

# **Funktionelle Analyse von Mutanten des LPS- bindenden Proteins (LBP)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie  
eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom-Biologin Jana Kristin Eckert  
geboren am 8.11.1975 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Christoph Marksches  
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Ralf R. Schumann  
2. Prof. Dr. rer. nat. Erwin Schneider  
3. Priv. Doz. Dr. rer. nat. Andra B. Schromm

eingereicht: 24.09.2008

Datum der Promotion: 09.03.2009



**Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung .....	3
Summary .....	4
1 Einleitung.....	5
1.1 Immunsystem.....	5
1.2 Die Rolle der TLR im angeborenen Immunsystem .....	5
1.3 LPS .....	9
1.4 Das LPS bindende Protein LBP und verwandte Proteine .....	11
1.5 LBP-LPS-Interaktion .....	14
1.6 Weitere Interaktionspartner von LBP: TLR2-Liganden.....	14
1.7 LBP als diagnostischer Marker.....	16
1.8 Genetische Variabilität des LBP .....	18
1.9 Ziele der Arbeit.....	20
2 Methoden .....	21
2.1 Herstellung der rekombinanten Proteine.....	21
2.1.1 Mutagenese.....	23
2.1.2 Klonierung .....	24
2.1.2.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	24
2.1.2.2 Restriktion mit BamH1 .....	25
2.1.2.3 Dephosphorylierung .....	25
2.1.2.4 Ligation.....	26
2.1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	26
2.1.4 Transformation in <i>E. coli</i> .....	26
2.1.5 Herstellen von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> .....	27
2.1.6 Restriktion mit EcoRV.....	28
2.1.7 Sequenzierung .....	29
2.1.8 Zellkultur .....	32
2.1.8.1 Zellzahlbestimmung .....	32
2.1.8.2 Transfektion.....	32
2.1.8.3 Expression der Proteine .....	33
2.1.9 Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	34
2.1.10 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	35
2.2 SNP-Analyse.....	35
2.3 Serumgewinnung .....	37
2.4 Albuminentfernung .....	37
2.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
2.6 Westernblot .....	38
2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) ....	40
2.8 Stimulation von Zellen aus immortalen Zelllinien .....	41
2.8.1 RAW264.7 .....	41
2.8.2 THP1 .....	41
2.8.3 Präparation und Stimulation humaner PBMC.....	41
2.9 Doppel-Sandwich-Enzymgekoppelter Immuno-Absorbtions-Assay (DS-ELISA).....	42
2.9.1 Allgemein.....	42

2.9.2	Spezifikationen .....	44
2.9.3	hLBP - Bindungsversuch .....	45
2.9.4	Biotinylieren von Antikörpern .....	46
3	Material und Geräte .....	47
3.1	Puffer, Medien und Lösung .....	47
3.2	Antikörper .....	51
3.3	Standards, Primer und Enzyme .....	52
3.4	Zelllinien, <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide .....	53
3.5	Kommerzielle Kits und Lösungen .....	54
3.6	Spezielle Laborgeräte .....	55
3.7	Verbrauchsmaterial .....	55
3.8	Verwendete Software .....	56
4	Ergebnisse .....	57
4.1	Rekombinante Proteine .....	57
4.1.1	Allgemeine Beschreibung .....	57
4.1.2	Protein-Expression in eukaryotischen Zellen .....	58
4.1.3	Aufreinigung .....	59
4.1.4	Versuche in <i>E. coli</i> .....	61
4.2	Bindungsverhalten der LBP-Varianten .....	63
4.3	Die Mutante LBP-c998t .....	65
4.3.1	Populationsdaten zu SNP c998t .....	65
4.3.2	Bioinformatische Analyse .....	66
4.3.3	Darstellung der Mutante LBP-c998t im Westernblot .....	69
4.4	Beschreibung der humanen Seren .....	70
4.5	Zellstimulation .....	75
4.5.1	RAW264.7 .....	76
4.5.2	THP1 .....	78
4.5.3	Humane Monozyten .....	80
5	Diskussion .....	82
5.1	Auswirkung und Bedeutung der LBP-Mutation c998t .....	82
5.2	Interaktion der TLR-Liganden mit LBP .....	89
6	Ausblick .....	96
7	Anhang .....	97
	Literatur .....	113
	Abkürzungsverzeichnis .....	125
	Danksagung .....	131
	Eidesstattliche Erklärung .....	132

## Zusammenfassung

LBP vermittelt im Wirtsorganismus die direkte Immunantwort auf bakterielle Liganden wie das Lipopolysaccharid (LPS) von Gram-negativen oder Lipopeptide von Gram-positiven Bakterien. In dieser Arbeit wurde durch die Herstellung zweier Mutanten die Funktionsweise von LBP weiter aufgeklärt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine natürlich vorkommende Mutation des LBP (c998t), die an Position 333 zu einem Austausch der Aminosäure Prolin zu Leucin führt, hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf Struktur und Funktionalität des Proteins untersucht. Westernblot-Analysen des rekombinant hergestellten Proteins und humaner Seren von Mutationsträgern weisen auf einen Zerfall des mutierten Proteins hin. Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der Bindung bakterieller Liganden und einer deutlichen Reduktion der LBP-vermittelten Zytokinausschüttung von Immunzellen. Der Genpolymorphismus, welcher zum Auftreten der Mutation führt, hat eine Allelfrequenz von 0,072 in einer gesunden europäischen Population und betrifft dadurch ca. 15 % der Bevölkerung in heterozygoter Ausprägung. Homozygote Polymorphismusträger wurden in der Altersgruppe 20 - 60 Jahre in gesunden Probandenkollektiven bisher nicht gefunden, bei Kindern zwischen 9 und 11 Jahren war er selten (0,5 %). In Untersuchungen an Patientengruppen konnte gezeigt werden, dass es durch die Mutation zu einer deutlich erhöhten Mortalität bei Patienten mit septischen Komplikationen und einer durch Gram-negative Erreger verursachten Pneumonie kommt. Unsere Ergebnisse zur eingeschränkten Funktion des LBP-c998t bieten eine erste Erklärung dafür, wie diese Mutation vermutlich die Fähigkeit, Krankheiten zu bewältigen, beeinträchtigt. Innerhalb dieser Arbeit ging es des Weiteren um die Analyse der Bindung von bakteriellen Liganden an LBP. Dabei wurde eine potentiell gemeinsame Bindungsstelle für Liganden untersucht, die von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien stammen und später von den Toll-like Rezeptoren (TLRs) 2 und -4 erkannt werden. Dazu wurden Bindungsversuche zwischen Lipopeptiden und LPS mit einer zweiten LBP-Variante (LBP-E94/95) durchgeführt. In dieser Mutante sind positiv geladene Aminosäuren innerhalb der LPS-Bindungsstelle (Arginin 94 und Lysin 95) gegen negativ geladene Glutaminsäure ausgetauscht. Beim LPS führt dies zu einem Bindungsverlust. Auch für die Lipopeptide war durch die Mutationen die Interaktion mit LBP beeinträchtigt, was die These einer gemeinsamen Bindungsstelle von TLR2- und TLR4-Liganden an das Protein weiter unterstützt.

Schlagworte:

Innates Immunsystem, LPS-bindendes Protein, Toll-like Rezeptoren, Lipopeptide, Funktionelle Analyse

## Summary

LBP enhances the innate immune reaction against bacterial ligands like LPS from gram negative or lipopeptides from gram positive bacteria in the host. Here we investigated the function of LBP using two recombinant mutants of the protein. The first part of this work examines a natural occurring mutation of LBP (c998t) leading to an amino acid exchange of proline to leucine at position 333 with regard to the impact on structure and function of the protein. Western blot analyses of the recombinant protein and sera obtained from individuals differing in the LBP genotype indicate the disaggregation of the mutated protein. Thereby binding of bacterial ligands to LBP is diminished and the LBP mediated cytokine secretion of immune cells is reduced. The gene polymorphism leading to the occurrence of the mutation is present with an allelic frequency of 0.072 in healthy German populations thus affecting about 15 % of the population in a heterozygous form. We did not find any homozygous polymorphism carriers in the adult population (aged 20 - 60 years) and it was rare (0.5 %) in children between 9 – 11 years. A recent study has shown that this LBP-SNP led to a higher mortality in patients with septic complications and gram negative pneumonia. The results presented here, showing the negative impact on the function of LBP due to the mutation, may therefore be a first explanation on how this mutation affects the ability of people to deal with disease. Within this work binding of ligands to LBP was also explored. It was investigated whether ligands which are later recognized by Toll-like receptors (TLRs) 2 and – 4 share a common binding site on LBP. Assays with immobilized lipopeptides and LPS were performed with a second mutated LBP (LBP-E94/95). In this protein positively charged amino acids located within the LPS binding site of LBP (arginine 94 and lysine 95) were exchange against negatively charged glutamic acid. LPS binding to LBP is diminished completely. Here we showed that binding of lipopeptide to LBP is affected likewise, furthermore supporting the hypothesis of a common binding site for TLR2- and TLR4- ligands.

### Keywords:

Innate immune system, LPS binding protein, Toll-like receptors, lipopeptide, functional analysis

## 1 Einleitung

### 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem von Wirbeltieren ist in zwei Teile gegliedert: Die so genannte angeborene (engl. innate) und die erworbene (engl. acquired) Immunreaktion. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene. Diese werden anhand konservierter molekularer Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) erkannt (Janeway 1989), die in der Regel aus Zellwandbestandteilen oder Nukleinsäuren bestehen. Zu diesen Molekülen gehören z.B. das LPS der Gram-negativen Bakterien (Poltorak et al. 1998) oder virusspezifische RNS- und DNS-Sequenzen (Alexopoulou et al. 2001; Bauer et al. 2001). Für die Erkennung sind verschiedene intra- und extrazelluläre Rezeptoren (engl. pattern recognition receptor, PRR) zuständig. Die Aktivierung dieser führt zur Initiierung einer Signaltransduktionskaskade, die über die Translokation von Transkriptionsfaktoren zur Induktion einer Vielzahl von Genen führt, die u.a. für proinflammatorische Zytokine und Chemokine kodieren und so deren Ausschüttung einleiten. Parallel kommt es zu einer verstärkten Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, die unter anderem zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und damit zur Einleitung der erworbenen Immunreaktion erforderlich sind. Die Effektorzellen der erworbenen Immunantwort sind die B- und T-Lymphozyten, die über spezifische Rezeptoren und durch die Bildung von Antikörpern mit den Krankheitserregern interagieren und diese eliminieren. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort, kann die adaptive Immunreaktion als Folge einer Krankheit oder, falls möglich, einer Vakzinierung eine lebenslange Immunität erzeugen (Janeway Jr. et al. 2001).

### 1.2 Die Rolle der TLR im angeborenen Immunsystem

Eine wichtige Gruppe der PRRs sind die TLRs (Medzhitov et al. 1997; Rock et al. 1998; Kopp and Medzhitov 1999). Sie werden in vielen Körperzellen exprimiert, so auch auf bzw. in den an der angeborenen Immunität beteiligten Immunzellen. Zu ihnen gehören z.B. Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten. Die Bezeichnung „Toll-like Rezeptor“ deutet auf die Ähnlichkeit dieser Rezeptoren mit dem „Toll“-Protein von *Drosophila melanogaster* hin. Dieses wurde ursprünglich als Gen identifiziert, welches in der Embryonalentwicklung die dorso-ventrale Achsenbildung kontrolliert (Anderson et al. 1985). Das Protein ist auch in die Immunabwehr der Fliege

involviert, in dem es die Expression des anti-fungalen Peptids Drosomycin vermittelt (Lemaitre et al. 1996). Das „Toll“-Protein von *Drosophila* und die TLRs der Säugetiere sind Typ-I-Transmembranproteine. Sie sind extrazellulär bzw. endosomal durch leucinreiche sich wiederholende Sequenzen (engl. leucine-rich repeats, LRRs) charakterisiert. Intrazellulär werden sie durch eine Region charakterisiert, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Interleukin (IL)-1- und IL-18-Rezeptoren, als Toll/IL-1-Rezeptor-Homolog- (TIR-) Domäne bezeichnet wird (Kaisho and Akira 2002). Im Menschen wurden bisher zehn TLRs beschrieben (Tab.1), nur für neun von ihnen sind Liganden bekannt. In der Maus wurden zusätzlich die TLR11-13 identifiziert. Von diesen zusätzlichen Maus-TLRs ist nur für den TLR11 ein Ligand, das Profilin von Protozoa, sowie ein Bestandteil von uropathogenen *Escherichia (E.) coli* beschrieben worden (Zhang et al. 2004; Lauw et al. 2005; Yarovinsky et al. 2005). Obwohl das Gen für TLR11 auch im Menschen vorkommt, wird es aufgrund eines Stop-Codons nicht komplett exprimiert. TLRs werden von einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert. Man unterteilt sie nach ihrer Lokalisation in der Zelle in zwei Gruppen: Die TLR1, -2, -4, -5, -6 und -10 sind in der äußeren Zellmembran lokalisiert und haben nach außen gerichtete LLR-Domänen. Sie erkennen überwiegend bakterielle Zellwandbestandteile. Die TLR3, -7, -8 und -9 werden intrazellulär in Endosomen exprimiert, die LRRs ragen in das Innere der Endosomen. Sie erkennen bakterielle oder virale Nukleinsäuren (O'Neill 2006; Becker and O'Neill 2007).

