halbwertszeiten im Serum bestimmt, die exemplarisch in der untenstehenden Tabelle aufgelistet sind (Ried et al., 1996; Hoess 1997). Dabei zeigte sich, dass die zyklische Konformation nicht nur für die hochaffine LPS-Bindung von entscheidender Bedeutung ist, sondern zusätzlich eine höhere Serumstabilität mit sich bringt.

<b>Peptid</b>		<b>Serumhalbwertszeit bei 37°C im Serum</b>
LL 10	(lineares LALF-Peptid)	17-20 Min
LALF 10	(zyklisches LALF-Peptid)	77 Min
LALF 11	(zyklisches LALF-Peptid)	75 Min
LALF 14	(zyklisches LALF-Peptid)	84 Min
H 14	(zyklisches LBP-Peptid)	91 Min
LL 10-H 14	(linear-zyklisches Dimer)	90-120 Min
DIL 14	(zyklisches LALF-Peptid, D-Aminosäuren)	ca. 1200 Min

**Tabelle 1.1: Serumhalbwertszeiten LPS-bindender Peptide**

Der Aufbau der verschiedenen Versuchsreihen wurde so gestaltet, dass die durchschnittliche Halbwertszeit der Peptide berücksichtigt wurde.

## 2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Lipopolysaccharide gramnegativer Erreger sind potente Moleküle, die in der Lage sind, im menschlichen Organismus fatale Reaktionen zu induzieren. In die pathophysiologischen Abläufe beim Zustandekommen schwerer Krankheitsbilder wie dem septischen Schock konnte dank intensiver Forschung in den vergangenen Jahren Einblick gewonnen werden. In die Immunantwort sind unter anderem LPS-Bindeproteine involviert, die den Transport und die Bindung des Endotoxins an zelluläre Rezeptoren bewerkstelligen. Ein möglicher therapeutischer Ansatz ist daher, die Bindung des LPS an die Zielzellen durch geeignete Substanzen zu inhibieren und damit die Induktion der überschießenden Immunantwort zu unterbrechen oder zumindest abzuschwächen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Endotoxin-neutralisierenden Eigenschaften synthetischer Peptide untersucht, die von den bekannten LPS-bindenden Proteinen LBP, BPI, LALF und Polymyxin B abgeleitet sind. Die Peptide wurden von A. Höß, basierend auf seinen Untersuchungen auf diesem Gebiet, entwickelt (Hoess et al., 1993; Hoess et al., 1995; Ried et al., 1996). Die Aufgabenstellung bestand darin, das inhibitorische Potenzial der LPS-bindenden Peptide in verschiedenen Modellen zu untersuchen und die wirksamsten Substanzen zu identifizieren, die für die Weiterentwicklung zur klinischen Anwendung in Frage kommen.

Die experimentelle Arbeit gliedert sich in die folgenden Schritte:

- 1.) Entwicklung eines für das Peptidscreening geeigneten *in vitro*-Zellkulturmodells mit murinen und humanen Zellen zur Identifikation potenter Substanzen
- 2.) Untersuchung der wirksamen Moleküle in diversen *in vivo*-Mausmodellen (Stimulation, Überleben, CASP)

Die bearbeiteten Fragestellungen sind dabei im Einzelnen:

- 1.) Welche Gruppe der LPS-inhibierenden Peptide verfügt über das größte inhibitorische Potenzial (LALF, LBP, BPI, PMB)?
- 2.) Welchen Einfluss auf das Bindungsverhalten haben Moleküllänge und -struktur (linear, zyklisch, multimer)?
- 3.) Wie verhalten sich die Peptide in unterschiedlichen Systemen (murine und humane Zellen, muriner Organismus)?
- 4.) Kommen die Substanzen als potenzielle Wirkstoffgruppe für die prophylaktische Anwendung in der Sepsisbehandlung in Frage?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bezugsquellennachweis

##### 3.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit weiblichen Inzucht-Mäusen im Alter zwischen 8 und 10 Wochen durchgeführt. Die verwendeten Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden bezogen von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln. Die Unterbringung erfolgte nach Ankunft im institutseigenen Mausstall unter SPF-Bedingungen (Spezifisch Pathogen-frei).

##### 3.1.2 Chemische Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biochrom KG, Berlin

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

CibcoBRL, Karlsruhe

FLUKA Chemie, Buchs

HyClone, Logan

Merck, Darmstadt

Sigma, Taufkirchen

Sigma-Aldrich, Steinheim

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
<b>Aqua ad iniectabilia</b> steril, pyrogenfrei	Apotheke Klinikum Rechts der Isar
<b>β-Merkaptoethanol 50MM</b>	Cibco, #31350-010
<b>BSA</b> Bovine Serum Albumin	Sigma, #A-3294
<b>D-Galaktosaminhydrochlorid</b> C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>5</sub>	Rotichrom® CHR Roth, Art.# 7411.2
<b>Di-Natriumhydrogenphosphat</b>	FLUKA, #71640

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
<b>DMSO</b>	Sigma, #D-2650
Dimethylsulfoxid	
<b>Endotoxinarmes Medium</b>	seromed ® VLE RPMI 1640 Medium ( <i>Very Low Endotoxin</i> ; Endotoxin < 0,01 EU/ml) mit Glutamin und NaHCO <sub>3</sub> Biochrom, Cat.No. FG 1415
<b>Endotoxinfreies Wasser</b>	Water for Embryo Transfer, Sigma, W-1503
<b>Eosinrot</b>	Sigma
<b>FBS</b>	HyClone, Cat.No. SH30070.03
Fetal Bovine Serum	
<b>FCS</b>	seromed ® Biochrom, Cat.No. S0115
Fetal Calf Serum	
<b>Human Serum (male)</b>	Sigma, H-1388
<b>Isopropanol</b>	FLUKA, 59301
2-Propanol	
<b>LPS</b>	LPS von <i>Salmonella enteritidis</i> ,
Lipopolysaccharid, Endotoxin	Lyophilisat, Sigma, L-2012
<b>MTT</b>	Sigma, M-2128
3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5diphenyltetrazoliumbromid, C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> SBr	
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Merck, #106346
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
<b>Natriumhydrogencarbonat</b>	Merck, #106329
NaHCO <sub>3</sub>	

---

<b>Natriumkarbonat</b> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, #106392
<b>OPI Supplement</b> Oxalazetat-Pyruvat-Insulin	OPI Media Supplement Hybri-Max, Sigma-Aldrich, #O-5003
<b>PBS</b> Phosphate buffered saline	seromed ® Instamed 9.55 g/l PBS Dulbecco, pH 7,3 Biochrom, Cat.No.L182-50
<b>Penicillin / Streptomycin</b>	10.000 IE / 10.000 µg/ml, lyophilisiert seromed ® Biochrom, A 2210
<b>Polymyxin B</b>	Polymyxin B sulfate, Sigma #P-1004
<b>Salzsäure</b> HCl	FLUKA, 84415
<b>Schwefelsäure</b> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 95-97%	Merck, #100731
<b>TMB</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin- Dihydrochlorid	TMB-Tablets, Sigma, #T-3405
<b>Tween 20</b>	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate, Sigma, #P-1379
<b>Wasserstoffperoxid</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Sigma-Aldrich, Cat.No. 21.676-3
<b>Zitrat</b> C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Roth, Art.#6490.2

### 3.1.3 ELISA-Kits

<b>MESSUNG VON TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>BEZEICHNUNG, HERSTELLER</b>
murin	DuoSeT™ Genzyme Corporation, Cambridge, USA
human	OptEIA™ Human TNF- $\alpha$ -Set PharMingen, San Diego, USA

### 3.1.4 Verbrauchsmaterial

<b>MATERIAL</b>	<b>BEZUGSQUELLE</b>
Mikrotiterplatten (96 well)	Nuclon™ surface, Nunc, Wiesbaden
Kanülen	B.Braun, Melsungen
Parafilm M	American National Can™, Chicago, USA
Plastikwaren (Pipetten, Kryotubes, Spritzen)	Nunc, Wiesbaden Falcon, New Jersey, USA Corning, New York, USA B. Braun, Melsungen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

### 3.1.5 Geräte

<b>GERÄT</b>	<b>HERSTELLER</b>
ELISA-Reader	ARGUS 400 microplate reader, Packard
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Jena Leica DMBRE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Sterilbank	HLB 2472, Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 15, Haereus, Hanau Biofuge 15 R, Haereus, Hanau
Zentrifugen	Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau Omnifuge 2,0 RS, Haereus, Hanau

### 3.1.6 Software

<b>PROGRAMM</b>	<b>HERSTELLER</b>
CorelDRAW 8.0	Corel Corp.
MS Excel 97 / 2000	Microsoft Corp.
MS Windows 98 / XP	Microsoft Corp.
MS Word 97 / 2000	Microsoft Corp.
Reference Manager 9.5	ISI Research Soft
SigmaPlot 2.0	Jandel Corp.
SPSS 11.0	SPSS Inc.

## 3.2 Medien

Alle Medien wurden bei 4°C gelagert und innerhalb eines Zeitraumes von maximal 5 Tagen verbraucht. Vor Verwendung wurde die benötigte Menge Medium entnommen und im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

## 3.2.1 Grundmedium und Zusätze

<b>Grundmedium</b>	seromed ® VLE RPMI 1640 Medium (Very Low Endotoxin; Endotoxin < 0,01 EU/ml) mit Glutamin und NaHCO <sub>3</sub> Biochrom, Cat.No. FG 1415
<b>β-Merkaptoethanol</b>	Lagerung bei 4°C
<b>FCS</b>	Hitzeinaktivierung 30 Min bei 56°C Lagerung bei 4°C
<b>Humanes Serum</b>	Hitzeinaktivierung 30 Min bei 56°C Lagerung bei 4°C
<b>OPI-Supplement</b>	Lagerung bei -20°C
<b>Penicillin / Streptomycin</b> 10.000 IU / 10.000 µg/ml, lyophilisiert	Ansetzen der Stocklösung: mit 5 ml sterilem H <sub>2</sub> O bidest. rekonstituieren aliquotieren zu je 5 ml (= 100 IU/ml) Lagerung bei -20°C

## 3.2.2 „Lowtox“-Medium 10% für ANA 1-Zellkultur

<b>Grundmedium</b>	VLE RPMI 1640 Medium
<b>Zusätze</b>	
FCS	10 %
Penicillin / Streptomycin	100 IU/ml
β-Merkaptoethanol	0,05 mM

### 3.2.3 „Lowtox“-Medium 10% für MonoMac 6-Zellkultur

<b>Grundmedium</b>	VLE RPMI 1640 Medium
<b>Zusätze</b>	
humanes Serum	10 %
Penicillin / Streptomycin	100 IU/ml
β-Merkaptoethanol	0,05 mM
OPI-Supplement	1 %

### 3.2.4 „Lowtox“-Medium 10% für humane periphere mononukleäre Blutzellen

<b>Grundmedium</b>	VLE RPMI 1640 Medium
<b>Zusätze</b>	
Spenderserum	10 %
β-Merkaptoethanol	0,05 mM

### 3.2.5 Einfriermedium für murine und humane Zellen

<b>Zusätze</b>	
FCS (HyClone)	90 %
DMSO	10 %

Einfriervolumen 1 ml mit  $10^7$  Zellen pro Kryotube

## 3.3 LPS-inhibierende Peptide

Die untersuchten Peptide basieren auf den als Bindungsdomänen charakterisierten Aminosäuresequenzen vier bekannter Endotoxin-bindender Substanzen: *Limulus*-Anti-LPS-Faktor (LALF), LPS-binding protein (LBP), Bactericidal/permeability increasing protein (BPI) und Polymyxin B (PMB). Das Design der Peptide stammt von A. Höß. Alle Peptide wurden synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Berlin. Die Herstellung erfolgte an einem automatisierten Peptid-Synthesizer

unter Verwendung eines Standard-Fmoc-Maschinenprotokolls. Zyklische Peptide wurden hergestellt durch Inkubation Cystein-haltiger Peptide in 10% Me<sub>2</sub>SO für 24 Stunden bei Raumtemperatur (Tam et al., 1991). Durch Aufreinigung wurde ein Reinheitsgrad von über 95% erreicht. Die Charakterisierung der Peptide wurde durchgeführt mittels LD-TOF-*(laser desorption-time of flight)* Massenspektroskopie. Die *in vitro*-Serumhalbwertszeiten der Peptide bei 37°C wurden von A. Höß bestimmt und sind auszugsweise in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Für den Ansatz der Stockagelösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurden die lyophilisierten Peptide in Endotoxin-freiem Wasser gelöst (Water for Embryo Transfer, Sigma), gevortext und anschließend steril filtriert. Die Stockagelösung wurde aliquotiert und bis zum Verbrauch bei -20°C gelagert.

Die vollständigen Peptidsequenzen sind in den Tabellen 3.1 bis 3.7 dargestellt. In der Übersicht sind die Einbuchstabencodes sowie die Positionen der Aminosäuren (aa) im authentischen Protein (Bindungsdomänen von LALF, LBP, BPI und Polymyxin B) angegeben. Für die Peptidbezeichnungen wurde folgendes Schema verwendet:

LL	lineares LALF-Peptid
2 / 3-	LALF-Bindungsdomäne Teilstrang 2/3
L(ALF)	zyklisches LALF-Peptid
R(ET) / I	reverse / invertierte Sequenz
D	rechtsdrehende Aminosäure
H	humanes LBP-Peptid
LH	lineares hLBP-Peptid
B(PI)	humanes BPI-Peptid
NEU	neutrale Gesamtladung
Pol P	Polymyxin B-Peptid

Die Zahlen hinter der Bezeichnung geben die Länge der Sequenz, das heisst die Anzahl der Aminosäuren an. Peptide mit zwei Cysteinen wurden oxidiert, um eine zyklische Konformation zu erhalten. An der Zyklisierung beteiligte Aminosäurereste sind in der Übersicht blau hervorgehoben. Kursive Schreibweise bedeutet, dass Aminosäuren ausgetauscht oder ergänzt wurden. D-Aminosäuren sind durch Kleinbuchstaben dargestellt.

Als Kontrollen dienten die Peptide PA-10 mit willkürlicher Anordnung der Aminosäurereste 36-45 der LALF-Schleife und positiver Gesamtladung, sowie NEU-10, welches eine neutrale Gesamtladung aufweist.

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
aa 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52		
<i>LALF-Protein</i> ...	C H Y R I K P T F R R L K W K Y K G K F W C ...	Bindungsdomäne aa31-52
<b>Lineare LALF-Peptide</b>		
LL 10	K P T F R R L K W K	LALF aa36-45 minimaler Bindungsabschnitt (?)
R-LL 10	K W K L R R F T P K	LALF aa45-36, invertierte Sequenz
2-LL 10	H Y R I K P T F R R	LALF aa32-41
3-LL 10	L K W K Y K G K F W	LALF aa42-51
<b>Zyklische LALF-Peptide</b>		
LALF 10	G C T F R R L K W K C G	LALF aa38-45 minimaler Bindungsabschnitt (?)
RETL 10	G C K L R R F T P K C G	LALF aa43-36 invertierte Sequenz
LALF 11	K C T F R R L K W K C G	LALF aa36-45
RETL 11	G C K W K L R R F T P K C G	LALF aa45-36 invertierte Sequenz
LALF 14	G C K P T F R R L K W K Y K C G	LALF aa36-47 minimaler Bindungsabschnitt (?)
LALF 14- laureyl	C G K P T F R R L K W K Y K C - laureyl	LALF aa36-47 + Laurylsäure
DL 14	g c k p t f r r l k w k y k c g	LALF aa36-47 Daa
DIL 14	g c k y k w k l r r f t p k c g	LALF aa47-36 Daa, invertierte Sequenz
KL 14	G C K P T F K K L K W K Y K C G	LALF aa36-47 Arg = Lys
LALF 17	G C K P T F R R L K W K Y K C K F	LALF aa36-50
LALF 22	G C H Y R I K P T F R R L K W K Y K G K F W C G	LALF aa31-52 gesamte LALF- Bindungsdomäne mit authentischer Cys-Brücke

Tabelle 3.1: Lineare und zyklische LALF-Peptide

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
H 14	... <sup>aa</sup> A C R W K V R K S F F K L Q C G ... 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101	Bindungsdomäne des humanen LBP aa90-101, zyklisch
<i>LBP-Peptide</i>		
DH 14	a c r w k v r k s f f k l q c g	hLBP aa90-101, zyklisch, Daa
DIH 14	g c q l k f f s k r v k w r c a	hLBP aa90-101, zyklisch, Daa, invertierte Sequenz
KH 14	C K W K V K K S F F K L Q C G	hLBP aa90-101, zyklisch, Arg = Lys
LH 10	K V R K S F F K L Q	hLBP aa92-101, linear

Tabelle 3.2: LBP-Peptide

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
BPI 14	<sup>aa</sup> A C K W K A Q K R F L K M S C G 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101	Bindungsdomäne des humanen BPI aa90-101, zyklisch

Tabelle 3.3: BPI-Peptid

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
<i>Polymyxin-Peptide</i>		
Pol P1	I K T K K F L K K T	linear
Pol P2	K T K C K F L K K C	zyklisch

Tabelle 3.4: Polymyxin B-Peptide

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
<i>D-Aminosäuren-Peptide</i>		
DL 14	g c k p t f r r l k w k y k c g	LALF aa36-47, zyklisch
DIL 14	g c k y k w k l r r f t p k c g	LALF aa47-36, zyklisch invertierte Sequenz
DH 14	a c r w k v r k s f f k l q c g	hLBP aa90-101, zyklisch
DIH 14	g c q l k f f s k r v k w r c a	hLBP aa90-101, zyklisch, invertierte Sequenz
DILL 10-H 14	g c q l k f f s k r v k w r c k w k l r r f t p k	zyklisches hLBP + lineares LALF, invertierte Sequenz

Tabelle 3.5: D-Aminosäuren-Peptide

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
<i>Multimere und hybride Peptide</i>		
LL 10-L 11	K P T F R R L K W K C T F R R L K W K C G	lineares + zyklisches LALF
LL 10-L 14	K P T F R R L K W K C K P T F R R L K W K Y K C G	lineares + zyklisches LALF
LL 10-L 14-LL 10	K P T F R R L K W K C K P T F R R L K W K Y K C K P T F R R L K W K	lineares + zyklisches + lineares LALF
LL 10-H 14	K P T F R R L K W K C R W K V R K S F F K L Q C G	lineares LALF + zyklisches hLBP
LL 10-H 14-LL 10	K P T F R R L K W K C R W K V R K S F F K L Q C K P T F R R L K W K	lineares LALF + zyklisches hLBP + lineares LALF
DILL 10-H 14	g c q l k f f s k r v k w r c k w k l r r f t p k	zyklisches hLBP + lineares LALF, invertierte Sequenz, Daa
ZLL 10-H 14	K P T F R R L K W K G G S G G C R W K V R K S F F K L Q C G	lineares LALF + <i>Abstandhalter</i> + zyklisches hLBP
B 10-L 14	K K I E S A L R N K C K P T F R R L K W K Y K C	lineares hBPI + zyklisches LALF
B 10-H 14	K K I E S A L R N K C R W K V R K S F F K L Q C G	lineares hBPI + zyklisches hLBP

Tabelle 3.6: Multimere und hybride Peptide

Peptid-bezeichnung	Aminosäuresequenz	Beschreibung
<i>artifizielle Kontrollpeptide</i>		
MS-21	K C F T R R A K W R C	zyklisches Kontrollpeptid, randomisierte Sequenz aus LALF
MS-22	C K W K I R K F S C N	zyklisches Kontrollpeptid, randomisierte Sequenz aus BPI
NEU-10	G A T P Q D L N T M K	lineares Kontrollpeptid mit neutraler Gesamtladung
PA-10	P R R W T F K L K K	lineares Kontrollpeptid mit randomisierter Sequenz aus LALF aa36-45, positive Ladung

Tabelle 3.7: Artifizielle Kontrollpeptide

### 3.4 TNF- $\alpha$ -ELISA

#### 3.4.1 Stammlösungen und Puffer

STAMMLÖSUNG / PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG	
PBS (phosphate buffered saline)	9,55 g ad 1 l	PBS H <sub>2</sub> O bidest pH 7,3
Phosphatlösung 0,2 M	28,4 g ad 1 l	Di-Natriumhydrogenphosphat H <sub>2</sub> O bidest
Phosphat-Zitrat-Puffer 0,05 M	25,7 ml 24,3 ml ad 100 ml	0,2 M Phosphatlösung 0,1M Zitronensäure H <sub>2</sub> O bidest pH 5,0 Lagerung bei 4°C
Zitronensäure 0,1 M	19,2 g ad 1 l	Zitrat H <sub>2</sub> O bidest

### 3.4.2 TNF- $\alpha$ -Messung in murinen Proben

Zur Bestimmung des TNF- $\alpha$ -Gehalts in Proben, welche aus Zellkulturüberständen und murinem Serum stammten, wurde ein kommerzieller TNF- $\alpha$ -ELISA-Kit verwendet (DuoSeT™, 80-3807-00, Genzyme Corporation, Cambridge, USA). Dieser enthält bereits zwei Antikörper (Hamster-Anti-Maus-TNF- $\alpha$ -AK, HRP-konjugierter Ziegen-Anti-Maus-TNF- $\alpha$ -AK) sowie den Standard (rekombinantes Maus-TNF- $\alpha$ ).

Folgende Chemikalien wurden zusätzlich benötigt:

PUFFER UND VERDÜNNUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG	
Bindungspuffer für den 1. Antikörper = 0,1 M Karbonat	2,4 g	Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
	1,7-3g	Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )
	ad 500 ml	$\text{H}_2\text{O}$ bidest
		pH 9,5 Lagerung bei 4°C
Waschpuffer		PBS
	0,05 %	Tween 20
		pH 7,3
		Lagerung bei Raumtemperatur
Blockpuffer		PBS
	1 %	BSA vor Verwendung frisch ansetzen
Verdünnung für Proben und Standard		in Abhängigkeit von der Herkunft der Proben: Zellkulturmedium oder Mausserum
Verdünnung für 2. Antikörper		PBS
	1 %	BSA
	0,05 %	Tween 20 vor Verwendung frisch ansetzen
Substratpuffer	10 ml	Phosphat-Zitrat-Puffer 0,05 M, pH 5,0
	1 Tablette	TMB
(angegebene Mengen ausreichend für eine	2 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ 30%

96er-Mikrotiterplatte)		vor Verwendung frisch ansetzen
Stoplösung	5,3 ml	Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
= 1 M Schwefelsäure	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O bidest
		Lagerung bei Raumtemperatur

Der Assay wurde bis auf geringe Adaptionen bezüglich Konzentrationen und Inkubationszeiten gemäß den Herstellerempfehlungen nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

- Der 1. Antikörper (Hamster-Anti-Maus-TNF- $\alpha$ -AK) wurde in Bindungspuffer auf 3  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und über Nacht bei 4°C an eine 96er Mikrotiterplatte (Nuclon<sup>TM</sup> surface) fixiert (100  $\mu\text{l/well}$ ).
- Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Blockierung nicht besetzter Bindungsstellen mit Blockpuffer bei 37°C für 120 Min (250  $\mu\text{l/well}$ ).
- Zur Erstellung der Standardkurve wurden die angegebenen Konzentrationen verwendet. Für den Ansatz wurde Waschpuffer mit Medium bzw. Serum 1:1 vorverdünnt, dann TNF- $\alpha$ -Standard in entsprechender Menge zugegeben:

Standard 1	1:2	4480	pg/ml
Standard 2	1:4	2240	pg/ml
Standard 3	1:16	560	pg/ml
Standard 4	1:64	140	pg/ml
Standard 5	1:256	35	pg/ml
Leerwert	-	0	pg/ml

- Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 beziehungsweise 1:4 mit Waschpuffer verdünnt. Standard und Proben wurden als Doppelbestimmungen auf die Platte aufgebracht (100  $\mu\text{l/well}$ ) und über Nacht bei 4°C inkubiert.
- Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung der Platten durch 4-5maliges Waschen mit Waschpuffer. Nach dem Trocknen wurde der Zweitantikörper aufgebracht (HRP-konjugierter Ziege-Anti-Maus-TNF- $\alpha$ -AK, Konzentration 2,1  $\mu\text{g/ml}$  in Bindungspuffer, 100  $\mu\text{l/well}$ ) und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
- Nach erneutem 4-5maligen Waschen und Trocknen wurde frisch hergestelltes Substrat-Reagenz zugegeben (100  $\mu\text{l/well}$ ) und die Farbänderung beobachtet. Durch Zugabe von Stoplösung (100  $\mu\text{l/well}$ ) erfolgte nach einer maximalen Entwicklungszeit von 10 Min der Abbruch der Reaktion. Innerhalb von 30 Min wurde die Messung im ELISA-Reader bei 450 nm durchgeführt. Jede Messung erfolgte in Duplikaten.

### 3.4.3 TNF- $\alpha$ -Messung in humanen Proben

TNF- $\alpha$  in Überständen aus humanen Zellkulturen wurde mittels eines kompletten TNF- $\alpha$ -ELISA-Kits (OptEIA™ Human TNF- $\alpha$ -Set, #2637KI, PharMingen, San Diego, USA) gemessen. Darin enthalten sind zwei Antikörper (Maus-Anti-Mensch-TNF- $\alpha$ -AK, biotinylierter Maus-Anti-Mensch-TNF- $\alpha$ -AK), das Enzymreagenz (Streptavidin-HRP-Konjugat) sowie der Standard (rekombinanter Human-TNF- $\alpha$ ).

