

## **2 Einleitung**

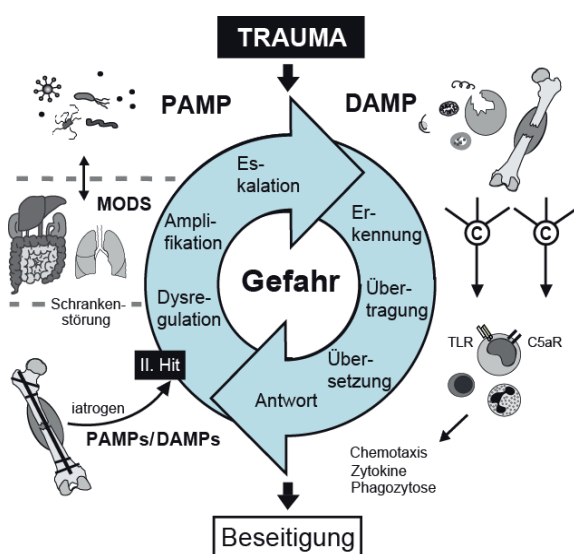
### **2.1 Immunologische Traumfolgen**

Ein ausgeprägtes Trauma im Sinne einer Mehrfachverletzung verlangt dem Körper und insbesondere dem Immunsystem in der Akutsituation ein hohes Maß an Kompensation und Regenerationsvermögen ab. Darüber hinaus ist das Immunsystem an den konsekutiv ablaufenden Reparaturvorgängen grundlegend beteiligt. In vielen Fällen wird jedoch im Verlauf eine unverhältnismäßige systemische Entzündungsantwort beobachtet, wobei die Inzidenz einer zusätzlichen bakteriellen Infektion, einer Sepsis, mit der Schwere des Verletzungsmusters korreliert [57]. Trotz intensiver und vielversprechender Forschung auf diesem Gebiet seit über zwei Jahrzehnten bleibt die Sepsis eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen [43]. Eine niederländische Studie erfasste eines der größten Probleme der modernen Sepsistherapie, die klinische Früherkennung. Die befragten Assistenzärzte waren in den Bereichen Diagnose und Behandlung sehr gut geschult, weniger jedoch in der rechtzeitigen Erkennung septischer Symptome [49]. Als entscheidender Faktor zur erfolgreichen Intervention kristallisiert sich mehr und mehr die zeitliche Komponente heraus. Neben der Identifikation möglicher therapeutischer Angriffspunkte steht daher die Entwicklung zuverlässiger diagnostischer Möglichkeiten im Vordergrund.

### **2.2 Molekulare Gefahrenantwort nach Polytrauma**

Im Falle einer Pathogenexposition nach traumatischem Zellbarriereverlust wird die initiale Gefahrenerkennung des Körpers durch sogenannte PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, „pathogen associated molecular patterns“) vermittelt. Dies sind molekulare Strukturen, die sich in einer Vielzahl von Mikroorganismen finden, nicht jedoch im körpereigenen Gewebe. Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen diese molekularen Strukturen und reagieren mit einer prompten Entzündungsantwort vor Ort. Ein Beispiel hierfür sind Lipopolysaccharide (LPS), welche sich in der äußeren Hülle Gram negativer Bakterien befinden und von Toll-like Rezeptoren (TLR) beispielsweise auf Monozyten oder dendritischen Zellen erkannt werden. Antigenpräesentierende