**Tab. 1: Humane TLRs mit einer Auswahl von Liganden**

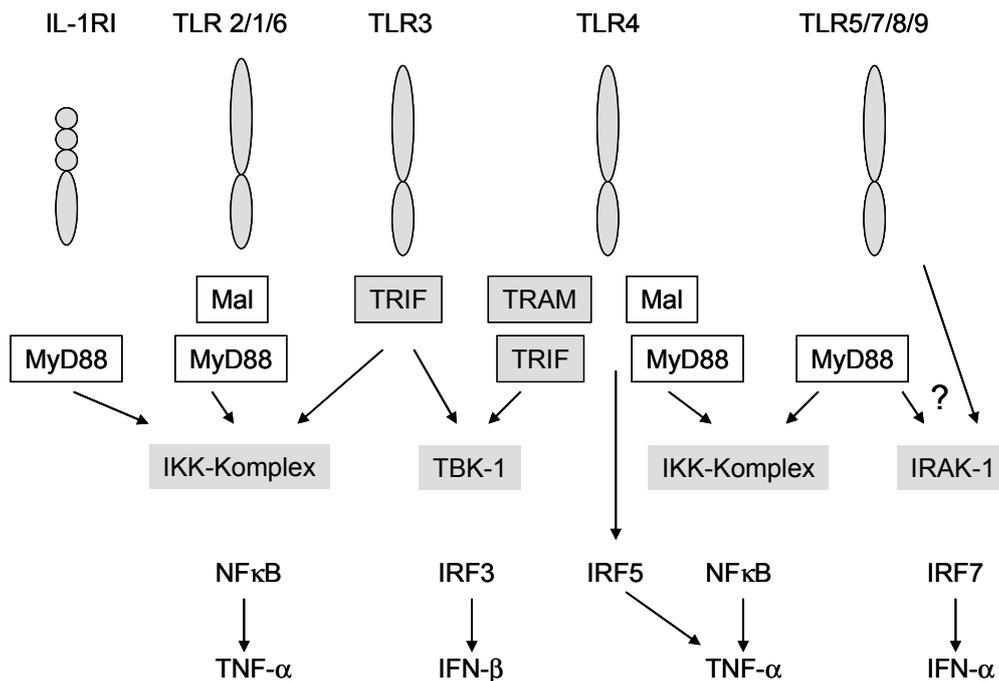
Dargestellt sind die zehn im Menschen bekannten TLRs mit dem Ort ihrer Expression innerhalb der Zelle und einigen beispielhaften Liganden. CpGs: Cytosin-Guanin-Wiederholungen, ds: doppelsträngig, HSP: Hitzeschockprotein, LP: Lipopeptid, LPS: Lipopolysaccharid, si: small interfering, ss: einzelsträngig (Krishnan et al. 2007).

TLR	Lokalisation	Liganden
TLR1	Zellmembran	LP3
TLR2	Zellmembran	LP2, LP3, LTA, Zymosan
TLR3	Endosom	dsRNS, Poly-IC, virale RNS, siRNS, endogene RNS
TLR4	Zellmembran	LPS, HSP60 und -70, Taxol
TLR5	Zellmembran	Flagellin
TLR6	Zellmembran	LP2, LTA, Zymosan
TLR7	Endosom	ssRNS, R848
TLR8	Endosom	ssRNS, R848
TLR9	Endosom	CpGs
TLR10	Zellmembran	Unbekannt

Die genaue Struktur sämtlicher TLRs ist bisher nicht aufgeklärt. Es gibt jedoch erste Kristallisationen und daraus resultierende Strukturmodelle zu den Ektodomänen der TLR3, TLR4/MD2 und TLR2/1. Die dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne des TLR3 zeigt dabei eine hufeisenförmige Anordnung der ligandenbindenden Domäne, die aus den LRRs besteht (Bell et al. 2005; Choe et al. 2005). Sie nehmen die Form einer Spule an. Während diese Struktur im Fall von TLR3 eine Einheit bildet, ist sie bei TLR2/1 und -4 in drei unterschiedliche, deutlich voneinander abgegrenzte Bereiche unterteilt (Jin et al. 2007; Kim et al. 2007). Sie unterscheiden sich dadurch von TLR3 und anderen LRR-haltigen Proteinen. Die postulierte Dimerisierung von TLRs, sei es als Homodimer wie TLR4 oder als Heterodimer wie bei TLR2/1, scheint sich durch die bisherigen Strukturaufklärungen zu bestätigen (Kirk and Bazan 2005). Ob die Dimerisierung der TLR zum Zwecke der Liganden-Bindung oder als dessen Folge entsteht, ist noch ungeklärt. Durch die Verwendung verschiedener Spulenwindungen (engl. loops), unterschiedlich in Sequenz und Länge und spezifisch für die verschiedenen TLRs, kann es zur Bildung unterschiedlicher Rezeptor- (Homo- oder Hetero-) dimere kommen. Dies würde eine mögliche Erklärung für das Phänomen darstellen, dass eine große Anzahl strukturell verschiedener Liganden für die TLRs gefunden wurde. Die Erkennung eines breiten Spektrums an Pathogen wird so ermöglicht. Die Interaktion mit den Liganden scheint nicht im Inneren der Rezeptoren stattzufinden, sondern in der V-förmigen Einbuchtung zwischen den dimerisierenden Strukturen (Jin et al. 2007).

Nach Interaktion eines Liganden mit der leucinreichen Domäne der TLRs, wird eine Signalübertragungskette aktiviert, die im Zellkern mit der Translokation von Transkriptionsfaktoren endet. Die TLR-Signaltransduktion wird durch verschiedene, die TIR-Domäne-enthaltende Adaptermoleküle, vermittelt. Dadurch kann auch intrazellulär die Signalspezifität gewährleistet werden (Vogel et al. 2003; Yamamoto et al. 2004). Zu ihnen zählen MyD88 (engl. myeloid differentiation primary response protein 88) (Medzhitov et al. 1998), TRAM (engl. TRIF related adaptor molecule) (Fitzgerald et al. 2003), TRIF (engl. TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$ ) (Yamamoto et al. 2002b) und Mal (engl. MyD88 adaptor like) (Fitzgerald et al. 2001), auch bekannt als TIRAP (engl. TIR domain-containing adaptor protein) (Horng et al. 2001).

Es gibt zwei Hauptsignaltransduktionswege, den MyD88- und den TRIF-abhängigen Weg (Abb. 1). Über MyD88 leiten alle TLRs außer TLR3 die Signale in die Zelle weiter.



**Abb. 1: Vergleich der Signalkaskaden von IL-1-Rezeptor-Typ-I (IL-1 RI) und den TLRs**

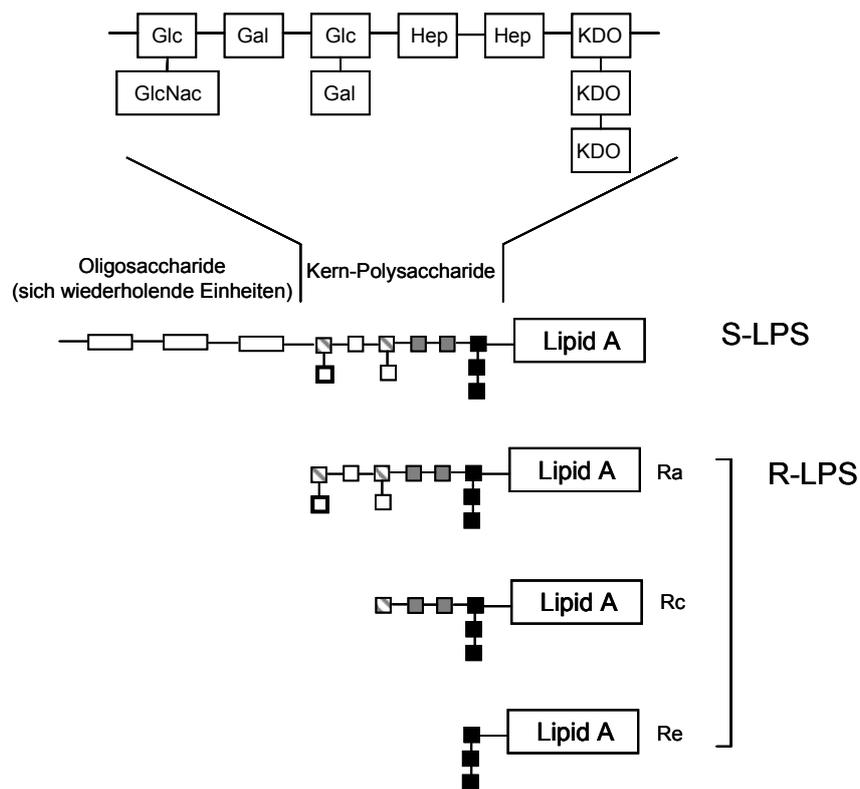
Von oben nach unten abgebildet sind die Rezeptoren, die entweder auf der Zelloberfläche (IL-1RI, TLR1, -2, -4, -5, -6) oder in den Endosomen (TLR3, -7, -8, -9) lokalisiert sind, die Adaptermoleküle (z.B. Mal), die Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF3) und ausgewählte induzierbare Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ ). NF $\kappa$ B: Transkriptionsfaktor, IKK: Inhibitor des NF $\kappa$ B-Kinase-Komplex, TBK: IKK-ähnliche Kinase, IRAK: IL-1-Rezeptor assoziiert Kinase, IRF: Interferon-regulierender Faktor (Transkriptionsfaktor), TNF: Tumornekrosefaktor, IFN: Interferon (Moynagh 2005; O'Neill 2006).

Über diese Signalkette wird der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert, der zur Induktion von Genen führt, die für proinflammatorische Zytokine kodieren, wie z.B. TNF- $\alpha$ . In diesen Signaltransduktionsweg ist für die TLR2 und -4 auch das Adaptermolekül Mal involviert (Yamamoto et al. 2002a). TLR3 verwendet ausschließlich den TRIF-Signalweg zur Induktion der Typ-I-Interferone (Yamamoto et al. 2002b; Kawai and Akira 2006). Diese MyD88-unabhängige Signalkette wird ebenfalls von TLR4 angesprochen, jedoch unter Einbeziehung von TRAM, dem vierten eine TIR-Domäne enthaltenden Adaptermoleküls (Yamamoto et al. 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TRAM eine Brückenfunktion für TRIF übernimmt, wie sie auch Mal für MyD88 innehat (Kagan and Medzhitov 2006; Kagan et al. 2008; Tanimura et al. 2008). Die Induktion von IFN- $\alpha$  und weiteren Typ-I-Interferonen erfolgt über einen speziellen, noch nicht abschließend aufgeklärten MyD88-abhängigen Signalweg, ausgelöst durch die TLR7, -9 und eventuell auch -8. Die Signalkaskade teilt sich vermutlich unterhalb von MyD88

und führt einerseits über eine NF $\kappa$ B-Aktivierung zur Ausschütten von TNF- $\alpha$ , andererseits über den Molekülkomplex CTTP (engl. cytoplasmic transductional-transcriptional processor) und den Transkriptionsfaktor IRF7 (engl. interferon regulatory factor) zur Sekretion von IFN- $\alpha$ . (Honda et al. 2004; Fitzgerald-Bocarsly et al. 2008).

### 1.3 LPS

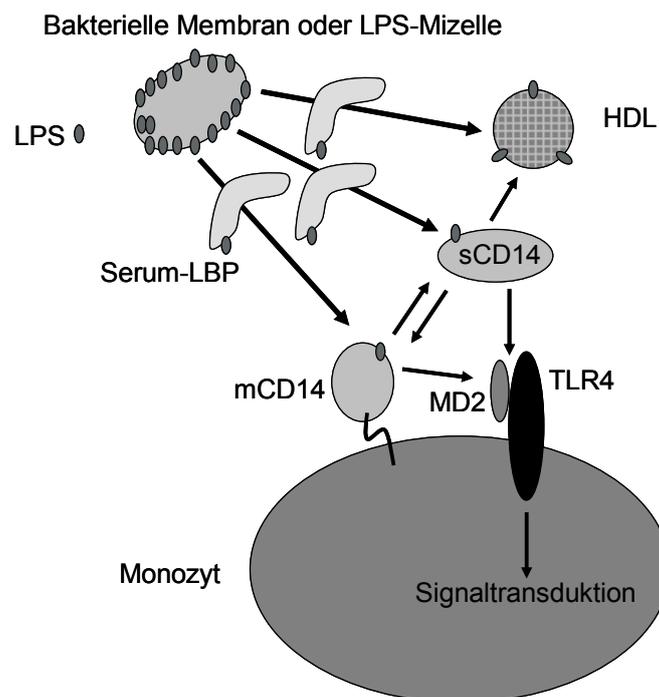
LPS, eine der Hauptkomponenten der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, ist der am besten charakterisierte Ligand für einen TLR, den TLR4 (Poltorak et al. 1998; Miyake 2004; Jerala 2007). LPS ist ein Glykolipid und besteht aus einem hydrophoben Lipid-Anteil, dem Lipid A, welches in der äußeren Schicht der bakteriellen Zellmembran lokalisiert ist, einem Kern-Polysaccharid und variablen hydrophilen Polysaccharidketten, die von der Bakterienzellwand weggerichtet sind (Raetz 1990).



**Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedene LPS-Formen**

Die LPS-Varianten sind unterteilt nach der Länge ihrer Polysaccharidketten (Huber et al. 2006). Es existieren zwischen den R-LPS-Formen Ra und Re verschiedene Übergangsformen mit unterschiedlichen Kernpolysaccharidketten. KDO (schwarzes Quadrat): 2-Keto-3-Desoxyoctonat; Hep (graues Quadrat): Heptose; Glc (gestreiftes Quadrat): Glukose; Gal (weißes Quadrat mit dünnem Rand): Galaktose; GlcNac (weißes Quadrat mit dickem Rand): N-Acetyl-Glukosamin.

