

# Schlussbericht

für den Zeitraum 01. 05. 1998 bis 31.4. 2001

Gemeinsames ProjektA1/B1

Teilprojektleiter: Prof. Dr. A.J. Ulmer & Priv.-Doz. Dr. Ulrich Zähringer

Förderkennzeichen: 01KI 9851/0

## Vorhaben (Zusatzantrag):

Biochemische Isolierung und biologische Charakterisierung von löslichem Peptidoglycan und Lipoteichonsäure

## I. Kurze Darstellung

### I.1. Aufgabenstellung:

Das Ziel dieses Projektes war es endotoxin-freies lösliches Peptidoglycan aus *Streptococcus aureus* zu isolieren und chemisch wie biologisch zu charakterisieren. Hierzu sollten charakteristische und strukturell definierte Zellwandbestandteil Gram-positiver Bakterien, die an den Mechanismen der Ausbildung einer septischen Schockreaktion beteiligt sind, auf molekularer Ebene untersucht und charakterisiert werden.

### I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Die Laborgruppen der beiden Projektleiter befassen sich seit Jahren

1. mit der chemischen Strukturanalyse von Zellwandbestandteilen aus Gram-negativen Bakterien (LPS, Glycolipide, Polysaccharide etc.) (Zähringer) und
2. mit Untersuchungen zur entzündlichen Aktivität von Zellwandkomponenten Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien (Ulmer).

Beide Gruppen verfügen über eine langjährige Expertise auf diesen Forschungsgebieten.

### I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben war organisatorisch in drei Unterbereiche angelegt:

- a) Insbesondere für die geplanten Experimente in den Maus-Modellen *in vivo* ist ein größere Mengenbedarf an PG und LTA nötig, der nicht mehr durch unsere bisherigen Kooperationspartner gedeckt werden kann. Wir haben daher beschlossen, diesen Bedarf durch eine eigene biochemische Isolierung zu decken. PG wird als lösliches Molekül (sPG) aus dem

Überstand von *S.aureus*, die unter  $\beta$ -Lactam Antikörper wachsen, isoliert. LTA soll aus der Zellwand von *S.aureus* mit heißem Wasser-Phenol extrahiert werden. Die Präparate sollen dann nicht nur für das beantragte Vorhaben genutzt werden, sondern allen interessierten Partnern im "Sepsis-Verbund" zur Verfügung stehen. Insbesondere war darauf zu achten, dass die auf diese Weise erhaltenene sPG Präparate nicht mit Fremdmolekülen vergleichbarer biologische Potenz (Lipopolysaccharid, Lipopeptid) kontaminiert waren.

b) In den letzten Jahren ist die Beteiligung von Endothelzellen für die Entstehung des septischen Schock immer mehr evident geworden. Wie wollen daher die entzündliche Reaktion von Endothelzellen *in vitro* als Antwort auf die Stimulation mit sPG und LTA prüfen. Diese Untersuchungen beinhalten die Produktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen, und die Induktion einer Apoptosis (programmierter Zelltod).

c) Schließlich wollen wir die Beteiligung von sPG und LTA bei der Induktion eines septischen Schocks *in vivo* (Mausmodell) prüfen. Ferner soll der Einfluß von sPG und LTA auf den Verlauf einer experimentellen Blinddarmligatur und -Perforation (ein Mausmodell der Peritonitis) untersucht werden. Diese beiden Projekte werden in Zusammenarbeit mit dem Projekt A2 (Prof. Dr. K. Heeg) und dem Projekt A3 (Prof. Dr. D.N.Männel/ PD Dr. W.Falk/ PD Dr. B.Echtenacher) durchgeführt.

#### I.4. Wissenschaftlicher Stand an den angeknüpft wurde:

Während einer Infektion mit Bakterien wird der Wirt mit verschiedenen Toxinen konfrontiert, die von diesen entweder aktiv in die Umgebung abgegeben oder durch Zerfallsprozesse auf passive Weise z.B. beim Absterben der Mikroorganismen, freigesetzt werden. Als Beispiel der ersten Gruppe gelten Exotoxine ( $\alpha$ -Toxin, Hämolysin und Superantigene (1, 2)). Vertreter der zweiten Gruppe sind Zellwandkomponenten von Bakterien der äußeren Zellmembran von denen das Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) zu den wichtigsten Komponenten zählt, die von Rezeptoren des Angeborenen Immunsystems schon in sehr geringen Mengen erkannt werden. Darüber hinaus sind sowohl in Gram-positiven wie auch Gram-negativen Bakterien Lipopeptide und das Peptidoglycan (PG, Murein) als pro-inflammatorische Stimulantien von großer biomedizinischer Bedeutung. Gram-positive Bakterien besitzen zusätzlich weitere amphiphile Makromoleküle wie z.B. Lipoteichonsäuren (LTA) oder Lipoarabinomannane, die ebenfalls von herausragender biomedizinischer Bedeutung bei der Vermittlung von pathophysiologischen Prozessen sind (3, 4, 5, 6). Von allen