Zellen des Immunsystems können aber nicht nur durch exogene Pathogene aktiviert werden, sondern auch durch körpereigene, bei Zell- und Gewebeschäden frei werdende Moleküle oder Signale. Diese sogenannten DAMPs (Gefahren-assoziierte molekulare Muster, „danger associated molecular patterns“) sind endogene Gefahrensignale, deren Freisetzung ebenfalls eine Entzündungsantwort mit dem Ziel der lokalen Gefahrenbeseitigung auslöst und vorantreibt. PAMPs und DAMPs interagieren teilweise mit denselben Rezeptoren („pattern recognition receptors“ (PRRs), z.B. TLR2 und TLR4) auf Zellen des Immunsystems, trotz erheblicher Unterschiede der Liganden. Die nachgeschaltete Immunantwort unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen auf verschiedensten Ebenen. Es kommt unter anderem zu einer raschen Aktivierung der Serinproteasen des Komplementsystems und des Gerinnungssystems [53]. Nicht jede Gewebeschädigung führt aber zu einer rein lokalen, zielgerichteten Entzündungsreaktion. Eine unangemessen stark ausgeprägte Immunantwort im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion äußert sich klinisch in Form von Hyperthermie oder Hypothermie, Leukozytose oder Leukopenie, Tachypnoe und Tachykardie, wobei ein SIRS („systemic inflammatory response syndrome“) definitionsgemäß bei Nachweis von bereits zwei dieser Symptome vorliegt. Im Falle einer zusätzlich vorhandenen Infektion spricht man von einer Sepsis. Posttraumatische Komplikationen, operative Eingriffe oder intensivmedizinische Interventionen können die immunologische Entgleisung weiter antreiben, wobei letztlich das Multiorganversagen droht.



**Abb. 1:**

**Modell der posttraumatischen Gefahrenerkennung und -beseitigung sowie Gefahreneskalation auf immunologischer Ebene**

DAMP = „danger associated molecular pattern“

PAMP = „pathogen associated molecular pattern“

TLR = „Toll-like“ Rezeptor

C5aR = Komplement C5a Rezeptor

MODS = Multiorgandysfunktionssyndrom

II. Hit = operative und nicht operative Interventionen, Komplikationen

[modifiziert nach Huber-Lang et al., DFG Antrag KFO 200 „Die posttraumatische Entzündungsantwort“ 2009, die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. M. Huber-Lang]

Bekanntermaßen existieren Mechanismen zum Schutz von körpereigenem Gewebe nach DAMP-Aktivierung, z.B. auf dem Wege einer Co-Rezeptor vermittelten Inhibierung der intrazellulären Signaltransduktion, worüber u.a. die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kontrolliert werden kann. Eine DAMP-vermittelte Gefahrenantwort kann somit selektiv reguliert werden [53]. Das intakte Immunsystem kann zwischen gefährlichen und nicht gefährlichen Signalen unterscheiden [35]. Es erfüllt damit viel mehr als nur die Warnfunktion vor „Fremdem“, es detektiert vielmehr „Gefahren“ für die körpereigene Gewebeintegrität, was eine Grundvoraussetzung ist für eine fein abgestimmte, der Bedrohung angemessene Reaktion [53]. Eine wichtige Rolle in der Erkennung von Gefahrenmolekülen und bei der Feinregulation der Gefahrenantwort spielt das Komplementsystem. Es trägt wirksam zur Inaktivierung von Pathogenen, zur Identifikation und Beseitigung beschädigter körpereigener Zellen sowie zum Schutz von gesundem Gewebe bei, und erfüllt damit eine wesentliche Funktion in der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts des Körpers [42].

### **2.3 Das Komplementsystem**

Die Einzelkomponenten des Komplementsystems C1-C9 werden in der Leber synthetisiert und zirkulieren in ihrer inaktiven Form im Plasma. Klassischerweise führt die Pathogen-assoziierte Aktivierung der Komplementkaskade über einen der drei Hauptaktivierungswege zu einer Lyse der Zielzelle. Der klassische Weg wird durch IgG- oder IgM-Immunkomplexe, aber auch durch C-reaktives Protein (CRP), virale Proteine oder das Serum-Amyloid-Protein, sowie verschiedene Polyanionen (z.B. RNS) aktiviert [13]. Die Formation des C1-Komplexes führt zur Spaltung der Komponenten C2 und C4. Die Interaktion von Mannose-bindendem Lektin (MBL) mit bakteriellen Oberflächenproteinen initiiert den Lektin Weg. Durch die Anlagerung von MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1,-2,-3) entsteht ein Enzymkomplex, der wiederum in der Lage ist, C2 und C4 zu spalten. Eine weitere Möglichkeit beschreibt der alternative Weg, ausgelöst durch Oberflächenmerkmale von Bakterien, LPS, aber auch CRP [13] oder Autoantikörper [12]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MBL C3 auch in Abwesenheit von C2 spalten, und damit den alternativen Weg aktivieren kann [52]. C3 ist zudem einer ständigen spontanen