Man unterscheidet im Hinblick auf die Polysaccharidketten und den daraus resultierenden Erscheinungsformen so genanntes „raues (engl. rough) R“-LPS und „glattes (engl. smooth) S“-LPS (Abb. 2). Das S-LPS B4:0111 von *Escherichia coli* (*E. coli*) kann z.B. aus Polysaccharidketten mit bis zu 50 Oligosaccharid-Einheiten bestehen und lässt die Bakterienkolonien auf Agarplatten glatt erscheinen. Beim R-LPS Re595 von *Salmonella* (*S.*) *minnesota* hingegen fehlen jegliche Polysaccharidketten, was in der Lichtmikroskopie zu einer rau aussehenden Oberfläche der Kolonien führt. Die biologische Aktivität des LPS wird über den konservierten Lipid A-Anteil vermittelt (Loppnow et al. 1990; Jiang et al. 2005; Zughair et al. 2005; Jerala 2007). So kann eine große Bandbreite an Gram-negativen Bakterien detektiert werden. Zur effektiven Signalübertragung benötigt TLR4 die Hilfe von mindestens drei Proteinen: MD2, das LPS-bindende Protein (LBP) und CD14, die zusammen den LPS-Rezeptorkomplex bilden (Gioannini et al. 2005).



**Abb. 3: Modell zur Interaktion von LPS mit Serum-LBP und CD14**

In der Abbildung ist ein Modell zur Interaktion von LPS mit dem LPS-Rezeptorkomplex dargestellt (Vesny et al. 2000): LBP bindet LPS aus LPS-Aggregaten und transportiert es zum HDL oder CD14 (s: lösliche oder m: membrangebunden). Vom CD14 wird es zum MD2/TLR4-Rezeptorkomplex transportiert, wo die Signaltransduktion in die Zelle initiiert wird.

Die Reaktionskette beginnt mit der Bindung von LPS an das lösliche LBP (Abb. 3). Es wird dann an das CD14-Molekül transportiert (Wright et al. 1990; Frey et al. 1992;

Hailman et al. 1994; Tobias et al. 1995). CD14 ist ein 55-kDa-Glykoprotein, welches entweder über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker in der Membran von Monozyten und Neutrophilen verankert ist (mCD14) oder als lösliche Form (sCD14) im Serum vorliegt (Haziot et al. 1988). Die Bindung zwischen CD14 und LPS ist nicht absolut spezifisch, denn es konnte gezeigt werden, dass auch mikrobielle Produkte Gram-positiver Bakterien und von Mykobakterien mit dem CD14 reagieren können (Pugin et al. 1994). CD14 dient wahrscheinlich der Konzentration und Präsentation des LPS am TLR4/MD2-Rezeptor. MD2 ist ein ca. 25 kDa großes Glykoprotein auf der Oberfläche von Zellen, das an TLR4 bindet (Shimazu et al. 1999). Die Koexpression von MD2 und TLR4 ist für die optimale Oberflächenverteilung und Funktion des LPS-Rezeptorkomplexes notwendig (Nagai et al. 2002). Auch vom MD2 existiert eine lösliche Form (sMD2) (Visintin et al. 2001). Es ist in der Lage über Disulfidbrücken zu polymerisieren und Oligomere zu bilden, die vermutlich mehr als einen TLR4 binden und so große LPS-Rezeptorkluster bilden. In MD2-defizienten Zellen ist sMD2 in der Lage die Immunreaktion gegen LPS über TLR4 zu vermitteln (Schromm et al. 2001). Entgegen frühere Annahme bindet das LPS nicht an TLR4, sondern an MD2 (Viriyakosol et al. 2001; Visintin et al. 2003). Diese Bindung könnte durch eine Strukturänderung im MD2 die Interaktion und Heterodimerbildung von MD2 mit TLR4 und so die Signaltransduktion in die Zelle auslösen (Kim et al. 2007).

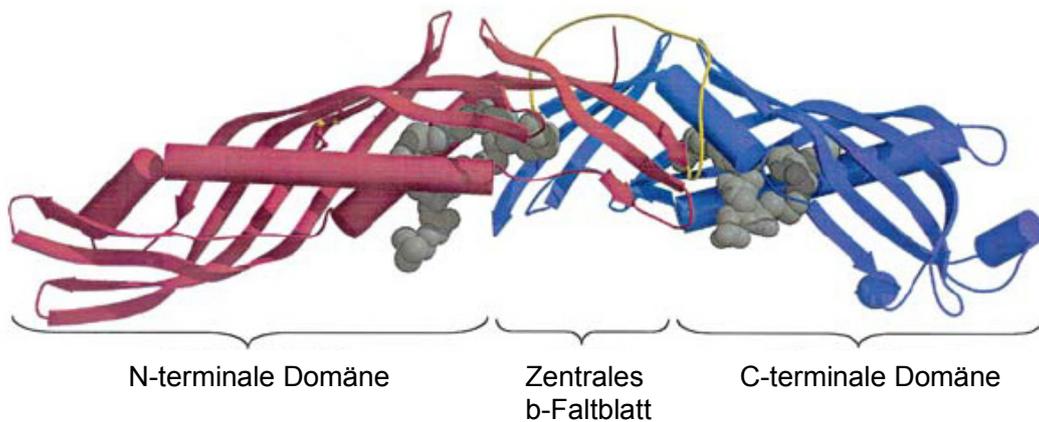
#### **1.4 Das LPS bindende Protein LBP und verwandte Proteine**

LBP hat im gesunden Menschen eine Serumkonzentration von 5-15 µg/ml, die im Falle einer Infektion oder während der so genannten Akutphasereaktion um das 10- bis 50-fache ansteigen kann (Froon et al. 1995; Zweigner et al. 2001). Das Protein besteht aus 452 Aminosäuren und wird als 50-kDa-Protein vor allem von Hepatozyten gebildet (Tobias et al. 1986; Ramadori et al. 1990; Schumann et al. 1990). Die Synthese von LBP konnte auch in Epithelzellen nachgewiesen werden, so z.B. in Haut, Lunge und Darm, sowie in den Muskelzellen der Lungenarterien und des Herzens (Su et al. 1994; Dentener et al. 2000; Fang et al. 2004; Ren et al. 2004). Das Gen für humanes LBP ist auf dem größeren Arm des Chromosom 20 (20q) lokalisiert, in der selben Region wie das „bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI), ein nah verwandtes Protein (Gray et al. 1993). Die DNS-Sequenz des LBP hat eine Länge von ca. 28,5 kb und besteht aus 14 Exons und 13 Introns (Hubacek et al. 1997). Sie codiert für eine Aminosäure (AS)-sequenz mit 452 AS und hat die typische 25-AS Signalsequenz, charakteristisch für sekretierte Proteine (Schumann et al. 1990).

LBP ist ein „Klasse-1-Akutphaseprotein“ (Schumann et al. 1996), dessen Transkription primär durch die Bindung von nuklearen Transkriptionsfaktoren an die Bindungsstellen APRF/STAT-3 und C/EBP aktiviert und durch synergistische Effekte der Zytokine IL-1/IL-6 oder IL-6/Dexamethason induziert wird. Die transkriptionelle Aktivierung kann jedoch auch durch andere Zytokine beeinflusst werden. Im Zusammenhang mit Morbus Crohn wurde entdeckt, dass IL-22 die LBP-Produktion beeinflusst. Es verstärkt die LBP-mRNS-Expression und die Proteinsekretion in der Leber, aber nicht in Lunge oder Niere, entweder allein oder im Zusammenspiel mit IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 (Wolk et al. 2007). Einen inhibierenden Einfluss auf die LBP-Freisetzung hat TGF- $\beta$ , gleichzeitig oder kurz nach der Stimulierung von Leberzellen (Hallatschek et al. 2004).

Die Struktur von LBP ist vermutlich der des BPI sehr ähnlich (Beamer et al. 1998), eines Protein, das man in neutrophilen Granulozyten findet. Die Proteine zeigen in ihrer Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 45 % und bilden gemeinsam mit weiteren, schwach homologen Lipidbindungsproteinen (Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP) und Phospholipid Transfer Protein (PLTP)) eine strukturell und funktionell verwandte Proteinfamilie (Tall 1995). LBP und BPI können über ihre gesamte Aminosäuresequenz hinweg einander angepasst werden, mit Ausnahme zweier Lücken von je einer Aminosäure im LBP. Diese liegen jedoch N-terminal in Bereichen, in denen sie für die Gesamt-Tertiärstruktur unerheblich sind. Es handelt sich um die AS 124 und 150 der BPI-Sequenz (entsprechend AS 148 und 174 in der LBP-Sequenz). Beide Proteine sind in der Lage, LPS zu binden. BPI zeigt dabei eine ca. 50-fach höhere Affinität gegenüber LPS als LBP und ist bakterizid gegen Gram-negative Bakterien (Gazzano-Santoro et al. 1994). Die Serumkonzentration von BPI liegt mit 5 - 70 ng/ml in gesunden Menschen jedoch ca. 1000-fach unter der von LBP (White et al. 1994). BPI neutralisiert LPS und blockiert seine Interaktion mit LBP, begünstigt die Phagozytose von Bakterien durch Leukozyten und verhindert so potentiell die Entzündungsreaktionen (Wilde et al. 1994; Iovine et al. 1997; Tobias et al. 1997). Aktuelle Untersuchungen weisen außerdem auf eine potentielle Rolle des Proteins für die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen hin, was zur Einleitung der adaptiven Immunantwort führen könnte (Schultz et al. 2007). BPI wird hauptsächlich in Vorläuferzellen von Neutrophilen gebildet und intrazellulär in deren zytoplasmatischen Granula gelagert (Weiss and Olsson 1987). Entgegen der ursprünglichen Annahme, die Expression von BPI sei auf diese Zellen beschränkt, konnte sie mittlerweile auch für verschiedene andere Zelltypen, wie mukosale Epithelzellen und Hautfibroblasten nachgewiesen werden (Canny et al. 2002; Reichel et al. 2003). BPI zeigt in Röntgenstrukturanalysen eine Bumerang-ähnliche Form, die aufgrund der Sequenz- und Funktionsähnlichkeiten auch für das

LBP angenommen wird (Beamer et al. 1997, 1998). BPI ist aus zwei strukturell ähnlichen, jedoch sequenziell unterschiedlichen Domänen (N-terminal und C-terminal) aufgebaut und über eine prolinreiche Sequenz verbunden (Abb. 4). Diese Verbindungssequenz bildet ein  $\beta$ -Faltblatt, während jede Domäne aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und 2 flankierenden  $\alpha$ -Helices besteht. Diese Strukturen bilden an der konkaven Seite des Proteins je eine apolare Tasche, in der ein Phosphatidylcholin-Molekül binden kann (Beamer et al. 1997). Die Frage, ob es diese Taschen auch im LBP gibt, und wenn ja, welche Funktion sie haben, ist bisher nicht geklärt.



**Abb. 4: Struktur von BPI**

Abgebildet ist ein Ribbon-Diagramm von humanem BPI (Beamer 2003). Die Aminosäuren in der N-terminalen Domäne (1–220) sind in magentarot gezeigt, die in der C-terminalen Domäne (250–456) in blau. Eine prolinreiche Sequenz (gelb) verbindet die beiden Domänen. In grau dargestellt sind die in den apolaren Taschen gebundenen Phosphatidylcholine.

Wie viele eukaryotische Proteine wird LBP durch Glykosylierung posttranslational modifiziert. Nach der Glykosylierung liegt LBP in Form von zwei, 58 und 60 kDa großen Glykoproteinen vor und wird, vermittelt über die 25 AS-langen Signalsequenz ins Blut sezerniert (Schumann et al. 1990). LBP existiert jedoch nicht nur in löslicher Form, sondern auch als in die Zellmembran integriertes Transmembran-Protein (Gutsmann et al. 2001; Müller et al. 2003). Es wird vermutet, dass in diesem Fall der positiv geladene N-Terminus mit der negativ geladenen Lipidmembran interagiert und das Protein so in die Membran eingelagert wird, dass die potentiellen Phospholipidtaschen innerhalb der Membran liegen, während N- und C-Terminus aus der Membran herausragen.