Immunstimulationen des Angeborenen Immunsystems hat das LPS eine herausragende Rolle und es ist daher in den letzten Jahren das am besten untersuchte Immunstimulans gewesen, sowohl was seine Struktur als auch seine biologische Wirkungsmechanismen betrifft. Schon geringe Mengen LPS können im Wirtsorganismus pathophysiologische Reaktionen hervorrufen, die auch bei einer akuten Infektion, z.B. bei der Sepsis, beobachtet werden können. Diese Tatsache hat jedoch in der Vergangenheit dazu geführt, dass andere, putative toxische Substanzen bakteriellen Ursprungs weniger intensiv untersucht worden sind und daher nicht im Fokus des Interesses der Infektionsforschung standen. In den letzten Jahren wurde jedoch mehr und mehr bekannt, dass auch Lipopeptide, insbesondere das MALP-2 aus Mycoplasmen, in gleicher Konzentration wie das LPS zur Manifestation pathophysiologischer Reaktionen fähig ist (14, 15). Darüber hinaus hat die Entdeckung der differenzierten Signaltransduktionswege, die über mehrere Toll-like Rezeptoren verlaufen, zunehmend das Interesse an den verschiedenen Immunstimulatoren des Angeborenen Immunsystems merklich verbreitert und ausgeweitet. So sind neben LPS und Lipopeptid noch andere Glycolipide der bakteriellen Zellwand (z.B. Lipoarabinomannan, Glycosphingolipide etc. Referenz 19) bzw. charakteristische Komponenten bakterieller Substanzen (CpG, Ref. 20) und vor allem das Peptidoglycan (Murein) als wirksame Stimulatoren des Angeborenen Immunsystems erkannt und beschrieben worden. Die Wirkmechanismen dieser Substanzen auf molekularer Ebene blieben jedoch bisher unverstanden.

Das Peptidoglycan (PG) ist ein Bestandteil der Zellwand von sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien. In Gram-positiven macht PG mehr als 50% der Zellmasse aus und stellt damit mengenmäßig das wohl am häufigsten vorkommende Immunstimulans dar. Seine Struktur besteht aus einem linearen Polymer (Glycan), das aus einem  $\beta(1\rightarrow4)$ -verbrückten Disaccharid, bestehend aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin, aufgebaut ist. Der Lactylrest der Muraminsäure ist mit einem Stammpeptid (stem peptide) verbunden, das aus charakteristischen Aminosäuren besteht (Diaminopimelinsäure, Lysin etc.), die in der Regel eine zusätzliche funktionelle Aminogruppe tragen, an der ein weiteres Zwischenpeptid (interpeptide linkage) meist 4-5 Glycinreste angebunden sein kann. Dieses Zwischenpeptid vermag sich seinerseits wieder mit anderen Peptidoglycansträngen zu einem drei-dimensionalen Netzwerk zu verbinden, das von einer bemerkenswerten mechanischen Stabilität ist. Das native PG ist in seiner nativen und funktionellen Form (als Gerüstsubstanz) unlöslich (uPG) und seine Darstellung stellt daher biochemisch eine hohe Herausforderung dar. Daneben kennt man auch noch eine lösliche Form des PG (sPG) das von Bakterien während der Behandlung mit Antibiotika (z.B. Penizillin) freigesetzt wird. In unserer Gruppe

konnte gezeigt werden, dass dieses Peptidoglycan als Immunstimulans in humanen Monozyten (hMNC) die Produktion und Freisetzung von Zytokinen bewirkt (4, 7) und damit zu den pro-inflammatorischen Reaktionen während einer Sepsis in einem infizierten Wirtsorganismus eine Rolle spielen kann. Man hat beobachtet, dass PG wie auch anti-PG Antikörper bei infizierten Patienten während einer Infektion mit Gram-positiven Bakterien beteiligt sind (8, 9).

Lipoteichonsäuren (LTA) sind Glycolipide die aus der Plasmamembran durch das Peptidoglycangerüst hindurch in den extrazellulären Raum ragen. Wie LPS bestehen sie aus negativ geladenen amphiphilen Strukturen die mit einem Diacylglycerolteil in der Zellwand verankert sind (10, 11). Wie die anderen oben beschriebenen Moleküle (LPS, PG) werden LTA's von den Bakterien freigesetzt wenn man diese mit Zellwandantibiotika behandelt (11). Aus diesen Gründen wurde LTA als ein weiterer Kandidat von pro-inflammatorisch aktiven Molekülen betrachtet, die bei der Infektion eine Schlüsselrolle zukommen können. So konnte an verschiedener Stelle gezeigt werden, dass LTA Präparationen fähig sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen zu induzieren (TNF, IL-18, IL-6, IL-8, and IL-12) wie auch die induzierbare Stickstoffoxidsynthase (iNOS) (4, 6, 12, 13).