Hydrolyse zu C3-(H<sub>2</sub>O), einem funktionellen Korrelat von C3b, ausgesetzt, was dazu führt, dass der alternative Weg in geringem Maße permanent aktiviert wird. Allen drei Aktivierungswegen gemein ist die Formation einer C3-Konvertase, gefolgt von einer C5-Konvertase. Diese Enzymkomplexe sind in der Lage, C3 bzw. C5 zu spalten und somit die Anaphylatoxine C3a und C5a freizusetzen. Die C5-Konvertase führt schließlich durch Abspaltung von C5a zur Bildung von C5b und anschließend zur schrittweisen Bildung des Membranangriffskomplexes, bestehend aus den Komponenten C5b-9. Dieser vermag Zellen oder Bakterien zu perforieren, was zu ungehindertem Ionenaustausch und anschließender Lyse führt [31], [19]. Daneben sind einige Proteasen des Gerinnungs- und des fibrinolytischen Systems in der Lage als C3- bzw. C5-Konvertasen zu fungieren (FXa, FXIa, Plasmin, Thrombin), die Anaphylatoxine C3a und C5a freizusetzen und selbst in Abwesenheit von C3 die Komplementkaskade zu initiieren [23], [3], [2].

Die Abbildung wurde aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

**Abb. 2:**  
**Schematische Darstellung der Komplementaktivierung** [58], modifiziert nach [3]. Neben dem klassischen Weg, dem Lektin Weg und dem alternativen Weg der Komplementaktivierung sind Proteasen des Gerinnungs- und des fibrinolytischen Systems imstande die Komplementfaktoren C3 und C5 zu spalten.

## 2.4 Generierung und Funktion der Anaphylatoxine C3a und C5a

Bei den aktivierten Komplementfaktoren C3a und C5a handelt es sich um potente Anaphylatoxine, die durch die C3- bzw. C5-Konvertase aus den zentralen Komplementfaktoren C3 und C5 abgespalten werden. Alternativ dazu können sie durch Enzyme freigesetzt werden, die unter Umgehung der drei bekannten Aktivierungswege als Konvertasen fungieren [13]. Das C3a Fragment besteht aus 77 Aminosäuren und ist ca. 9 kDa schwer [39], [25]. Zwei kurze Helices und ein langer, helikal angeordneter Bereich formen den Kern des Moleküls [39]. Verantwortlich für die biologische Aktivität ist das C-terminale Ende, insbesondere Arginin auf Position 77, welches mit dem spezifischen C3a-Rezeptor (C3aR) auf den Zielzellen interagiert. Desarginylierung durch die Carboxypeptidase N führt zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität [7], [4], [50]. C5a ist ein ca. 14 kDa schweres Glykoprotein, bestehend aus 74 Aminosäuren, 36% davon sind identisch mit der Aminosäuresequenz des C3a-Moleküls [39]. Vier antiparallele  $\alpha$ -Helices, verbunden durch drei interhelikale Loop-Segmente (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>), bilden den Kern des C5a-Moleküls, dessen Tertiärstruktur über Disulfidbrücken stabilisiert wird. In diesen Kernstrukturen befinden sich Bindungsregionen, die zusammen mit dem beweglichen carboxyterminalen Ende für die Interaktion des C5a-Moleküls mit seinem Rezeptor verantwortlich sind [22]. Auch C5a wird im Plasma durch die Abspaltung des carboxyterminalen Arginins inaktiviert [50]. Der C5a-Rezeptor (C5aR, CD88) wird auf vielen Entzündungs-assoziierten Zelltypen, insbesondere Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, aber auch auf zahlreichen anderen Zellen exprimiert, was sich in der großen Vielfalt physiologischer und pathologischer, C5a-vermittelter Zellreaktionen spiegelt. Der C5aR weist, ebenso wie der C3aR, strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit anderen entzündungsrelevanten Rezeptoren auf: es handelt sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus 7 transmembranären Domänen vom Rhodopsin-Typ [4], [22], [16], [17]. Funktionell sind die Komplementspaltprodukte C3a und C5a hoch wirksame Anaphylatoxine, die alle klassischen Zeichen einer Entzündung (Tumor, Dolor, Rubor, Calor, Functio laesa) hervorrufen können [13]. Beide nehmen Einfluss auf die Phagozytenmigration, die Relaxation glatter Muskulatur, die Degranulation von Mastzellen sowie die Aktivierung von Granulozyten. Die konsekutive Freisetzung vasoaktiver Substanzen bewirkt eine Steigerung der