### **1.5 LBP-LPS-Interaktion**

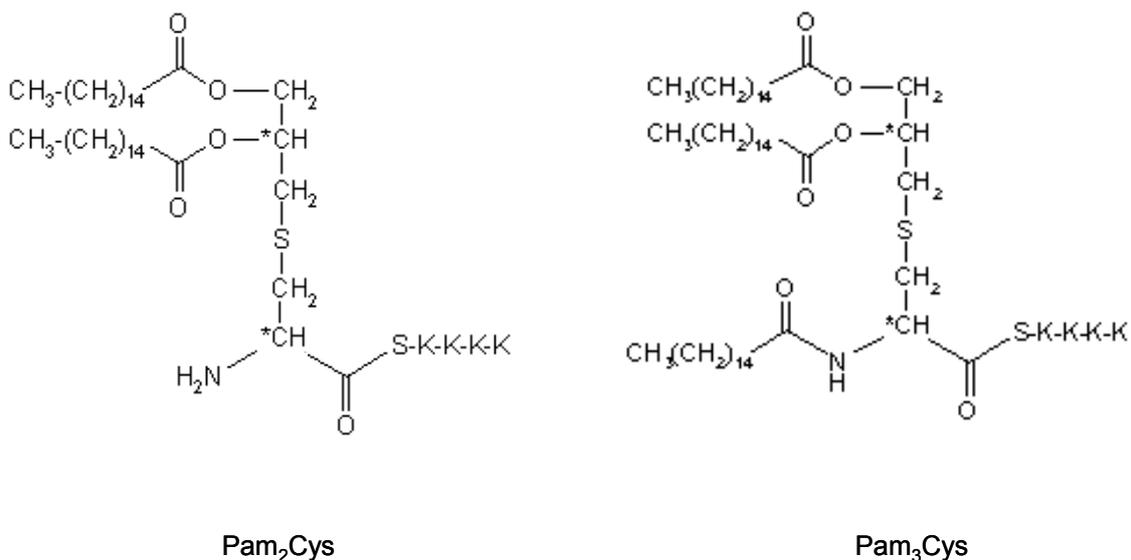
LPS wird u.a. beim Wachstum von Bakterien freigesetzt (Munford et al. 1984). Als amphiphiles Molekül führt es in wässrigem Medium, wie dem Blut, zur Mizellenbildung (Berg et al. 2002). Das Serum-LBP setzt LPS-Moleküle aus diesen LPS-Aggregaten frei und transportiert sie entweder zum CD14, CD14-abhängig zum HDL (engl. high density lipoprotein) oder CD14-unabhängig zu Plasma-Lipoproteinen (Schumann et al. 1990; Vesny et al. 2000). Die Bindung von LPS an LBP erfolgt wie beim BPI über den Lipid-A-Anteil des LPS (Tobias et al. 1989; Gazzano-Santoro et al. 1992). Die Bindung von LPS erfolgt im N-terminalen Bereich des LBP (Han et al. 1994; Theofan et al. 1994). Dort sind verschiedene positiv geladene Aminosäuren lokalisiert (Arginin 94, Lysin 95 und Lysin 99), deren Austausch gegen eine negative geladene Glutaminsäure dazu führt, dass LBP nicht mehr fähig ist, LPS zu binden (Lamping et al. 1996). Die Interaktion mit CD14 erfolgt hingegen über den C-terminalen Proteinanteil (Han et al. 1994; Theofan et al. 1994). Auch für das membranständige LBP konnte die LBP-abhängige Zellaktivierung durch LPS gezeigt werden (Müller et al. 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass LPS über das membranäre LBP vermittelt, ebenfalls in die Zellmembran eingelagert wird und dann mit der membranständigen Form des CD14 interagiert (Gutsmann et al. 2001).

Die funktionellen Auswirkungen der Interaktion von LBP mit LPS sind konzentrationsabhängig. Bei niedrigen LBP-Konzentrationen im Serum transportiert es LPS zum CD14, initiiert so die Signaltransduktion via TLR4/MD2 und leitet die Immunreaktion gegen Gram-negative Bakterien ein (Abb. 3). LBP erhöht so die Sensitivität der Zellen gegenüber LPS um das 100-1000-fache (Wright et al. 1990; Martin et al. 1992; Poltorak et al. 1998; Visintin et al. 2003). Hohe Serumkonzentrationen von LBP, wie sie während der Akutphasereaktion vorkommen, führen hingegen zu einer gegensätzlichen Wirkung (Zweigner et al. 2001). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass hohe LBP-Spiegel den LPS-Effekt auf Zytokinebene inhibieren und die Mäuse vor einem septischen Schock in Folge einer Infektion mit Gram-negativen Bakterien oder LPS schützen (Lamping et al. 1998). Dieser neutralisierende Effekt entsteht vermutlich durch den Transport des LPS in Lipoproteine wie das HDL (Wurfel et al. 1994) und durch, wie kürzlich vorgeschlagen, eine „stille“ Aufnahme des LPS in die Zellen, jedoch ohne das Auslösen einer Signaltransduktion (Hamann et al. 2005).

### **1.6 Weitere Interaktionspartner von LBP: TLR2-Liganden**

Neben der Rolle in der Erkennung von LPS und seines Transfers an CD14 und den TLR4/MD2-Rezeptorkomplex, ist LBP auch in die Vermittlung der Signaltransduktion

verschiedener TLR2-Liganden involviert (Schröder et al. 2004). Für TLR2 sind viele verschiedene Liganden beschrieben worden (Tabelle 1). Sehr gut untersucht sind die di- und triazylierten Lipopeptide (LP2 und LP3) von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, Mykobakterien und Mykoplasmen (Abb. 5). Bei der gleichzeitigen Stimulierung von humanen Monozyten mit LBP und Lipopeptiden konnte eine Erhöhung der Zytokinsekretion im Vergleich mit der Stimulation durch Lipopeptide allein nachgewiesen werden (Schröder et al. 2004). Auch eine direkte Bindung von LBP an Lipopeptide wurde hier gezeigt. Im Gegensatz zur Interaktion von LBP und LPS existiert dabei jedoch keine zweiphasige Dosis-Wirkungs-Kurve mit inhibierendem Effekt bei hohen LBP-Konzentrationen. Aus Wettbewerbsversuchen schlussfolgerten Schröder et al. (2004), dass die Bindungsstellen von LBP für die Liganden LPS und das diazylierte Lipopeptide identisch, für das triazylierte Lipopeptid jedoch unterschiedlich lokalisiert sind.



**Abb. 5: Strukturformel von Lipopeptiden**

Dargestellt sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten di- (Pam<sub>2</sub>Cys) und tri- (Pam<sub>3</sub>Cys) azylierten Lipopeptide: Auf der linken Seite befinden sich die Azylgruppen. SKKKK kennzeichnet den Peptid-Anteil der Lipopeptide bestehend aus einem Serin und vier Lysin. C: Kohlenstoff, H: Wasserstoff, O: Sauerstoff.

Die Interaktion der Lipopeptide mit der Zelle verläuft über die Heterodimerbildung von TLR2 mit TLR1 oder -6 (Ozinsky et al. 2000; Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002). Die ursprüngliche Annahme, dass diazylierte Lipopeptide wie das MALP-2 der Mykoplasmen ausschließlich mit dem TLR2/6-Rezeptorkomplex interagieren, während triazylierte Lipopeptide das Heterodimer TLR2/1 zur effektiven Signaltransduktion be-

nötigen, wurde kürzlich revidiert. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass nicht nur die Anzahl der Fettsäureketten entscheidend für die Wahl des Heterodimer ist, sondern auch deren Position sowie die Aminosäurefrequenz des Peptidanteils (Buwitt-Beckmann et al. 2005; Omuetti et al. 2005). Das bedeutet, ein Lipopeptid mit drei Fettsäuren ist für die Aktivierung von TLR2/1 nötig, aber nicht unbedingt ausreichend. Analoges gilt für die Aktivierung von TLR2/6 und diazylierte Lipopeptide (Buwitt-Beckmann et al. 2006). Ausschlaggebend scheint zusätzlich die Ladung der Aminosäuren des Peptidanteils zu sein. Unabhängig vom verwendeten Heterodimer wird intrazellulär derselbe Signaltransduktionsweg initiiert (Farhat et al. 2008). Die Bildung der TLR2-Heterodimere dient also der Erkennung eines größtmöglichen Spektrums verschiedener Lipopeptide.

### 1.7 LBP als diagnostischer Marker

LBP spielt eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Pathogenen, wie Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Die Expression von LBP wird dabei im Laufe der Akutphasereaktion deutlich erhöht. Die Akutphase folgt einer zunächst lokalen Reaktion des Körpers auf eine externe Bedrohung und führt über Mediatoren, wie IL-1 und TNF- $\alpha$  zu einer systemischen Reaktion, deren zentraler Bestandteil die veränderte Ausschüttung von Akutphaseproteinen der Leber ist (Baumann and Gaudie 1994; Schumann and Zweigner 1999). Die systemische Entzündungsreaktion (engl. systemic inflammatory response, SIRS) bezeichnet das klinische Bild, welches sich als Folge der Aktionen intrinsischer Mediatoren im Zuge einer Akutphasereaktion einstellt (Nyström 1998). Sie kann sowohl in Folge einer Infektion, als auch nach Trauma, schweren Verletzungen (z.B. Verbrennungen) oder Operationen auftreten. SIRS ist definiert durch die folgenden klinischen Parameter, von denen mindestens zwei präsent sein müssen:

- Körpertemperatur  $> 38$  oder  $< 36$  °C,
- Herzrate  $> 90$  Schläge/min,
- Atemrate  $> 20$  Atemzüge/min oder  $P_a\text{CO}_2 < 32$  Torr (4,3 kPa),
- Anzahl der weißen Blutzellen  $> 12000$  Zellen/mm<sup>3</sup> oder  $< 4000$  Zellen/mm<sup>3</sup> oder unreife (Band-) Formen.

Sepsis ist die systemische Reaktion auf eine Infektion mit mindestens zwei daraus resultierenden SIRS-Kriterien. Ursache für die Infektion können Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen sein. Der septische Schock wird durch das zusätzliche Auftreten von niedrigem Blutdruck trotz adäquatem Volumenersatz (systolischer Blutdruck  $< 90$  mmHg oder Reduktion um  $> 40$  mmHg von Grundlinie) davon abgrenzt. Pro Jahr er-

kranken in Deutschland ca. 100 - 150 000 Menschen an Sepsis, septischem Schock und schwerer Sepsis (Brunkhorst 2004; Engel et al. 2007). Die Mortalität liegt bei etwa 50 %. Sowohl die Erkennung als auch die Therapie der Sepsis ist schwierig. Mögliche Therapieschritte reichen von unterstützenden Maßnahmen wie künstlicher Beatmung oder der Kontrolle des Blutzuckerspiegels bis zur Kausaltherapie mit der Gabe von Antibiotika (Reinhart et al. 2007). Bei der Einhaltung dieser Leitlinien gibt es jedoch momentan noch deutliche Defizite (Brunkhorst et al. 2008). Oft wird falsch beatmet, der Blutzuckerspiegel nicht überwacht oder mögliche Medikationen (z.B. Hydrokortison) unterlassen. Auch die Diagnostik der Sepsis wird kontrovers diskutiert (Claessens and Dhainaut 2007). Die durch die Leitlinien gegebene Definition von SIRS und Sepsis wird als zu vielfältig und wenig spezifisch beurteilt (Alberti et al. 2005). Es wird nach einfachen, möglichst messbaren Variablen gesucht. Da Bestandteil einer Sepsis per Definition eine Infektion ist, könnten Akutphaseproteine, wie das LBP nützliche Helfer für die Indikation einer Störung der Homöostase innerhalb des Organismus und für das Überwachen von Krankheitsverläufen sein (Schumann and Zweigner 1999). Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Wert des LBP als diagnostischen Marker in Patienten mit SIRS und als potentiell prognostischen Marker bewerten. In verschiedenen Studien auf Intensivstationen mit einem durchschnittlichen Patientenkollektiv von 60 - 70 Personen lag die LBP-Serumkonzentration der Patienten mit SIRS/Sepsis oder septischem Schock generell höher als in den gesunden Kontrollgruppen (Froon et al. 1995; Prucha et al. 2003). Es besteht keine Assoziation zwischen LBP und dem Erreger einer Bakteriämie (Gram-negativ versus Gram-positiv). Oft gibt es nicht einmal eine Assoziation zwischen infektiös bedingter Sepsis oder SIRS. Voraussagen für das Überleben der Patienten waren nicht möglich. Bei schwerkranken Neugeborenen und Kindern zeigte LBP eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Unterscheidung zwischen nichtinfektiösem SIRS und bakterieller Sepsis in allen beteiligten Altersgruppen, jedoch mit der höchsten Genauigkeit bei Neugeborenen (Pavcnik-Arnol et al. 2004, 2007). Die LBP-Konzentrationen waren signifikant höher in der SIRS/Sepsis-Gruppe verglichen mit der SIRS/Nicht-Sepsis-Gruppe am Tag der Einlieferung bzw. einen Tag später. LBP war, verglichen mit den parallel untersuchten Parametern wie Procalcitonin (PCT), C-reaktives Protein (CRP), CD14 und LPS, der bessere diagnostische Marker. Im Gegensatz zu den Daten an erwachsenen Patienten (Prucha et al. 2003) konnte in einer weiteren Studie an Kindern gezeigt werden, dass erhöhte LBP-Serumkonzentrationen eindeutig mit bakterieller Infektion assoziiert sind (Ubenauf et al. 2007). Dies veranlassete die Autoren dazu, LBP für Kinder als Marker für eine bakterielle Infektion zu postulieren. All diese Studien betrachten jedoch sehr kleine Patientenkollektive. Größere Studien und zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob LBP sich als Marker zur Un-

terscheidung zwischen SIRS, Sepsis und septischem Schock oder auch für die Identifizierung bakterieller Infektionen im Kindesalter durchsetzt (Zweigner et al. 2006).