Darüberhinaus sind folgende Chemikalien erforderlich:

PUFFER UND VERDÜNNUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG	
Bindungspuffer für den 1. Antikörper = 0,1 M Karbonat, pH 9,5	3,56 g	Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )
	8,4 g	Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O bidest
		Lagerung bei 4°C Verbrauch innerhalb 30 d
Waschpuffer		PBS
	0,05 %	Tween 20
		Lagerung bei Raumtemperatur Verbrauch innerhalb von 30 d
Verdünnung für 2. Antikörper, Proben und Standard, Blockpuffer		PBS
	10 %	FCS
		pH 7,0 Lagerung bei 4°C für max. 7 d
Substratpuffer  (angegebene Mengen ausreichend für eine 96er-Mikrotiterplatte)	10 ml	Phosphat-Zitrat-Puffer 0,05 M, pH 5,0
	1 Tablette	TMB
	2 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%
		vor Verwendung frisch ansetzen

Stopplösung	5,3 ml	Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
= 1 M Schwefelsäure	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O bidest
		Lagerung bei Raumtemperatur

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerprotokoll mit Modifikationen bei den eingesetzten Standardkonzentrationen:

- Der Bindungsantikörper (Maus-Anti-Mensch-TNF- $\alpha$ -AK) wurde in Bindungspuffer 1:250 verdünnt und auf eine 96er Mikrotiterplatte (Nuclon<sup>TM</sup> surface) aufgebracht (100  $\mu$ l/well). Die Platte wurde verschlossen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
- Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen die Blockierung nicht besetzter Bindungsstellen bei Raumtemperatur für 60 Min (200  $\mu$ l/well).
- Der lyophilisierte Standard wurde mit Aqua bidest. rekonstituiert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.
- Vor Gebrauch wurde durch Zugabe von Verdünnungslösung eine Standardkonzentration von 1000 pg/ml hergestellt, als weitere Konzentrationen für die Standardkurve wurden verwendet:

Standard 1	1000	pg/ml
Standard 2	500	pg/ml
Standard 3	250	pg/ml
Standard 4	125	pg/ml
Standard 5	62,5	pg/ml
Standard 6	31,2	pg/ml
Leerwert	-	0
		pg/ml

- Standard und Proben (1:2 oder 1:4 verdünnt) wurden jeweils doppelt auf die Platte aufgebracht (100  $\mu$ l/well) und für 120 Min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach fünfmaligem Waschen wurde der Detektionsantikörper zusammen mit dem Enzym zugegeben (100  $\mu$ l/well), die Platte verschlossen und 60 Min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach weiteren 7 Waschgängen wurde die Substratlösung zugegeben (100  $\mu$ l/well) und die Platte für 30 Min an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur abgestellt. Die Zugabe der Stopplösung (50  $\mu$ l/well) unterbrach die Reaktion. Innerhalb von 30 Min erfolgte die Messung in Duplikaten im ELISA-Reader bei 450 nm.

### 3.5 MTT-Assay

Die in *in vitro*-Versuchen verwendeten Zellen können durch verschiedene Einflüsse Schaden nehmen, absterben und so falsche Ergebnisse liefern. Als eine mögliche Noxe kamen in den durchgeführten Experimenten die untersuchten Peptide in Betracht. Da abgetötete Zellen kein TNF- $\alpha$  produzieren, würde eine Messung im Überstand einen falsch niedrigen Wert und damit einen in der Realität nicht vorhandenen Inhibitionseffekt zeigen. Es ist daher erforderlich, nach erfolgter Peptidexposition und Stimulation am Ende des Versuchs die Vitalität der Zellen zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurde ein MTT-Assay durchgeführt, welcher eine quantitative Analyse der mitochondrialen Stoffwechselaktivität erlaubt. Man benötigt hierfür:

CHEMIKALIE	ZUSAMMENSETZUNG	
MTT-Lösung	25 mg ad 10 ml	MTT PBS steril filtriert lichtgeschützte Lagerung bei 4°C
Lösungsmittel für Kristalle		0,04 N HCL-Isopropanol

#### Durchführung

- Zu den Zellen, die auf der Mikrotiterplatte verblieben sind, wird nach Abnahme der Überstände Medium (50  $\mu$ l/well) und MTT (20  $\mu$ l/well) gegeben und die Platte 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
- MTT wird nur von vitalen Zellen innerhalb von 3 Stunden mitochondrial metabolisiert. Makroskopisch erkennbar ist dies durch die Bildung violetter Kristalle, die sich im Überstand sammeln. Unmittelbar nach Auflösung der Kristalle mit HCL-Isopropanol (150  $\mu$ l/well) erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 570/690 nm im ELISA-Reader. Jede Messung erfolgte in Duplikaten.

### 3.6 *in vitro* – Modelle

Um den inhibitorischen Effekt einer größeren Anzahl von LPS-bindenden Peptiden untersuchen zu können, wurde eine auf Zellkulturen basierende Versuchsanordnung etabliert. Dabei kamen sowohl murine und humane Zelllinien als auch humane periphere mononukleäre Blutzellen zum Einsatz.

#### 3.6.1 ANA 1-Zellkultur

Bei der Zelllinie ANA 1 handelt es sich um immortalisierte murine Makrophagen, die eine hohe Sensibilität gegenüber Endotoxin aufweisen und sich daher für die geplanten Versuchsreihen sehr gut eignen. Die Zellen wurden in „Lowtox“-Medium (VLE RPMI 1640 Medium, Endotoxin < 0,01 EU/ml) unter Zusatz von FCS,  $\beta$ -Merkaptoethanol und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Sie wurden in Zellkulturschalen im Inkubator bei 37° aufbewahrt, die Zelldichte lag zwischen  $3 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Vor der Zugabe wurde die benötigte Menge Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Ungünstige Kulturbedingungen wie zum Beispiel zu hohe bzw. zu niedrige Zelldichte oder verbrauchtes Medium wirken auf die Zellen als Stressoren, worauf sie unter anderem mit erhöhter Zytokinausschüttung reagieren. Es ist daher wichtig, stets optimale Kulturbedingungen zu bieten, um in Versuchen keine prästimulierten Zellen einzusetzen.

Zur Zählung wurden Zellen aus der Kultur entnommen, mit Eosinrot gefärbt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht.

---

#### EOSINLÖSUNG FÜR ZELLZÄHLUNG

---

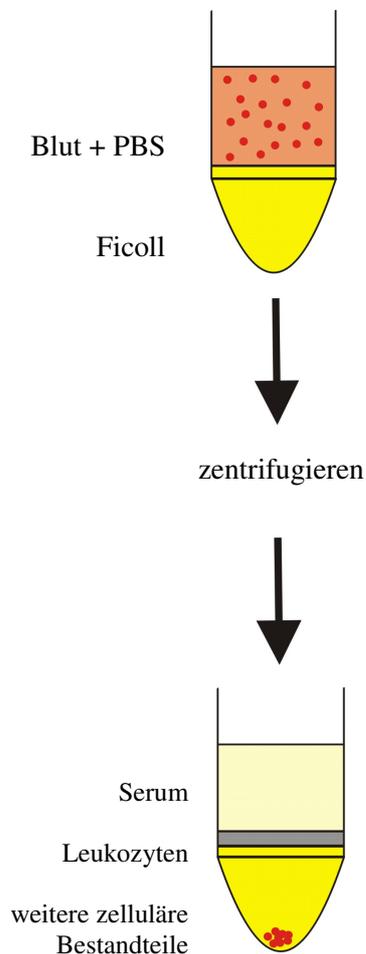
10 g	Eosin
ad 1 l	H <sub>2</sub> O bidest
	steril filtrieren
	Zum Färben die Lösung 10fach verdünnt einsetzen

#### 3.6.2 MonoMac 6-Zellkultur

MonoMac 6 ist eine humane Monozytenlinie, die aus einem Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert wurde und die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften reifer Monozyten zeigt (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Auch diese Zellen reagieren hoch sensibel auf Endotoxin. Für die Kultur wurde VLE RPMI 1640-Medium unter Zusatz von Humanserum,  $\beta$ -Mercaptoethanol, OPI-Supplement und Penicillin/Streptomycin verwendet, das jeden zweiten Tag erneuert und vor der Zugabe auf 37°C erwärmt wurde. Die Zellkulturschalen wurden im Inkubator bei 37° aufbewahrt, die Zelldichte betrug zwischen  $3 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Zellzählung erfolgte nach Färbung mit Eosinrot in einer Neubauer-Zählkammer wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben.

### 3.6.3 Humane periphere mononukleäre Blutzellen

Die Gewinnung humaner peripherer mononukleärer Zellen (PBMC, „*buffy coat*“) aus Spenderblut erfolgte durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Diese Methode eignet sich gut zur Auftrennung einer Suspension aus Zellen und weiteren Bestandteilen, wie sie im Vollblut vorliegt. Bei Zentrifugation sedimentieren die Partikel in Abhängigkeit vom umgebenden Medium proportional zu ihrer Größe und kommen so in unterschiedlichen Schichten zu liegen. Zur Isolierung mononukleärer Leukozyten wurde Ficoll mit der Dichte 1.077 verwendet. Nach Zentrifugation (20 Min 1000 g bei 20°C, Dezeleration 0) befanden sich die unterschiedlichen Populationen der mononukleären Leukozyten in der Interphase (Abbildung 3.1). Der „Überstand“ aus Spenderserum wurde abgenommen und für die anschließenden Versuche aufbewahrt. Die Leukozyten wurden geerntet und nach zweimaligem Waschen mit frischem Medium in Stimulationsexperimenten eingesetzt. Diese Zellen wurden stets frisch gewonnen und nicht kultiviert.



#### Durchführung:

- 15 ml Ficoll 1.077 auf 37°C erwärmen und in ein Plastikgefäß füllen
- 25 ml Spenderblut mit 25 ml PBS mischen und vorsichtig darüberschichten
- Zentrifugieren 20 Min 1000 g bei 20°C
- PBS-Schicht mit Pasteurpipette absaugen und verwerfen
- „Überstand“ aus Serum vorsichtig abpipettieren und als Medium-Zusatz verwenden
- Leukozyten ernten, in Spitzbodengefäß geben, mit frischem Medium resuspendieren, zentrifugieren 5 Min/ 1500 UpM/ RT
- Medium absaugen, Pellet mit frischem Medium resuspendieren, Zellzählung durchführen, zentrifugieren 5 Min/ 1500 UpM/ RT
- Medium absaugen, Pellet mit frischem Medium resuspendieren (Volumen nach gewünschter Zellkonzentration)

**Abbildung 3.1: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

### 3.6.4 Versuchsaufbau

Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen entsprechend vorbereitet, gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Je nach Zellart wurden unterschiedliche Mengen eingesetzt:

ZELLTYP	ANZAHL PRO WELL
ANA 1	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen
MonoMac 6	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen
PBMC	5 x 10 <sup>5</sup> Zellen

Daneben wurden folgende Reagenzien benötigt:

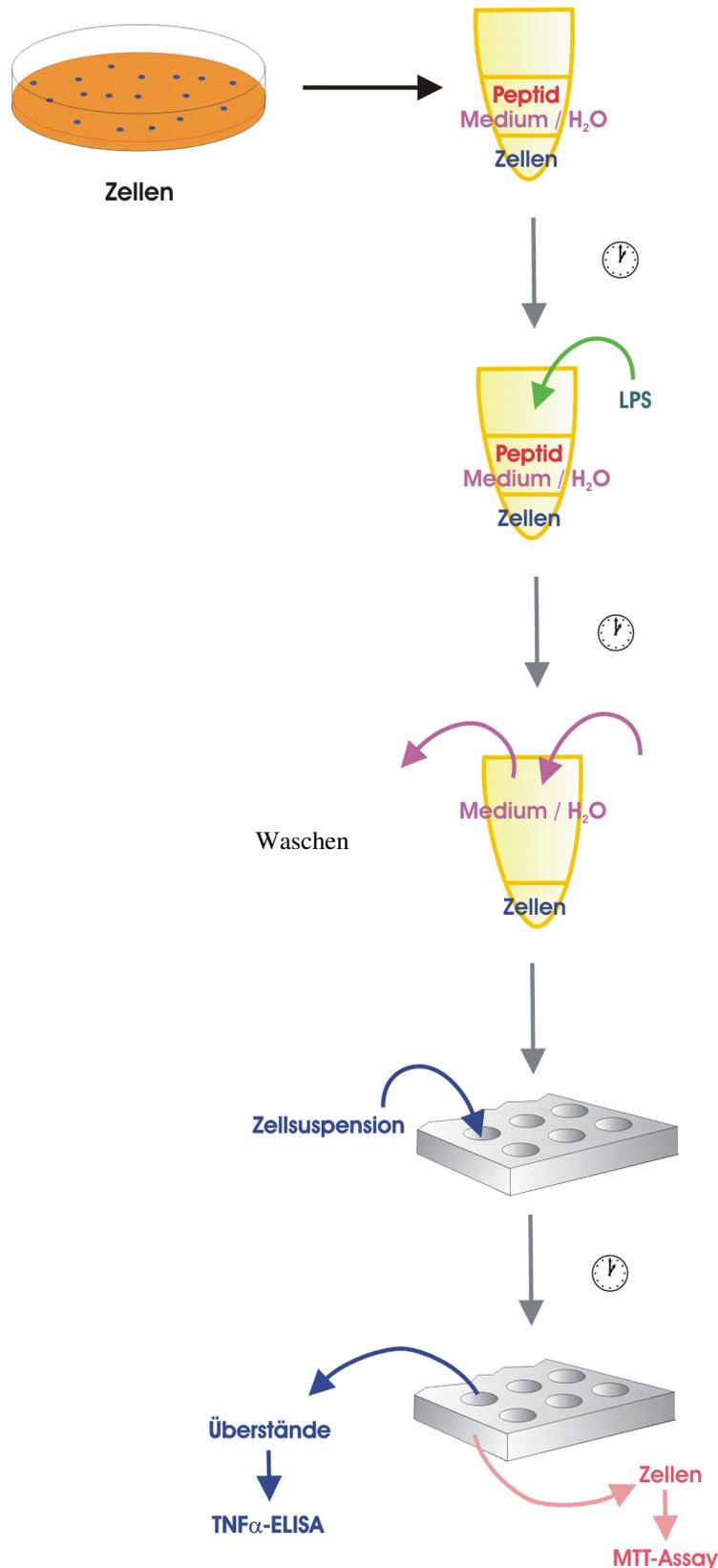
REAGENS	ANSATZ / VERWENDUNG
Peptide	Lyophilisat in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stock 10 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei -20°C vor Verwendung gut mischen
Polymyxin B	Trockensubstanz in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stock 10 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei -20°C vor Verwendung gut mischen für jedes Experiment frisches Aliquot verwenden, Reste verwerfen
LPS <i>S. enteritidis</i>	Lyophilisat in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stock 1 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei -20°C vor Verwendung 10 Min vortexen für jedes Experiment frisches Aliquot verwenden, Reste verwerfen

Da die Peptide hinsichtlich ihrer *prophylaktischen* Wirksamkeit untersucht werden sollten, wurden sie den Zellen *vor* der Endotoxinapplikation zugesetzt. Der Zeitabstand von 5 Min wurde dabei so gewählt, dass die begrenzte Stabilität der Peptide im Serum ausreichend berücksichtigt war. In Vorversuchen konnte ausgeschlossen werden, dass die Peptide selbst auf die Zellen stimulierend wirken (Daten nicht gezeigt). Zytotoxizität wurde bei einzelnen multimeren Peptiden lediglich in höheren Konzentrationen ab 15 µg/ml beobachtet. Die in den *in vitro*-Experimenten verwendete Dosierung wurde mit 5 µg/ml daher so gewählt, dass mit einer zellschädigenden Wirkung nicht zu rechnen war. Polymyxin B wurde ebenfalls in der Konzentration 5 µg/ml eingesetzt.

Endotoxin wurde vor Verwendung 10 Min gevortext, um eventuell vorhandene Micellen aufzulösen und die Bindungsstellen freizulegen. In vorausgegangenen Untersuchungen hatten LALF-Peptide die höchste Affinität zu LPS von *Salmonella enteritidis* gezeigt (Hoess et al., 1995). Die optimalen LPS-Konzentrationen und Stimulationszeiten waren in Vorversuchen ermittelt worden und betragen 40 ng/ml für ANA 1 und MonoMac 6 beziehungsweise 5 ng/ml für PBMC bei einer Einwirkzeit von 30 Min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur Entfernung von ungebundenem Endotoxin und Peptiden wurden die Zellen im Anschluss daran zweimal gewaschen, in eine 96-well Flachbodenmikrotiterplatten überführt und für weitere 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und bis zur Messung des TNF- $\alpha$ -Gehalts mittels ELISA bei -20°C gelagert. Die anschließende Überprüfung der Zellvitalität erfolgte anhand des oben beschriebenen MTT-Assays.

Bei jedem Experiment wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

LPS-Kontrolle	Stimulation ohne Peptidzugabe
Zellkontrolle	keine LPS- / Peptidzugabe
Wasserkontrolle	keine LPS- / Peptidzugabe, hypotones Medium
PA 10	Kontrollpeptid ohne neutralisierende Wirkung
NEU 10	Kontrollpeptid ohne neutralisierende Wirkung

Durchführung:

- 150 µl Zellsuspension in ein Eppendorf-Tube pipettieren
- 150 µl Peptidverdünung (Konz. 5 µg/ml) zugeben
- nach 5 Min 300 µl LPS-Verdünnung zugeben (Konz. 40 ng/ml für ANA 1 und MonoMac 6 bzw. 5 ng/ml für PBMC)
- Pulszeit von 30 Min im Brutschrank (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>)
- Waschen:
  - 1) zentrifugieren 5 Min/ 1500 UpM, Überstand absaugen, 1 ml Medium dazu, Zellen resuspendieren
  - 2) zentrifugieren 4 Min/ 1500 UpM, Überstand absaugen, 1 ml Medium dazu, Zellen resuspendieren
  - 3) zentrifugieren 4 Min/ 1500 UpM, Überstand absaugen, mit 600 µl Medium Zellen resuspendieren
- je 200 µl Zellsuspension aus Tube in 96-well-ZK-Platte überführen
- 4 h inkubieren (Brutschrank)
- ZK-Überstände abnehmen → ELISA
- zu den Zellen 50 µl Medium und 20 µl MTT → MTT-Assay

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls

### 3.7 *in vivo* – Modelle

Verabreicht man Mäusen Endotoxin, so führt dies zur Ausschüttung diverser Zytokine, darunter TNF- $\alpha$ , welcher als wichtiger Mediator in der Pathophysiologie der Sepsis fungiert. Der maximale TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum wird 60–90 Min nach der LPS-Applikation erreicht. Nach 180 Min ist bereits wieder ein Rückgang feststellbar (Michie et al., 1988; Cannon et al., 1990).

In mehreren Tiermodellen wurde das Potenzial LPS-bindender Peptide hinsichtlich der Inhibition der TNF- $\alpha$ -Freisetzung und der Verbesserung von Überlebenszeiten untersucht. Eingesetzt wurden hierbei Peptide, die in Zellkultur-Versuchen eine besonders ausgeprägte Inhibitionswirkung gezeigt hatten. Für die *in vivo*-Experimente wurden weibliche C57BL/6- und BALB/c-Mäuse im Alter zwischen 8 und 10 Wochen verwendet, deren Körpergewicht im Durchschnitt 20 g betrug. Pro Gruppe wurden 2 bis 4 Tiere behandelt, die Versuchsreihen wurden mehrfach wiederholt. Da die Versuchsprozedur den Tieren Stress verursacht, was zur Verfälschung des Hintergrunds - beispielsweise infolge vermehrter Glukokortikoid-Freisetzung - führen könnte, erhielten auch Mäuse für Negativkontrollen in identischen Intervallen Injektionen mit gleichen Volumina Trägerlösung.

Peptide und Polymyxin B wurden jeweils in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Alle Mäuse (außer Negativkontrollen) erhielten die identische Menge LPS von *Salmonella enteritidis*. Sämtliche Injektionen wurden nach negativem Aspirationsversuch intraperitoneal verabreicht, wobei das applizierte Gesamtvolumen maximal 200  $\mu$ l betrug.

REAGENS	ANSATZ / VERWENDUNG
Peptide	Lyophilisat in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stockage 10 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ vor Verwendung gut mischen
Polymyxin B	Trockensubstanz in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stockage 10 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ vor Verwendung gut mischen, Reste verwerfen
LPS <i>S. enteritidis</i>	Lyophilisat in Endotoxin-freiem Wasser lösen (Stockage 1 mg/ml) steril filtrieren, aliquotieren Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ vor Verwendung 10 Min vortexen, Reste verwerfen

### 3.7.1 Versuchsaufbau für Inhibitionsexperimente

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob Mäuse, die LPS-bindende Peptide erhalten hatten, nach Endotoxingabe niedrigere TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum aufweisen als die unbehandelten Kontrollen. Hierfür wurden den Tieren 100  $\mu$ g Peptid bzw. Polymyxin B in 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia intraperitoneal verabreicht (LPS-, H<sub>2</sub>O-Kontrollen: 100  $\mu$ l Aqua). Nach 15 Min wurde 1  $\mu$ g LPS in 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia gespritzt (H<sub>2</sub>O-Kontrolle: 100  $\mu$ l Aqua). Der Zeitraum der maximalen Immunantwort mit den höchsten TNF- $\alpha$ -Spiegeln im Serum liegt zwischen 60 und 90 Min nach der Endotoxingabe. Die Tiere wurden daher 75 Min nach der LPS-Applikation mittels CO<sub>2</sub> getötet und Blut aus dem Herzen gewonnen. Die Blutproben wurden 7 Min bei 10.000 UpM zentrifugiert, die Serumüberstände abgenommen und bis zur Analyse im TNF- $\alpha$ -ELISA bei -20°C gelagert.

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität der Peptide im Organismus wurden in einigen Experimenten die Intervalle zwischen Peptid- und Endotoxinapplikation variiert. LL 10-H 14 wurde dazu in Zeitabständen von 1 h vor bis 1 h nach der LPS-Gabe verabreicht.

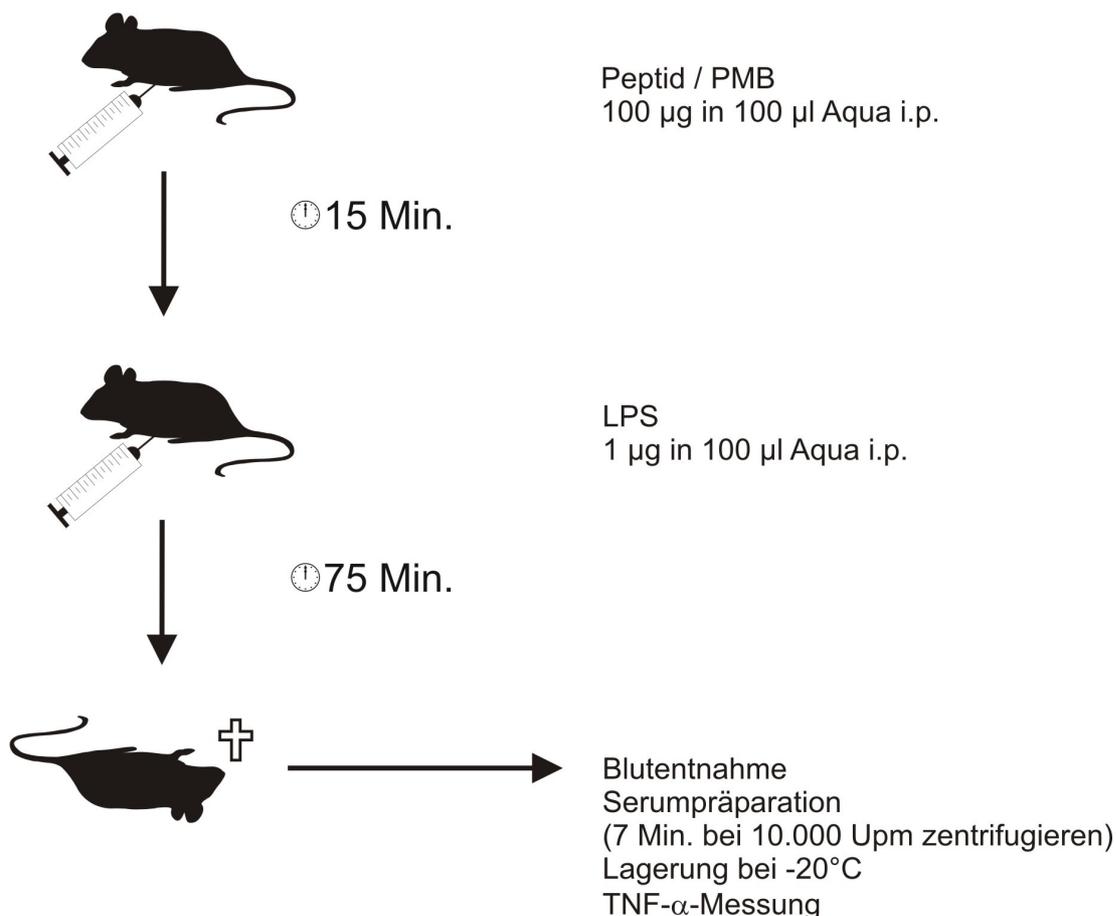


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für *in vivo*-Inhibitionsexperimente

### 3.7.2 Versuchsaufbau für Überlebensversuche

Es wurde geprüft, ob die Gabe LPS-bindender Peptide die Überlebenschance von Mäusen mit Endotoxinschock steigern kann. Um einen septischen Schock zu induzieren, wurden den Tieren Mengen zwischen 4 und 20 mg D-Galaktosaminhydrochlorid (D-GalN) in 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia intraperitoneal injiziert (Keppler et al., 1968; Decker und Keppler, 1974; Lehmann et al., 1987). Nach 45 Min erhielten sie 100  $\mu$ g Peptid beziehungsweise Polymyxin B in 50  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia (LPS-, H<sub>2</sub>O-Kontrollen: 50  $\mu$ l Aqua) und nach weiteren 15 Min 1  $\mu$ g LPS in 50  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia (H<sub>2</sub>O-Kontrolle: 50  $\mu$ l Aqua) ebenfalls i.p. (injiziertes Gesamtvolumen 200  $\mu$ l pro Maus). Die Mäuse wurden über einen definierten Zeitraum hinweg beobachtet und die Anzahl der überlebenden Tiere protokolliert.