Bei Beginn des Projektes war die Frage über die Bedeutung des LTA als bioaktiver Induktor des Angeborenen Immunsystems noch in Frage gestellt (16). Chemisch synthetisierte LTA Strukturen die dem LTA-1 und LTA-2 von *Enterococcus hirae* entsprachen, waren überraschend biologisch inaktiv. Dadurch wurde die Frage aufgeworfen, ob die biologische Aktivität, die man ursprünglich dem LTA zugeschrieben hat, diesem auch zukommt oder ob diese einer Kontamination zugeschrieben werden muss (18).

## **REFERENCES**

1. Bhakdi S, Grimminger F, Suttorp N, Walmrath D, Seeger W. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrom and septic shock: The unknown connection. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183:119-144.
2. Seidl PH, Schleifer KH. Biological properties of peptidoglycan. Berlin: Walter de Gruyter, 1986.
3. Rietschel ETh, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8:217-225.
4. Mattsson, E., L. Verhage, J. Rollof, A. Fleer, J. Verhoef, and H. van Dijk. 1993. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6. *FEMS Imm. Med. Microbiol.* **7**: 281-288.[32].

5. Dziarski, R. Effects of peptidoglycan on the cellular components of the immune system. In: Biological properties of peptidoglycan. Eds. P.H. Seidl and K.H. Schleifer. Walter De Gruyter, Berlin 1986, pp 229- 247.
6. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1991; 59:4614-4620.
7. B.Weidemann, H.Brade, E.Th. Rietschel, R.Dziarski, V.Bazil, S.Kusumoto, H.-D.Flad, and A.J.Ulmer: Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures. *Infect.Immun.* 62:4709-4715 (1994).
8. B.Christensson: The diagnosis value of antibodies to peptidoglycan and other *Staphylococcus aureus* antigens in serious staphylococcal infections. In: Biological properties of peptidoglycan (Eds P.H.Seydel and K.H.Schleifer), Walter de Gruyter, Berlin 1986, pp 21- 35.
9. H.I. Wergeland and Curt Endresen: Antibodies to various bacterial cell wall peptidoglycan in patient sera and in rabbit sera. In: Biological properties of peptidoglycan (Eds P.H.Seydel and K.H.Schleifer), Walter de Gruyter, Berlin 1986, pp 99 - 104.
10. Fischer W. Bacterial phospholipids and lipoteichoic acids. In: Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids (Ed M.Kates). Plenum Press, N.Y., 1990: 123-234.
11. Fischer W. Lipoteichoic acids and lipoglycans. In: Bacterial cell wall (Eds. J.M.Ghuysen and R.Hackenbeck) Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 1994: 199 - 215.
12. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 1996; 64:1906-1912.
13. Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, Van Otteren GM, Strieter RM. Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* 1994; 62: 119-125.
14. Muhlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med.* 1997;185:1951-1958.
15. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 2000;164:554-557.
16. Takada H, Kawabata Y, Arakaki R, Kusumoto S, Fukase K, Suda Y, Yoshimura T, Koikeguchi S, Kato K, Komuro T, Tanaka N, Saito M, Yoshida T, Sato M, Kotani S. Molecular and structural requirements of a lipoteichoic acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for cytokine-inducing, antitumor, and antigenic activities. *Infect Immun* 1995; 63:57-65.

17. De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10359-10363.
18. Suda Y, Tochio H, Kawano K, Takada H, Yoshida T, Kotani S, Kusumoto S. Cytokine-inducing glycolipids in the lipoteichoic acid fraction from *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 12:97-112.
19. Dziarski R, Ulmer AJ, Gupta D. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem Immunol*. 2000;74:83-107.
20. Lipford GB, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol*. 1998 ;6:496-500.

#### I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

##### Kooperationspartner innerhalb des "Verbundes"

Prof. Dr. K. Heeg (Projekt A2): In Zusammenarbeit mit K. Heeg ist die Wirkung von sPG und hinsichtlich der Entwicklung eines lethalen Schocks untersucht worden.

Prof. Dr. D.N. Männel (Projekt A3): Die Wirkung von sPG auf das Überleben einer CLP ist in Kooperation mit D.N. Männel durchgeführt worden.

Prof. Dr. U. Seydel (Projekt A6): Die Wirkung von sPG in künstlichen und natürlichen Membranmodellen (path-clamp Methode) sowie in humanen Monozyten sollen hinsichtlich Mechanismen der Signaltransduktion untersucht worden.

##### Weitere Kooperationspartner außerhalb des "Verbundes"

Prof. Dr. R. Dziarski, Dept. of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Gary, USA. Herr Prof. Dziarski hat uns zu Beginn unserer Untersuchungen geringe Mengen sPG zur Verfügung gestellt.