### 1.8 Genetische Variabilität des LBP

Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphisms, SNPs) bezeichnen Sequenzalternativen (Allele) in der genomischen DNS, die in normalen Individuen einer Population existieren (Brookes 1999). Das am seltensten vorkommende Allel tritt mit einer Häufigkeit von mindestens einem Prozent auf. SNPs können synonym oder nicht-synonym sein. Da es bei synonymen SNPs zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz kommt, werden sie auch als stille Mutationen bezeichnet (Zhang and Hewitt 2003). Nicht-synonyme SNPs verursachen hingegen einen Austausch der entsprechenden Aminosäure oder die Bildung eines Stop-Codons. Die Folgen sind eine veränderte Konformation oder auch Veränderungen in der post-translationalen Modifikation (z.B. Glykosylierung) des Proteins. Dies kann zu einer Funktionsbeeinträchtigung mit Auswirkung auf den Stoffwechsel oder das Immunsystem führen. Dadurch können einerseits Krankheiten begünstigt oder hervorgerufen werden, andererseits kann es auch zu schützenden Effekten kommen. Dies kann auch für einen SNP variieren, je nach auftretendem Genotyp (heterozygot versus homozygot), wie z.B. bei Sichelzellanämie und Malaria (Williams et al. 2005). Die Sichelzellanämie wird durch ein verändertes Hämoglobin (HbS anstelle von HbA) hervorgerufen, welches zu einer Modifikation der Erythrozytenform führt. Die Zellen sind weniger verformbar und blockieren dadurch Blutgefäße (WHO 2006). Unbehandelt kann dies in chronisch akutem Schmerzsyndrom, schweren bakteriellen Infektionen und Nekrose resultieren. Das homozygote Auftreten des veränderten Gens für Hämoglobin (HbS) ist in diesem Fall pathogen. Das Tragen der heterozygoten Variante (HbAS) hat kaum Auswirkungen auf eine gesunde Person. Es schützt zwar auch nicht komplett gegen eine Infektion mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*, führt aber zu einer deutlich geringeren Parasitendichte, wodurch der Schweregrad der Krankheit verringert wird (Williams et al. 2005). SNPs, die für sich allein genommen Krankheiten verursachen, sind jedoch eher selten. Oft ist es der kombinatorische Effekt von SNPs in verschiedenen Genen und äußeren Umwelteinflüsse, der bestimmt ob ein Individuum erkrankt (Brookes 1999).

Ob ein Faktor zum Risiko für das Auftreten einer Krankheit beiträgt, zeigt sich an der erhöhten Häufigkeit, mit der dieser Faktor in einer Population von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auftritt. Für LBP sind bisher nur wenige SNPs beschrieben worden. Die ursprünglich als Cystein<sub>98</sub>→Glycin (T<sub>292</sub>→G) und Prolin<sub>436</sub>→Leucin

(C<sub>1306</sub>→T) bezeichneten Polymorphismen (Hubacek et al. 2001) wurden später in zwei gesonderten Arbeiten neu lokalisiert und beschrieben (Barber and O'Keefe 2003; Korhonen et al. 2006). Cystein<sub>98</sub>→Glycin wird zum synonymen Austausch Prolin<sub>97</sub>→Prolin (T<sub>291</sub>→C). Die von Hubacek et al. 2001 zunächst beschriebene Assoziation zwischen dem Tragen eines mutierten Allels und dem erhöhten Risiko für eine Sepsis in Männern konnte in einer Folgearbeit nicht bestätigt werden (Barber and O'Keefe 2003). Der zweite SNP liegt an Aminosäure-Position 436 (Korhonen et al. 2006). Eine Änderung der Sequenzdaten seit 2001 bedingte, dass das dazugehörige Nukleotid (C→T, ehemals an Position 1306) nun an Position 1341 liegt und dies zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Leucin führt. Eine Assoziation mit bestimmten Krankheiten wurde bisher nicht gezeigt.

In einer Studie an einem japanischen Patientenkollektiv wurden 1145 SNPs des Chromosom 20q, welches auch das LBP-Gen enthält, auf eine Korrelation mit Diabetes Typ 2 hin untersucht (Takeuchi et al. 2007). Die stärkste Assoziation mit der Krankheit wurde entgegen den Erwartungen für einen SNP innerhalb des LBP-Gens (rs2232592) gefunden. Dieser führt an Position 401 zu einem Austausch des Nukleotids A→G. Über die biologische Relevanz dieses Ergebnisses wurde keine Aussage getroffen. Eine Funktion von LBP im Krankheitsbild des Diabetes ist nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem angeborenen Immunsystem, Fettleibigkeit und Diabetes Typ 2 (Lazar 2005). So ähneln die Fettzellen den Makrophagen in ihrer Fähigkeit, Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 zu sezernieren (Creely et al. 2007). Ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung dieser beiden Zelltypen scheint möglich (Hotamisligil 2003). Darüber hinaus gilt Diabetes mittlerweile als mit proinflammatorischen Zytokinen assoziierte Krankheit (Pickup 2004), bei der Marker der Inflammation, wie das CRP und verschiedene Zytokine mit dem Auftreten der Diabetes Typ 2 korreliert sind und z.T. sogar als Voraussage für die Entwicklung der Krankheit verwendet werden können. Die eindeutigste Assoziation zwischen einer Krankheit und dem Vorkommen eines LBP-SNP wurde kürzlich für Gram-negative Bakteriämien bei allogenen Knochenmarkstransplantationen beschrieben (Chien et al. 2008). Es wurde ein Polymorphismus im Promotorbereich von LBP identifiziert, der nicht nur erhöhte LBP-Serumkonzentrationen mit sich bringt, sondern auch ein fünffach höheres Risiko für das Versterben nach Transplantation bei Auftreten einer Gram-negativen Bakteriämie bedeutet. Der Nukleotidaustausch C→T an Position -778 beeinträchtigt die CAAT-Box des Promotors (Schumann et al. 1996), was vermutlich zu einer verstärkten Promotoraktivität und so zu einer erhöhten LBP-Konzentration im Plasma führt. Wie in vielen Polymorphismus-Studien fehlen jedoch auch hier die sich anbietenden funktio-

nen Analysen, um genaueres über Wirkmechanismen und Funktionsweise des Immunsystems sagen zu können.

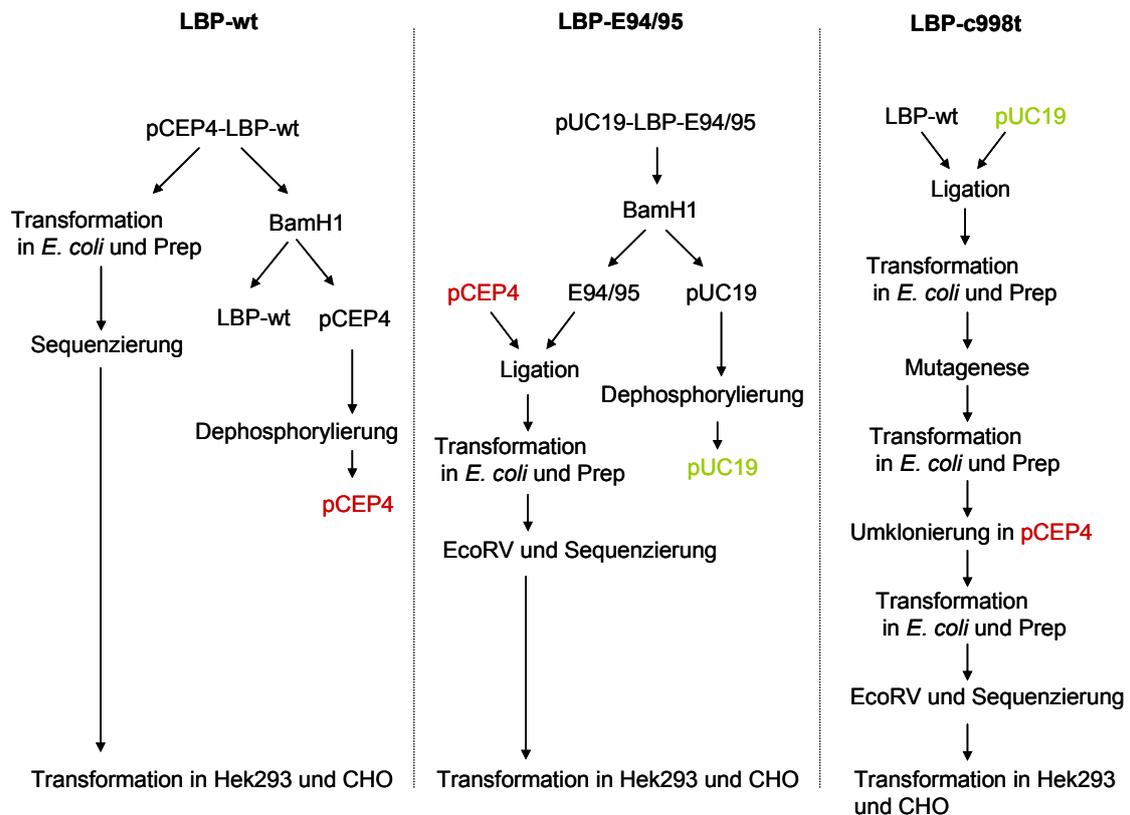
### **1.9 Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit wurde eine natürlich vorkommende Mutation im LBP durch rekombinante Expression und funktionelle Analyse untersucht. Die Mutation bewirkt einen Nukleotid-Austausch in der DNS-Sequenz an Position 998 (Cytosin→Thymin). Dadurch kommt es zum Wechsel in der Aminosäuresequenz, das Prolin an Position 333 wird durch ein Leucin ausgetauscht. Die daraus resultierende Mutante LBP-c998t wurde zusammen mit dem LBP-wt und einer weiteren LBP-Variante (LBP-E94/95) rekombinant in eukaryotischen Zellen exprimiert und in Bindungsversuchen, bei Zellstimulationen und in Westernblotanalysen eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob die Mutation einen Einfluss auf Struktur und Funktion des LBP hat. Die zweite in dieser Arbeit verwendete LBP-Mutante (LBP-E94/95) ist nicht natürlich vorkommend. Sie wurde für die Beschreibung der LPS-Bindungsstelle am LBP entworfen. Bei dieser LBP-Variante sind die beiden für die LPS-Bindung essentiellen, positiv geladenen Aminosäuren Arginin 94 und Lysin 95 gegen eine negativ geladene Glutaminsäure ausgetauscht worden. Für die Bindungs- und Stimulationsversuche wurden stellvertretend für alle potentiellen Liganden zwei verschiedene LPS-Formen (TLR4-Liganden) und zwei unterschiedlich azylierte Lipopeptide (TLR2-Liganden) verwendet. Im Rahmen diese Arbeit wurde so nachgeprüft, ob die TLR2 und -4-Liganden dieselbe Bindungsstelle am LBP nutzen.

## 2 Methoden

### 2.1 Herstellung der rekombinanten Proteine

Alle LBP-Varianten sind unterschiedlichen Ursprungs und durchliefen unterschiedliche Schritte (Abb. 6) bevor sie mittels des eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 (Abb. 7) in den HEK293- bzw. CHO-Zellen exprimiert werden konnten.



**Abb. 6: Überblick über die Herstellung der rekombinanten Proteine**

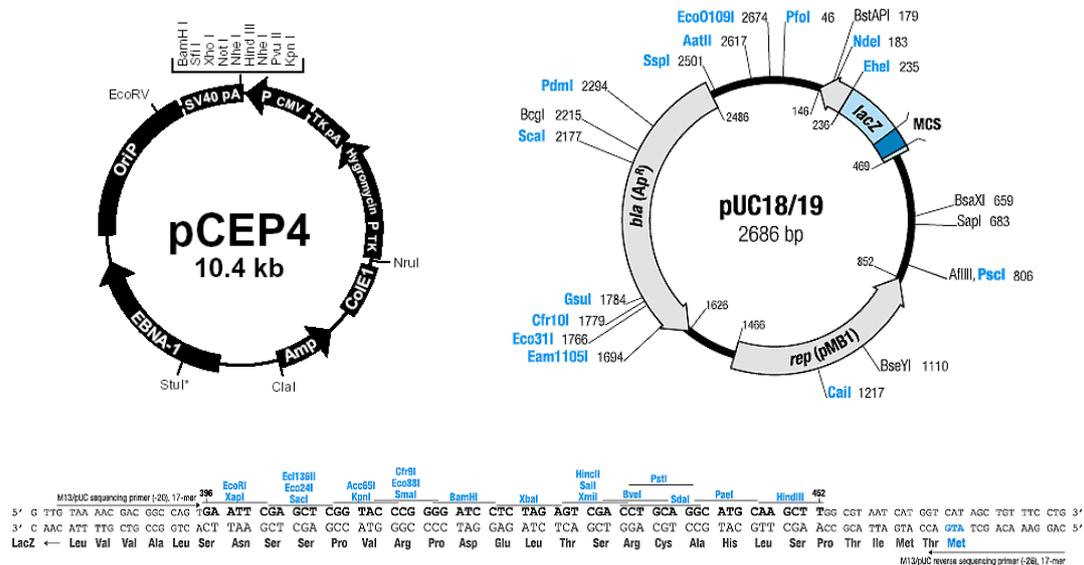
Die Plasmide pCEP4-LBP-wt und pUC19-LBP-E94/95 waren in unserem Labor bereits vorhanden und dienten als Ausgangspunkt für die Herstellung der rekombinanten LBP-Varianten. Für die Gewinnung von LBP-wt war nach Vervielfältigung des die Sequenz enthaltenen Plasmids (pCEP4-LBP-wt) in *E. coli* (Transformation und Prep) und der Kontrollsequenzierung nur noch die Transformation in die eukaryotischen Zellen (HEK und CHO) nötig. Die Sequenz des LBP-E94/95 musste aus dem prokaryotischen Vektor pUC19 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 umkloniert werden (Restriktion mit BamH1, Ligation). Dann wurde auch hier das Plasmid in *E. coli* vervielfältigt, sequenziert zur Kontrolle und die Zelllinien transfiziert. Die Sequenz LBP-c998t wurde durch Mutagenese der Sequenz LBP-wt im Plasmid pUC19 (pUC19-LBP-wt) hergestellt, in pCEP4 umkloniert, vermehrt, sequenziert und in HEK- und CHO-Zellen transfiziert. Farblich markiert sind die verwendeten Plasmide: pUC19 (grün) und pCEP4 (rot).