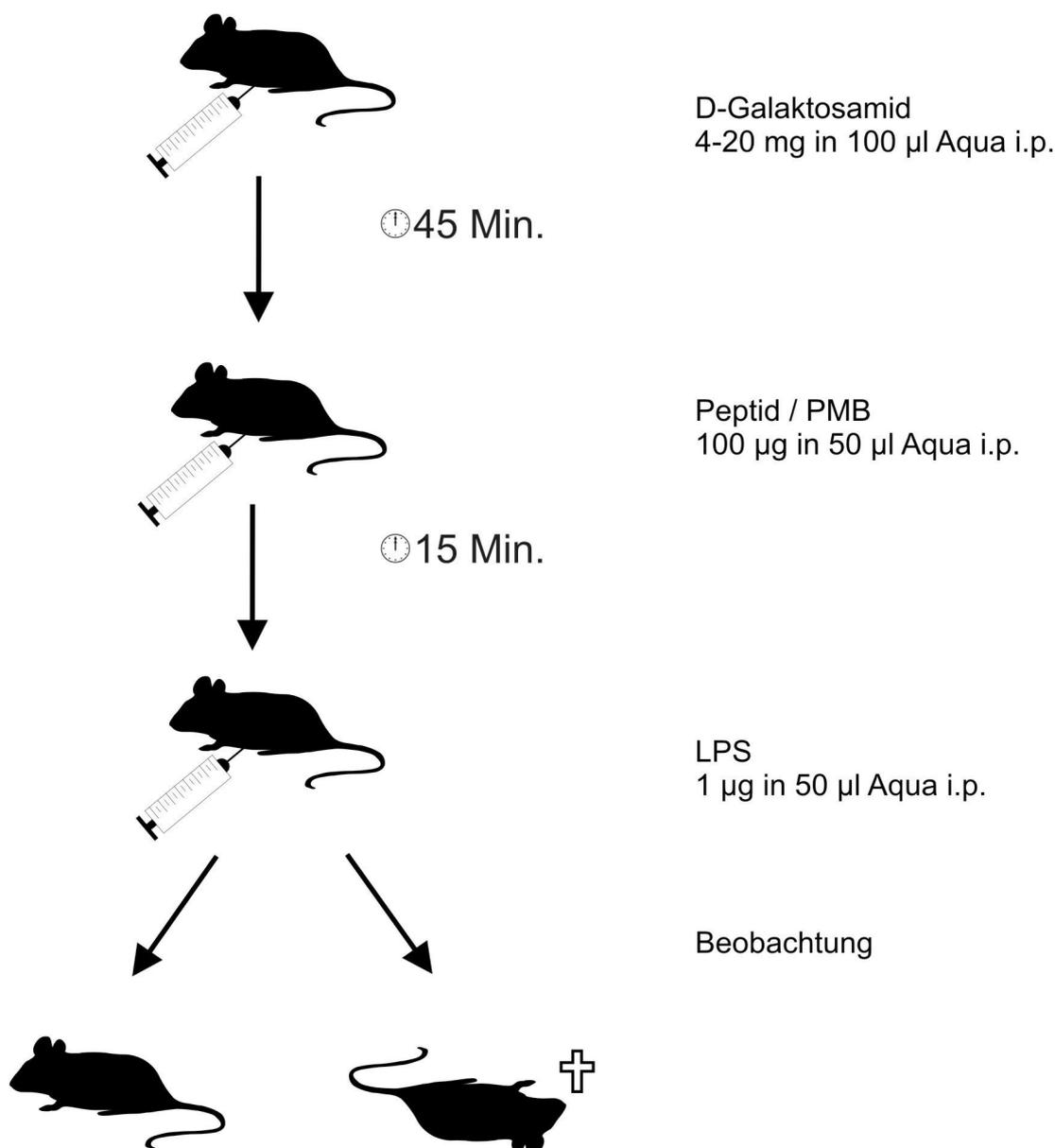


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für *in vivo*-Überlebensexperimente

### 3.7.3 *Colon ascendens* Stent Peritonitis (CASP)-Modell

Das CASP-Tiermodell ermöglicht eine standardisierte und reproduzierbare Vorgehensweise für Untersuchungen über pathophysiologische Abläufe bei der Sepsis (Zantl et al., 1998). Hierbei wird C57BL/6 -Mäusen ein Kunststoff-Stent in das *Colon ascendens* implantiert und dadurch eine Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle geschaffen. Auf diese Weise wird eine Situation simuliert, die vergleichbar ist mit einer Anastomoseninsuffizienz nach einem Darmeingriff. Im weiteren Versuchsverlauf entwickeln die Tiere eine Peritonitis und zeigen Symptome eines systemischen Sepsis-Syndroms (SIRS). Die Letalität korreliert dabei mit dem Durchmesser des eingesetzten Stents. Bei den in dieser Versuchsreihe verwendeten 18G-Stents liegt sie ohne Therapie bei 68 % (Zantl et al., 1998). Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten zeigen, ob die Letalität in diesem Modell durch wiederholte Applikation von LPS-bindenden Peptiden gesenkt werden kann. Für die Durchführung der Operationen bedanke ich mich herzlich bei Dr. Stefan Maier.

Die Eingriffe wurden in Äthernarkose vorgenommen. Dafür setzt man die Mäuse zunächst für ca. 30 Sekunden in eine Ätherkammer, anschließend atmen sie zur Erhaltung der Narkose ein Äther-Luft-Gemisch aus einem 15 ml Falcon-Röhrchen, an dessen Boden äthergetränkte Kompressen eingebracht wurden. Die Narkosetiefe kann über Veränderung der Entfernung des Röhrchens zur Nasenspitze der Maus reguliert werden. Nach Beendigung des Eingriffs wird das Röhrchen entfernt, das Tier erwacht nach kurzer Zeit.

Nach der Operation wurden die Mäuse zur weiteren Beobachtung in ihre Käfige zurückgesetzt und zwei Behandlungsgruppen gebildet:

<b>GRUPPE 1</b>	<b>GRUPPE 2</b>
(N = 10)	(N = 10)
3, 6 und 9 h postoperativ	3, 6 und 9 h postoperativ
100 µg LL 10-H 14 in	100 µl Aqua ad iniectabilia i.p.
100 µl Aqua ad iniectabilia i.p.	(Kontrolle)

Über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 7 Tagen wurde die Anzahl der überlebenden Tiere in regelmäßigen Abständen protokolliert.

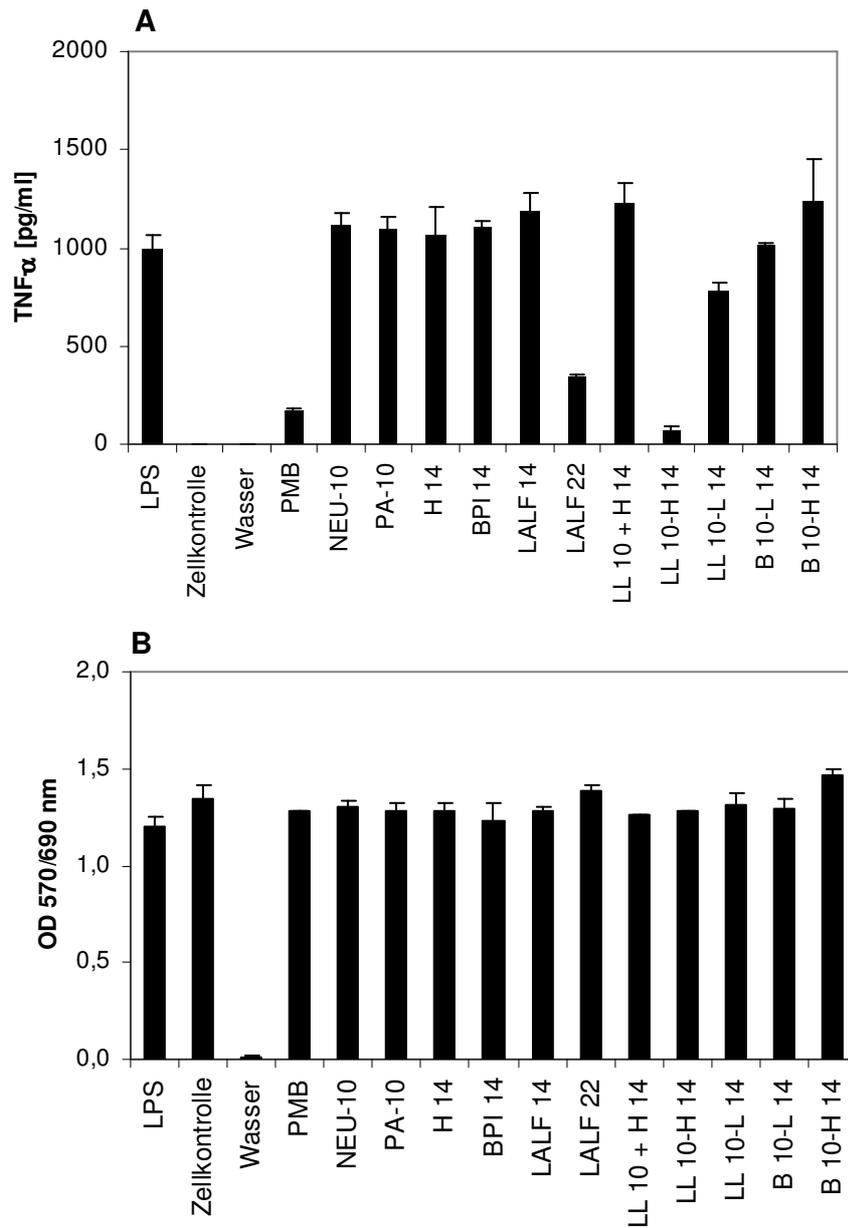
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 LPS-inhibierende Peptide reduzieren die Endotoxin-induzierte TNF- $\alpha$ -freisetzung durch Makrophagen *in vitro*

#### 4.1.1 ANA 1-Zellkulturmodell

Der Einfluss LPS-bindender Peptide auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion Endotoxin-stimulierter Makrophagen wurde zunächst an Zellen der murinen Makrophagenzelllinie ANA 1 untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach dem unter Punkt 3.6.4 dargestellten Protokoll behandelt. Anhand dieses standardisierten Verfahrens konnte für alle vorhandenen Peptide ein orientierendes Screening vorgenommen werden. Die effektivsten Peptide konnten dadurch identifiziert und in weitergehenden Experimenten untersucht werden.

Die Messung des TNF- $\alpha$ -Gehaltes im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Die Vitalität der Zellen wurde nach jedem Experiment mittels MTT-Assay überprüft, um falsch negative Ergebnisse infolge Zelltodes ausschließen zu können. Abbildung 4.1 zeigt beispielhaft die Messwerte eines Versuchs, der gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt wurde.



**Abbildung 4.1: Untersuchung LPS-bindender Peptide im ANA 1-Zellkulturmodell**

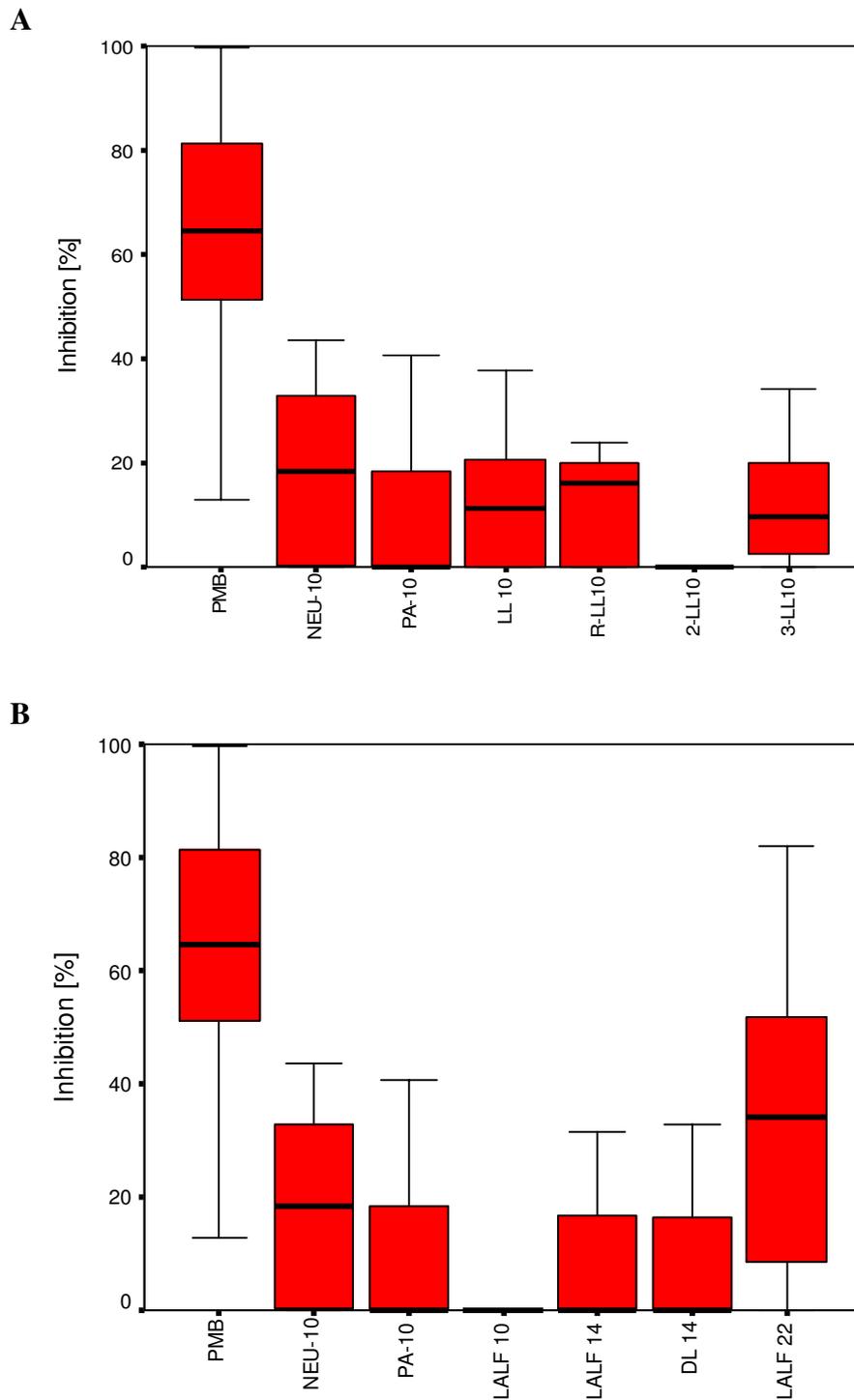
**A. TNF- $\alpha$ -Messung im ELISA**

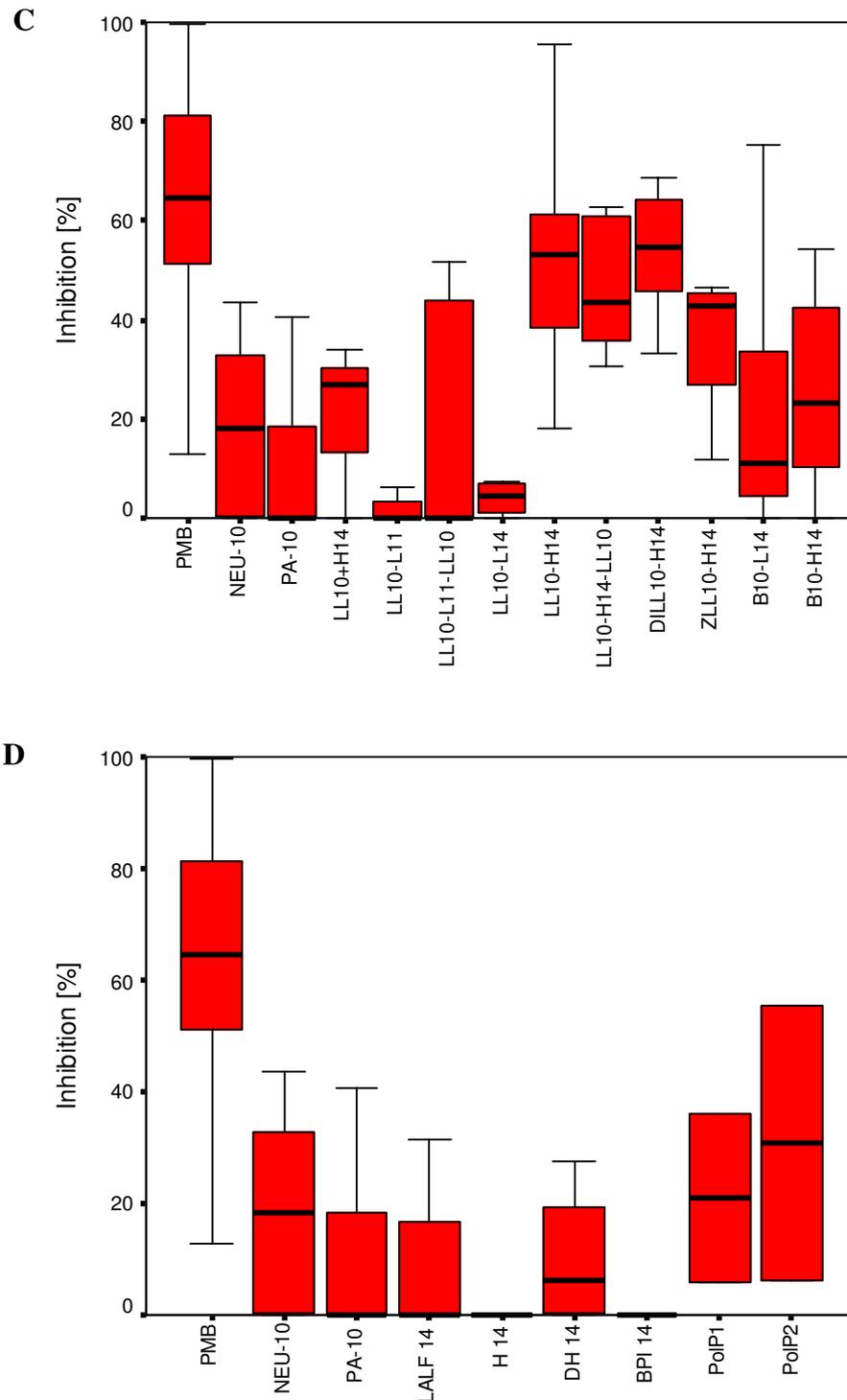
**B. Vitalitätsprüfung im MTT-Assay**

ANA-1 Zellen ( $1 \times 10^5$ /well) wurden mit verschiedenen Peptiden (5 mg/ml) inkubiert. Nach 5 Min wurde LPS in der Konzentration 40 ng/ml zugegeben und für 30 Min belassen. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und deren TNF- $\alpha$ -Gehalt im ELISA gemessen. Im dargestellten Experiment führten lediglich PMB, LALF 22 und LL 10-H 14 zu einer wesentlichen Reduktion der TNF- $\alpha$ -Spiegel (A). Die Überprüfung der Zellvitalität im MTT-Assay ergab, dass alle eingesetzten Zellen nach Versuchsdurchführung MTT metabolisieren konnten, was sich in Form eines hohen optischen Dichtewerts zeigt (OD). Lediglich die Zellen im hypotonen Medium (Wasserkontrolle) waren erwartungsgemäß abgestorben (B).

LPS: stimulierte Zellen ohne Peptidzugabe (Positivkontrolle); Zellkontrolle: unstimulierte Zellen (Negativkontrolle); Wasser: unstimulierte Zellen in hypotonem Medium (Negativkontrolle für MTT-Assay). Dargestellt ist ein repräsentatives von mehreren identischen Experimenten. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde aus den einzelnen Messwerten die prozentuale Inhibition bezogen auf die jeweilige LPS-Referenzkontrolle errechnet. Das inhibitorische Potenzial der Peptide wurde verglichen mit dem der Kontrollpeptide NEU-10 beziehungsweise PA-10 einerseits und dem von PMB andererseits. Die Abbildungen 4.2 A-D zeigen zusammengefasst die gemittelten Inhibitionswerte einiger ausgewählter Peptide aus mehreren identischen Experimenten.





**Abbildung 4.2: Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im ANA 1-Zellkulturmodell**

**A. lineare LALF-Peptide** (vorherige Seite)

**B. zyklische LALF-Peptide** (vorherige Seite)

**C. multimere Peptide**

**D. Vergleich von Peptiden mit Bindungssequenzen des LALF, LPB, BPI und PMB**

Nach Versuchsdurchführung gemäß Stimulationsprotokoll wurde der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Überstand von ANA 1-Zellkulturen mittels ELISA gemessen. Für jedes Peptid wurde die prozentuale Inhibition im jeweiligen Experiment errechnet (Referenzgrößen: LPS-Kontrolle = 0%, Zellkontrolle = 100%). Für die statistische Analyse wurden die Inhibitionswerte für ein Peptid aus allen durchgeführten Versuchen zusammengefasst (asymptotische Signifikanz,  $p < 0,05$ ). In den Boxplots dargestellt sind die so ermittelten Inhibitionswerte ausgewählter Peptide. Dabei repräsentiert die Box den Interquartilbereich mit 50% der Werte, die Querlinie stellt die Lage des Medians dar. Die von der Box ausgehenden Linien reichen jeweils bis zum höchsten beziehungsweise niedrigsten Wert.

### Zyklische Peptide sind den linearen überlegen

Wie schon in vorausgegangenen Bindungsstudien zeigten sich zyklische Peptide den linearen deutlich überlegen (Ried et al., 1996). Die linearen LALF-Peptide, welche unterschiedliche Abschnitte der LPS-Bindungsschleife enthalten (siehe hierzu Abb. 1.10), konnten keine wesentliche Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung erreichen (Abbildung 4.2 A). Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da sich in vorausgegangenen Studien LL 10 sowohl wirksam in Lipid A-Bindungs- wie auch Konkurrenzexperimenten erwies und als der minimale LPS-bindende Abschnitt betrachtet wurde (Ried et al., 1996).

Bei den zyklischen LALF-Peptiden (Abbildung 4.2 B) wurde eine deutliche Zunahme des inhibitorischen Potenzials in Abhängigkeit der Kettenlänge beobachtet: Am wenigsten wirksam erwies sich LALF 10, wogegen LALF 22 im Vergleich zum Kontrollpeptid NEU 10 eine signifikante Inhibition zeigte ( $p=0,027$ ), die im Mittel bei 35,7 % lag. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass für eine hochaffine Bindung nicht nur die zyklische Konformation erforderlich ist, sondern auch die präzise strukturelle Anordnung der kompletten Endotoxin-bindenden Domäne. Die minimale Bindungssequenz liegt nach unseren Ergebnissen mutmaßlich im Bereich der Aminosäuren 36/38-45/47 (LALF 10 und LALF 14). LBP-, BPI- wie auch Polymyxin B-Peptide waren insgesamt nicht in der Lage, die TNF- $\alpha$ -Spiegel effektiv zu reduzieren (Abbildung 4.2 D). Ein Austausch von Aminosäuren, wie er beispielsweise bei KL 14 vorgenommen wurde (*Arginin*  $\rightarrow$  *Lysin*), beeinflusste die Wirksamkeit der Peptide ebenso wenig wie die Verwendung von D-Aminosäuren, die zu einer erhöhten Serumstabilität beitragen sollten (Daten nicht gezeigt).