Prof. Dr. S. Kusumoto, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University, Osaka, Japan. Herr Prof. Kusumoto hat uns synthetische LPS-Antagonisten zur Verfügung gestellt.

Dr. Carsten Kirschning, Technische Universität München: In Zusammenarbeit mit Dr. Kirschning ist die Wirkung von sPG und hinsichtlich der Entwicklung eines lethalen Schocks untersucht worden.

Dr. D.P. Rossignol, Eisai Research Institute, Andover, USA: Herr Dr. Rossignol hat uns Lipoid A Analoga zur Verfügung gestellt, die in Hamster Zellen LPS-Antagonisten sind.

Prof. Dr. Helmut König, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Justus-Liebig-Universität Mainz hat uns  $\beta$ -1,4 Glycan zur Verfügung gestellt.

## **II. Eingehende Darstellung**

### II.1. Erzielte Ergebnisse

#### II. 1.1. Strukturanalytische Arbeiten

Zunächst stand im chemischen Teil des Zusatzprojektes die Präparation und chemische Analyse von löslichem Peptidoglycan (sPG) im Vordergrund. Nicht näher angereichertes, rohes sPG wurde aus dem Überstand von unter  $\beta$ -Lactam Antibiotika angezogenen *Staphylococcus aureus* isoliert. Ziel war es zunächst ausreichende Mengen des zur Verfügung stehenden Materials an rohem sPG für weitere biologische Tests zu sichern. Die biologischen Experimente der ersten Förderphase im Teilprojekt A1 hatten damals eindeutig einen Engpass bei der Bereitstellung größerer Mengen an sPG aufgezeigt, der mit diesem Teilprojekt überbrückt werden sollte und konnte.

Zu diesem Zweck mussten wir im ersten Förderjahr zunächst sowohl neue mikrobiologische als auch chemische Methoden etablieren, was ebenso problemlos gelang wie die Einarbeitung der für dieses Projekt neu eingestellten Technischen Assistentin in das spezielle Thema. Wir haben zunächst ausreichend (ca. 160 mg) sPG aus *S. aureus* isoliert und für biologische Untersuchungen [Prof. Dr. A.J. Ulmer (A1), PD Dr. St. Uhlig, Prof. D. Männel, Prof. U. Seydel, Prof. Dr. D. Golenbock, Boston, USA] eingesetzt. Diese haben jedoch durch biologische Tests ergeben, dass die ersten Präparationen von rohem sPG aus unserem Labor hoch mit Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) kontaminiert waren. Wir haben dieses Problem der Tatsache zugeschrieben, dass in unserem Endotoxinlabor der Laborgruppe Immunchemie, die mit großen, Grammengen von LPS arbeitet, eine kontaminationsfreie Darstellung von sPG nicht möglich ist. Systematische Untersuchungen haben ergeben, dass

neben den verwendeten Lösungsmittel auch die Geräte (Lyophilisation, Zentrifugen, Chromatographie-Einheiten etc.) stark mit LPS kontaminiert waren. Dieses Problem konnte letztlich nur durch die Neueinrichtung eines komplett neu ausgestatteten "PG-Labors" in einem andern Laborgebäude gelöst werden. Das unter Endotoxin-freien Bedingungen in diesem Labor hergestellte sPG (sPG<sub>UZ</sub>) zeigte dann auch identische biologische Eigenschaften wie das sPG, das in der ersten Förderperiode im Projekt A1 verwendet und dort von Prof. Dr. R. Dziarski (sPG<sub>RD</sub>) zur Verfügung gestellt wurde. Damit war eines der ersten Teilprobleme in diesem Projekt einem relativ kurzen Zeitraum gelöst.

Wir haben uns danach in diesem Projekt aber nicht nur mit der Herstellung von Endotoxin-freiem löslichem PG beschränkt, sondern uns auch mit der Frage beschäftigt, welcher Teil oder welche Teilstruktur des sPG für die biologischen Eigenschaften des sPG verantwortlich sind. Hierzu wurde grob angereichertes sPG mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) weiter aufgetrennt und sowohl chemisch als auch biologisch weiter analysiert. Wir konnten hieraus PG Teilstrukturen mit MurNAc-GlcNAc-Disaccharid-Fragmente mit unterschiedlichen Peptidketten identifizieren. Allerdings war dieses Verfahren nicht geeignet große Mengen an reinen Substanzen und Partialstrukturen für biologische Tests herzustellen. Es hat sich bei der Herstellung von sPG herausgestellt, dass die Darstellung mittels unter Antibiotika angezogenen *S. aureus* vor allem zeitaufwendig ist. Daher wurden alternative Methoden der Extraktion und Präparation von löslichen Peptidoglycan Fraktionen aus unlöslichem Peptidoglycan (uPG), welches den Hauptanteil des Gesamtglycans in *S. aureus* ausmacht, angegangen. Diese Arbeiten wurden in der zweiten Hälfte des PG-projektes durchgeführt, sie führten zu den folgenden Ergebnissen:

Aus uPG wurden mittels enzymatischem Abbau lösliches PG dargestellt. Hierzu haben wir verschiedene enzymatische Abbauprozesse getestet. Mittels Lysozym-Behandlung (Muramidase) von 50 mg uPG konnten, nach anschließender GPC (TSK HW-40), insgesamt 4 mg (8 % w/w) lösliche PG Fraktionen isoliert werden. Diese Menge entspricht dem Erwartungswert der Literaturangaben sollte aber im Laufe des Projektes noch weiter verbessert werden soll. Wir haben an verschiedenen Verfahren zur Darstellung von PG-Partialstrukturen mittels PG-abbauenden Enzymen (Lysozym, Trypsin, Pronase, Amidase) gearbeitet und diese versucht zu optimieren, um genügend Material für chemische und biologische Experimente zur Verfügung zu haben. Die einzelnen Fraktionen des ersten Lysozym-Abbaus von PG-Fragmenten aus uPG wurden eingehend mittels GC, GC-MS, HPLC und "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight – Mass Spectrometry" (MALDI-TOF-MS) untersucht. Hierbei konnten verschiedene

Partialstrukturen mit einem MurNAc-GlcNAc-Disaccharid und variierenden Peptidketten mittels MALDI-TOF-MS bestimmt werden. In diesen Peptid-Fragmenten waren die dem Disaccharid proximalen Peptid-Domänen Ala-iGln-Lys konstant (stem peptides), die "Quervernetzungseinheiten" (interpeptide bridges – meist (Gly)<sub>5</sub>-Reste dagegen stärker variabel als das in der Literatur berichtet. Wir fanden mittels MS Analyse verschiedene Modifikationen des, die neben Gly, Ser, Val und Asx besaßen. Damit konnten wir einerseits bereits bekannte PG-Strukturen in *S. aureus*, andererseits konnten wir auch erstmals Hinweise auf eine wesentlich höhere Strukturvielfalt bei den variablen Peptidanteilen erhalten. Leider konnte dieses Verfahren nur zu chemisch-analytischen Präparationen verwendet werden und war, trotz eingehender Optimierung, nicht geeignet ausreichende Mengen an reinen Disaccharid-Peptidfragmenten für eine vollständige chemische Analyse und vor allem nicht für biologische Experimente zu liefern. Dennoch erschien uns dieser Ansatz erfolgversprechend und wir werden ihn in einem Fortsetzungsprojekt weiter vorantreiben.

Bei der Anzucht der *S. aureus* Bakterien wurden, entsprechend der Antragsbeschreibung, neben uPG und sPG parallel noch die Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren gesammelt, vorgereinigt und mit diesem Material erste chemische Analysen durchgeführt. Dieser Teil des Projektes wurde jedoch infolge der überwältigenden Ergebnisse bei den biologischen Tests des sPG, zurückgestellt zugunsten der reproduzierbaren und verlässlichen Darstellung und Analyse von sPG, das sich als biologisch aktiv herausgestellt hatte und das von mehr als fünf Arbeitsgruppen (s. oben) inzwischen verwendet werden konnte. Die Ergebnisse dieser Kooperationen sind noch im Gange und werden erst in den kommenden Monaten abgeschlossen werden.

Nachdem in den ersten beiden (1998-1999) die endotoxinfreie Präparation von löslichem Peptidoglycan (sPG) im Vordergrund stand, haben wir in der zweiten Hälfte des Förderzeitraums im wesentlichen zwei Ziele verfolgt. Einerseits konnte die kontinuierliche Herstellung ausreichender Mengen an Endotoxin-freiem sPG für die kooperierenden Gruppen sichergestellt werden und andererseits haben wir die chemische Analyse von bioaktiven Substrukturen des sPG weiter vorangetrieben. Auf Grund guter technischer Voraussetzungen war es nun möglich, endotoxinfreies sPG aus dem Überstand, von unter  $\beta$ -Lactam Antibiotika angezogenen *Staphylococcus aureus*, nach der Methode von Rosenthal und Dziarski (1994, *Meth. Enzymol.*, **235**: 253-285) in ausreichender Menge herzustellen und zu isolieren. Es zeigte sich, dass alle Chargen unseres sPG nur in Spuren mit Endotoxin kontaminiert waren, und lediglich mit einem LAL-Wert weit unter dem Schwellenwert der Makrophagen-Aktivierung behaftet war (< 0.5 pg LPS/mg PG). Darüber hinaus konnten wir

mit entsprechenden Modifikationen bei der Anzucht der Bakterien die Ausbeute an sPG weiter verbessern. Somit stand im Berichtsjahr endotoxinfreies sPG in ausreichender Menge für weitere biologische Tests, die in verschiedenen Laboratorien innerhalb des Sepsis-Verbundes durchgeführt wurden zur Verfügung (s. unten).