Das die LBP-wt-Sequenz enthaltende Plasmid pCEP4-LBP-wt wurde von Nicolas Schröder zur Verfügung gestellt. Es diente durch Restriktion mit dem Enzym BamH1 (2.1.2.2) einerseits als Quelle für die DNS-Sequenz von LBP, das in der Mutagenese eingesetzt wurde (2.1.1) und andererseits als Quelle für den Vektor pCEP4. Neben der Transfektion in die eukaryotischen Zellen (2.1.8.2) wurde es auch in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (2.1.4). Daraus wurde eine 100 ml-Übernachtskultur in LB-Amp-Flüssigmedium hergestellt (2.1.3). Aus dieser wurden für die langfristige Lagerung Glycerolstocks und in einem Maxiprep größere Mengen des pCEP4-LBPwt-Plasmids hergestellt.

Das Plasmid pUC19-LBP-E94/95 mit der Sequenz für die LBP-Variante E94/95 stammt aus den Arbeiten von Norbert Lamping (Lamping et al. 1996). Es diente als Quelle für die DNS-Sequenz des LBP-E94/95 und für den Vektor pUC19 (Abb. 7), der für die Mutagenese verwendet wurde. Die DNS-Sequenz des LBP-E94/95 musste in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 umkloniert werden (2.1.2). Dazu wurden beide Plasmide (pUC19-LBP-E94/95 und pCEP4-LBP-wt) mit dem Restriktionsenzym BamH1 geschnitten (2.1.2.2). Der Verdau wurde in einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden (das Insert LBP-E94/95 und das Plasmid pCEP4) unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten (2.1.2.1). Insert und Plasmid wurden mit Hilfe des Qiagen-Gel-Extraction-Kits aufgereinigt. Das linearisierte Plasmid wurde dephosphoryliert (2.1.2.3), um zu verhindern, dass es rezirkularisiert. Das Plasmid pCEP4 und die LBP-E94/95-Sequenz wurden dann miteinander ligiert, d.h. mittels des Enzyms T4-Ligase verbunden (2.1.2.4). Nach erfolgreicher Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (2.1.4 und 2.1.5) wurden kleine Mengen des Plasmids aus einer 5 ml-Übernachtskultur aufgereinigt. Durch den Restriktionsverdau mit EcoRV (2.1.6) wurde die richtige Orientierung des Insert überprüft und zur Kontrolle der Sequenz dann eine Sequenzierung durchgeführt (2.1.7). Erst nach positiven Ergebnissen mit beiden Methoden wurde eine Großkultur inklusive Plasmidaufreinigung und Glycerolstockherstellung durchgeführt (2.1.3) und das Plasmid in HEK293- und CHO-Zellen transfiziert (2.1.8.2).

Für die Herstellung der LBP-Variante-c998t wurde zuerst das Insert des Vektor pCEP4-LBP-wt in den Vektor pUC19 umkloniert, da dieser sich aufgrund seiner geringeren Größe besser für die Mutagenese eignet (Restriktion mit BamH1, Dephosphorylierung, Ligation, Transformation von *E. coli* und Überprüfung im Gel nach Plasmidaufreinigung aus einer kleinen Übernachtskultur und erneutem Restriktionsverdau mit BamH1, 2.1.2 - 2.1.4). Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt (2.1.1). Nach Rückklonierung in den Vektor pCEP4 (2.1.2) und Transfor-

mation in *E. coli* (2.1.4) wurden kleine Übernachtkulturen hergestellt und die Plasmide mittels Kit aufgereinigt. Durch Verdau mit EcoRV (2.1.6) und Sequenzierung (2.1.7) wurde nach positiven Klonen gesucht, diese dann über eine Großkultur (Maxiprep und Glyzerolkultur, 2.1.3) langfristig lagerbar gemacht und in die eukaryotischen Zellen transfiziert (2.1.8.2).



**Abb. 7: Vektorkarten von pCEP4 und pUC18/19**

Darstellung der Vektoren die in dieser Arbeit verwendet wurden mit ihrer „Multiple-Cloning-Site“ (Bereich im Plasmid der definierte Restriktionsstellen zum kontrollierten Einbau von DNS enthält). Sie unterscheiden sich sowohl in der Größe, als auch in ihrer Verwendung. Links: der eukaryotische Expressionsvektor pCEP4 mit 10,4 kb, rechts: der prokaryotische Expressionsvektor pUC19 mit 2,7 kb. Im unteren Bereich ist die „Multiple-Cloning-Site“ von pUC18/19 (MCS, im Vektor oben rechts) mit den darin enthaltenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme abgebildet. Die Restriktionsstellen des Plasmids pCEP4 sind am Plasmid (links) oben markiert.

### 2.1.1 Mutagenese

Die Mutagenese des LBP-wt zum LBP-c998t wurde mit dem „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis“-Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Aus der Plasmidgröße und der Sequenz ergaben sich folgende Spezifikationen für die Synthese der mutierten DNS:

Reagenz	Menge
DNS	48 ng pUC19-LBP-wt (1µl)
10 x Puffer	5 µl
Primer c998t (10 pmol/µl)	1,2 µl
Primer Antisense c998t (10 pmol/µl)	1,2 µl
dNTP-Mix	1 µl

PfuUltra-HF-DNS-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	39,6 $\mu$ l
Gesamt	50 $\mu$ l

Programm:

1. 30 sec 95 °C
2. 12 Zyklen: 30 sec 95 °C, 1 min 55 °C, 5 min 68 °C
3. 4 °C  $\infty$ .

Der Verdau der Vorlage-DNS (pUC19-LBP-wt), sowie die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* mit dem mutierten Plasmid wurde mit den Reagenzien des Herstellers nach dessen Protokoll durchgeführt.

### 2.1.2 Klonierung

Beim Klonieren wird eine DNS-Sequenz (Insert) in einen Vektor eingefügt. Diese Sequenz kann entweder durch eine Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) synthetisiert oder aus einem anderen Vektor ausgeschnitten werden (Restriktionsverdau). Da die Zielsequenzen dieser Arbeit schon in einem Plasmid vorhanden waren bzw. durch Mutagenese in einem Plasmid verändert werden mussten, wurden die entsprechenden Sequenzen über in beiden Vektoren (Ursprung und Ziel) vorhandene Restriktionsstellen entfernt bzw. eingefügt. Die Plasmide pCEP4 und pUC19 besitzen beide eine Multiple-Cloning-Site, die Schnittstellen für verschiedene Enzyme enthielt. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamH1 war darunter, lag in keiner anderen beteiligten Sequenz vor und wurde deshalb für die Klonierung verwendet. Alle Zwischenschritte wurden zur Kontrolle auf einprozentige Agarosegele aufgetragen.

#### 2.1.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook (Sambrook et al. 1989) wurden DNS-Fragmente durch Anlegen eines Stromfeldes ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei liefen kleinere Fragmente schneller vom negativen zum positiven Pol als große. Die Agarose wurde mit einer Endkonzentration von 1 % in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde „Gel-Red“ in einer 1:1000 Verdünnung dazugeben und gut durchmischt. Das Agens „Gel-Red“ lagerte sich an die Basen der DNS, ähnlich wie Ethidiumbromid. Es kann durch UV-Licht angeregt werden, fluoresziert und macht die DNS-Fragmente sichtbar. Es ist jedoch im Vergleich zum Ethidi-

umbromid weniger karzinogen. Die noch flüssige einprozentige Agaroselösung wurde in eine Horizontalgelkammer gegossen und ein analytischer Kamm eingesetzt bis das Gel erstarrt war. Dadurch entstanden an der Oberseite des Gels rechteckige Hohlräume (Geltaschen). Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Zur Bestimmung der Fragment-Größen wurden 5 µl eines DNS-Größenstandards parallel zu den Proben auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief bei einer Spannung von 120 V ca. 1 h. Die Gele wurden in einer Geldokumentationsanlage unter UV-Lichtquelle fotografiert und dokumentiert.

#### 2.1.2.2 Restriktion mit BamH1

Reagenz	Menge
DNS	5 µl pUC19-LBP-E94/95 bzw. 2 µl pCEP4-LBPwt
10 x Puffer	1 µl
BamH1 (1U/µl)	1 µl
BSA 100 x	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	2,5 µl bzw. 5,5 µl
Gesamt	10 µl

Die Reaktion lief für 2 h bei 37 °C ab.

#### 2.1.2.3 Dephosphorylierung

Um nach erfolgreicher Linearisierung das Rezirkulieren von Plasmiden zu verhindern, wird das Zielplasmid dephosphoryliert, d.h. die endständigen Phosphatgruppen werden entfernt.

Reagenz	Menge
DNS	40 µl
10 x Puffer	5 µl
CIAP	5 µl
Gesamt	50 µl

Die Reaktion verlief für 30 min bei 37 °C. Um die Reagenzien für weitere Versuche aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser mit dem „QIAquick PCR Purification“-Kit aufgereinigt und mit 40 µl Elutionspuffer eluiert.

#### 2.1.2.4 Ligation

Reagenz	Menge
Vektor	4,5 µl
Insert	13,5 µl
10 x Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
Gesamt	21 µl

Die Ligation lief für 8 h bei 16 °C ab und wurde dann bis zur Transformation bei 4 °C gelagert.

#### 2.1.3 Kultivierung von *E. coli*-Bakterien

*E. coli*-Bakterien wurden nach frischem Ausstrich auf LB-Agarplatten bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Agarplatten waren mit den entsprechenden Selektionsantibiotika versetzt. Die Bakterien wurden so ausgestrichen, dass sich deutlich getrennte Einzelkolonien entwickelten, jede aus einem Klon gewachsen. Sie wurden für vier Wochen bei 4 °C gelagert. Monatlich wurden die Bakterien von -80 °C-Stocks neu ausgestrichen. Zur Herstellung kleiner Übernachtskulturen wurde je eine Kolonie von LB-Agarplatte mit einem sterilen Holzstab oder einer sterilen Pipettenspitze (10 µl) gepickt und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt. Die Kulturen wurden dann über Nacht (ca. 20 h) bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Sie wurden für die Aufreinigung kleinerer Mengen Plasmid (Miniprep) und für weitere Analysen verwendet. Für eine große Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Amp-Flüssigmedium in einen 500 ml-Schüttelkolben gefüllt und mit 1 ml der kleinen Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation fand wie die kleine Übernachtskultur für 20 h bei 100 rpm und 37 °C statt. Aus der Übernachtskultur wurden dann große Mengen Plasmid-DNS mittels des Kits „MaxiPrep“ aufgereinigt und Glycerolstocks hergestellt. Letztere dienen der langfristigen Lagerung der transformierten *E. coli*. Dazu wurden 800 µl der Übernachtskultur mit 200 µl Glycerol gründlich vermischt und diese dann bei -80 °C eingefroren.

#### 2.1.4 Transformation in *E. coli*

Bei der Transformation wird Plasmid-DNS zusätzlich zum normalen Genom in ein Bakterium eingebracht. Die Transformation kann durch Hitzeschock oder elektrisch erfolgen. Dazu müssen die Bakterien kompetent sein, d.h. in der Lage, DNS aufzunehmen. Die verwendeten *E. coli* waren chemisch kompetent gemacht (siehe 2.4) und wurden bei -80 °C portioniert gelagert. Für die Transformation wurde die benötigte Anzahl ali-

quotierter *E. coli*-Suspensionen (je 100 µl) auf Eis aufgetaut und mit 10 - 30 ng DNS vermischt. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde es für 45 sec einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt (Thermoblock oder Wasserbad), um dann wieder für 2 min auf Eis gelagert zu werden. Nach dem Zusatz von 200 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für mindestens 1 h bei 37 °C geschüttelt. Diese Inkubation diente dem Ausbilden der auf dem Plasmid vorhandenen und zur Selektion von transformationspositiven *E. coli* verwendeten Antibiotikaresistenz. Von jedem Transformationsansatz wurden 100 µl auf einer LB-Amp-Agarplatte mit einem sterilen Glaspatel ausgestrichen und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Nur positive Klone, d.h. *E. coli*-Kolonien deren Ursprungs-Bakterium das Plasmid aufgenommen hatte, sollten nach Ablauf dieser Zeit gewachsen sein. Bei jeder Transformation wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. Das bedeutet, dass ein Aliquot *E. coli*-Suspension die gesamte Prozedur mit 5 µl Wasser statt DNS durchlief. Da so keine Antibiotika-Resistenz auf die Bakterien übertragen werden konnte, sollten sie auf den Antibiotika-LB-Platten nicht wachsen. Dies dient zur Überprüfung, ob die Bakterien eine eigene Resistenz tragen. Außerdem können diese Bakterien auf einer LB-Platte ohne Antibiotika ausplattiert werden um die generelle Vitalität der Bakterien zu testen.