### Optimierung durch Kopplung von Bindungsdomänen

Eine deutliche Verbesserung brachte dagegen die Einführung der multimeren Hybrid-Peptide mit sich (Abbildung 4.2 C). Es handelt sich dabei um Peptide, in denen zwei oder drei Bindungsdomänen aus LALF, LBP beziehungsweise BPI kombiniert werden. Damit wird zum einen die Anzahl der potenziellen LPS-Bindungspunkte erhöht, zum anderen beeinflusst vermutlich auch die besondere räumliche Konformation das Bindungsverhalten. In unserem Aufbau wurden mehrere Kombinationen von Abschnitten aus den genannten Bindungsdomänen untersucht. Über das ausgeprägteste inhibitorische Potenzial verfügte hier das Dimer LL 10-H 14, welches sich aus linearem LALF (LL 10) und humanem LBP (H 14) zusammensetzt (Abbildung 4.2 C, vergleiche auch Abbildung 1.12). In einigen Versuchen konnte LL 10-H 14 die TNF- $\alpha$ -Freisetzung um bis zu 95 % senken. Im Mittel erreichte es eine Inhibition von 53,15 %. Bemerkenswerterweise sind die einzelnen Bestandteile LL 10 und H 14 weder separat noch simultan verabreicht in der Lage, die Endotoxinwirkung signifikant zu antagonisieren (Abbildung 4.2 C). Dies legt den Schluss nahe, dass die Kopplung der beiden Peptidketten und die damit einhergehende enge Nachbarschaft der Domänen eine unabdingbare Voraussetzung für die Wirksamkeit darstellt. Ersetzt man den LBP-Anteil (H 14) durch eine zyklische LALF-Komponente (L 14), erhält man das Peptid LL 10-L 14. Dieses konnte interessanterweise die TNF- $\alpha$ -Freisetzung nicht mehr blockieren (Abbildung 4.2 C). Ebenso war das Inhibierungspotenzial beim Dimer B 10-H 14, in welchem LL 10 gegen die lineare BPI-Komponente B 10 ausgetauscht

worden war, deutlich vermindert. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die LPS-Bindungskapazität nicht nur von der Anzahl der Bindungsdomänen in einem Peptid abhängt, sondern auch von deren Art beziehungsweise Konformation. Von allen hier untersuchten Hybrid-Peptiden wurden die besten synergistischen Effekte bei der Kombination einer linearen LALF-Kette mit einer Schleife aus dem humanen LBP beobachtet, wie dies im Dimer LL 10-H 14 realisiert ist.

Es wurde der Versuch unternommen, die Bindungskapazität von LL 10-H 14 durch Anfügen einer dritten Komponente (LL 10-H 14-LL 10), Interposition eines Abstandhalters (ZLL 10-H 14) beziehungsweise Verwendung von D-Aminosäuren (DILL 10-H 14) zu optimieren. Die so entstandenen Peptide konnten zwar die TNF- $\alpha$ -Freisetzung signifikant reduzieren, wiesen aber kein gesteigertes inhibitorisches Potenzial auf (Abbildung 4.2 C).

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten ergab, dass die Mehrzahl der untersuchten Peptide in dieser Versuchsreihe die TNF- $\alpha$ -Freisetzung entweder nur im gleichen Maße wie die Kontrollpeptide reduzieren oder aber keinen messbaren Effekt erzielen konnte. Das zyklische LALF 22 mit der kompletten LALF-Bindungsdomäne sowie die multimeren Hybrid-Peptide LL 10-H 14, LL 10-H 14-LL 10, DILL 10-H 14 und ZLL 10-H 14 zeigten im Vergleich zum Kontrollpeptid NEU 10 ein signifikant höheres Inhibitions Potenzial (siehe Tabelle 4.1), jedoch keinen Vorteil gegenüber PMB.

KONTROLLE	PEPTID	ASYMPTOTISCHE SIGNIFIKANZ (WILCOXON-TEST)
NEU 10	LALF 22	p=0,027
NEU 10	LL 10-H 14	p<0,0001
NEU 10	LL 10-H 14-LL 10	p=0,004
NEU 10	DILL 10-H 14	p=0,001
NEU 10	ZLL 10-H 14	p=0,045

**Tabelle 4.1: Statistische Auswertung der Inhibitionswerte ausgewählter LPS-bindender Peptide**  
Zusammengestellt sind die Werte der asymptotischen Signifikanz im Wilcoxon-Test. Dabei wurden die Peptide mit dem Kontrollpeptid NEU 10 hinsichtlich der Inhibitionswerte verglichen.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob eine repetitive Zugabe der Peptide das inhibitorische Potenzial steigern kann. Einer ANA 1-Zellkultur wurden zu diesem Zweck Peptide in der Konzentration 5  $\mu$ g/ml mehrmals hintereinander verabreicht (5 Min vor LPS, 10 und 20 Min nach LPS). Die TNF- $\alpha$ -Freisetzung konnte dadurch allerdings nicht weiter reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

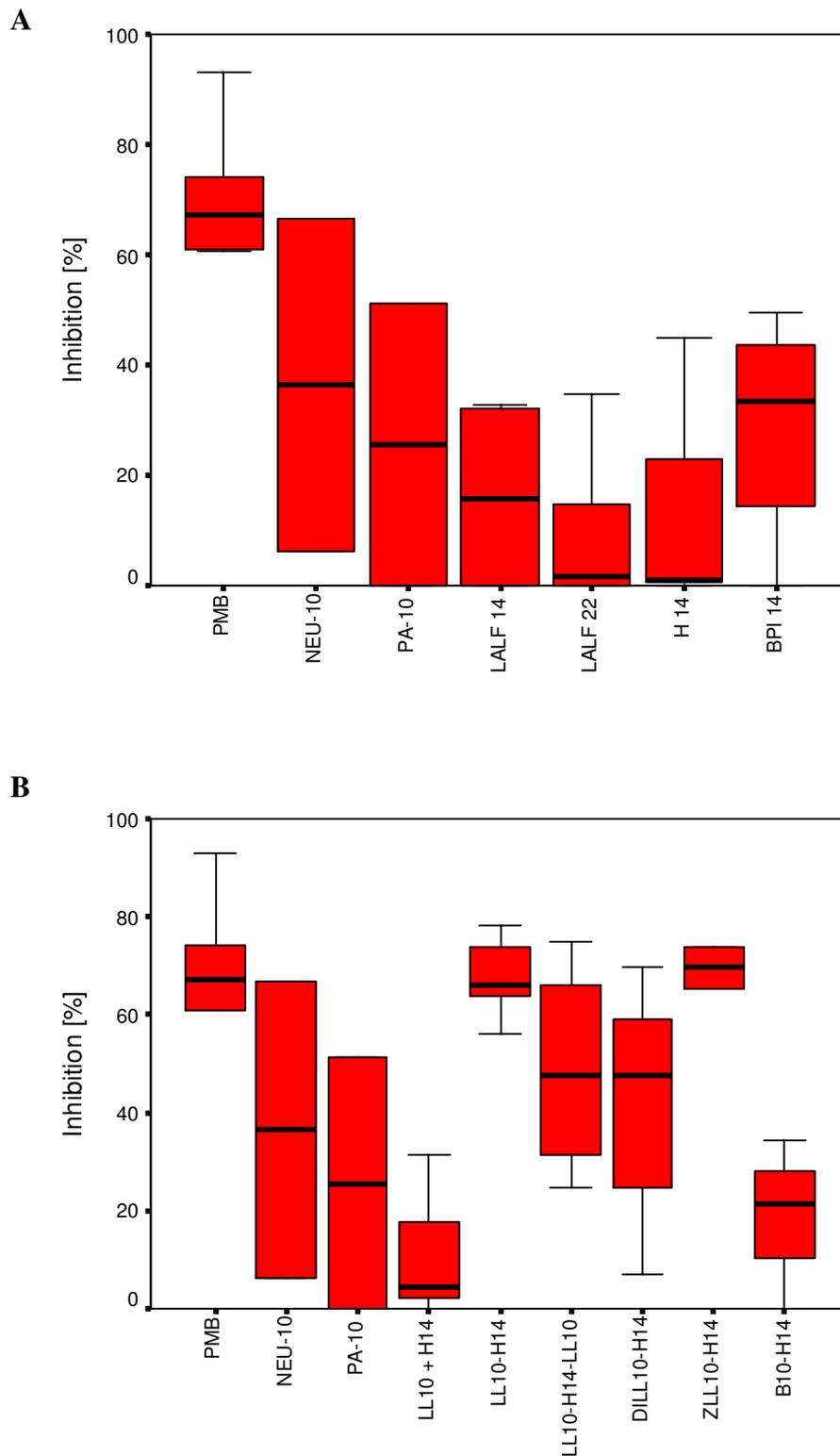
## 4.1.2 Untersuchung humaner Zellen

Zur Fragestellung, ob LPS-bindende Peptide auch bei humanen Zellen die TNF- $\alpha$ -Sekretion nach Endotoxinstimulation reduzieren können, wurden die Peptide an der humanen Makrophagenzelllinie MonoMac 6 wie auch an Leukozyten aus peripherem Blut in der gleichen Weise untersucht wie im Stimulationsprotokoll unter Punkt 3.6.4 beschrieben. Nach Zugabe von Peptiden und Endotoxin und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt und die Zellvitalität im MTT-Assay überprüft. Zum Vergleich verschiedener Experimente wurde wiederum die prozentuale Inhibition betrachtet, die wie oben beschrieben ermittelt wurde.

### 4.1.2.1 MonoMac 6-Zellkulturmodell

Wie Abbildung 4.3 B zeigt, liegen die Inhibitionswerte von PMB (62,3 %), LL 10-H 14 (67,9 %) und ZLL 10-H 14 (69,7 %) auf gleichem Niveau. Auch die optimierten Hybrid-Peptide LL 10-H 14-LL 10 und DILL 10-H 14 erreichen mit 48,6 % beziehungsweise 41,7 % eine deutliche Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Abbildung 4.3 B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den murinen Zellkulturexperimenten stand die Beobachtung, dass die zyklischen LALF-Peptide bei MonoMac 6 die Endotoxinwirkung nicht antagonisieren konnten (Abbildung 4.3 A). Auch die übrigen untersuchten Peptide erzielten hier keine effektive Neutralisierung.

Im MTT-Assay ergaben sich keine Hinweise auf eine toxische Wirkung der Peptide auf die humanen Makrophagen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.3: Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im MonoMac-6-Zellkulturmodell**

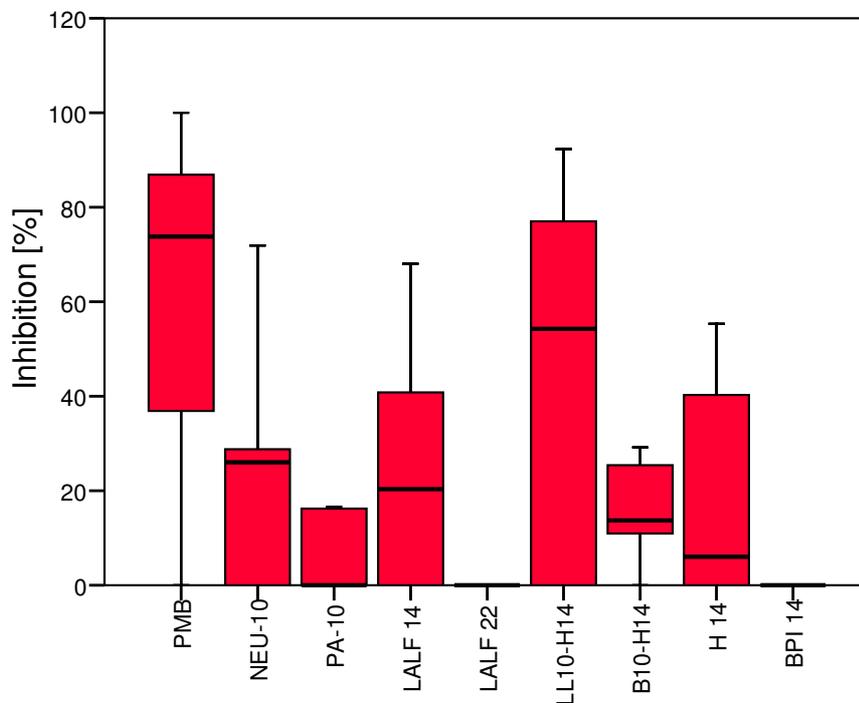
**A. zyklische LALF-Peptide und humanes LBP**

**B. multimerische Peptide**

Nach Versuchsdurchführung gemäß Stimulationsprotokoll wurde der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Überstand von MonoMac 6-Zellkulturen mittels ELISA gemessen und die prozentuale Inhibition bezogen auf die LPS-Kontrolle berechnet. Dargestellt sind die Inhibitionswerte ausgewählter Peptide aus allen durchgeführten Versuchen.

#### 4.1.2.2 Humane periphere mononukleäre Blutzellen

Für diese Experimente wurden mononukleäre Zellen (PBMC, „buffy coat“) aus humanem Spenderblut isoliert (siehe Punkt 3.6.3) und entsprechend dem Standard-Versuchsprotokoll mit LPS und Endotoxin-bindenden Peptiden behandelt. Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass wiederum das Dimer LL 10-H 14 neben PMB das höchste inhibitorische Potenzial aller hier getesteten Peptide aufweist und eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung um bis zu 92 % erreicht. Die statistische Auswertung der Daten mittels Wilcoxon-Test ergab allerdings keinen signifikanten Vorteil des Peptids gegenüber PMB. Das aus den MonoMac 6-Experimenten bekannte Ergebnis, dass einige der bei murinen Makrophagen wirksamen Peptide wie LALF 22 keine effektive Blockade bei humanen Zellen erzielen konnten, bestätigte sich auch in dieser Versuchsreihe.



**Abbildung 4.4: Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im PBMC-Modell**

Nach Versuchsdurchführung gemäß Stimulationsprotokoll wurde der TNF- $\alpha$ -Gehalt im Überstand von Kulturen peripherer Leukozyten mittels ELISA gemessen und die prozentuale Inhibition bezogen auf die LPS-Kontrolle berechnet. Dargestellt sind die Inhibitionswerte ausgewählter Peptide aus allen durchgeführten Versuchen.

Auf der Darstellung erkennt man die teilweise erhebliche Schwankungsbreite der Werte. Dieses Phänomen ist am ehesten durch die Inhomogenität der Zellpopulation erklärbar. Humane Leukozyten aus peripherem Blut lassen sich nicht *in vitro* kultivieren und müssen für jede Versuchsreihe frisch aus Spenderblut isoliert werden. Zellen von verschiedenen Spendern reagieren ihrer genetischen Ausstattung entsprechend individuell auf Stimuli wie LPS-Exposition. Denkbar ist auch, dass schon die Aufbereitung der Zellen ihren Aktivierungszustand in unterschiedlichem Maße verändert. Trotz der methodischen Schwierigkeiten bietet aber die Verwendung humaner Leukozyten für *in vitro*-Experimente den Vorteil möglichst realitätsnaher Bedingungen bei der Untersuchung der Frage, ob LPS-inhibierende Peptide auch im menschlichen Organismus einen protektiven Effekt haben könnten.

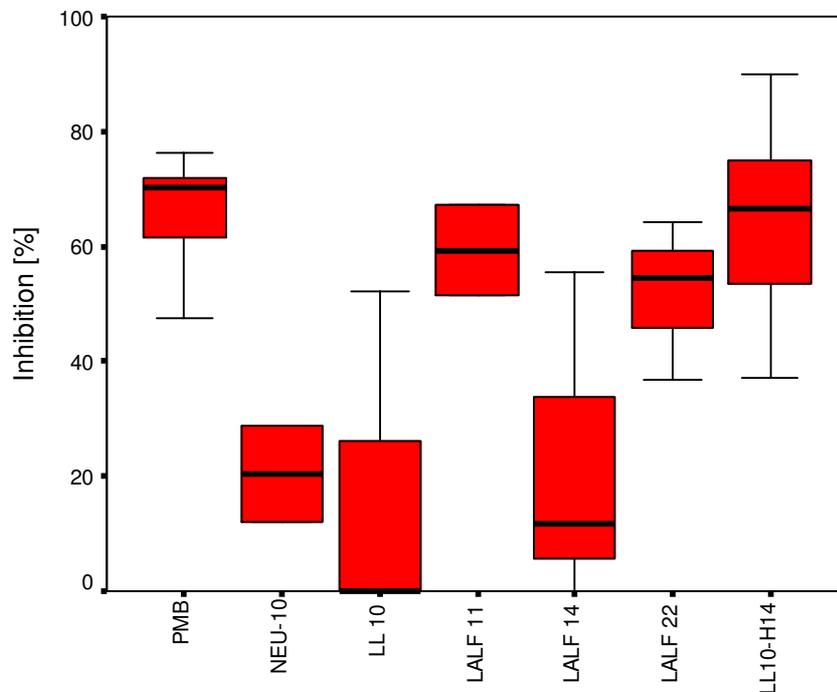
#### **LL 10-H 14 zeigt signifikante Inhibition bei humanen Zellen**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Gegensatz zu den murinen Makrophagen bei den untersuchten humanen Zelltypen die zyklischen LALF-Peptide einschließlich LALF 22 die Endotoxinwirkung nicht antagonisieren konnten. Die Gründe hierfür sind gegenwärtig unklar. Methodische Ursachen können weitgehend ausgeschlossen werden, da alle relevanten *in vitro*-Experimente nach einem standardisierten Stimulationsprotokoll durchgeführt wurden. Für alle Versuche wurde identisches LPS verwendet. Um eine Beeinflussung durch unterschiedliche LBP-Arten auszuschließen (humanes versus bovines LBP), wurden die Versuche mit humanen Zellen sowohl mit humanem Serum als auch mit FCS durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen. Die Aminosäuresequenzen des murinen und des humanen CD 14-Rezeptormoleküls weisen 66 % Homologie auf (Ferrero et al., 1990). Eine Erklärung könnte also darin liegen, dass die Bindung des Endotoxins an den humanen beziehungsweise murinen Rezeptor auf unterschiedliche Weise erfolgt und LALF 22 lediglich letzteren Bindungsmodus blockiert. Zu bedenken gilt es weiterhin, dass humane Makrophagen weitaus sensibler auf Endotoxinstimulation reagieren als die murinen Zellen, so dass geringe Mengen an LPS bereits ein Maximum an Aktivierung bedingen. Da wie erwähnt alle Zellkulturen nach demselben Protokoll behandelt wurden, könnte die standardmäßig verwendete Endotoxinkonzentration für die humanen Makrophagen zu hoch sein, so dass der protektive Effekt eines Peptids nicht mehr zum Tragen kommt.

#### **4.2 LPS-inhibierende Peptide supprimieren die TNF- $\alpha$ -Sekretion *in vivo***

Nachdem das inhibitorische Potenzial der Peptide in den Zellkulturmodellen nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, ob sie auch im lebenden Organismus ihre protektive Wirkung entfalten könnten. Hierzu wurde in einem Mausmodell untersucht, in welchem Ausmaß die systemische TNF- $\alpha$ -Freisetzung nach Endotoxin-Stimulation blockiert wird, wenn die Tiere vorher LPS-inhibierende Peptide erhalten hatten. Durch die vorangegangene *in vitro*-Testung war es möglich, sich dabei auf die effektivsten Substanzen zu konzentrieren. Mäuse der Stämme C57BL/6 und BALB/c erhielten zunächst das Peptid LL 10, LALF 11, LALF 14, LALF 22 oder LL 10-H 14 und 15 Min später LPS (siehe Punkt 3.7.1). Beide Injektionen wurden intraperitoneal verabreicht. Eine unmittelbare toxische Wirkung der Peptide konnte dabei nicht beobachtet werden. 60-90 Min nach der Endotoxin-Gabe ist die maximale systemische Immunantwort zu erwarten. Den Tieren wurde nach 75 Min Blut

entnommen und der TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum mittels ELISA bestimmt. Aus den Messwerten wurde in der vorher beschriebenen Weise die prozentuale Inhibition errechnet. Da die Untersuchungen beider Mausstämme zu identischen Ergebnissen führten, wurden die Daten zusammengefasst in Abbildung 4.5 dargestellt.

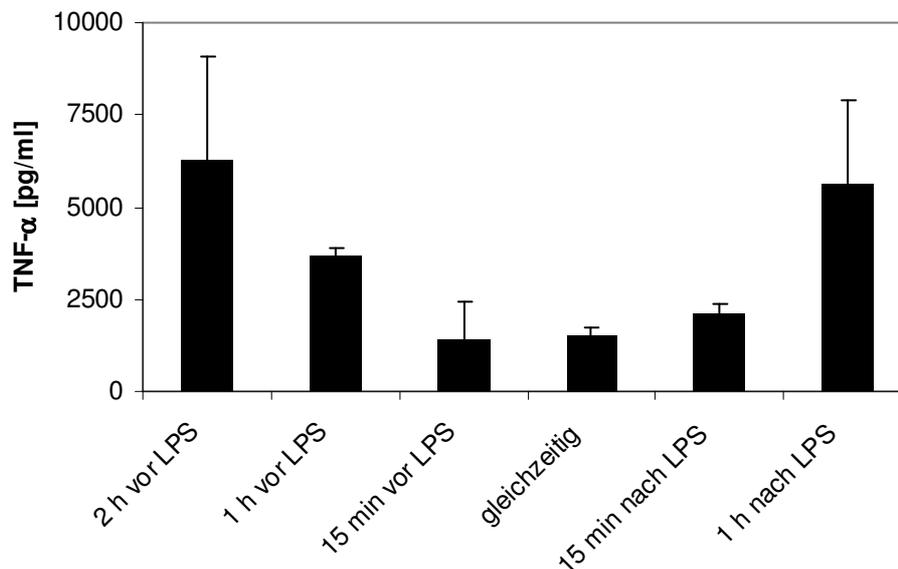


**Abbildung 4.5: Inhibitorisches Potenzial LPS-bindender Peptide im Maus-Inhibitionsmodell**

C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurde ein Peptid, PMB beziehungsweise Wasser (LPS- und Wasserkontrolle) und 15 Min später LPS i.p. injiziert. 75 Min nach der zweiten Injektion wurde den Tieren Blut entnommen. Die Messung des TNF- $\alpha$ -Gehalts im Serum erfolgte im ELISA. Im Boxplot dargestellt sind die prozentualen Inhibitionswerte aus allen durchgeführten Versuchen beider Mausstämme, die aus den Messwerten bezogen auf die jeweilige LPS-Kontrolle errechnet wurden.

Wie der Graph zeigt, konnte LL 10-H 14 die TNF- $\alpha$ -Induktion im Mittel zu 65,1 % inhibieren und verfügt damit über eine dem PMB (63,1 %) vergleichbare Potenz. In einzelnen Experimenten erreichte das dimere Peptid eine Inhibition von bis zu 89,8 %. LALF 11 und LALF 22 reduzierten die TNF- $\alpha$ -Freisetzung um durchschnittlich 59,3 % beziehungsweise 51,8 %.

Um zu evaluieren, wie lange LL 10-H 14 *in vivo* aktiv ist, wurden die Intervalle zwischen Peptid- und Endotoxinapplikation verändert. Die Tiere erhielten dazu LL 10-H 14 in Zeitabständen von 2 h vor bis 1 h nach der LPS-Gabe. Die maximale Reduktion der TNF- $\alpha$ -Spiegel konnte erzielt werden, wenn man das Peptid 15 Min vor, zeitgleich oder 15 Min nach der LPS-Gabe injizierte. Bei längeren Abständen nahm dagegen die Wirksamkeit deutlich ab (Abbildung 4.6). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass LL 10-H 14 *in vivo* vermutlich für eine Zeitspanne von 15-30 Min funktional aktiv ist.



**Abbildung 4.6: Evaluation der funktionalen Aktivität des Peptids LL 10-H 14 *in vivo***

C57BL/6-Mäuse erhielten 100  $\mu$ g LL 10-H 14 in variierenden Zeitabständen zur LPS-Gabe (1  $\mu$ g). 75 Min nach der zweiten Injektion wurde den Tieren Blut entnommen. Die Abbildung zeigt den jeweiligen Gehalt an TNF- $\alpha$  im Serum, die Messung erfolgte im ELISA in Doppelbestimmung. Die Linien geben die Standardabweichung wieder. Dargestellt ist eines von mehreren identischen Experimenten.