Die Verfügbarkeit von großen Mengen sPG (> 100 mg) ermöglichte es uns dieses weiter aufzureinigen und durch eine weitere Anreicherung der biologisch aktiven Subfraktionen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) an einer TSK- 40 Säule vorzunehmen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels chemischer Analysen auf ihre Komponenten [Zucker (GLC-MS), Aminosäuren (HPLC)] untersucht (Bausteinanalyse). Darüberhinaus auch mittels Methoden, welche die Analyse des gesamten, intakten Moleküls gestatten [Massenspektrometrie (MALDI-MS, ‚matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry‘ und Kernresonanzspektroskopie (NMR)]. Besonders auffallend war die hohe Variation bei den Sub-Strukturen der Stamm- und Zwischenpeptiden (cross-linking stem- and interlinking peptide bridges), wohingegen die Strukturelemente des Glycans  $\{[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}_p\text{NAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-MurNAc-(1}\rightarrow\text{)]}_{n=1}\}$  im wesentlichen konstant blieben. Dort konnten keine der bekannten Modifikationen im MurNAc (de-NAc, OAc, Sulfat, Phosphat) festgestellt werden. Diese Strukturmodifikation könnte allerdings auch auf die artifizielle Bedingungen der Biosynthese des sPG unter  $\beta$ -Lactam Einwirkung zurückgeführt werden.

So fanden wir, dass im *S. aureus* sPG Peptidsegmente, neben den erwarteten Aminosäuren der Stamm und Zwischenpeptide [Alanin, iso-Glutamin, Lysin und Glycin (Ala, iGln, Lys, Gly)] signifikante Mengen an Serin (Ser) in denen der Glycin-Anteil durch 2-3 Mole Ser ersetzt worden ist. Auch wurde in Tests mit humanen Monozyten gefunden, dass nicht das hochmolekulare sPG (MW 100 – 50 kDa) sondern ein kleineres Teilfragment der Größe ~ 7 - 10 kDa, biologische Wirkung entfaltet (TNF $\alpha$ ). Es muss in diesem Zusammenhang jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Partialstrukturen des sPG auf Gewichtsbasis nie eine höhere spezifische Aktivität gegenüber den Rohpräparaten gezeigt haben. Diese ersten Befunde könnten auch ein Hinweis darauf sein, dass das hier verwendete biologische „read-out-system“ (Aktivierung von humanen Monozyten) besonders sensitiv auf synergistische oder multifaktorielle Effekte reagiert.

Unsere Strukturanalysen (GLC-MS, HPLC, MALDI, NMR) der aktiven Sub-Fraktionen haben darüber hinaus ergeben, dass mittelgroße sPG-Polymere (7 - 10 kDa) erwartungsgemäß noch nicht homogen waren und vor allem in der Peptid-Seitenkette strukturelle Variationen aufwiesen. Weitere Analysen mittels ‚reversed phase‘ HPLC haben sodann ergeben, dass diese Fraktionen höchst inhomogen und nur unter hohem

Substanzverlust weiter anzureichern waren, weshalb eine präparative Darstellung dieser bioaktiven Subfragmente mittels HPLC im Berichtsjahr notwendig wurde. Diese ist leider noch nicht mit dem gewünschten Erfolg gelungen. Die für eine NMR-Analyse erforderliche Milligramm-Menge konnten auf diese Weise noch nicht erreicht werden.

Aus diesen Gründen haben noch am Ende der Förderperiode eine Kooperation mit den Labors von Prof. Phillippe Moreillon (Lausanne University, Switzerland) und Prof. Tetsuo Shiba (Peptide Research Institute, Osaka, Japan) begonnen, die uns natürliche und synthetische Stammpeptide aus *S. aureus* zur Verfügung gestellt haben (**Majcherczyk, P.A.**, et al., JBC, 274: 1999, 12537 - 12543). Wenngleich diese Substanzen, die ausschließlich aus Peptidfragmenten bestanden, keine biologischen Aktivitäten zeigten, waren sie doch wertvolle Referenzverbindungen für die weitere Strukturanalyse mittels MALDI-TOF-MS und vor allem NMR.