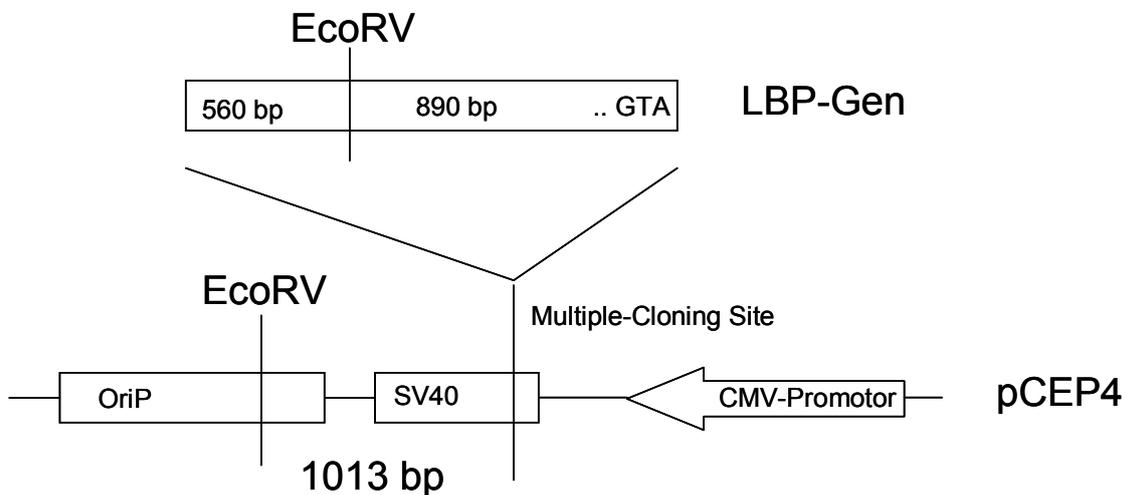
### 2.1.5 Herstellen von chemisch-kompetenten *E. coli*

Es wurden kompetente Bakterien verwendet um Plasmid-DNS zu vermehren. Wir verwendeten die so genannte Calciumchlorid-Methode (Mühlhardt 2003). Dazu wurden die Bakterien zuerst aus einer Glyzerolkultur mit einer Impföse auf einer SOB-Agarplatte ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Zwei Einzelkolonien wurden dann mit sterilen Pipettenspitzen in je 5 ml SOB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> überimpft und für 20 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Je 50 µl der Bakteriensuspension wurden in je 30 ml SOB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> in 250 ml-Schüttelkolben überimpft und für 2,5 bis 4 h bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Alle 20 - 30 min wurde eine 1 ml-Probe entnommen und die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Als Nullwert wurde SOB-Medium verwendet. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,5 waren die Zellen in der richtigen Wachstumsphase zum Ernten (logarithmische Phase). Die Zellen wurden in sterile, gekühlte 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3100 g und 4 °C. Der Mediumüberstand wurde abgenommen und verworfen. Um alle Mediumsreste zu entfernen, wurden die Reaktionsgefäße mit dem Bakterienpellet 10 min umgedreht und auf saugfähiges Papier gestellt. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 20 ml kalten Transformationspuffer FSB resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugati-

onsschritt (10 min, 3100 g, 4 °C) wurde das Bakterienpellet in 4 ml FSB-Puffer re-suspendiert. Dazu wurden 140 µl DMSO gegeben. Zum Vermischen wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt und dann 15 min auf Eis inkubiert. Nach der erneuten Zugabe von 140 µl DMSO und schwenken, wurde der Inkubationsschritt wiederholt. Je 100 µl Zellen wurden in vorgekühlte, sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.1.6 Restriktion mit EcoRV

Zur Überprüfung, ob das Insert in der richtigen Orientierung in das pCEP4-Plasmid eingebaut wurde, d.h. das Start-Codon des Gens nach der auf dem Plasmid liegenden Promotorsequenz kommt, wurde ein Verdau mit dem Enzym EcoRV durchgeführt. Jeweils die Vektorsequenz (Position nach Multiple-Cloning-Site: 1013 bp) und das Insert (Position: 890 bp, Rest 556 bp) tragen eine Schnittstelle für dieses Restriktionsenzym (Abb.8). Dadurch wird das Plasmid in zwei Teile zerschnitten. Bei richtiger Orientierung ist das kleinere Fragment 1569 bp groß (1013 + 556), während es bei falscher Orientierung 1903 bp (1013 + 890) groß ist. Diese zwei unterschiedlich großen Fragmente sind im Agarosegel gut voneinander zu unterscheiden.



**Abb. 8: Darstellung des EcoRV-Verdaus**

Zur Kontrolle der Orientierung des Inserts im Plasmid wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRV durchgeführt. Oben befindet sich das LBP-Gen in umgekehrter Orientierung (..GTA: Startcodon des LBP-Gens in verkehrter Reihenfolge). Unten ist ein Ausschnitt aus dem pCEP4-Vektor dargestellt, in den das LBP kloniert wurde. Je nach Orientierung des Inserts ergeben sich nach Restriktion mit dem Enzym EcoRV unterschiedliche große Fragmente, die im SDS-Page unterscheidbar sind. OriP: Startpunkt der Plasmidreplikation (engl. „origin of replication“), SV40: Promotor. bp: Basenpaare.

Ansatz:

Reagenz	Menge
DNS	5 µl
10 x Puffer (Neb3)	1 µl
EcoRV 1 U/µl	1 µl
BSA 10 x	1 µl
H <sub>2</sub> O	2 µl
Gesamt	10 µl

Der Verdau wurde für 2 h bei 37 °C durchgeführt und dann im einprozentigen Agarosegel überprüft.

### 2.1.7 Sequenzierung

Alle LBP-Varianten wurden zur Kontrolle sequenziert. Dazu wurden zuerst mit verschiedenen Primerpaaren die einzelnen Abschnitte der Sequenz in einer PCR amplifiziert.

PCR-Ansatz:

Reagenz	Menge
DNS	5 µl
Primer 1 (10µM)	2,5 µl
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl
10 x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
dNTP (2,5 mM)	4 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	29,25 µl
Gesamt	50 µl

Primerpaare (Abb. 9):

- pCEP4for und LBPrev
- EBVrev und LBPfor
- pCEPfor2 und LBPrev
- EBVrev2 und LBPfor
- LBPintern und LBPfor (nur für LBPC998t)

Programm:

1. 10 min 94 °C
2. 35 Zyklen: 45 sec 94 °C, 45 sec 50 °C, 60 sec 72 °C
3. 10 min 72 °C
4. 4 °C ∞.

pCEP4	10	20	30	40	50	
	TCCACCCCAT	TGACGTC AAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	pCEP4for2
	AGGTGGGGTA	ACTGCAGTTA	CCCTCAAACA	AAACCGTGGT	TTTAGTTGCC	
pCEP4	110	120	130	140	150	
	TAGGCGTGTA	CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTCGT	TTAGTGAACC	pCEP4for
	ATCCGCACAT	GCCACCTCC	AGATATATTC	GTCTCGAGCA	AATCACTTGG	
pCEP4 - hLBP	210	220	230	240	250	
	CGCTCGAGGC	CGGCAAGGCC	GATGGGGGCC	TTGGCAAGAG	CCCTGCCGTC	Startcodon
	GCGAGCTCCG	GCCGTTCCGG	CTACCCCGG	AACCGTTCTC	GGGACGGCAG	
hLBP	860	870	880	890	900	
	GCCTTATCTC	CAAACCTCTC	CAGTTACAAC	AGAGATTGAC	AGTTTCGCCG	LBPfor
	CGGAATAGAG	GTTTGAGACG	GTC AATGTTG	TCTCTAACTG	TCAAAGCGGC	
hLBP	1010	1020	1030	1040	1050	
	TACCCTCCTT	GCTGCAGTCA	TGAGCCTTCC	TGAGGAACAC	AACAAAATGG	
	ATGGGAGGAA	CGACGTCAGT	ACTCGGAAGG	ACTCCTTGTTG	TTGTTTTTACC	LBPprev
hLBP	1060	1070	1080	1090	1100	
	TCTACTTTGC	CATCTCGGAT	TATGTCTTCA	ACACGGCCAG	CCTGGTTTAT	
	AGATGAAACG	GTAGAGCCTA	ATACAGAAGT	TGTGCCGGTC	GGACC AAATA	
hLBP	1310	1320	1330	1340	1350	
	CTATATGGAG	ATAGATGCCT	TTGTGCTCCT	GCCAGCTCC	AGCAAGGAGC	
	GATATACCTC	TATCTACGGA	AACACGAGGA	CGGGTCGAGG	TCGTTCTCTG	LBPintern
pCEP4 - hLBP	1660	1670	1680	1690	1700	
	AATACATGAG	AGTTGGATGA	TCCAGACATG	ATAAGATACA	TTGATGAGTT	Stopcodon
	TTATGTACTC	TCAACCTACT	AGGTCTCTAC	TATTCTATGT	AACTACTCAA	EBVrev
pCEP4	1710	1720	1730	1740	1750	
	TGGACAAACC	ACAAC TAGAA	TGCAGTGAAA	AAAATGCTTT	ATTTGTGAAA	
	ACCTGTTTTGG	TGTTGATCTT	ACGTCACTTT	TTTTACGAAA	TAAACACTTT	
pCEP4	1860	1870	1880	1890	1900	
	GTGGGAGGTT	TTTTAAAGCA	AGTAAAACCT	CTACAAATGT	GGTATGGCTG	
	CACCCTCCAA	AAAATTTCTG	TCATTTTGGA	GATGTTTACA	CCATAACCGAC	EBVrev2

**Abb. 9: DNS-Sequenz des LBP-wt im Vektor pCEP4 und PCR-Primern**

Darstellung der Lage der PCR-Primer (grün markiert) im fertigen Konstrukt (pCEP4-LBP-wt). Abgebildet ist die gesamte LBP-wt-DNS-Sequenz (inklusive Start- und Stopcodon: rot) und die Übergänge zum Vektor pCEP4 vor und hinter dem Insert.

In einem Agarosegel wurden je 5 µl des PCR-Produkts auf die richtige Größe hin überprüft. Für die weitere Verwendung wurden die PCR-Produkte dann aufgereinigt, da

Enzyme und Rest-Reagenzien die Sequenzierung stören könnten. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz mit 100 µl 6 M NaJ und 6 µl Silica-Matrix gründlich gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (20 sec bei 1000 g) wurde der Überstand verworfen. Die Matrix mit der gebundenen DNS wurde mit 100 µl Waschpuffer versetzt, wieder kurz zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Das Präzipitat wurde dann mit 30 - 50 µl Aqua dest. vermengt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 16000 g wurde der Überstand abgenommen und in Q-Biogene-Spin-Module überführt. Diese wurden für 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des „Quick Start Master Mix“ durchgeführt. Dieser enthielt neben der Taq-Polymerase auch dNTPs. Ein Teil dieser war endständig farbmarkiert, so dass bei Einbau dieser Nukleotide die DNS-Synthese abbrach. So entstanden viele unterschiedliche lange Fragmente der Gesamtsequenz. Jedes der vier Nukleotide trug eine andere Farbmarkierung die von einem Laser erkannt werden konnte. Dies geschah am Sequenzierer CEQ8000. Mittels der dazugehörigen Software konnte daraus die DNS-Sequenz ermittelt werden. Für den Sequenzieransatz wurden 5 µl aufgereinigte PCR mit je 1 µl eines der in der PCR verwendeten Primer versetzt. Dazu wurden 4 µl des Mastermix gegeben und der Ansatz mit 10 µl Aqua dest auf 20 µl aufgefüllt.

Programm:

1. 30 Zyklen: 20 sec 96 °C, 20 sec 50 °C, 4 min 60 °C
2. 4 °C ∞.

Für die Sequenzbestimmung im Sequenzierer wurden die Proben noch mittels Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu wurden pro Sequenzieransatz 5 µl Fällungslösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Der Sequenzieransatz wurde dazugegeben. Zu jeder Probe wurden dann 60 µl 95-prozentiges Ethanol gegeben und alles gründlich gemischt. Nach Zentrifugation bei 17000 g und 4 °C für 15 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Dem Pellet wurden dann 100 µl 70-prozentiges Ethanol hinzugefügt und alles bei 13000 g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und das Reaktionsgefäß für mindestens 12 min unter Vakuum zentrifugiert um das Pellet zu trocknen und so von Ethanolrückständen zu befreien. Das Pellet wurde dann in SLS-Lösung resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben wurden dann auf eine 96-Loch-Sequenzier-Platte überführt. Auf jede Probe wurde ein Tropfen Mineralöl gegeben und diese dann zusammen mit einer entsprechenden Puffer-Platte und dem Sequenziergel in den Se-

quenzierer gestellt. Die Sequenzbestimmung fand entsprechend der Anleitung des Herstellers statt.

### 2.1.8 Zellkultur

Die Expression der Proteine wurde in HEK293-Zellen und in CHO-Zellen durchgeführt. HEK293 sind menschliche embryonale Nierenzellen. Weitere Zelllinien die für Stimulationsversuche (2.8) verwendet wurden, waren THP1-Zellen, eine humane Monozyten-Zelllinie und RAW264.7, eine murine monozytäre Makrophagenzelllinie. Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, mit 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 95 % kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:5 verdünnt und mit neuem Medium versorgt. Es wurde bis zur Auswertung der Versuche mittels ELISA unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Vor jedem Schritt wurden die Zellen unter dem Binokular überprüft, um sicher zu sein, dass keine Kontaminationen auftraten und die Zellen vital waren.

#### 2.1.8.1 Zellzahlbestimmung

Die Konzentration der Zellen wurde mit einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. In diese waren Quadrate eingeritzt, die gewährleisten, dass ein definiertes Volumen der Zellsuspension ausgezählt wurde. Die verwendeten Zellen waren groß genug, um im Binokular ohne Trypanblaufärbung über ihre Vitalität entscheiden zu können. Es wurden die Zellen in allen Großquadraten gezählt und gemittelt. Der Zellzahl N in einem Großquadrat entsprachen dann  $N \times 10^4$  Zellen in 1 ml Zellsuspension.