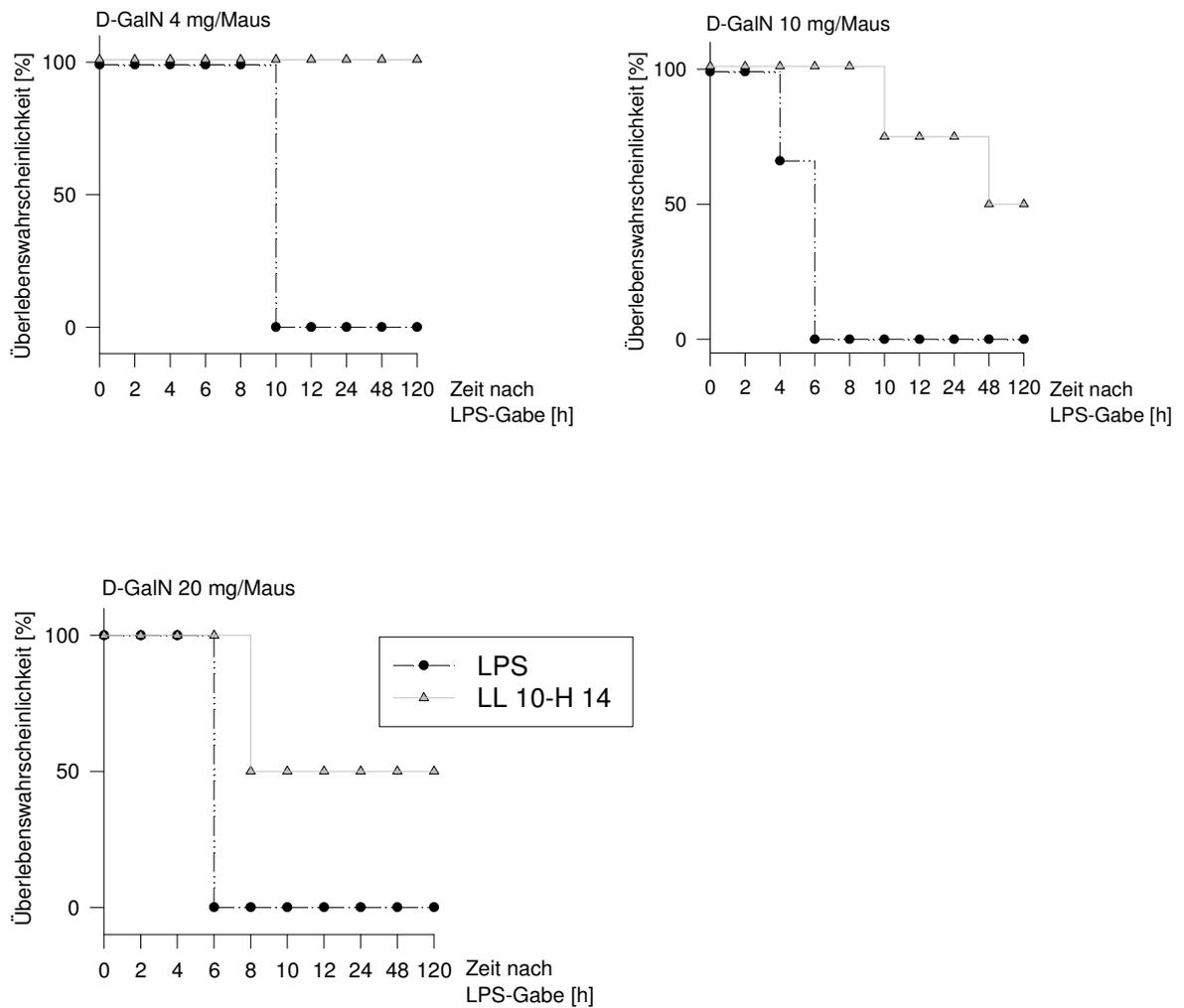
Ausgehend von den Ergebnissen der Bindungsstudien von A. Höß war anzunehmen, dass vorformierte LPS-Peptid-Komplexe die Endotoxinwirkung *a priori* besser antagonisieren könnten. Interessanterweise war die Suppression der TNF- $\alpha$ -Sekretion aber durchwegs deutlich geringer ausgeprägt, wenn ein Peptid mit LPS *in vitro* gemischt, für einen Zeitraum von 5 bis 30 Min inkubiert und dann erst gespritzt wurde (maximale Inhibition 39,2 %, Daten nicht gezeigt). Der Grund für diese Diskrepanz ist gegenwärtig unklar.

### 4.3 Das Peptid LL 10-H 14 erhöht die Überlebensrate im Endotoxin/D-GalN-Modell

Die Beantwortung der Frage, ob ein synthetisches Peptid in der Lage ist, LPS-induzierte Letalität zu vermindern und damit als potenzielles Medikament in der Sepsistherapie in Betracht zu kommen, stellt den Untersucher vor eine gewisse Herausforderung. Eine wichtige Voraussetzung hierzu ist ein geeigneter Versuchsaufbau, der die pathogenetischen Vorgänge bei der Sepsis möglichst naturgetreu simuliert, dabei einfach zu handhaben und effizient anzuwenden ist. Da diese Bedingungen im murinen Endotoxin/D-GalN-Schockmodell, das 1979 von Galanos und Freudenberg beschrieben wurde, erfüllt sind, wurde das potenteste Peptid LL 10-H 14 mit diesem Modell weitergehend untersucht.

D-Galaktosamin N erhöht bei Mäusen durch seine hepatotoxische Wirkung dosisabhängig die Sensibilität für die toxischen Effekte des TNF- $\alpha$  um ein Vielfaches (Decker und Keppler, 1974; Galanos et al., 1979). In der vorliegenden Versuchreihe wurde den Tieren D-GalN in variabler Dosierung (4–20 mg/Maus) 1 h vor der LPS-Gabe verabreicht (siehe Punkt 3.7.2). 15 Min vor der Endotoxinapplikation erhielten sie LL 10-H 14. Wie erwartet zeigte sich eine Abhängigkeit des protektiven Effekts des Peptids von der D-GalN-Dosis. Aus Abbildung 4.7 geht hervor, dass bei einer Behandlung mit 4 mg D-GalN 100 % der Tiere überlebten. Erhielten sie dagegen 10 mg beziehungsweise 20 mg D-GalN, lag die Überlebenswahrscheinlichkeit nur mehr bei 50 %. Über die gesamte Beobachtungszeit konnten bei den überlebenden Tieren klinisch keine Hinweise auf eine toxische Schädigung durch das Peptid gefunden werden.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Mäusen mit Endotoxin-induziertem letalem Schock konnte somit durch die Gabe von LL 10-H14 und der subtotalen Blockade der TNF- $\alpha$ -Freisetzung signifikant verbessert werden. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass gewisse minimale Mengen des Mediators für eine suffiziente Immunantwort erforderlich zu sein scheinen (siehe Punkt 1.2.4.3). Begründbar ist dies durch den Umstand, dass D-Galaktosamin N die Sensibilität gegenüber der TNF- $\alpha$ -Wirkung dosisabhängig erhöht (Galanos et al., 1979); Mäuse reagieren also nach Verabreichung größerer Mengen D-GalN deutlich empfindlicher auf dieselbe TNF- $\alpha$ -Konzentration als nach kleinen Dosen. Der protektive Effekt des Peptids, durch den sich die TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum wie dargestellt deutlich reduzieren ließen, reicht somit offenbar beim Einsatz höherer Mengen von D-Galaktosamin N nicht mehr aus, um die Induktion eines letalen Schockgeschehens in allen Fällen zu verhindern.



#### Abbildung 4.7: Überlebenswahrscheinlichkeit im D-GalN-Modell

Die Behandlung D-GalN-sensitiverter C57BL/6 Mäuse mit dem Peptid LL 10-H 14 15 Min vor der LPS-Gabe erhöhte die Überlebensrate auf 50-100%. Die protektive Wirkung stand in direktem Zusammenhang mit der verabreichten Dosis D-GalN und nahm bei höheren Konzentrationen ab, da hierbei die Sensitivität der Tiere gegenüber TNF- $\alpha$  gesteigert ist. Gezeigt ist jeweils eines von mehreren identischen Experimenten. Pro Gruppe wurden 3 bis 5 Tiere behandelt. LPS: Kontrollen ohne Peptidgabe

#### 4.4 Im CASP-Modell bringt LL 10-H 14 eine leichte Verbesserung der Überlebensrate

Beim CASP (*Colon ascendens Stent Peritonitis*)-Modell wird bei Mäusen künstlich eine Sepsis infolge eines peritonealen Eingriffs erzeugt. Es bietet den Vorteil einer sehr realistischen Simulation der Pathogenese eines septischen Schocks. Ein Nachteil liegt jedoch in der aufwändigen Vorbereitung und Präparation der Versuchstiere, da jedes Tier einer Operation unterzogen werden muss.

Eine Gruppe mit 10 Mäusen erhielt 3, 6 und 9 h nach dem Eingriff intraperitoneale Injektionen mit jeweils 100 mg LL 10-H 14. Der Kontrollgruppe wurde zu diesen Zeitpunkten Aqua ad injectabilia gespritzt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über insgesamt 7 Tage. Danach lag die Überlebensrate bei den Mäusen, die LL 10-H 14 erhalten hatten, bei 30 %, in der unbehandelten Kontrollgruppe bei 20 % (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung mit einem LPS-inhibierenden Peptid, das *in vitro* eine deutliche Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung erreichte, konnte demnach das Überleben in diesem Sepsismodell nicht signifikant verbessern. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass in der Pathogenese des septischen Schocks eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle spielen, so dass durch die Inaktivierung eines Schlüsselmoleküls wie LPS die Kaskade der Immunreaktionen nicht völlig unterbrochen werden kann.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Die Problematik der adäquaten Sepsistherapie

Sepsis und septischer Schock stellen insbesondere in der Intensivmedizin eine große Problematik dar. Trotz bestmöglicher Versorgung und optimaler Antibiotikatherapie liegt die Letalität des septischen Schocks seit Jahren auf einem nahezu unverändert hohem Niveau (Glauser et al., 1991; Hardaway, 2000; Angus et al., 2001). Infolge der Veränderungen im Patientenkollektiv -beispielsweise durch höheres Lebensalter oder Immunsuppression sowie der Behandlungsoptionen mit aggressiverem operativen Vorgehen- erscheint eine Zunahme der Fallzahlen in der Zukunft wahrscheinlich.

Das Wissen um die pathophysiologischen Vorgänge im Organismus, die zur Entstehung einer schweren Sepsis führen, konnte in den vergangenen Jahren erheblich erweitert werden. Trotz der neu gewonnenen Erkenntnisse ist es dennoch bis heute nicht gelungen, die komplexen Zusammenhänge in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Verschiedenste therapeutische Ansätze zielen auf die Unterbrechung der fatalen Kaskade ab, die infolge der Präsenz pathogener Keime im Organismus und die dadurch induzierte Immunantwort angestoßen wird. Ein großes Problem ergibt sich daraus, dass entscheidende Schritte der Immunreaktion bereits abgelaufen oder im Gange sind zu einem Zeitpunkt, da das septische Geschehen klinisch evident wird. Die suffiziente Antibiotikatherapie und intensivmedizinische Maßnahmen stehen dann im Vordergrund. Wünschenswert wären aber auch Substanzen, die in einem wesentlich früheren Stadium in das Geschehen eingreifen, die Immunreaktion modulieren und so die fatalen Folgen *a priori* verhindern können. Ein geeignetes Medikament müsste eine sehr gute Verträglichkeit aufweisen und kostengünstig sein, da es allen gefährdeten Patienten prophylaktisch verabreicht werden würde. Die Suche nach wirksamen Substanzen wird weltweit intensiv betrieben und ist seit Jahren Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen (Cohen, 2002; Rice und Bernard, 2005). Einige Ansätze wie die Neutralisation proinflammatorischer Zytokine oder die Blockade von LPS-Rezeptoren und Signaltransduktion wurden bereits unter Punkt 1.3.2 erläutert. Im Folgenden soll die Anwendung LPS-bindender Peptide genauer betrachtet werden.

### 5.2 LPS-inhibierende Peptide

#### 5.2.1 Die Identifizierung Endotoxin-bindender Abschnitte

Eine häufig verwendete Methode zur Identifikation von funktionellen Domänen ist die Abbildung eines Proteins durch kurze synthetische Peptide mit überlappenden Sequenzen. Bei der Untersuchung des LBP (Taylor et al., 1995; Lamping et al., 1996), BPI (Little et al., 1994) und TALF (Kloczewiak et al., 1994) konnten auf diesem Wege lineare Peptide mit LPS-Bindeaktivität gefunden werden. Interessanterweise hat die Bindung von Endotoxin an die nativen Proteine LBP, LALF und BPI unterschiedliche, teils konträre Effekte zur Folge, obwohl sie sehr ähnliche Bindungsmotive besitzen (Hoess et al., 1993): So verstärkt LBP die Endotoxinwirkung, indem es dessen Transport und Bindung

an CD14 katalysiert (Schumann et al., 1994), während BPI und LALF die toxischen Effekte inhibieren (sogenannte „LPS-Detoxifizierung“; Wainwright et al., 1990; Elsbach und Weiss, 1993). Lange war nicht bekannt, inwieweit molekulare Details in der LPS-Erkennung hinsichtlich der unterschiedlichen Aktivitäten von Bedeutung sind. Der Einfluss auf die funktionelle Aktivität der einzelnen Proteine konnte mittels synthetischer Peptide und insbesondere durch die Mutationsanalyse der LPS-Bindedomäne detaillierter bestimmt werden (Lamping et al., 1996).

In mehreren Studien wurden bisher die Eigenschaften einer Vielzahl synthetischer Peptide untersucht und belegt. Bereits in den Achzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts beschäftigten sich Arbeitsgruppen um Nakamura und Miyata mit antimikrobiellen Peptiden aus Hämocyten der Pfeilschwanzkrebse *Tachypleus tridentatus* und *Limulus polyphemus* (Nakamura et al., 1988; Miyata et al., 1989). Neben der hemmenden Wirkung auf das Wachstum grampositiver und -negativer Bakterien wie auch von Pilzen verfügten die synthetisch hergestellten Peptide (siehe Tabelle 5.1) über die Eigenschaft, mit Endotoxin Komplexe zu formen. Die Autoren postulierten bereits einen Zusammenhang zwischen dem amphipathischen, zyklischen Aufbau und der biologischen Aktivität (Miyata et al., 1989).

Eine Gruppe um Rustici und Porro beschäftigte sich mit LPS-bindenden Peptiden, die sich vom Polymyxin B ableiten und auch als „Synthetische Anti-Endotoxin-Peptide“ (SAEP; siehe Tabelle 5.1) bezeichnet wurden (Rustici et al., 1993; Porro et al., 1998, Iwagaki et al., 2000). Aus ihren Beobachtungen ergab sich, dass die Bindungsdomäne des PMB mit hoher Wahrscheinlichkeit im Bereich der Aminosäuren 29 bis 59 liegt, wobei das minimale Bindungsmotiv die Residuen 41-53 umfasst (Rustici et al., 1993; Porro et al., 1998). Durch Invertierung der Bindungssequenz wurde interessanterweise die Affinität der SAEP nicht wesentlich beeinflusst. In unseren Untersuchungen zeigten dagegen Peptide mit inverser Aminosäuresequenz keine Bindungseigenschaften (Daten nicht gezeigt; vergleiche hierzu auch Ried et al., 1996). Die beiden PMB-Peptide Pol P1 (entsprechend SAEP-6) und Pol P2 (entsprechend SAEP-2 mit der ausgeprägtesten Potenz bei Rustici) wurden auch in unseren initialen Screeningexperimenten mit murinen Makrophagen untersucht, jedoch zeigten sie in diesem Modell lediglich eine Inhibierung auf dem Niveau der Kontrollpeptide (siehe Abbildung 4.2 D) und wurden deshalb in den weitergehenden Versuchsreihen nicht eingesetzt. Auch andere Publikationen belegten bereits eine große Variabilität bei der Wirksamkeit dieser Endotoxin-bindenden Peptide (Iwagaki et al., 2000).

Im Zuge der Suche nach der Endotoxin-bindenden Domäne des LALF analysierten Ried et al. einige der LALF-Peptide, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und LPS-Neutralisierungspotenz (Ried et al., 1996). Bei den untersuchten Moleküle handelt es sich um die linearen Peptide LL 10, 2-LL 10, 3-LL 10, R-LL 10 (bei Ried bezeichnet als LL:36-45, LL:32-41, LL:42-51 beziehungsweise LL:45-36) sowie um die zyklischen Peptide LALF 10, LALF 11, LALF 14, LALF 22 und RETL 10. Identisch sind auch die verwendeten Kontrollpeptide NEU-10 und PA-10 (alle Aminosäuresequenzen siehe Tabellen 3.1 und 3.7). Interessanterweise zeigte derjenige Abschnitt des LALF (LL:42-51, in unserer Arbeit als 3-LL 10 bezeichnet), welcher dem postulierten Bindungsmotiv des PMB entspricht (Position 41-53, siehe oben) keinerlei Bindungsaktivität. Die

minimale Bindungsdomäne des LALF scheint sich eher im oberen Loop-Bereich (Aminosäuren 36/38-45/47) zu befinden (Hoess et al., 1996; Ried et al., 1996). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass LALF 14 und H 14 zwar suffizient an Lipid A binden und die LBP/Lipid A-Interaktion blockieren, aber dennoch die Endotoxin-induzierte Zytokinproduktion nicht verhindern können (Hoess et al., 1996; Ried et al., 1996). Es scheinen also neben der effektiven Bindung an Lipid A noch weitere (strukturelle?) Faktoren bei der Inhibition der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen. Auf die Bedeutung der räumlichen Konformation wird unten eingegangen.

Ein dem LALF sehr nah verwandtes Protein ist der *Tachypleus*-Anti-LPS-Faktor (TALF). Es stammt aus Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses *Tachypleus tridentatus* und besteht aus 102 Aminosäuren, die 83 % Sequenzhomologie zum LALF aufweisen. Wie dieses besitzt es eine hohe Bindungsaffinität zum Lipid A und kann die toxischen Effekte des Endotoxins inhibieren. Der Aminosäureabschnitt 41-51 wurde als LPS-Bindedomäne postuliert (Muta et al., 1987; Desch et al., 1989) und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie der des PMB beziehungsweise des 3-LL 10. Kloczewiak et al. konnten zeigen, dass das Peptid TALF 29-59 (siehe Tabelle 5.1) die Zytokinfreisetzung in humanen Monozyten reduziert und im Mausmodell das Überleben signifikant verbessert, ohne jedoch die Wirkung des PMB zu erreichen. Der Austausch einzelner Aminosäuren im genannten Abschnitt beeinflusste die Aktivität nicht (Kloczewiak et al., 1994). Dieser Befund wurde auch in unseren Untersuchungen bestätigt (Austausch Arginin gegen Lysin in KL 14, siehe Tabelle 3.1; Daten nicht gezeigt). Ein zu LL 10 homologes TALF-Peptid (Position 36-45) wurde in der zitierten Studie nicht untersucht, weshalb ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Aus der Beobachtung, dass das Peptid TALF 29-59 die beschriebenen Wirkungen erzielte, obwohl es eine deutlich geringere LPS-Neutralisierungsfähigkeit besitzt als natives LALF, schließen die Autoren, dass der durch die Bindung von Endotoxin verbesserten Eliminierung eine größere Bedeutung zukommt als der Detoxifizierung. Sicherlich tragen beide Aspekte ihren Anteil zur Wirksamkeit der LPS-bindenden Moleküle bei. Vergleicht man die Affinität der durch Peptide repräsentierten Domänen mit der von Holoproteinen, beobachtet man häufig eine erniedrigte Bindungsaktivität (Little et al., 1994, Taylor et al., 1995).

Porro et al. versuchten anhand physikalisch-chemischer Eigenschaften die Bindungsregionen weiterer nativer Endotoxin-bindender Proteine mit einem Algorithmus zu berechnen (Porro et al., 1998). Nach ihrer Annahme sollte sich die Bindungsdomäne des CAP-18 (*cationic antibacterial proteins*) im Bereich der Aminosäuren 107-125 befinden. Tatsächlich wurde von Larrick und Hirata dessen minimales Bindungsmotiv zwischen den Positionen 106-137 identifiziert (Peptid #36-1, siehe Tabelle 5.1). Die Gruppe hatte dazu Proteine mit LPS-neutralisierender Aktivität aus Kaninchen-Granulozyten isoliert, die aufgrund ihrer chemisch-biologischen Eigenschaften unter der Bezeichnung Kationische Antibakterielle Proteine (CAP) zusammengefasst wurden (Hirata, 1994; Larrick et al., 1994a; Larrick et al., 1994b). Anhand synthetisch hergestellter Proteine konnten die Aktivitäten eingehend untersucht werden: Sie banden Endotoxin unterschiedlicher Bakterienspezies und verfügten über antibakterielle Wirksamkeit sowohl gegen gramnegative wie auch grampositive Keime. Einzelne Peptide verringerten signifikant die LPS-induzierte Produktion von TF, Stickstoffradikalen, IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  in murinen und humanen Makrophagen auch bei Gabe bis zu 3 Stunden nach LPS-Stimulus.

Im D-GalN-Modell überlebten Peptid-behandelte Mäuse signifikant länger, wenn das Peptid für 1 bis 2 Stunden mit LPS vorinkubiert worden war. Ein auffälliger Befund war, dass für die *in vitro*-Experimente ein weitaus größerer molarer Überschuss des Peptids erforderlich war als *in vivo*. Auch hier vermuten die Autoren, dass die durch Peptidbindung verbesserte Eliminierung des LPS möglicherweise einen höheren Stellenwert einnimmt als die direkte Neutralisierung (vergleiche hierzu Kloczewiak et al., 1994).

Die Bindungsdomäne des LBP wurde zunächst im Amino-terminalen Abschnitt des Proteins vermutet (Theofan et al., 1994). Unter Zuhilfenahme von synthetischen Peptiden konnte sie schließlich genauer identifiziert werden. Wie sich herausstellte umfasst die LPS-bindende Sequenz die Aminosäuren 85/90-101/108 (Taylor et al., 1995; Lamping et al., 1996). Einzelne aus diesem Abschnitt stammende Moleküle waren in der Lage, spezifisch an Lipid A zu binden und die Endotoxin-vermittelte Freisetzung von TNF- $\alpha$  sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem vergleichbaren Maß wie PMB zu blockieren (siehe Tabelle 5.1). In unseren Versuchen zeigte ein die Bindungsdomäne enthaltendes zyklisches Peptid (H 14, siehe Tabelle 3.2) allerdings keine nennenswerte Wirkung. Der Grund hierfür ist nicht geklärt.

Ooi, Little, Weiss und weitere Autoren untersuchten eingehend das Endotoxin-neutralisierende Potenzial von BPI (Ooi et al., 1991; Weiss et al., 1992; Little et al., 1994; Gray und Haseman, 1994; Jiang et al., 2004). Hierbei wurden mehrere Bindungsdomänen identifiziert, deren aktivste Region sich im Bereich der Residuen 73-99 befindet (Little et al., 1994). Synthetische Peptide mit einer Sequenzlänge von 15 Aminosäuren (siehe Tabelle 5.1) zeigten eine dosisabhängige, signifikante Inhibierung LPS-induzierter Effekte (Little et al., 1994). Einzelne Peptide verfügten über eine bakterizide Wirksamkeit wie das native Protein, die teilweise auch in humanem Vollblut nachzuweisen war (Ooi et al., 1987; Weiss et al., 1992). Gray und Haseman demonstrierten, dass ein Peptid mit der Sequenz aa90-99 *P. aeruginosa* effektiv abtöten konnte, wobei die Wirkung durch Einführung eines zusätzlichen Cysteins noch verstärkt wurde. Es verfügte dagegen über keinerlei LPS-neutralisierende Potenz. Durch Hybridisierung eines Peptids mit LPS-inhibierenden Eigenschaften und einem bakteriziden Molekül konnte ein Dimer erzeugt werden, das über beide Effekte verfügt (Gray und Haseman, 1994). Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen und erweitert: Es wurden Hybrid-Peptide synthetisiert, die zum einen zyklische wie auch lineare Anteile enthalten und zum anderen Endotoxin-bindende Domänen unterschiedlicher Proteine vereinigen.

Eine Gruppe um Höß führte Studien durch, in denen die Bindungseigenschaften des LALF 22 mit denen eines zyklischen BPI-Peptids, das die Sequenz aa90-101 umfasste und damit innerhalb der definierten Bindungsdomäne lag (BPI 14, siehe Tabelle 3.3; vergleiche hierzu Little et al., 1994), verglichen wurden (Hoess et al., 1995). Es zeigte sich, dass LALF 22 sowohl Lipid A als auch LPS besser als BPI 90-101 bindet, wobei die Affinität vergleichbar ist mit der des PMB. Anhand von Konkurrenzexperimenten ließ sich belegen, dass LALF 22, PMB und auch BPI 90-101 dasselbe Bindungssepitop am Lipid A-Molekül besitzen. In unseren Versuchen wurde ebenfalls BPI 14 verwendet. Es erreichte jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$ -Spiegel. Als möglicher Grund kommt hierfür neben Beschaffenheit beziehungsweise Qualität des

Moleküls (z.B. Serumstabilität) in erster Linie auch das hier durchgeführte experimentelle Setting mit LPS-Stimulation *nach* Peptidgabe in Frage, das sich in diesem Punkt wesentlich von den Modellen anderer Autoren unterscheidet.

Einen der ersten „cross-species“-Ansätze lieferten Battafarano und Mitarbeiter. Sie testeten Peptide, welche auf den Bindungsmotiven des LBP, BPI und LALF basieren (Battafarano et al., 1995). Die Länge der Peptide beträgt zwischen 27 und 30 Aminosäuren (siehe Tabelle 5.1). Drei synthetische Peptide senkten im Gegensatz zum Kontrollpeptid die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Makrophagen nach LPS-Stimulation signifikant, und auch im D-Gal-Tiermodell wurde die Endotoxin-vermittelte Letalität durch ein Peptid (BG38) reduziert.