Es hat sich im Verlauf des Berichtsjahres auch herausgestellt, dass die Darstellung mittels unter  $\beta$ -Lactam Antibiotika angezogenen *S. aureus* (sPG) problematisch und zeitaufwendig ist. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass diese Methode höchstwahrscheinlich Strukturartefakte liefert, die zwar für die Darstellung biologisch aktiver Subfraktionen geeignet ist, die aber für die Strukturanalyse des nativen PG als unbrauchbar angesehen werden muss. Deshalb haben wir begonnen mit kombinierten Methoden der Extraktion und Präparation von löslichen Peptidoglycan Fraktionen aus unlöslichem Peptidoglycan (uPG) bzw. intaktem PG zu isolieren, welches den Hauptanteil des Gesamtglycans in *S. aureus* ausmacht. Leider konnte das durch verschiedene enzymatische Abbauverfahren (z.B. Lysozym-Behandlung, Muramidase) hergestellte lösliche PG, trotz verschiedener Modifikationen (z.B. Anwesenheit von Detergentien, Kombination von chemischen und enzymatischen Abbauverfahren) nicht weiter verbessert werden, sodass das gesamte Projekt im Berichtsjahr immer noch mit dem sPG aus dem  $\beta$ -Lactam-Ansatz bestritten werden musste. Unsere Ergebnisse deuten an, dass bestimmte Strukturvariationen in der Glycan-Kette existieren. So ist z.B. bekannt, dass freie Aminogruppen (oder OAc-Gruppen) im Muraminsäure-Rest zur Hemmung der PG-abbauenden Enzyme führen und auf diese Weise kann der Muramidase-Abbau nicht quantitativ erfolgen. Versuche uPG zu N-acetylieren (oder zu de-O-Acetylieren) und dann einer zweiten Muramidase-Behandlung zu unterziehen wurden begonnen. Leider befindet sich dieser Zugang zu löslichen PG-Präparaten aus uPG noch in den methodischen Anfängen. Ein abschließendes Urteil kann aus dem gegenwärtigen Kenntnisstand noch nicht gefällt werden. Um Diversifikationen zu vermeiden

haben wir uns daher im Berichtsjahr bei den biologischen Tests weiter auf das sPG aus dem  $\beta$ -Lactam Ansatz konzentriert.

## II. 1.2. Biologische Arbeiten

Im Rahmen des beantragten Vorhabens war die Isolierung und Reinigung von biologisch aktivem löslichem Peptidoglycan (sPG) aus den Kulturüberständen von *S.aureus* etabliert worden und erste Testungen *in vitro* durchgeführt worden. Es hatte sich gezeigt, dass sPG verschiedene Zellen des adaptiven und nicht-adaptiven Immunsystems *in vitro* aktivieren kann.

Nachdem jetzt eine genügende Menge von Endotoxin-freiem sPG zur Verfügung stand, wurden in einer Zusammenarbeit mit der Gruppe von Frau Prof. Dr. D. Männel (Regensburg), Herrn Dr. K. Heeg (Marburg) und Herrn Dr. C. Kirschung (München) erste Voruntersuchungen zur biologischen Aktivität von sPG in Tiermodellen durchgeführt.

Das Tiermodell der Galaktosamin-behandelten Maus ist ein biologisches Testsystem, in dem die Produktion von TNF *in vivo* sehr empfindlich dargestellt werden kann. Durch die Vorbehandlung von Mäusen mit Galaktosamin werden die Mäuse hochempfindlich gegenüber geringste Mengen von TNF. Diese geringen Mengen von TNF verursachen einen toxischen Leberschaden, der zum Tode der Tiere führt. Es zeigte sich in den Voruntersuchungen von Herrn Prof. Dr. K. Heeg und auch von Herrn Dr. C. Kirschning, dass nach Injektion selbst von 3 mg sPG per Maus, diese Galaktosamin-vorbehandelten Mäuse überleben. Die bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass sPG, wenn es i.v. oder i.p. injiziert wird, in Mäusen nicht die Produktion von TNF hervorruft. Die Ursache hierfür ist ungeklärt zumal Mausmakrophagen sich durchaus mit sPG zur TNF Freisetzung *in vitro* stimulieren lassen.

In einem weiteren Tiermodell wurde der letale Ausgang einer Blinddarmligation und -perforation (CLP) überprüft. In diesem Model verursacht die CLP eine letale Infektion des Peritoneums mit Darmbakterien. Frühere Untersuchungen in dem Labor von Frau Prof. Dr. D. Männel (Universität Regensburg) haben gezeigt, dass eine Vorbehandlung der CLP mit Lipopolysaccharid zu einem Schutz gegenüber des letalen Ausgangs der CLP führt. In diesem Modell haben Herr Dr. B. Echternacher und Frau Prof. Dr. D. Männel die Wirkung von sPG untersucht. In ersten Experimenten zeigte sich, dass sPG ebenso wie LPS einen Schutz

gegenüber der letalen CLP hervorruft. In weiteren Untersuchungen sollen diese vorläufigen Ergebnisse verifiziert werden und der Mechanismus des sPG induzierten Schutzes geklärt werden.