Gefäßpermeabilität [39], [17]. Daneben können eosinophile Granulozyten stimuliert und zur Enzymfreisetzung veranlasst werden [11]. Im Gegensatz zu C3a wirkt C5a zudem als direktes Chemokin für neutrophile Granulozyten, und ist imstande, deren phagozytotische Aktivität zu steigern [17], [11]. C3a und C5a erfüllen zudem zahlreiche regulatorische Funktionen, sie sind unter anderem in Vorgänge des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes (Apoptose) eingebunden [13]. Bei mangelnder Regulation des Komplementsystems kann sich dieses jedoch auch gegen gesundes Gewebe richten. Die übersteigerte Freisetzung der Anaphylatoxine spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung komplexer Krankheitsbilder und ist unter anderem assoziiert mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko [54], entzündlichen und thrombotischen Gefäßereignissen [40], der Schocklunge (ARDS) [27] sowie allergischem Asthma [66]. Besonders ausgeprägt zu beobachten sind die Auswirkungen einer unangemessen starken Komplementaktivierung in der septischen Entzündungsantwort [63].

## **2.5 Die posttraumatische Komplementantwort**

C5a ist vor allem im Kontext der Sepsis bereits intensiv untersucht und als relevanter Faktor bei verschiedenen pathophysiologischen Ereignissen identifiziert worden. Die posttraumatisch entstehende Sepsis ist assoziiert mit einer massiven Aktivierung des Komplementsystems, vor allem des alternativen Weges, und einer dadurch erhöhten Plasmakonzentration des Anaphylatoxins C5a [63]. Die extensive Freisetzung von C5a bewirkt eine Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten (PMN), im Besonderen kompromittiert sie deren Fähigkeit zur Phagozytose, zur chemotaktischen Antwort, sowie zur Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur oxidativen Abwehr von Bakterien. Dadurch wird schließlich die Neutralisierung von bakteriellen Eindringlingen behindert [24], [18]. C5a ist zudem mitverantwortlich für die Freisetzung entzündlicher Mediatoren. Durch die Blockade sowohl von C5a (z.B. mit einem spezifischen Antikörper) als auch des C5aR (z.B. mit einem C5aR-Antagonisten) kann die Funktion der neutrophilen Granulozyten größtenteils aufrecht erhalten, die Anzeichen für Multiorganversagen (MOV) deutlich verringert, und die Überlebensrate von septischen Versuchstieren drastisch erhöht werden [18], [21], [10]. C5L2, ein zweiter, hoch-affiner Rezeptor für C5a, spielt ebenfalls

eine Rolle in C5a vermittelten septischen Reaktionen. In septischen Mäusen ohne C5a-Rezeptor (C5aR<sup>-/-</sup> bzw. C5L2<sup>-/-</sup>) ist die Freisetzung entzündlicher Mediatoren um mehr als 60% reduziert [44] und auch in septischen Tieren, die das C5-Molekül nicht synthetisieren können (C5<sup>-/-</sup>), werden Zytokine in deutlich vermindertem Umfang freigesetzt; vergleichbares gilt in Abwesenheit von C3 [14]. Die Blockade des C5aR kann weiterhin die Entwicklung einer Sepsis-assoziierten Gerinnungsstörung (Koagulopathie) in Grenzen halten [32], was dafür spricht, dass C5a auch in der Sepsis-assoziierten Dysfunktion der Homöostase eine große Rolle spielt. Dieses Wissen exponiert C5a als überlebensrelevanten Faktor im septischen Geschehen und rechtfertigt die Untersuchung weiterer Interaktionen.