### 5.2.2 Die Bedeutung der räumlichen Konformation

Rustici und Porro konnten zeigen, dass die LPS-Bindungsaffinität der Peptide umso höher ausgeprägt ist, je mehr Größe und Konformation dem nativen PMB-Molekül entsprechen (Rustici et al., 1993; Porro et al., 1998). Ihre Peptide banden an LPS verschiedener Spezies. Stochiometrisch entsprachen die Peptid-Lipid A-Komplexe denen, die mit nativem PMB gebildet werden. In den Untersuchungen zeigte sich, dass ein 10 Aminosäuren umfassendes zyklisches Peptid LPS mit höherer Affinität bindet als das vergleichbare lineare Molekül (Rustici et al., 1993). Zum übereinstimmenden Ergebnis kamen Ried et al. bei ihren Studien mit LALF-Peptiden: Lediglich ein lineares Peptid (LL:36-45 = LL 10) war in der Lage, LPS zu binden. Die zyklischen 10mer Peptide waren in ihrer LPS-Bindeaktivität deutlich überlegen und erreichten eine Inhibition bis zu 85 % (Ried et al., 1996; Lamping et al., 1996). LALF 14 verfügt über eine dem PMB vergleichbare Bindungsaffinität und außerdem über eine höhere Serumstabilität als die linearen Peptide (siehe auch Tabelle 1.1). Überraschenderweise ließen sich nicht alle dieser Befunde in unseren Untersuchungen eindeutig reproduzieren.

Bei länger-kettigen LALF-Peptiden stellt sich eine andere Situation dar, was sich am Beispiel LALF 22 demonstrieren lässt: Sowohl oxidiertes (= zyklisches) als auch reduziertes (= lineares) LALF 22 konnte LPS mit annähernd gleicher Affinität binden (Hoess, 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für ein 24aa-TALF-Peptid beschrieben, das Kloczewiak et al. neben anderen LPS-bindenden Molekülen (siehe Tabelle 5.1) aus dem *Tachypleus*-Anti-LPS-Faktor isoliert hatten (Kloczewiak et al., 1994). Im Vergleich ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der Affinität linearer und zyklischer Moleküle (Kloczewiak et al., 1994). Die Autoren folgern aus diesen Beobachtungen, dass die räumliche Konformation eines Peptids -in diesem Fall also die Zyklisierung- die LPS-Bindungsfähigkeit nicht zwingend beeinflusst. Eine plausible Erklärung ergibt sich allerdings aus der Betrachtung der Schleifenstruktur, die durch das Peptid LALF 22 repräsentiert wird. In dieser sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen 2 und 3 des  $\beta$ -Faltblatts vorhanden (siehe Abbildung 1.8). Mit hoher Wahrscheinlichkeit entstehen derartige Wechselwirkungen auch im synthetischen Peptid, so dass sich eine zyklische Formation auch im Falle des linearen LALF-22 „spontan“ ausbilden könnte. Dadurch wird verständlich, weshalb für länger-kettige LALF- oder TALF-Peptide eine Zyklisierung mittels Cysteinen für eine hohe Bindungsaffinität nicht notwendigerweise erforderlich ist. Bei den kürzer-kettigen Peptiden ist dagegen die Bildung von

Wasserstoffbrückenbindungen und damit die Formierung einer Schleifenstruktur sehr unwahrscheinlich, so dass hier erst mittels Einführung von Cysteinen und nachfolgender Oxidation eine zyklische Konformation „künstlich“ herbeigeführt wird.

Tabelle 5.1: Übersicht über LPS-bindende Peptide anderer Autoren

Autoren / Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz	Eigenschaften / Beschreibung
<i>Nakamura, 1988 und Miyata, 1989</i>		
Tachyplesin I	KWCFRV CYRGICYRRCR	17aa, 2 C-C-Brücken (4→17 und 8→13)
Tachyplesin II	RWCFRV CYRGICYRKCR	17aa, 2 C-C-Brücken (4→17 und 8→13)
Polyphemusin I	RRWCFRV CYRGFCYRKCR	18aa, 2 C-C-Brücken (4→17 und 8→13)
Polyphemusin II	RRWCFRV CYKGFYRKCR	18aa, 2 C-C-Brücken (4→17 und 8→13)
<i>Rustici et al., 1993 und Porro et al., 1998 (Auswahl)</i>		
Peptid 1 / SAEP-1	CKFLKCC	zyklisches PMB-Peptid
Peptid 2 / SAEP-2	KTKCKFLKCC	zyklisches PMB-Peptid
Peptid 3 / SAEP-3	IKTKCKFLKCC	zyklisches PMB-Peptid
Peptid 4 / SAEP-4	KFLKKT	lineares PMB-Peptid
Peptid 5 / SAEP-5	CKKLFKCKTK	zyklisches PMB-Peptid; Peptid 2 mit invertierter Sequenz
Peptid 6 / SAEP-6	IKTKKFLKKT	lineares PMB-Peptid

Tabelle 5.1: Übersicht über LPS-bindende Peptide anderer Autoren (Fortsetzung)

Autoren / Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz	Eigenschaften / Beschreibung
<i>Kloczewiak et al., 1994 (Auswahl)</i>		
TALF 1-30	EGGIWTQLALALVKNLATLWQSGDFQLGH	
TALF 29-59	GHECHYRINPTVKRLKWKYKGGKFWCPSWTSI	komplette Bindungsdomäne, zyklisches Peptid maximales Bindungspotenzial
TALF 57-84	TSITGRATKSSRSGAVEHSVRDFVSQAK	
TALF 78-102	DFVSQAKSSGLITEKEAQTFSYQ	
TALF 41-53	KRLKWYKGGKFWC	minimales Bindungsmotiv
TALF 53-41	CWFKGKYKWKLRK	Kontrollpeptid ohne LPS-bindendes Potenzial
TALF 41-53 model	KRAKAKAKAKAAC	Kontrollpeptid ohne LPS-bindendes Potenzial
<i>Hirata / Larrick et al., 1994 (Auswahl)</i>		
#197-1	GLRKRLRKFRNKIKEKLLKIGQKIQLLPLAPRTDY	C-term. CAP-18-Fragment, aa106-142, 7 kD
#36-1	GLRKRLRKFRNKIKEKLLKIGQKIQLLPLA	vgl. #197-1, aa106-137, minimales Bindungsmotiv
#32-1	GLRKRLRK	kein LPS-bindendes Potenzial
#50-2	IKEKLLKIGQKIQLLPLAPRTDY	kein LPS-bindendes Potenzial

Tabelle 5.1: Übersicht über LPS-bindende Peptide anderer Autoren (Fortsetzung)

Autoren / Peptidbezeichnung	Aminosäuresequenz	Eigenschaften / Beschreibung
<i>Taylor et al., 1995 (Auswahl)</i>		
Peptid 31	WKVRKSFFKLQGSFD-NH <sub>2</sub>	LBP-Peptid aa 91-105, Bindungsmotiv
Peptid 32	RKSFFKLQGSFDVSV-NH <sub>2</sub>	LBP-Peptid aa 94-108, Bindungsmotiv
<i>Little et al., 1994 (Auswahl)</i>		
73-87	NVGLKFSISNANIKI	BPI-Peptid aa 73-87
77-91	KFSISNANIKISGKW	BPI-Peptid aa 77-91
81-95	SNANIKISGKWKAQK	BPI-Peptid aa 81-95
85-99	IKISGKWKAQKRFLK	BPI-Peptid aa 85-99
<i>Gray und Haseman, 1994 (Auswahl)</i>		
#90-99	KWKAQKRFLK	BPI-Peptid mit bakteriziden Eigenschaften
C#90-99	CKWKAQKRFLK	durch Einfügen eines C verbessertes Peptid
C#227-236	CEFYSENHHNP	LPS-neutralisierendes BPI-Peptid
CHybrid	CEFYSENHHNPKWKAQKRFLK	Hybrid: LPS-bindend und bakterizid

Tabelle 5.1: Übersicht über LPS-bindende Peptide anderer Autoren (Fortsetzung)

<i>Battafarano et al., 1995</i>		
BG16	MNSQVCEKVTNSVSSKLPYFQTLPVMTKI	BPI-Peptid aa 170-199 = Kontrolle
BG38	NANCKISGKWKAKRFLKMSGNFDCSI	BPI-Peptid aa 82-108
BG42	DHECHYRIKPTFRRLLKWKYKGFWCPS	LALF-Peptid aa 28-54
BG43	DSSIRVQGRWKVRKSFFKLGGSFDVSV	LBP-Peptid aa 82-108

### 5.2.3 Funktionelle Aktivität, Kinetik und Toxizität der Peptide

Es ist davon auszugehen, dass die Peptide aufgrund ihres geringen Molekulargewichts relativ schnell renal eliminiert werden. Gleichzeitig werden sie durch Serumproteasen abgebaut, so dass sie insgesamt nur über eine zeitlich limitierte funktionelle Aktivität verfügen. Das ausgeprägteste inhibitorische Potenzial der untersuchten Peptide zeigte sich demzufolge dann, wenn Endotoxin und Peptid jeweils singularär zu definierten Zeitpunkten appliziert wurden.

Durch Variation der Zeitabstände zwischen Peptid- und Endotoxinapplikation konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die beste Inhibition bei Peptidgabe 15 Minuten vor oder 15 Minuten nach Endotoxinstimulation erreicht wird (siehe Abbildung 4.6). Da bei längeren Intervallen die Wirksamkeit deutlich abnimmt, ist davon auszugehen, dass beispielsweise LL 10-H 14 *in vivo* für einen Zeitraum von 15-30 Minuten funktional aktiv ist. Interessanterweise lag die experimentell bestimmte Halbwertszeit für LL 10-H 14 im Serum bei 37°C bei 90-120 Minuten. Dies legt den Schluss nahe, dass die funktionelle Aktivität eines Peptids im Organismus deutlich kürzer anzusetzen ist als es die *in vitro* determinierte Serumstabilität vermuten ließe. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang sicherlich auch der Befund, dass die aus D-Aminosäure bestehenden Peptide zwar eine deutlich erhöhte Serumstabilität aufweisen (siehe Tabelle 1.1); wie sich aus den hier gewonnenen Daten ableiten lässt, trägt diese aber offenbar nicht zu einer verbesserten Wirksamkeit bei.

Die Situation, wie sie bei einer bakteriellen Infektion beziehungsweise einer Sepsis vorliegt, unterscheidet sich allerdings von den experimentellen Anordnungen in erster Linie dadurch, dass dabei Endotoxin über einen längeren Zeitraum kontinuierlich freigesetzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde dies am CASP-Modell simuliert. Hierbei erzeugt man bei Mäusen im Rahmen eines abdominalen Eingriffs eine Leckage am Colon ascendens, was zur Entwicklung einer peritonealen Sepsis führt. Den Tieren wurde postoperativ wiederholt LL 10-H 14 verabreicht. Dadurch konnte das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar verbessert werden, der Unterschied war aber nach statistischer Auswertung nicht signifikant. Ein Nachteil des hier gewählten Versuchsaufbaus liegt sicherlich darin, dass das Peptid postoperativ lediglich dreimal im Abstand mehrerer Stunden appliziert wurde. Möglicherweise könnten beispielsweise durch die kontinuierliche Applikation mittels einer Infusionspumpe deutlich bessere Ergebnisse erreicht werden. Zudem könnten auch an den Molekülen selbst Verbesserungen vorgenommen werden, wie unter dem nächsten Punkt vorgeschlagen.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigten einige Peptide ein inhibitorisches Potenzial, welches dem des PMB vergleichbar war. Anders als beim PMB, das bekanntermaßen schwere Nebenwirkungen hervorrufen kann, ergaben sich weder bei den Experimenten mit Zellkulturen Hinweise auf eine Schädigung durch Peptide noch konnte bei Versuchstieren eine unmittelbare toxische Wirkung beobachtet werden. Selbstverständlich sind die bisher vorliegenden Daten bei weitem nicht ausreichend für eine generelle Aussage zur Verträglichkeit der Peptide, weitergehende Untersuchungen sind unerlässlich.

## 5.2.4 Optimierungsoptionen

Die zyklische Struktur eines Peptids bietet neben den genannten Eigenschaften den Vorteil der längeren Halbwertszeit in Serum. Die Stabilität kann weiterhin durch Einführung von D-Aminosäuren, die eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Proteasen aufweisen, verbessert werden (siehe Tabelle 1.1). Ein denkbarer Ansatz wäre auch die Bindung eines Peptids an ein Carrier-Molekül, das die Affinität und/oder die Stabilität erhöht. Durch Di- beziehungsweise Trimerisierung der LPS-Bindedomänen konnten bereits Peptide mit höherer LPS-Bindeaktivität synthetisiert werden. Weitere Optimierungsmöglichkeiten bieten sich selbstverständlich auch durch Kombination der genannten Optionen.

In unseren Studien brachte die Einführung von D-Aminosäuren keinen entscheidenden Vorteil. Dagegen zeigten Peptide, in denen zwei oder drei Bindungsdomänen aus LALF, LBP beziehungsweise BPI miteinander verbunden wurden, deutlich verbesserte Bindungseigenschaften. Grundlage für diese Überlegung war die Annahme, dass mehrere LPS-Bindungspunkte die Affinität zum LPS-Molekül erhöhen und die Bindung stabilisieren können. Auch für native LPS-bindende Proteine wie LBP wird postuliert, dass ein Protein-Molekül in der Lage ist, mehrere Moleküle Endotoxin zu binden (Tobias et al., 1995). Zusätzlich könnte sich die infolge der Multimerisation erreichte Größe des Peptids positiv auf das Bindungsverhalten auswirken und außerdem die Elimination aus dem Organismus verzögern. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch von Gray und Haseman verfolgt, die bakterizide mit Endotoxin-bindenden BPI-Peptiden fusionierten und ein Dimer erhielten, das beide Eigenschaften besaß, die sich sogar synergistisch zu verstärken schienen (Gray und Haseman, 1994). Dieses lineare Dimer ließ sich in seiner Effektivität durch Einfügen eines Cysteins noch steigern (siehe Tabelle 5.1). Interessant wäre hier die Fragestellung, ob sich in letzterer Konstellation spontan -also ohne gezielte Zyklisierung- eine Schleifenstruktur ausbildet und dies zur besseren Bindungsaffinität beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte das dimere Hybrid-Peptid LL 10-H 14, das aus linearem LALF (LL 10) und humanem LBP (H 14) besteht, das ausgeprägteste inhibitorische Potenzial sowohl *in vitro* (murine und humane Zellen) als auch *in vivo*. Es reduzierte die TNF- $\alpha$ -Freisetzung um bis zu 95 % und verfügte damit über eine dem PMB gleichwertige Wirksamkeit. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung und enge Nachbarschaft der beiden Bindungsdomänen unabdingbar für eine suffiziente Endotoxinbindung ist: Die einzelnen Bestandteile LL 10 und H 14 konnten weder separat noch simultan verabreicht die Endotoxinwirkung signifikant antagonisieren (siehe Abbildung 4.2 C). Bemerkenswerterweise ging das inhibitorische Potenzial weitestgehend verloren, wenn der zyklische LBP-Anteil H 14 durch andere zyklische Komponenten (z. B. L 14) ersetzt wurde. Auch Peptide, in denen die lineare Komponente LL 10 gegen andere lineare Peptide ausgetauscht wurden, konnten die TNF- $\alpha$ -Freisetzung nicht mehr blockieren. Die Beobachtung, dass der Austausch LPS-bindender Domänen zum Verlust der neutralisierenden Eigenschaften effektiver Peptide führen, erscheint besonders interessant vor dem Hintergrund, dass der Domänentausch auf der Ebene des LBP-Proteins dessen Funktion nicht beeinträchtigt (Schumann et al., 1997). Weitere hier beispielhaft unternommene Optimierungsansätze wie Synthese von Trimeren und Interposition eines Abstandhalters konnten das

inhibitorische Potenzial nicht weiter steigern, wobei wie erwähnt noch eine Vielzahl weiterer Optionen denkbar ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bereits in einer Vielzahl von Publikationen die Wirksamkeit der LPS-inhibierenden Peptide erforscht und belegt wurde. Diese Untersuchungen geben einerseits Einblick in die molekulare Beschaffenheit Endotoxin-bindender Moleküle, ihren Aufbau, die beteiligten Strukturen und minimalen Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, um eine messbare Affinität zu erhalten. Andererseits schaffen diese Erkenntnisse die Basis für die Entwicklung weiterer hochaffiner Substanzen, die zukünftig in der Sepsistherapie eingesetzt werden könnten. In vielen der genannten Studien ergaben sich bereits deutliche Hinweise darauf, dass eine größtmögliche Annäherung an die natürliche Konformation der Bindungsregion die Affinität an Lipid A erhöht. Auch aus unseren Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Endotoxin-neutralisierenden Eigenschaften eines Peptids umso besser ausgeprägt sind, je ähnlicher es der nativen Bindungsdomäne ist. Der Identifizierung der Bindemotive kommt daher eine entscheidende Bedeutung zu. Als Folge der Imitation der Schleifenstruktur konnte die Bindungsaffinität der LPS-bindenden Peptide deutlich gesteigert werden, was den großen Einfluss der räumlichen Konformation belegt.

Die meisten Studien unterscheiden sich in wesentlichen Punkten vom Versuchsaufbau unserer Modelle, wodurch sich sicherlich teilweise die abweichenden Untersuchungsergebnisse begründen lassen. Der Großteil der Experimente in der Literatur wurde mit Peptiden durchgeführt, die mit Endotoxin vorinkubiert worden waren. Dieses Setting ermöglicht die Bildung von Komplexen vor Applikation, was die Gegebenheiten im septischen Organismus allerdings unzureichend wiedergibt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde demgegenüber versucht, die klinischen Gegebenheiten so weit als möglich zu imitieren. Endotoxin und Peptide wurden daher separat und mit zeitlichem Abstand verabreicht. Bemerkenswerterweise erhielt man *in vivo* sogar eine deutlich geringere Suppression der TNF- $\alpha$ -Freisetzung, wenn das Peptid nach einer vorangegangenen Inkubation mit LPS verabreicht wurde (siehe Punkt 4.2). Aus den Ergebnissen der Bindungsstudien könnte man durchaus folgern, dass präformierte Komplexe aus Peptid und LPS die Bindung des Endotoxins an LBP und damit die Signaltransduktion effektiver verhindern (Hoess et al., 1996). Die Gründe dafür, warum es offenbar von Vorteil ist, Peptide und LPS getrennt voneinander zu verabreichen, sind aus der vorliegenden Datenlage nicht ersichtlich. Es ist aber sicherlich eine interessante Fragestellung, die durch weitergehende Untersuchungen detaillierter zu analysieren wäre.

Beachtenswert erscheint, dass in manchen experimentellen Anordnungen ein exzessiver Peptid-Überschuss (bis 1000-fach) erforderlich war, um eine signifikante Wirksamkeit zu erreichen. In den hier durchgeführten Experimenten lag der Peptid-Überschuss im Bereich von 100- bis 125-fach über der LPS-Dosis, wobei sich keine toxischen Effekte feststellen ließen. Ein weiterer Unterschied zu unseren Untersuchungen besteht darin, dass vielfach die *in vitro*-Experimente in serumfreiem Medium durchgeführt wurden. Eine mögliche Beeinflussung durch Serumfaktoren kommt dadurch nicht zum Tragen. In der Tat lässt sich nachweisen, dass die Affinität LPS-bindender Peptide in Anwesenheit von Serum deutlich abnimmt (Ried et al., 1996). Auch in diesem Punkt orientierten sich unsere Modelle an den natürlichen Gegebenheiten, so dass alle *in vitro*-Versuche unter Serumzugabe stattfanden.

### 5.3 Klinische Implikationen der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem LPS-bindenden Peptid LL 10-H 14 ein Molekül charakterisiert werden, das in der Lage ist, sowohl in Tiermodellen als auch in Versuchen mit humanen Zellen die Freisetzung des TNF- $\alpha$  nach Endotoxin-Stimulus signifikant zu reduzieren. Durch die spezifische Bindung des LL 10-H 14 an das LPS gelingt es, die Kopplung des Endotoxins an LBP und an Oberflächenrezeptoren zu inhibieren. Die durch die Zellaktivierung induzierte Freisetzung von Zytokinen wird damit unterbrochen.

Von entscheidendem Vorteil ist, dass das Peptid seine Wirksamkeit sowohl bei prophylaktischer als auch bei postexpositioneller Gabe entfaltet. Dies spielt eine große Rolle bei der klinischen Anwendung, da bei Sepsispatienten ein definierter Zeitpunkt der Endotoxinfreisetzung nicht gegeben beziehungsweise nicht bekannt ist. Vorteilhaft sind weiterhin die verhältnismäßig einfache und kostengünstige Herstellung des Peptids. Die maschinelle Synthese im Labor garantiert eine gleichbleibende Qualität der Substanz. Gleichzeitig bietet sich die Möglichkeit, Änderungen und Verbesserungen an der Molekülstruktur jederzeit und ohne großen Aufwand umsetzen zu können. In keiner der hier durchgeführten Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine toxische Schädigung von Zellen oder Tieren durch die Gabe von LL 10-H 14. Selbstverständlich können diese Beobachtungen nur orientierend herangezogen werden und erlauben keine grundlegende Aussage zu Toxizität und Verträglichkeit der Substanz, die noch detailliert geprüft werden müssen. Allergische Reaktionen, die bei der Anwendung nativer Proteine wahrscheinlich wären, sind aufgrund der geringen Molekülgröße der Peptide nicht zu erwarten. Beim klinischen Einsatz des Peptids sollte ferner beachtet werden, dass es sich um eine Substanz mit limitierter biologischer Stabilität und funktioneller Aktivität handelt, deren Wirksamkeit auf ein gewisses Zeitfenster begrenzt ist.

Im Rahmen der Sepsis laufen eine Vielzahl pathophysiologischer Schritte parallel nebeneinander ab, die im Detail noch nicht aufgeklärt sind. Die Blockade des wichtigen Schlüssel moleküls Endotoxin greift an einer entscheidenden Stelle in das Geschehen ein. Dennoch haben Studien in der Vergangenheit ergeben, dass eine Unterbrechung der fatalen Kaskade dadurch letztlich nicht erreicht werden kann. Vor diesem Hintergrund kann das Ziel der klinischen Anwendung LPS-inhibierender Peptide nicht die Etablierung als Monotherapie in der Behandlung des septischen Schocks sein. Vielmehr könnte es als additives Medikament sinnvoll in die bestehenden Therapieschemata integriert werden und dazu beitragen, die Letalität des septischen Schocks entscheidend zu verbessern.

### 5.4 Ausblick

Es ist seit langem bekannt, dass im Rahmen einer septischen Erkrankung äußerst komplexe Reaktionen ablaufen. Details der Pathogenese des septischen Schocks bleiben trotz des enormen Zuwachses an Wissen auf diesem Gebiet ungeklärt. Dieser Umstand erklärt zumindest teilweise, warum in klinischen Tests Substanzen weitgehend versagen, die gegen Schlüssel moleküle und Hauptmediatoren der Immunreaktion gerichtet sind und in Tiermodellen effektiv waren. Dies könnte auch als Hinweis darauf gedeutet werden, dass Tiermodelle mit definierter kurzfristiger Toxininfusion

die klinische Situation nicht korrekt wiedergeben. Tatsächlich beobachtet man bei septischen Patienten eine stetige oder rekurrente Einschwemmung pathogener Mikroorganismen oder deren Toxine über einen längeren Zeitraum hinweg. In Tiermodellen, die standardisiert und unter Laborbedingungen reproduzierbar sein müssen, bleiben klinische Faktoren wie der individuelle Zustand des Patienten, onkologische und internistische Erkrankungen, das Operationstrauma und seine Folgen sowie die Intensivtherapie mit multiplen invasiven Maßnahmen unberücksichtigt. Auch die unterschiedlichen Verlaufsformen der Sepsis werden nicht erfasst. So beobachtet man in der Klinik hyperakute Verläufe ebenso wie wochenlange Erkrankungen mit immer wiederkehrenden septischen Schüben. Pathologische und protektive Funktionen von Zytokinen sind bei diesen Verlaufsformen sicherlich getrennt zu bewerten. Wünschenswert erscheint daher die Entwicklung neuer Tiermodelle, die dem klinischen Verlauf der Sepsis in seiner gesamten Komplexität möglichst genau entsprechen und dadurch auch Einblick gewähren in den individuellen Reaktionszustand des Immunsystems (Hyporeaktivität/Hypersensitivität) vor und während der Sepsis. Anhand geeigneter Modelle (z.B. CASP-Mausmodell) könnten neue Therapiekonzepte zuverlässiger erarbeitet werden.

Einige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten LPS-inhibierenden Peptide waren in der Lage, die Endotoxin-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung deutlich zu reduzieren. Über die ausgeprägteste Wirksamkeit verfügte das Dimer LL 10-H 14. Es wäre damit ein geeigneter Kandidat für die Entwicklung sepsisspezifischer Medikamente. Durch weitere Optimierung des Moleküls (z.B. durch Verlängerung der funktionellen Aktivitätsphase) könnte das inhibitorische Potenzial noch gesteigert werden. Eine Verbesserung wäre auch durch Konjugation an ein Trägerprotein denkbar (Gray und Haseman, 1994). Zusätzlich sollten Untersuchungen zur Verträglichkeit und hinsichtlich eventueller toxischer Wirkungen durchgeführt werden.

