

Schlussbericht

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

Gemeinsames Projekt A1/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 Zellwandbestandteile 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 größerer 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 β -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 (Lipopolysacchari, 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 Adhensionsmolekülen, 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 (α -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- α , interleukin-1 β 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.