## **2.6 Posttraumatische Aktivierung der Serinproteasensysteme**

Nach ausgeprägtem Gewebetrauma, vor allem bei zusätzlichem Vorliegen eines Volumenmangels mit klinisch relevanter Schocksymptomatik, erfolgt häufig innerhalb weniger Minuten eine überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems. Diese akute traumainduzierte Koagulopathie (ATC) geht einher mit einer unkontrollierten synchronen Blutungs- und Gerinnungsneigung [15]. Ebenso wird eine ausgeprägte unkontrollierte Entzündungsantwort in Form einer systemischen Mediatorfreisetzung bis hin zu septischen Komplikationen beobachtet. Als zentraler Katalysator hierfür gilt die Aktivierung des Komplementsystems [63]. Im Rahmen der posttraumatischen Aktivierung besteht eine enge Verknüpfung beider Serinproteasensysteme, bestehend aus der Gerinnungs- und der Komplementkaskade [34]. Es mehren sich die Hinweise, dass nicht nur das posttraumatische entzündliche Geschehen das Gerinnungssystem beeinträchtigt, sondern auch Gerinnungsfaktoren die Entzündungsreaktionen in beträchtlichem Maße beeinflussen [3], [63], [34]. Verschiedene Serinproteasen des Gerinnungssystems, wie z.B. Thrombin [23], Plasmin, aber auch Faktor Xa und XIa, sind imstande das Komplementsystem zu aktivieren und die biologisch aktiven Anaphylatoxine C3a und C5a freizusetzen [2]. Die Interaktion von Komplement- und Gerinnungssystem spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle in der septischen Entgleisung nach Polytrauma mit mikrovaskulären Störungen, Organ-Blut-Schranken-Störungen, bis hin zum



Organversagen [33]. Vor wenigen Jahren wurde eine Serinprotease beschrieben, die aufgrund einiger Funktionen dem Koagulationssystem zugeordnet werden kann und deren Aktivitätszustand unter anderem von Substanzen aus geschädigten Zellen beeinflusst wird [56]. Im Kontext der posttraumatischen, septischen Entzündungsantwort wurde dieses Enzym bisher jedoch nicht untersucht.

## **2.7 Die „Factor Seven Activating Protease“ (FSAP)**

Das „hyaluronan binding protein 2“ (HABP2) wurde zunächst in einer Bindung mit Hyaluron entdeckt und charakterisiert [9]. Den Namen „Factor Seven Activating Protease“ (FSAP) verdankt das Enzym seiner Fähigkeit, Faktor VII spalten zu können [47]. Weitere, synonym verwendete Bezeichnungen sind: HABP („hyaluronan binding protein“) und PHBP („plasma hyaluronan-binding protein“). Diese Protease (FSAP) wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und liegt im Plasma in einer Konzentration von ca. 12 µg/ml vor [29], [30], bei Frauen wurden tendenziell höhere FSAP-Konzentrationen und Aktivitätslevel beobachtet [46]. Das zu Grunde liegende HABP2 Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q25.3) [41]. Synthetisiert wird FSAP als einkettiges, ca. 60 ± 5 kDa schweres Protein, welches durch Autoaktivierung in die Form seines funktionalen Heterodimers mit einer leichten Kette (ca. 30 kDa) und einer schweren Kette (ca. 45 kDa), verbunden durch eine Disulfidbrücke, übergeht [9], [29]. Die Struktur des Enzyms wird gegenwärtig untersucht, identifiziert wurden bereits drei „epidermal-growth factor (EGF)-like“ Domänen, eine Kringle-Domäne sowie eine Serinproteasen-Domäne [9]. Ein positiv geladener Bereich innerhalb der EGF-like Domäne 3 ist, neben anderen Domänen, verantwortlich für die Regulation der enzymatischen Aktivität [1], [37]. Negativ geladene Makromoleküle wie Polyamine, Heparin oder RNS, aber auch Histone [36], [38], [62], katalysieren über diese Bindung die Autoaktivierung von FSAP, können aber auch, wie am Beispiel von Heparin, als Co-Faktoren verschiedener Serinproteaseninhibitoren (wie z.B. Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 [PAI-1] oder Antithrombin) die Neutralisierung von FSAP beschleunigen [36]. Ein azidotisches Milieu führt sowohl zu reduzierter Aktivierung als auch zu reduzierter Degradierung des Enzyms [55]. Ca<sup>2+</sup> führt zu