Trotz (oder wegen?) der vielfältigen Interventionsmöglichkeiten stehen für die gezielte Behandlung der Sepsis bislang keine spezifischen Medikamente zur Verfügung. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden neben den bereits erwähnten weitere vielversprechende Ansätze untersucht, beispielsweise der Einsatz von IFN- $\gamma$  (Döcke et al., 1997), MIF (Makrophagen-Migration-Inhibitionsfaktor) (Calandra et al., 1995; Bozza et al., 1999; Calandra et al., 2000; Roger et al., 2001; Mitchell et al., 2002; Kudrin et al., 2006), anti-C5a-Antikörpern (Czermak et al., 1999; Guo und Ward, 2005), Statinen (Terblanche et al., 2006) oder niedrig dosiertem Hydrocortison (Annane et al., 2002). Umfangreiche Studien wurden auch zur Hemmung der Apoptose durchgeführt, in deren Ablauf antiinflammatorische Zytokine sezerniert werden, welche eine Immunparalyse begünstigen (Hotchkiss et al., 2000; Oberholzer et al., 2001; Coopersmith et al., 2002; Wesche-Soldato et al., 2005). Einen weiteren Ansatzpunkt bietet der prokoagulatorische Status des Gerinnungssystems, den man zum Beispiel durch Gabe von rekombinant hergestelltem aktiviertem Protein C (Bernard et al., 2001), Antithrombin III (Warren et al., 2001) oder TFPI (*tissue-factor-pathway inhibitor*) (Abraham et al., 2003) zu modulieren versucht.

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit HMGB1 (*High-mobility group box 1 protein*), das im Nukleus der meisten eukaryotischen Zellen vorkommt. Es wird nach Stimulation durch Pathogene von Phagozyten mit einer Latenz von mehreren Stunden freigesetzt. Das Protein besitzt die Wirkung eines

*späten* proinflammatorischen Zytokins, weshalb die Inhibition innerhalb eines größeren zeitlichen Fensters wirksam sein dürfte (Wang et al., 1999; Lotze und Tracey, 2005). Mit Antikörpern gegen HMGB1 konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit in Tiermodellen verbessert werden (Wang et al., 1999; Yang et al., 2004; Sundén-Cullberg et al., 2005; Qin et al., 2006).

Ein weiteres Ziel für die therapeutische Intervention bieten Rezeptoren. Bei TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells*) handelt es sich um einen Rezeptor aus der Familie der Immunglobuline, der Neutrophile und Monozyten beziehungsweise Makrophagen über das Adapterprotein DAP12 aktiviert. TREM-1 verstärkt die TLR-induzierte Immunantwort bei mikrobiellen Infektionen und potenziert die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. In Mausmodellen konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit durch Blockade von TREM-1 verbessert werden (Bouchon et al., 2001; Colonna und Facchetti, 2003). Auch die Wirksamkeit der Blockade des TLR 4 war und ist Gegenstand mehrerer Studien (Bunnell et al., 2000; Hawkins et al., 2002; van der Poll und Opal, 2008). Ein abschließendes Ergebnis liegt diesbezüglich derzeit noch nicht vor.

Die Mehrzahl der Therapiestudien mit innovativen Medikamenten brachte bislang allerdings keinen entscheidenden Durchbruch in der Behandlung der verschiedenen Sepsisformen. Das weitgehende Scheitern neuer immunmodulatorischer Therapieansätze hängt wohl nicht zuletzt mit dem Fehlen einer differenzierteren Diagnostik zusammen. Eine deutliche Verbesserung der Therapierbarkeit septischer Erkrankungen wäre zu erwarten, wenn die Diagnose zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt gestellt werden könnte (Mort und Yeston, 1999; Hotchkiss und Karl, 2003). In diesem Zusammenhang sollte auch die Bedeutung einer einheitlichen Nomenklatur bei der Bezeichnung dieser Krankheitsbilder betont werden, die dazu beitragen kann, Missverständnissen aufgrund unterschiedlicher Begriffsverwendung vorzubeugen. Die einheitliche Einteilung der Krankheitsbilder in Schweregrade und das Zusammenfassen von Patienten mit bestimmten Merkmalen in Untergruppen (z.B. PIRO-Konzept) könnte die Vergleichbarkeit der durchgeführten klinischen Studien wesentlich erleichtern.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Als Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien wird Endotoxin bei Infektionen im Organismus freigesetzt. Beim Menschen kann es bereits in sehr geringen Mengen toxische Effekte hervorrufen, die sich im Rahmen schwerer Krankheitsbilder manifestieren. Die Therapie gravierender septischer Erkrankungen wie des septischen Schocks gestaltet sich problematisch, da keine spezifischen Medikamente zur Verfügung stehen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Diagnosestellung erst mit dem Auftreten der klinischen Symptomatik möglich ist. Ein frühzeitiger Therapiebeginn könnte aber die Prognose der betroffenen Patienten entscheidend verbessern. Die konventionelle Behandlung umfasst Fokussanierung, Antibiotikagabe sowie intensivmedizinische Kompensation ausgefallener Organsysteme und hämodynamische Stabilisierung. Trotz der kontinuierlichen Verbesserung dieser Maßnahmen stagniert die Mortalität vor allem der schweren Sepsis und des septischen Schocks auf unverändert hohem Niveau.

Strategien mit dem Ziel einer prophylaktischen Behandlung der Sepsis spielen bisher klinisch eine eher untergeordnete Rolle, da es an effektiven Substanzen bislang mangelt. Durch umfangreiche interdisziplinäre Forschungsarbeit konnten in den vergangenen Jahren die an der Sepsisentstehung beteiligten pathogenetischen Faktoren identifiziert und Einblicke in das komplexe Zusammenspiel der an der Immunantwort beteiligten Zellen, Kaskadensysteme und Mediatoren gewonnen werden. Es ergaben sich daraus auch Ansatzpunkte für innovative Therapieoptionen. Bisher durchgeführte klinische Studien mit Substanzen, die gegen so genannte Schlüsselproteine und Hauptmediatoren der Sepsis gerichtet sind (z.B. anti-Lipid A-Antikörper, anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper und TNF-Rezeptor-Antagonisten) zeigten allerdings eher enttäuschende Resultate. Dies beweist, dass die beim Schockgeschehen ablaufenden Reaktionen äußerst komplex und in wichtigen Teilen bislang weiterhin unverstanden sind. Dennoch gilt es, weitere Substanzen zu charakterisieren, die in der Lage sind, Endotoxin effektiv zu binden und zu neutralisieren. Diese können künftig möglicherweise einen wichtigen Beitrag bei der Sepsisbehandlung leisten.

Neuere Ansätze bei der Entwicklung Endotoxin-neutralisierender Moleküle konzentrieren sich auf die Charakterisierung Lipid A-bindender Regionen in LPS-bindenden Proteinen. Ziel ist dabei, die durch Endotoxin induzierte Immunantwort mittels hochaffiner LPS-bindender Substanzen zu inhibieren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten synthetischen Peptide basieren auf den bekannten LPS-Bindedomänen der Proteine LBP (LPS-bindendes Protein), BPI (*Bactericidal/Permeability increasing Protein*), LALF (*Limulus*-Anti-LPS-Faktor) und PMB (Polymyxin B). Sie sind mit unterschiedlichen Eigenschaften z.B. hinsichtlich ihrer Konformation oder Serumstabilität ausgestattet. Die Spezifität der Bindung an Lipid A wurde bereits gezeigt (Ried et al., 1996). Aus dem großen Spektrum zu untersuchender Moleküle sollten die effektivsten LPS-bindenden Peptide isoliert werden. Hierfür wurde zunächst ein *in vitro*-Zellkulturmodell entwickelt, mit Hilfe dessen sich eine erste Differenzierung in potente und weniger effektive Peptide bewerkstelligen ließ. Als Parameter zur Messung der Aktivierung hochsensibler Makrophagen wurde TNF- $\alpha$  herangezogen, da dieses Zytokin nach einem LPS-Stimulus sehr schnell und in großer Menge freigesetzt wird (Gallay et al., 1993b) und mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits relativ einfach nachgewiesen werden kann. Die in den

Zellkulturversuchen effektivsten Peptide wurden im Anschluss in Tiermodellen weiter untersucht. Hierzu wurden einerseits die TNF- $\alpha$ -Serumspiegel in Endotoxin-behandelten Mäusen gemessen und andererseits die überlebensverbessernde Wirkung im Schockmodell überprüft.

Wir identifizierten im Rahmen unserer Untersuchungen mehrere synthetische Peptide mit LPS-neutralisierender Wirkung. Unsere Ergebnisse bestätigen Beobachtungen anderer Studien, in denen sich zyklische Peptide den linearen überlegen zeigten. Eine größtmögliche Annäherung an native Bindungsdomänen verbessert die Affinität. Um die Bindungskapazität der Peptide weiter zu verbessern, wurden Di- und Trimere synthetisiert, die zwei beziehungsweise drei Bindungsdomänen aus LALF, LBP und BPI enthalten. Über das am deutlichsten ausgeprägte Potenzial verfügte das Hybrid-Molekül LL 10-H 14, welches die Endotoxin-bindenden Domänen von LALF und LBP enthält: Im Zellkulturmodell reduzierte es die LPS-induzierte TNF  $\alpha$ -Freisetzung muriner Makrophagen um bis zu 90 %. Auch in Mäusen, die LL 10-H 14 erhielten, wurden nach Endotoxin-Applikation signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Serumspiegel gemessen. In humanen Makrophagenzelllinien wie auch in peripheren mononukleären Blutzellen konnte LL 10-H 14 die LPS-vermittelte TNF- $\alpha$ -Freisetzung senken. Weiterhin konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit im Endotoxin/D-GalN-Schockmodell durch das Hybridpeptid signifikant verbessert werden. Es kommt daher als potenzieller Kandidat für die Sepsistherapie in Frage. Wünschenswert wäre die Untersuchung dieses Moleküls im Rahmen klinischer Studien, um Aufschluss über die protektiven Eigenschaften bei Sepsispatienten zu gewinnen, sowie die Weiterentwicklung im Sinne einer weiteren Verbesserung hinsichtlich der LPS-Bindeaffinität und der Serumstabilität.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abraham, E., K. Reinhart, S. Opal, L. Demeyer, C. Doig, A. L. Rodriguez, R. Beale, P. Svoboda, P. F. Laterre, S. Simon, B. Light, H. Spapen, J. Stone, A. Seibert, C. Peckelsen, C. De Deyne, R. Postier, V. Pettilä, A. Artigas, S. R. Percell, V. Shu, C. Zwingelstein, J. Tobias, L. Poole, J. C. Stolzenbach, A. A. Creasey; OPTIMIST Trial Study Group. 2003. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 290:238-247.

ACCP/SCCM Consensus Conference. 1992. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 20:864-874.

Aketagawa, J., T. Miyata, S. Ohtsubo, T. Nakamura, T. Morita, H. Hayashida, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Takao und Y. Shimonishi. 1986. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* 261:7357-7365.

Alberti, C., C. Brun-Buisson, H. Burchardi, C. Martin, S. Goodman, A. Artigas, A. Sicignano, M. Palazzo, R. Moreno, R. Boulmé, E. Lepage, R. Le Gall. 2002. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 28:108-21.

Aldridge, S. 1993. Meeting the challenge of sepsis. *Trends Biotechnol.* 11:373-375.

Allen, J. B. und L. B. Weiner. 1981. Pneumococcal sepsis in childhood leukemia and lymphoma. *Pediatrics* 67:292-295.

Alpert, G., G. Baldwin, C. Thompson, N. Wainwright, T. J. Novitsky, Z. Gillis, J. Parsonnet, G. R. Fleisher und G. R. Siber. 1992. Limulus antilipopolysaccharide factor protects rabbits from meningococcal endotoxin shock. *J. Infect. Dis.* 165:494-500.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo und M. R. Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29:1303-1310.

Annane, D., V. Sebille, C. Charpentier, P. E. Bollaert, B. Francois, J. M. Korach, G. Capellier, Y. Cohen, E. Azoulay, G. Troche, P. Chaumet-Riffaut und E. Bellissant. 2002. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 288:862-871.

Bagby, G. J., K. J. Plessala, L. A. Wilson, J. J. Thompson und S. Nelson. 1991. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J. Infect. Dis.* 163:83-88.

- Bartels, H. und J. R. Siewert. 1991. Die Rolle der antibiotischen Therapie bei postoperativen infektiösen Komplikationen. *Klin. Wochenschr.* 69 Suppl 26:53-56.
- Battafarano, R. J., P. S. Dahlberg, C. A. Ratz, J. W. Johnston, B. H. Gray, J. R. Haseman, K. H. Mayo und D. L. Dunn. 1995. Peptide derivatives of three distinct lipopolysaccharide binding proteins inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in vitro. *Surgery* 118:318-324.
- Baumann, H., K. K. Morella und G. H. Wong. 1993. TNF-alpha, IL-1 beta, and hepatocyte growth factor cooperate in stimulating specific acute phase plasma protein genes in rat hepatoma cells. *J. Immunol.* 151:4248-4257.
- Baumgartner, J. D. und M. P. Glauser. 1993. Immunotherapy of endotoxemia and septicemia. *Immunobiology* 187:464-477.
- Berczi, I. 1998. Neuroendocrine response to endotoxin. *Ann. NY Acad. Sci.* 851:411-415.
- Bernard, G. R., J. L. Vincent, P. F. Laterre, S. P. LaRosa, J. F. Dhainaut, A. Lopez-Rodriguez, J. S. Steinbrub, G. E. Garber, J. D. Helterbrand, E. W. Ely, C. J. Fisher, Jr. und Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 344:699-709.
- Beutler, B., X. Du und A. Poltorak. 2001. Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. *J. Endotoxin Res.* 7:277-280.
- Beutler, B., I. W. Milsark und A. C. Cerami. 1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229:869-871.
- Billiar, T. R., R. D. Curran, M. A. West, K. Hofmann und R. L. Simmons. 1989. Kupffer cell cytotoxicity to hepatocytes in co-culture requires L-arginine. *Arch. Surg.* 124:1416-1420.
- Bone, R. C. 1995. Sepsis, sepsis syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Gulliver in Laputa. *JAMA* 273:155-156.
- Bone, R. C. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit. Care Med.* 24:1125-1128
- Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz, R. A. Balk und The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit. Care Med.* 17:389-393.
- Bouchon, A., F. Facchetti, M. A. Weigand und M. Colonna. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-1107.

- Bozza, M., A. R. Satoskar, G. Lin, B. Lu, A. A. Humbles, C. Gerard und J. R. David. 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* 189:341-346.
- Brade, H. und E. T. Rietschel. 1986. Endotoxine gramnegativer Bakterien: Chemische Struktur und biologischer Effekt. *Z. Gastroenterol.* 24 Suppl 3:25-31.
- Brandenburg, K., W. Richter, M. H. Koch, H. W. Meyer und U. Seydel. 1998. Characterization of the nonlamellar cubic and HII structures of lipid A from *Salmonella enterica* serovar Minnesota by X-ray diffraction and freeze-fracture electron microscopy. *Chem. Phys. Lipids* 91:53-69.
- Bunnell, E., M. Lynn, K. Habet, A. Neumann, C. A. Perdomo, L. T. Friedhoff, S. L. Rogers und J. E. Parrillo. 2000. A lipid A analog, E5531, blocks the endotoxin response in human volunteers with experimental endotoxemia. *Crit. Care Med.* 28:2713-2720.
- Calandra, T., J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami und R. Bucala. 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 377:68-71.
- Calandra, T., P. Y. Bochud und D. Heumann. 2002. Cytokines in septic shock. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 22:1-23.
- Calandra, T., B. Echtenacher, D. L. Roy, J. Pugin, C. N. Metz, L. Hültner, D. Heumann, D. Männel, R. Bucala und M. P. Glauser. 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* 6:164-170.
- Calandra, T., J. Gerain, D. Heumann, J. D. Baumgartner und M. P. Glauser. 1991. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: Evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am. J. Med.* 91:23-29.
- Calandra, T. und M. P. Glauser. 1990. Cytokines and septic shock. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13:377-381.
- Cannon, J. G., R. G. Tompkins, J. A. Gelfand, H. R. Michie, G. G. Stanford, J. W. van der Meer, S. Endres, G. Lonnemann, J. Corsetti, B. Chernow, et al. 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* 161:79-84.
- Caplan, E. S. 1993. Role of immunomodulator therapy in sepsis. *Am. J. Surg.* 165:20S-25S.
- Casey, L. C., R. A. Balk und R. C. Bone. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.* 119:771-778.
- Christ, W. J., O. Asano, A. L. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G. R. Dubuc, W. E. Gavin, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness und M. A. Mullarkey. 1995. E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. *Science* 268:80-83.

Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891.

Cohen, J. und M. P. Glauser. 1991. Septic shock: Treatment. *Lancet* 338:736-739.

Colonna, M. und F. Facchetti. 2003. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): A new player in acute inflammatory responses. *J. Infect. Dis.* 187:S397-S401.

Coopersmith, C. M., P. E. Stromberg, W. M. Dunne et al. 2002. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA.* 287:1716-1721.

Court, O., A. Kumar, J. E. Parrillo und A. Kumar. 2002. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit. Care* 6:500-508.

Craig, W. A., J. H. Turner und C. M. Kunin. 1974. Prevention of the generalized Shwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. *Infect. Immun.* 10:287-292.

Cristofaro, P. und S. M. Opal. 2003. The Toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert Opin. Ther. Targets* 7:603-612.

Czermak, B.J., V. Sarma, C. L. Pierson, R. L. Warner, M. Huber-Lang, N. M. Bless, H. Schmal, H. P. Friedl und P. A. Ward. 1999. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat. Med.* 5:788-792.

Damas, P., A. Reuter, P. Gysen, J. Demonty, M. Lamy und P. Franchimont. 1989. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit. Care Med.* 17:975-978.

Debets, J. M., W. A. Buurman und C. J. van der Linden. 1989. The role of tumor necrosis factor/cachectin in septic shock. *Prog. Clin. Biol. Res.* 308:463-466.

Decker, K. und D. Keppler. 1974. Galactosamine hepatitis: Key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 71:77-106.

Dellinger, R. P., J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, M. M. Levy und Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. 2004. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32:858-873.

Desch, C. E., P. O'Hara und J. M. Harlan. 1989. Antilipopolysaccharide factor from horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, inhibits lipopolysaccharide activation of cultured human endothelial cells. *Infect. Immun.* 57:1612-1614

- Di Padova, F. E., H. Brade, G. R. Barclay, I. R. Poxton, E. Liehl, E. Schuetze, H. P. Kocher, G. Ramsay, M. H. Schreier und D. B. McClelland. 1993. A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to Escherichia coli and Salmonella lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 61:3863-3872.
- Dinarello, C. A. 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44:153-205.
- Dinarello, C. A. und S. M. Wolff. 1993. The role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. J. Med.* 328:106-113.
- Döcke, W.D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H. D. Volk und W. Kox. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 3:678-681.
- Dustin, M. L. und T. A. Springer. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9:27-66.
- Echtenacher, B., W. Falk, D. N. Mannel und P. H. Krammer. 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145:3762-3766.
- Elsbach, P. 1998. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J. Leukoc. Biol.* 64:14-18.
- Elsbach, P. und J. Weiss. 1993. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology* 187:417-429.
- Elsbach, P., J. Weiss, R. Franson, S. Beckerdite-Quagliata, A. Schneider und L. Harris. 1979. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 254:11000-11009.
- Emerson, T. E. Jr., D. C. Lindsey, G. J. Jesmok, M. L. Duerr und M. A. Fournel. 1992. Efficacy of monoclonal antibody against tumor necrosis factor alpha in an endotoxemic baboon model. *Circ. Shock.* 38:75-84.
- Eskandari, M. K., G. Bolgos, C. Miller, D. T. Nguyen, L. E. DeForge und D. G. Remick. 1992. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J. Immunol.* 148:2724-2730.
- Evans, T. J. 1996. The role of macrophages in septic shock. *Immunobiology* 195:655-659.
- Ferrero, E., C. L. Hsieh, U. Francke und S. M. Goyert. 1990. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J. Immunol.* 145:331-336.
- Fey, G. H. und G. M. Fuller. 1987. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol. Biol. Med.* 4:323-338.

- Fiedler, V. B., I. Loof, E. Sander, V. Voehringer, C. Galanos und M. A. Fournel. 1992. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys. *J. Lab. Clin. Med.* 120:574-88.
- Fink, M. P. 2002. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: Potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5:167-174.
- Fisher, C. J., Jr., J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein und E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 334:1697-1702.
- Galanos, C., M. A. Freudenberg und W. Reutter. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5939-5943.
- Galanos, C., M. A. Freudenberg, F. Jay, D. Nerkar, K. Veleva, H. Brade und W. Strittmatter. 1984. Immunogenic properties of lipid A. *Rev. Infect. Dis.* 6:546-552.
- Galanos, C., O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto und H. Yoshimura. 1985. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* 148:1-5.
- Gallay, P., D. Heumann, D. Le Roy, C. Barras und M. P. Glauser. 1993a. Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9935-9938.
- Gallay, P., C. V. Jongeneel, C. Barras, M. Burnier, J. D. Baumgartner, M. P. Glauser und D. Heumann. 1993b. Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. *J. Immunol.* 150:5086-5093.
- Galloway, C. J., M. S. Madanat und G. Mitra. 1991. Monoclonal anti-tumor necrosis factor (TNF) antibodies protect mouse and human cells from TNF cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 140:37-43.
- Garcia, C. T., R. A. Saladino, C. Thompson, B. Hammer, Parsonnet J, Wainwright N, Novitsky T, G. R. Fleisher und G. R. Siber. 1994. Effect of a recombinant endotoxin-neutralizing protein on endotoxin shock in rabbits. *Crit. Care Med.* 22:1211-1218
- Gazzano-Santoro, H., J. B. Parent, L. Grinna, A. Horwitz, T. Parsons, G. Theofan, P. Elsbach, J. Weiss und P. J. Conlon. 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.* 60:4754-4761.

- Gegner, J. A., R. J. Ulevitch und P. S. Tobias. 1995. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J. Biol. Chem.* 270:5320-5325.
- Girardin, E., G. E. Grau, J. M. Dayer, P. Roux-Lombard und P. H. Lambert. 1988. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N. Engl. J. Med.* 319:397-400.
- Glauser, M. P., G. Zanetti, J. D. Baumgartner und J. Cohen. 1991. Septic shock: Pathogenesis. *Lancet* 338:732-736.
- Gray, B. H. und J. R. Haseman. 1994. Bactericidal activity of synthetic peptides based on the structure of the 55-kilodalton bactericidal protein from human neutrophils. *Infect. Immun.* 62:2732-2739
- Gray, P. W., G. Flaggs, S. R. Leong, R. J. Gumina, J. Weiss, C. E. Ooi und P. Elsbach. 1989. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. *J. Biol. Chem.* 264:9505-9509.
- Grunwald, U., C. Kruger und C. Schutt. 1993. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14 is a highly conserved specific function. *Circ. Shock* 39:220-225.
- Guo, R. F. und P. A. Ward. 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23:821-852.
- Hack, C. E. und S. Zeerleder. 2006. The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit. Care Med.* 29:S21-S27.
- Haeney, M. R. 1998. The role of the complement cascade in sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:41-46.
- Halstensen, A., M. Ceska, P. Brandtzaeg, H. Redl, A. Naess und A. Waage. 1993. Interleukin-8 in serum and cerebrospinal fluid from patients with meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 167:471-475.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs und R. J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
- Hardaway, R. M. 2000. A review of septic shock. *Am. Surg.* 66:22-29.
- Hassoun, H. T., B. C. Kone, D. W. Mercer, F. G. Moody, N. W. Weisbrodt und F. A. Moore. 2001. Post-injury multiple organ failure: The role of the gut. *Shock* 15:1-10.
- Hawkins, L. D., S. T. Ishizaka, P. McGuinness, H. Zhang, W. Gavin, B. DeCosta, Z. Meng, H. Yang, M. Mullarkey, D. W. Young, H. Yang, D. P. Rossignol, A. Nault, J. Rose, M. Przetak, J. C. Chow und F. Gusovsky. 2002. A novel class of endotoxin receptor agonists with simplified structure, toll-like receptor 4-dependent immunostimulatory action, and adjuvant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:655-661.