Neben sPG werden weitere Strukturen, wie Lipopeptide, Lipoteichonsäuren und andere Glycolipide als biologisch relevante Induktormoleküle angesehen werden, die in der Lage sind Monozyten zu über den "Toll-like receptor 2" (TLR2) zu aktivieren. Interessanterweise sind diese weiteren Induktormoleküle keine reinen Kohlenhydrate (Oligosaccharide, Polysaccharide), Peptide oder Glycopeptide sondern ausschließlich lipophile Moleküle (Lipopeptide, Glycolipide). Durch die ausgewiesene Expertise unseres Labors in der chemischen und biologischen Analyse von Glycolipiden war es daher naheliegend, im Rahmen des laufenden Projektes, neben den sPG-Fragmenten auch solche putative aktiven Lipide mit einzubeziehen. Es lässt sich beim gegenwärtigen Stand der Kenntnis nicht ausschließen, dass die vermeintlich aktiven sPG-Fraktionen allesamt lipoide Strukturen, wahrscheinlich als 'Kontaminationen' enthalten haben, da diese bereits in picomolaren Konzentrationen messbare biologische Aktivitäten zeigen und in diesen Konzentrationen mit chemischen Methoden alleine nicht nachweisbar sind.

## II.2. Voraussichtlicher Nutzen

Unsere Untersuchungen dienen dazu,

a) die Struktur des Peptidoglycan eingehender zu Beschreiben, insbesondere die räumliche Sekundärstruktur die zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise der äußeren Bakterienmembran führen kann und

b) die inflammatorische Wirkung bakterieller Komponenten, hier PG, zu beschreiben. Unsere Ergebnisse können so zu einem besseren Verständnis der Mechanismen, die zu einem letalen septischen Schock führen, beitragen.

## II.3. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die für das Vorhaben von Bedeutung waren.

**Siehe neuere Publikationen unter "Fachliteratur (I.4)"**

## II.4 Liste eigener Publikationen von Vorhabensergebnissen

1. E.Th.Rietschel, J.Schletter, B.Weidemann, V.El-Samalouti, T.Mattern, **U.Zähringer**,

- U.Seydel, H.Brade, H.-D.Flad, S.Kusumoto, R.Dzarski, and **A.J.Ulmer**: Lipopolysaccharide and Peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microbioal Drug Res.* 4:37-44 (1998).
2. **A.J. Ulmer**, R. Dziarski, V. El-Samalouti, E.Th. Rietschel, and H.-D. Flad: CD14, an innate immune receptor for various bacterial cell wall components. In: *Endotoxin in Health and Disease* (Eds. H.Brade, S.M.Opal, S.N.Vogel, and D.C.Morrison) Marcel Dekker Inc., New York, pp 463-472 (1999)
  3. R.Dziarki, **A.J.Ulmer**, and D.Gupta: Interactions of CD14 with components of Gram-positive bacteria. *Chem. Immunol.* 74:83-107 (2000)
  4. R.Dziarki, **A.J.Ulmer**, and D.Gupta: Interactions of bacterial lipopolysaccharide and peptidoglycan with mammalian CD14. In: *Glycomicrobiology* (Ed. R.J. Doyle), Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y., pp 145-186 (2000)
  5. S.G.Plötz, A.Lentschat, H.Behrendt, W.Plötz, L.Hamann, J.Ring, E.Th.Rietschel, H.-D.Flad, and **A.J.Ulmer**: The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood* 97:235-41 (2001).
  6. **A.J. Ulmer**, E.Th. Rietschel, **U. Zähringer**, and H.Heine: Lipopolysaccharide: Structure, bioactivity, receptors, and signal transduction. *TIGGs* (in press).
  7. S. Zeuke , **A. J. Ulmer**, **U. Zähringer**, H. A. Katus, and H. Heine: Activation of human coronary artery but not umbilical vein endothelial cells by Peptidoglycan. (submitted)

Publizierte Abstracts:

1. K. Marienfeld, A. Lentschat, H. Koenig, R. Dziarski, E.T. Rietschel, H.D. Flad, and **A.J. Ulmer**: Activation of endothelial cells by beta-1,4-glycan of b.subtilis. *Immunobiology* 220: 552 (1999).
2. K.Marienfeld, A.Lentschat, **U.Zähringer**, H.Heine, N.Reiling, H.Koenig, R.Dziarski, H.-D.Flad, and **A.J.Ulmer**: Activation of endothelial cells by the backbone of peptidoglycan,  $\beta$ -1,4-glycan. *J.Endotox.Res.* 6:179 (2000).
3. H.Heine, A.Schromm, **U.Zähringer**, D.Rossignol, E.Lien, D.Golenbock, H.-D.Flad, and **A.J.Ulmer**: Peptidoglycan-induced TLR2 dependent NF- $\kappa$ B translocation in CHO cells can not be blocked by LPS antagonists. *J.Endotox.Res.* 6:139 (2000).
4. H. Heine, **U. Zähringer**, D. Rossignol, E. Lien, D.T. Golenbock, H.-D. Flad, and **A.J. Ulmer**. LPS-antagonists fail to block TLR-2 dependent NF- $\kappa$ B translocation in CHO cells induced by peptidoglycan. *J Leuk Biol Supplement* :22 (2000)

Borstel, den 21.03.2002

.....  
Prof. Dr. A.J. Ulmer

.....  
Priv.-Doz. Dr. U. Zähringer