einer Stabilisierung der einkettigen Form des Enzyms und damit zu einer verlangsamten Aktivierung, wirkt aber auch stabilisierend auf die aktive Form von FSAP und verstärkt dadurch dessen enzymatische Aktivität [29]. Die aktive Form von FSAP kann bereits nach kurzer Zeit von Serinproteaseninhibitoren wie Alpha1-Proteinase-Inhibitor, Alpha2-Plasmin-Inhibitor, Antithrombin, C1-Inhibitor oder PAI-1 inhibiert und in Komplexen gebunden werden, wobei die Inaktivierung im Plasma hauptsächlich durch den C1-Inhibitor, aber auch durch Alpha2-Antiplasmin vermittelt wird [30], [48], [8]. Diese zahlreichen Regulationsmechanismen sprechen für ein komplexes Aufgabenspektrum der Serinprotease FSAP. Wie bereits erwähnt ist FSAP imstande, den Faktor VII des extrinsischen Aktivierungsweges der Koagulationskaskade unabhängig von „Tissue factor“ (TF) zu aktivieren [47]. Neben dieser pro-koagulativen Funktion konnten aber auch fibrinolytische Eigenschaften in Form einer Aktivierung einkettiger Plasminogenaktivatoren nachgewiesen werden [48]. Weiterhin ist FSAP in die Regulation der Zellhomöostase eingebunden. Die PDGF-BB („platelet-derived growth factor BB“) abhängige Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskulatur kann in vitro durch FSAP inhibiert werden, was einer proatherogenen Entwicklung entgegenwirkt [28]. Eine Besonderheit ist das Auftreten von Nukleotidpolymorphismen, bisher identifiziert wurden der Marburg-I- und der Marburg-II-Polymorphismus. Klinisch relevant ist vor allem der Marburg-I-Polymorphismus (G534E oder G511E) auf dem HABP2-Gen [45]. Die damit einhergehende geringere proteolytische Aktivität von FSAP ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [26], Hepatitis C Virus (HCV)-induzierte Leberfibrose [59], Carotisstenose [60], Artherosklerose [30] und möglicherweise thrombo-embolische Ereignisse [20]. Weiterhin präsentieren Personen mit diesem Polymorphismus bei unveränderter Aktivität von Faktor VII, eine verringerte Prourokinase-Aktivität [45] und damit ein tendenziell prothrombotisches Profil. Dies impliziert eine Gefäß-protective Rolle der regulär auftretenden Form von FSAP [30], [45]. Erst kürzlich wurde eine FSAP-Aktivierung bei Patienten während einer postoperativen Sepsis oder eines septischen Schocks beschrieben. Endogenes FSAP kann auch durch Kontakt mit apoptotischen oder nekrotischen Zellen aktiviert werden [56], [64] und im Gegenzug dazu die Freisetzung von Nukleosomen aus nekrotischen Zellen

katalysieren [65]. Die Plasmakonzentration zirkulierender Nukleosomen korreliert eng mit der Schwere und der Prognose einer Sepsis [56], FSAP könnte daher als Marker für Gewebeschäden fungieren.

Die Abbildung wurde aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

**Abb. 3: Modifizierte schematische Darstellung der Struktur von FSAP** [9], [45]. Hervorgehoben wurden die Lokalisationen der Nukleotidpolymorphismen Marburg I und Marburg II, ebenso die aktiven Bindungsstellen.

## 2.8 Zielsetzung

Die Protease FSAP wurde bereits in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen untersucht und als wichtiger Faktor des Gerinnungssystems identifiziert. Eine genauere Betrachtung der Aktivierung im Rahmen posttraumatischer und entzündlicher Reaktionen, insbesondere der Effekt auf die angeborene Immunantwort, wurde bislang nicht angestellt. Diese Arbeit befasst sich daher mit den Auswirkungen einer massiven Gewebeschädigung auf den Aktivitätszustand von FSAP, dessen mögliche Funktion als DAMP, und den Einfluss auf die posttraumatische Entzündungsantwort, im Speziellen auf die Aktivierung des Komplementsystems. Untersucht wird die zugrunde liegende Hypothese, in welcher wir postulieren, dass FSAP nach schwerer Gewebeerletzung deutlich aktiviert ist und infolgedessen zu einer nicht kanonischen Komplementaktivierung führt.