- Haziot, A., G. W. Rong, J. Silver und S. M. Goyert. 1993. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 151:1500-1507.
- Heinzel, F. P. und R. K. Root. Introduction to infectious diseases: Pathogenic mechanisms and host responses. In *Harrison's Principles of internal medicine*. J. D. Wilson, E. Braunwald, K. J. Isselbacher, R. G. Petersdorf, J. B. Martin, A. S. Fauci und R. K. Root (eds.), McGraw-Hill, Inc., New York, 1991, 447-451.
- Heumann, D., P. Gallay, S. Betz-Corradin, J. D. Baumgartner und M. P. Glauser. 1993. Competition between bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes. *J. Infect. Dis.* 167:1351-1357.
- Hirata, M., Y. Shimomura, M. Yoshida, S. C. Wright und J. W. Larrick. 1994. Endotoxin-binding synthetic peptides with endotoxin-neutralizing, antibacterial and anticoagulant activities. *Prog. Clin. Biol. Res.* 388:147-159.
- Hoess, A. „Endotoxin-bindende Peptide. Von der Kristallstruktur bis zur Entwicklung von Endotoxin-neutralisierenden Substanzen“. Habilitationsschrift TU München, 1997.
- Hoess, A., J. Schneider-Mergener und R. C. Liddington. 1995. Identification of the LPS-binding domain of an endotoxin neutralising protein, Limulus anti-LPS factor. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392:327-337.
- Hoess, A., S. Watson, G. R. Siber und R. Liddington. 1993. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* 12:3351-3356.
- Hood D. W., M. E. Deadman, T. Allen, H. Masoud, A. Martin, J. R. Brisson, R. Fleischmann, J. C. Venter, J. C. Richards und E. R. Moxon. 1996. Use of the complete genome sequence information of Haemophilus influenzae strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 22:951-65.
- Hotchkiss, R. S., K. C. Chang, P. E. Swanson et al. 2000. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat. Immunol.* 1:496-501.
- Hotchkiss, R. S. und I. E. Karl. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348:138-150.
- Iwagaki, A., M. Porro und M. Pollack. 2000. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolysaccharide (LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells expressing membrane-bound CD14. *Infect. Immun.* 68:1655-1663.
- Iwanaga, S. 1993. Primitive coagulation systems and their message to modern biology. *Thromb. Haemost.* 70:48-55.

- Jiang, Z., Z. Hong, W. Guo, G. Yiaoyun, L. Gengfa, L. Yongning und X. Guangxia. 2004. A synthetic peptide derived from bactericidal/permeability-increasing protein neutralizes endotoxin in vitro and in vivo. *Int. Immunopharmacol.* 4:527-537.
- Jin, H., R. Yang, S. A. Marsters, S. A. Bunting, F. M. Wurm, S. M. Chamow und A. Ashkenazi. 1994. Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesin: Comparison with anti-TNF monoclonal antibody. *J. Infect. Dis.* 170:1323-1326.
- Keppler, D., R. Lesch, W. Reutter und K. Decker. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 9:279-290.
- Kloczewiak, M., K. M. Black, P. Loisel, J. M. Cavaillon, N. Wainwright und H. S. Warren. 1994. Synthetic peptides that mimic the binding site of horseshoe crab antilipopolysaccharide factor. *J. Infect. Dis.* 170:1490-1497.
- Kreymann, G. und M. Wolf. 1996. Geschichte und Definition der Sepsis—brauchen wir eine neue Terminologie? *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 31:9-14.
- Kudrin, A., M. Scott, S. Martin, C. W. Chung, R. Donn, A. McMaster, S. Ellison, D. Ray, K. Ray und M. Binks. 2006. Human macrophage migration inhibitory factor: A proven immunomodulatory cytokine? *J. Biol. Chem.* 281:29641-51.
- Kuhn, H. M., L. Brade, B. J. Appelmelk, S. Kusumoto, E. T. Rietschel und H. Brade. 1992. Characterization of the epitope specificity of murine monoclonal antibodies directed against lipid A. *Infect. Immun.* 60:2201-2210.
- Lamping, N., R. Dettmer, N. W. J. Schröder, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger und R. R. Schumann. 1998. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.* 101:2065-2071.
- Lamping, N., A. Hoess, B. Yu, T. C. Park, C. J. Kirschning, D. Pfeil, D. Reuter, S. D. Wright, F. Herrmann und R. R. Schumann. 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.* 157:4648-4656.
- Larrick, J. W., M. Hirata, Y. Shimomura, M. Yoshida, H. Zheng, J. Zhong und S. C. Wright. 1994a. Rabbit CAP18 derived Peptides inhibit gram negative and gram positive bacteria. *Prog. Clin. Biol. Res.* 388:125-135.
- Larrick, J. W., M. Hirata, H. Zheng, J. Zhong, D. Bolin, J. M. Cavaillon, H. S. Warren und S. C. Wright. 1994b. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *J. Immunol.* 152:231-240.

- Lehmann, V., M. A. Freudenberg und C. Galanos. 1987. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J. Exp. Med.* 165:657-663.
- Lenhartz, H. „Die septischen Erkrankungen“. Hölder, Wien, 1903
- Leturcq, D.J., A. M. Moriarty, G. Talbott, R. K. Winn, T. R. Martin, R. J. Ulevitch. 1996. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J. Clin. Invest.* 98:1533-1538.
- Levi, M. und H. ten Cate. 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N. Engl. J. Med.* 341:586-592.
- Levin, J. und F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265-274.
- Little, R. G., D. N. Kelner, E. Lim, D. J. Burke und P. J. Conlon. 1994. Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI23). *J. Biol. Chem.* 269:1865-1872.
- Lorenz, H. M., C. Antoni, T. Valerius, R. Repp, M. Grunke, N. Schwerdtner, H. Nusslein, J. Woody, J. Kalden und B. Manger. 1996. In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J. Immunol.* 16:1646-1653.
- Lotze, M.T. und K. J. Tracey. 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5:331-342.
- Marra, M. N., C. G. Wilde, M. S. Collins, J. L. Snable, M. B. Thornton und R. W. Scott. 1992. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J. Immunol.* 148:532-537.
- Marra, M. N., C. G. Wilde, J. E. Griffith, J. L. Snable und R. W. Scott. 1990. Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J. Immunol.* 144:662-666.
- Marty, C., B. Misset, F. Tamion, C. Fitting, J. Carlet und J. M. Cavaillon. 1994. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit. Care Med.* 22:673-679.
- Maynard, J. R., B. E. Dreyer, M. B. Stemerman und F. A. Pitlick. 1977. Tissue factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblast. *Blood* 50: 387-396.
- McNamara, M. J., J. A. Norton, R. J. Nauta und H. R. Alexander. 1993. Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treatment against lethal endotoxemia in mice. *J. Surg. Res.* 54:316-321.

- Mead, P. S., J. P. Guo, A. M. Lefer, S. Pierce und M. Palladino. 1994. Protective effects of a monoclonal antibody against lipid A in endotoxic shock. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 16:405-412.
- Medzhitov R. und C. Janeway Jr. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343:338-344.
- Medzhitov R., P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388:394-397.
- Michie, H. R., K. R. Manogue, D. R. Spriggs, A. Revhaug, S. O'Dwyer, C. A. Dinarello, A. Cerami, S. M. Wolff und D. W. Wilmore. 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* 318:1481-1486.
- Mitchell, R. A., H. Liao, J. Chesney, G. Fingerle-Rowson, J. Baugh, J. David und R. Bucala. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:345-350.
- Miyata, T., F. Tokunaga, T. Yoneya, K. Yoshikawa, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao und Y. Shimonishi. 1989. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: Chemical structures and biological activity. *J. Biochem (Tokyo)* 106:663-668.
- Morita, T., S. Ohtsubo, T. Nakamura, S. Tanaka, S. Iwanaga, K. Ohashi und M. Niwa. 1985. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *J. Biochem.(Tokyo)* 97:1611-1620.
- Morrison, D. C. und D. M. Jacobs. 1976a. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 13:813-818.
- Morrison, D. C. und D. M. Jacobs. 1976b. Inhibition of lipopolysaccharide-initiated activation of serum complement by polymyxin B. *Infect. Immun.* 13:298-301.
- Morrison, D. C. und J. L. Ryan. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* 38:417-432.
- Mort, T. C. und N. S. Yeston. 1999. The relationship of pre mortem diagnoses and post mortem findings in a surgical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 27:299-303.
- Moxon, E. R. 1992. Molecular basis of invasive Haemophilus influenzae type b disease. *J. Infect. Dis.* 165 Suppl 1:S77-81.
- Muta, T., T. Miyata, F. Tokunaga et al. 1987. Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *L. polyphemus*. *J. Biochem.* 101:1321-1330

- Nakamura, T., H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanga, M. Niwa, T. Takao und Y. Shimonishi. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem.* 263:16709-16713
- Nassif, X., J. C. Mathison, E. Wolfson, J. A. Koziol, R. J. Ulevitch und M. So. 1992. Tumour necrosis factor alpha antibody protects against lethal meningococcaemia. *Mol. Microbiol.* 6:591-597.
- Nelson, D., N. Kuppermann, G. R. Fleisher, B. K. Hammer, C. M. Thompson, C. T. Garcia, T. J. Novistky, J. Parsonnet, A. Onderdonk, G. R. Siber und R. A. Saladino. 1995. Recombinant endotoxin neutralizing protein improves survival from *Escherichia coli* sepsis in rats. *Crit. Care Med.* 23:92-98.
- Neugebauer, E., S. Dimmeler und H. Troidl. 1995. Mediatorsysteme und Infektion. *Chirurg* 66:2-10.
- Oberholzer, C., A. Oberholzer, F. R. Bahjat et al. 2001. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:11503-11508
- Offner, F., J. Philippe, D. Vogelaers, F. Colardyn, G. Baele, M. Baudrihaye, A. Vermeulen und G. Leroux-Roels. 1990. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. *J. Lab. Clin. Med.* 116:100-105.
- Ooi, C. E., J. Weiss, P. Elsbach, B. Frangione und B. Mannion. 1987. A 25 kDa NH<sub>2</sub>-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60 kDa bactericidal/permeability-increasing protein. *J. Biol. Chem.* 262:14891.
- Ooi, C. E., J. Weiss, M. E. Doerfler, und P. Elsbach. 1991. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 174:649-655.
- Opal, S.M. und T. Glück. 2003. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med.* 31(1 Suppl):S57-64.
- Opal, S. M., A. S. Cross, J. W. Jhung, L. D. Young, J. E. Palardy, N. A. Parejo und C. Donsky. 1996. Potential hazards of combination immunotherapy in the treatment of experimental septic shock. *J. Infect. Dis.* 173:1415-1421.
- Paleolog, E. M., M. Hunt, M. J. Elliott, M. Feldmann, R. N. Maini und J. N. Woody. 1996. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:1082-1091.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige und S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Parrillo, J. E. 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N. Engl. J. Med.* 328:1471-1474.

- Parrillo, J. E., M. M. Parker, C. Natanson, A. F. Suffredini, R. L. Danner, R. E. Cunnion und F. P. Ognibene. 1990. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Intern. Med.* 113:227-242.
- Pennington, J. E. 1993. Therapy with antibody to tumor necrosis factor in sepsis. *Clin. Infect. Dis.* 17:S515-S519.
- Pfeiffer, R. 1892. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z. Hygiene* 11:393-412.
- Pinsky, M. R., J. L. Vincent, J. Deviere, M. Alegre, R. J. Kahn und E. Dupont. 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 103:565-575.
- Pittet, D., S. Rangel-Frausto, N. Li, D. Tarara, M. Costigan, L. Rempe, P. Jebson und R. P. Wenzel. 1995. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med.* 21:302-309.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton und B. Beutler. 1998a. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282:2085-2088.
- Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M. Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E. K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S. N. Vogel und B. Beutler. 1998b. Genetic and physical mapping of the Lps locus: Identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol. Dis.* 24:340-355.
- Porro, M., A. Rustici, M. Velucchi, D. Agnello, P. Villa und P. Ghezzi. 1998. Natural and synthetic polypeptides that recognize the conserved lipid A binding site of lipopolysaccharides. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397:315-325.
- Proud, D. und A. P. Kaplan. 1988. Kinin formation: Mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* 6:49-83.
- Qin, S., H. Wang, R. Yuan, H. Li, M. Ochani, K. Ochani, M. Rosas-Ballina, C. J. Czura, J. M. Huston, E. Miller, X. Lin, B. Sherry, A. Kumar, G. Larosa, W. Newman, K. J. Tracey und H. Yang. 2006. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J. Exp. Med.* 203:1637-1642.
- Raetz, C. R. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:129-170.
- Rangel-Frausto, M. S., D. Pittet, M. Costigan, T. Hwang, C. S. Davis und R. P. Wenzel. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273:117-123.
- Rice, T. W. und G. R. Bernard. 2005. Therapeutic intervention and targets for sepsis. *Annu. Rev. Med.* 56:225-248.

- Ried, C., C. Wahl, T. Miethke, G. Wellnhofer, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener und A. Hoess. 1996. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* 271:28120-28127.
- Rietschel, E. T. und H. Brade. 1992. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* 267:26-33.
- Rietschel, E. T., H. Brade, L. Brade, K. Brandenburg, U. Schade, U. Seydel, U. Zahringer, C. Galanos, O. Luderitz und O. Westphal. 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., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel und F. Di Padova. 1994. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217-225.
- Rifkind, D. 1967. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. *J. Bacteriol.* 93:1463-1464.
- Roger, T., J. David, M. P. Glauser und T. Calandra. 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.* 414:920-924.
- Roth, R. I., D. Su, A. H. Child, N. R. Wainwright und J. Levin. 1998. Limulus antilipopolysaccharide factor prevents mortality late in the course of endotoxemia. *J. Infect. Dis.* 177:388-394.
- Russell, D. A. und R. C. Thompson. 1993. Targets for sepsis therapies: Tumor necrosis factor versus interleukin-1. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:714-721.
- Rustici, A., M. Velucchi, R. Faggioni, M. Sironi, P. Ghezzi, S. Quataert, B. Green und M. Porro. 1993. Molecular mapping and detoxification of the lipid A binding site by synthetic peptides. *Science* 259:361-365.
- Saladino, R., C. T. Garcia, C. M. Thompson, B. K. Hammer, J. Parsonnet, T. J. Novitsky, G. R. Siber, und G. R. Fleisher. 1994. Efficacy of a recombinant endotoxin neutralizing protein in rabbits with escherichia coli sepsis. *Circ. Shock* 42:104-110.
- Salvo, I., W. de Cian, M. Musicco, M. Langer, R. Piadena, A. Wolfler, C. Montani und E. Magni. 1995. The Italian SEPSIS study: Preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 21:S244-S249.
- Sands, K. E., D. W. Bates, P. N. Lanke, P. S. Graman, P. L. Hibberd, K. L. Kahn, J. Parsonnet, R. Panzer, E. J. Orav, D. R. Snydman, E. Black, J. S. Schwartz, R. Moore, B. L. jr. Johnson, R. Platt und Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. 1997. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 278:234-240.
- Schottmüller, H. 1914. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandl. dt. Kongress Inn. Med.* 31:257-280.

- Schumann, R. R., N. Lamping und A. Hoess. 1997. Interchangeable endotoxin-binding domains in proteins with opposite lipopolysaccharide-dependent activities. *J. Immunol.* 159:5599-5605.
- Schumann, R. R., N. Lamping, C. J. Kirschning, H. P. Knopf, A. Hoess und F. Herrmann. 1994a. Lipopolysaccharide binding protein: Its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochem. Soc. Trans.* 22:80-82.
- Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flagg, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, und R. J. Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
- Schumann, R. R., E. T. Rietschel und H. Loppnow. 1994b. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med. Microbiol. Immunol.(Berl)* 183:279-297.
- Storm, D. R., K. S. Rosenthal und P. E. Swanson. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 46:723-763.
- Strassburg, C. P. 2003. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock liver. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:369-381.
- Sundén-Cullberg, J., A. Norrby-Teglund, A. Rouhiainen, H. Rauvala, G. Herman, K. J. Tracey, M. L. Lee, J. Andersson, L. Tokics und C. J. Treutiger. 2005. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 33:564-573.
- Swank, G. M. und E. A. Deitch. 1996. Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. *World J. Surg.* 20:411-417.
- Tam, J. P., C. R. Wu, W. Liu und J. W. Zhang. 1991. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* 113:6657-6662.
- Tanaka, S., T. Nakamura, T. Morita und S. Iwanaga. 1982. Limulus anti-LPS factor: An anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of Limulus coagulation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105:717-723.
- Taylor, A. H., G. Heavner, M. Nedelman, D. Sherris, E. Brunt, D. Knight und J. Ghayeb. 1995. Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J. Biol. Chem.* 270:17934-17938.
- ten Cate, H. 2000. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Crit. Care Med.* 28:S9-S11.
- Terblanche M., Y. Almog, R. S. Rosenson, T. S. Smith und D. G. Hackam. 2006. Statins: panacea for sepsis? *Lancet Infect. Dis.* 6:242-248.

- Theofan, G., A. H. Horwitz, R. E. Williams, P.-S. Liu, I. Chan, C. Birr, S. F. Carroll, K. Meszaros, J. B. Parent, H. Kasler, S. Aberle, P. W. Trown und H. Gazzano-Santoro. 1994. An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity. *J. Immunol.* 152:3623-3629.
- Tobias, P. S., J. A. Gegner, J. Han, T. Kirkland, V. Kravchenko, D. Leturcq, J. D. Lee, A. Moriarty, J. C. Mathison, J. Pugin, S. Steinemann und R. J. Ulevitch. 1994. LPS binding protein and CD14 in the LPS dependent activation of cells. *Prog. Clin. Biol. Res.* 388:31-39.
- Tobias, P. S., J. C. Mathison und R. J. Ulevitch. 1988. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to Gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.* 263:13479-13481.
- Tobias, P. S., K. Soldau, J. A. Gegner, D. Mintz und R. J. Ulevitch. 1995. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 270:10482-10488.
- Tracey, K. J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420:853-859.
- Tracey, K. J. und A. Cerami. 1994. Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45:491-503.
- Tracey, K. J., Y. Fong, D. G. Hesse, K. R. Manogue, A. T. Lee, G. C. Kuo, S. F. Lowry und A. Cerami. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664.
- Trappe, U. und H. Riess. 2005. Pathophysiologische Grundsätze bei Sepsis. *Hämostaseologie* 25:175-182.
- Tsiotou, A., G. Sakorafas, G. Anagnostopoulos und J. Bramis. 2005. Septic shock: Current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.* 11:RA76-RA85.
- Ulevitch, R. J. 1993. Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv. Immunol.* 53:267-289.
- Ulevitch, R. J. und P. S. Tobias. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437-457.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56:395-411.
- Vaara, M. und H. Nikaido. Molecular organization of the bacterial outer membrane. In *Chemistry of Endotoxin, Handbook of endotoxin*. E. T. Rietschel und R. A. Proctor (eds.) Elsevier, Amsterdam, 1984, 1-27.
- van der Poll, T. 2001. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect. Dis.* 1:165-174.

van der Poll, T. und S. M. Opal. 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.* 8:32-43. Epub 2007 Dec 11.

van Deuren, M. 1994. Kinetics of tumour necrosis factor-alpha, soluble tumour necrosis factor receptors, interleukin 1-beta and its receptor antagonist during serious infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:S12-S16.

van Zee, K. J., L. L. Moldawer, H. S. Oldenburg, W. A. Thompson, S. A. Stackpole, W. J. Montegut, M. A. Rogy, C. Meschter, H. Gallati, C. D. Schiller, W. F. Richter, H. Loetscher, A. Ashkenazi, C. M. Chamow, F. Wurm, S. E. Calvano, S. F. Lowry und W. Lesslauer. 1996. Protection against lethal *Escherichia coli* bacteriemia in baboons (*Papio anubis*) by pretreatment with a 55-kDa TNF receptor (CD120a)-Ig fusion protein, Ro 45-2081. *J. Immunol.* 156:2221-2230.

Varty, P. P., I. P. Linehan und P. B. Boulos. 1994. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 81:915-918.

Vincent, J. L., H. Zhang, C. Szabo und J. C. Preiser. 2000. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:1781-1785.

Volk, H. D., P. Reinke und W. D. Docke. 2000. Clinical aspects: From systemic inflammation to „immunoparalysis“. *Chem. Immunol.* 74:162-177.

Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf und T. Espevik. 1989. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.* 169:333-338.

Waage, A. und T. Espevik. 1988. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha/cachectin in mice. *J. Exp. Med.* 167:1987-1992.

Wainwright, N. R., R. J. Miller, E. Paus, T. J. Novisky, M. A. Fletcher und T. M. W. T. McKenna. *Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions*. Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1990, 315-325.

Wang, H, O. Bloom, M. Zhang, J. M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K. R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P. E. Molina, N. N. Abumrad, A. Sama und K. J. Tracey. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 285:248-251.

Warren, B. L., A. Eid, P. Singer, S. S. Pillay, P. Carl, I. Novak, P. Chalupa, A. Atherstone, I. Péntzes, A. Kübler, S. Knaub, H. O. Keinecke, H. Heinrichs, F. Schindel, M. Juers, R. C. Bone, S. M. Opal; KyberSept Trial Study Group. 2001. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 286:1869-1878.

- Warren, H. S., M. L. Glennon, N. Wainwright, S. F. Amato, K. M. Black, S. J. Kirsch, G. R. Riveau, R. I. Whyte, W. M. Zapol und T. J. Novitsky. 1992. Binding and neutralization of endotoxin by Limulus antilipopolysaccharide factor. *Infect. Immun.* 60:2506-2513.
- Weiss, J., P. Elsbach, I. Olsson und H. Odeberg. 1978. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 253: 2664-2672.
- Weiss, J., P. Elsbach, C. Shu, J. Castillo, L. Grinna, A. Horwitz und G. Theofan. 1992. Human BPI and a recombinant NH<sub>2</sub>-terminal fragment cause killing of serum-resistant Gram-negative bacteria in whole blood and inhibit TNF release induced by the bacteria. *J. Clin. Invest.* 90:1122-1130.
- Wesche-Soldato, D. E., C. S. Chung, J. Lomas-Neira, L. A. Doughty, S. H. Gregory und A. Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 for Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood.* 106:2295-2301.
- Westphal, O., U. Westphal und T. Sommer. The history of pyrogen research. In *Microbiology*. D. Schlessinger (ed.), American Society of Microbiology, Washington, D.C., 1978, 221-238.
- Wherry, J. C., J. E. Pennington und R. P. Wenzel. 1993. Tumor necrosis factor and the therapeutic potential of anti-tumor necrosis factor antibodies. *Crit. Care Med.* 21:S436-S440.
- Wortel, C. H., M. A. von der Mohler, S. J. van Deventer, C. L. Sprung, M. Jastremski, M. J. Lubbers, C. R. Smith, I. E. Allen und J. W. ten Cate. 1992. Effectiveness of a human monoclonal anti-endotoxin antibody (HA-1A) in gram-negative sepsis: Relationship to endotoxin and cytokine levels. *J. Infect. Dis.* 166:1367-1374.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch und J. C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
- Wright, S. D., P. S. Tobias, R. J. Ulevitch und R. A. Ramos. 1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 170:1231-1241.
- Wurfel, M. M., E. Hailman und S. D. Wright. 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.* 181:1743-1754.
- Wurfel, M. M., S. T. Kunitake, H. Lichenstein, J. P. Kane und S. D. Wright. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med.* 180:1025-1035.
- Yang, H., M. Ochani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H. E. Harris, S. M. Susarla, L. Ulloa, H. Wang, R. DiRaimo, C. J. Czura, H. Wang, J. Roth, H. S. Warren, M. P. Fink, M. J. Fenton, U. Andersson und K. J.

Tracey. 2004. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:296-301.

Zantl, N., A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J. R. Siewert, B. Holzmann, C. D. Heidecke und K. Pfeffer. 1998. Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis. *Infect. Immun.* 66:2300-2309.

Ziegler, E. J., C. J. Fisher, Jr., C. L. Sprung, R. C. Straube, J. C. Sadoff, G. E. Foulke, C. H. Wortel, M. P. Fink, R. P. Dellinger, N. N. Teng, et al. 1991. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 324:429-436.

Ziegler-Heitbrock, H. W., E. Thiel, A. Futterer, V. Herzog, A. Wirtz und G. Riethmuller. 1988. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41:456-461.

## DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. Thomas Miethke möchte ich mich sehr herzlich bedanken für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie für seine große Geduld.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Hermann Wagner, der mir die Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene ermöglichte und mich stets wohlwollend begleitete.

Für die Überlassung der Peptide, die Einweisung in deren Verwendung und wertvolle Anregungen bei der Versuchsplanung danke ich PD Dr. Adolf Höß. Bei Dr. Jens Schneider-Mergener möchte ich mich herzlich für die Synthese der Peptide bedanken.

Allen MitarbeiterInnen des Instituts danke ich für die fundierte Einführung in die immunologischen Labortechniken, die geduldige Anleitung und stete Hilfsbereitschaft sowie die technische und moralische Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei Dr. Matthias Lapatschek für die geduldige Einweisung in die statistische Auswertung, sowie bei Dr. Tim Sparwasser und Dr. Hans Häcker für ihre Anregungen und hilfreiche Diskussionen.

Ein großes Dankeschön an Dr. Stefan Maier für die Durchführung der CASP-Operationen und an Dr. Frank Bloos für die Hintergrundinformationen zur Sepsishistorie.

Für das Korrekturlesen des Manuskripts bedanke ich mich herzlichst bei Dr. Matthias Nörtemann.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Meinem Mann Michael und meinen Eltern für ihre beständige Motivation und Unterstützung, ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und ihre unendliche Geduld; Frau Lotte Schumann und Frau Regina Hartenberger für ihre unermüdliche und zuverlässige Kinderbetreuung - und nicht zuletzt meinen wunderbaren Kindern, die mich ebenfalls auf ihre Art nach Kräften unterstützt haben.