#### 2.1.8.2 Transfektion

Die Transfektion wurde mit FuGENE 6 Transfection Reagent durchgeführt. FuGENE 6 ist ein auf Lipiden basierendes, aus vielen Komponenten bestehendes Transfektionsreagenz. Es bildet Komplexe mit der DNS und kann diese so in die Zellen transportieren. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Loch in je 2 ml Medium in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen zu 50-80 % konfluent sein, was unter dem Binokular kontrolliert wurde. Gegebenenfalls wurde einen weiteren Tag mit der Transfektion gewartet. Der Transfektionsansatz mit einem Endvolumen von ca. 103 µl pro Loch bestand aus:

- 100 µl Kulturmedium ohne Zusätze,
- 3 µl FuGENE 6 und

- 1 µg DNS.

Beim Pipettieren des Transfektionsansatzes sollte die Reihenfolge: Medium – FuGENE 6 - DNS eingehalten werden. Es war darauf zu achten, dass FuGENE 6 nicht an der Gefäßwand haften blieb, da dessen Lipidkomponente dort dauerhaft adhären und so die Transfektionseffizienz beeinträchtigen könnte. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurde ein Mastermix angesetzt. Dafür wurden für die gewünschte Anzahl Löcher die Reagenzien berechnet und zusammen pipettiert. Der Transfektionsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte das Medium der Zellen gewechselt werden. Sie erhielten frisches Komplettmedium, wobei das Volumen auf 1 ml verringert wurde, um die Bedingungen für die Transfektion zu verbessern. Zur Transfektion wurde aus dem Mastermix das nötige Volumen pro Loch (103 µl) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Transfektion wurde durch Antibiotika-Selektion mit Hygromycin B aufrechterhalten. Von allen transfizierten Konstrukten wurden 1 ml-Aliquots zur Langzeitlagerung in Stickstoff angefertigt. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml-Minimalmedium aufgenommen, welches mit 20 % DMSO supplementiert war. Diese Aliquots wurden erst für 2 h bei -20 °C, dann über Nacht bei -80 °C gelagert. Erst am nächsten Morgen wurden sie in den Stickstoff-Behälter überführt.

### 2.1.8.3 Expression der Proteine

LBP ist ein sekretorisches Protein, d.h. nach Translation und Transkription in der Zelle wird es, vermittelt über eine Signalsequenz, aus der Zelle ausgeschleust und akkumuliert im Zellkulturüberstand. Eine Möglichkeit, die Expression von Proteinen durchzuführen, ist die normale Zellkultur. Hierbei wird bei jeder Zellpassage (alle 2 - 3 Tage Verdünnung der Zellen im Verhältnis 1:5) das verbrauchte Zellkulturmedium, das die Proteine enthält, vorsichtig abgenommen. Es wird bis zur weiteren Verwendung (Aufreinigung oder Einsatz im Bindungstest) in 50 ml-Röhrchen bei -20 °C gelagert. Ein zweites Verfahren zur Kultur Protein-exprimierender Zellen stellt die Verwendung des CELLline CL 350-Systems dar. Dabei handelte es sich um eine Zellkulturflasche mit einem inneren und einem äußeren „Raum“, die über eine semipermeable Membran miteinander verbunden sind. Im inneren, kleineren Volumen befinden sich die transformierten Zellen in ca. 5 ml Minimalmedium. Das äußere ca. 350 ml umfassende Volumen ist mit Nährmedium gefüllt. Die Ausschlussgröße der halbdurchlässigen Membran (10 kDa) bewirkte, dass zwar niedermolekulare Nährstoffe aus dem äußeren, größeren Volumen in die kleinere Kammer einwandern konnten, die hochmolekularen re-

kombinanten Proteine (58 - 60 kDa) jedoch innen verblieben und so in einem kleinem Volumen aufkonzentriert wurden.

### 2.1.9 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Alle rekombinanten Proteine wurden durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Ihre DNS-Sequenzen waren in Plasmide kloniert, die bei der Expression die Proteine durch eine sechsfache Wiederholung von Histidin (6-His-Anhang) verlängerten. Die Aminosäure Histidin bindet reversibel an Metall-Ionen, zum Beispiel Nickel oder Kobalt. Nach anfänglichen, wenig erfolgreichen Versuchen mit einer Nickel-Agarose-Matrix wurde eine Kobalt-Sepharose-Matrix (Talon) nebst den dazu gehörigen Pufferlösungen verwendet. In Etablierungsversuchen zur nativen Aufreinigung zeigte sich, dass die Proteine am besten in einer Natriumphosphatlösung mit pH 8 an die Matrix banden und mittels einer 0,15 M Imidazolösung mit pH 5 wieder von ihr gelöst werden konnten. Es wurde nach dem Batch/Gravity-Flow-Verfahren vorgegangen. Das bedeutet, dass die Lösung, in der die aufzureinigenden Proteine enthalten sind (Zellkulturente), mit der Matrix zusammen inkubiert wurde (Batch) und die Elution nur mittels Erdanziehung (Gravity) erfolgt. Dazu wurde zuerst die Matrix durch zweimalige Zugabe des 10-fachen Matrix-Bettvolumens Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 700 g für 2 min bei Raumtemperatur gespült. Alle weiteren Waschschriffe erfolgten für 5 min bei Raumtemperatur und 700 g. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Die Zellkulturente wurde mit der Matrix für mindestens 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker inkubiert, um die Bindung der Proteine über den Histidin-Anhang an die Matrix zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wurde durch Zentrifugieren entfernt. Es folgten zwei Reinigungsschritte mit jeweils dem 20-fachen Bettvolumen Waschpuffer und einer je 10-minütigen Inkubation. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Matrix in 5-fachem Bettvolumen Waschpuffer aufgenommen und auf eine Säule gegeben. Nachdem der Waschpuffer, der Erdanziehung folgend aus der Säule herausgelauften war, wurden zweimal 5 ml Elutionspuffer über die Säule gegeben, um das Protein von der Matrix zu lösen. Diese 5 ml-Fraktionen wurden in Dialyseschläuche überführt. Die Dialyse fand über Nacht bei 4 °C statt, der Dialysepuffer (Volumen 3 l) wurde dabei auf einem Rührer bewegt. Mit Hilfe von Centricon Plus-20-Aufkonzentrier-Gefäßen wurden die Proteine durch eine Reduktion des Lösungsvolumens am nächsten Tag aufkonzentriert. Nachdem die Filtereinheiten mit einer Poren/Ausschlussgröße von 20 kDa mit 19 ml PBS pH 7,4 gespült worden waren, wurden je 5 ml der dialysierten Proteinlösungen in sie eingefüllt und für 5 min bei 4000 g zentrifugiert. So wurde ein großer Teil des Volumens durch den Filter gepresst. Im Restvolumen (ca. 100 - 200 µl)

wurde das im Filter zurückgehaltene Protein durch invertierte Zentrifugation für 2 min bei 1000 g zurückgewonnen. Anschließend wurden die Proteine bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Im LBP-ELISA und im BCA-Test wurde die LBP- bzw. Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Vor und nach allen Reinigungsschritten wurden Proben genommen und diese dann zur Überprüfung des Aufreinigungsverlaufs im LBP-ELISA getestet und mit SDS-PAGE überprüft. Im Westernblot wurde das Protein dann mittels spezifischer Antikörper identifiziert.

#### **2.1.10 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Für die Expression der verschiedenen LBP-Varianten in *E. coli* wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Kolonie der entsprechenden Bakterien angeimpft. Die Schüttelinkubation fand über Nacht bei 37 °C und 250 rpm statt. Dem Medium wurden entsprechend der, auf dem Plasmid (pCEP4) enthaltenen Resistenz, Ampicillin zugesetzt. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit Antibiotika versetzt. Das Medium wurde mit den 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen schüttelten 2 - 3 h bei 37 °C und 100 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6. Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase und haben eine für die Expression optimale Dichte. Um die Expression zu verfolgen, wurden von diesem Zeitpunkt an alle 30 min je 1 ml Probe abgenommen. Diese wurde bei 10000 rpm für 2 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen und für die Verwendung im SDS-PAGE mit 40 µl 4x Probenpuffer versetzt.

#### **2.2 SNP-Analyse**

Es sollte ermittelt werden, wie die Verteilung der LBP-Mutation c998t in einer gesunden Population von Kaukasiern ist. Dazu wurde die DNS von Probanden aus einem Wangenabstrich aufgereinigt (QIAamp DNA Blood Mini Kit) und in einem Light-Cycler-Assay überprüft, ob die Mutation vorhanden war und ob ein (heterozygot) oder beide (homozygot) Allele des LBP-Gens mutiert waren. Dafür wurde eine Echtzeit-PCR (Real-Time (RT) -PCR) durchgeführt. Dabei kann jeder Schritt der PCR in Echtzeit verfolgt und die Quantität des PCR-Produkts durch Fluoreszenz bestimmt werden. Diese kam durch die Verwendung von Oligonukleotiden (Sonden) zustande, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind und einem kleinen Teil der Zielsequenz entsprachen. Sie wurden so anstelle von dNTPs in die neu-synthetisierte DNS eingebaut. Sonde 1 (LBP-Anker-Sonde) trug am 3'-OH-Ende den Farbstoff Fluoreszein. Dieser wurde von einer Lichtquelle im Light-Cycler-Gerät angeregt. Durch Hybridisierung beider Sonden mit der Muster-DNS gelangen die Sonden in räumliche Nähe und die angeregte Sonde 1

konnte nun Sonde 2 (LBP-Sensor-Sonde), die am 5'-PH-Ende den Fluoreszenzfarbstoff Red640 trägt, anregen. Das emittierte Licht der Wellenlänge 640 nm konnte vom Light-Cycler-Gerät detektiert und für die Quantifizierung benutzt werden. Im Anschluss an die PCR wurde zur Detektion der Punktmutation C→T an Basenpaar 998 eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde von einer Temperatur von 40 °C ausgehend diese stetig bis auf 80 °C erhöht. Wenn die Temperatur die Schmelztemperatur der Sonden ( $T_m$ ) überschreitet, lösen sich diese von der DNS und das Fluoreszenzsignal bricht ab. Der Einbau der Sonden (RT-PCR) wurde von der Light-Cycler-Software graphisch als Kurve dargestellt mit einem Maximum (Peak) wenn sich die meisten Sonden von der DNS abzulösen beginnen. Wenn im Genom eines Probanden der LBP-Polymorphismus c998t vorlag, kam es zu einer Fehlpaarung zwischen Sonde und DNS. Dadurch verringerte sich der Schmelzpunkt der Sonde von 59 °C für das Wildtyp-Allel auf 52 °C für das mutierte Allel. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Schmelzkurven wurden verwendet, um Wildtyp-Allelträger von Mutation-Trägern zu unterscheiden. Für Probanden mit heterozygotem LBP-Gen ergab sich eine Kurve mit einem Peak der mittig von Wildtyp- und homozygotem Mutations-Peak liegt. Diese entstand durch Überlagerung der beiden gleichzeitig auftretenden Schmelzkurven bei der Allele.

RT-PCR-Ansatz für den Light-Cycler:

Reagenz	Menge
DNS	2 µl
Primer LBP F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
LBP-Anker-Sonde (LNA, 4 µM)	1 µl
LBP-Sensor-Sonde (4 µM)	1 µl
10 x Puffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 µl
dNTP (2,5 mM)	1 µl
BSA	3 µl
Taq-Polymerase	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	5,8 µl
Gesamt	20 µl

PCR-Programm

1. Denaturierung 4 min 95 °C
2. 40 Zyklen: 0 sec 95 °C , 10 sec 56 °C, 8 sec 72 °C
3. Schmelzkurvenanalyse:

Temperatur	Zeit	Temperatur-Transition-Rate [°C / sec]
95 °C	10 sec	0,0
40 °C	30 sec	20,0
80 °C	0 sec	0,1
40 °C	30 sec	

Es wurde nur das Genom von freiwilligen und verfügbaren Probanden in der SNP-Analyse untersucht. Eine genaue Beschreibung des Probanden-Kollektivs findet sich bei Oh et al. 2008. Die Ergebnisse wurden verwendet, um passende Serumspender zu finden, d.h. Probanden mit und ohne Polymorphismus, die einwilligten, ihr Serum für Zellversuche und Bindungstests zur Verfügung zu stellen, um diese miteinander vergleichen zu können.

### 2.3 Serumgewinnung

Für die Gewinnung von humanem Serum wurde freiwilligen Spendern, deren Genotyp bezüglich des LBP bekannt war, je 10 ml Blut in einem Serum-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt) abgenommen. Die Röhrchen enthielten keinen Koagulationshemmer und so gerann das Blut während einer Wartezeit von 20 min bei 4 °C. Das koagulierte Blut wurde dann für 10 min bei 375 g zentrifugiert. Der klare Überstand (= Serum) wurde vorsichtig aliquotiert und bei -20 °C bis zur Nutzung gelagert.

### 2.4 Albuminentfernung

Der hohe Anteil an Albumin in humanem Serum (30 - 50 mg/ml) erschwerte eine gute Darstellung dieser Proben im SDS-PAGE und Westernblot. Deshalb wurde mittels des „ProMax Albumin Removal Kit“ (Polysciences, Inc.) und entsprechend den Anweisungen des Herstellers das Albumin daraus entfernt. Dazu wurden 10 µl Serum mit den entsprechenden Puffern und beschichteten Magnetpartikeln gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und dann durch magnetische Separation (12-Tube-Magnet, Qiagen) pelletiert. Im Überstand befand sich dann das Albumin, während alle übrigen Serumbestandteile an die Partikel gebunden waren. Nach 2-3 Waschvorgängen wurden diese mittels 50 µl Elutionspuffer eluiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

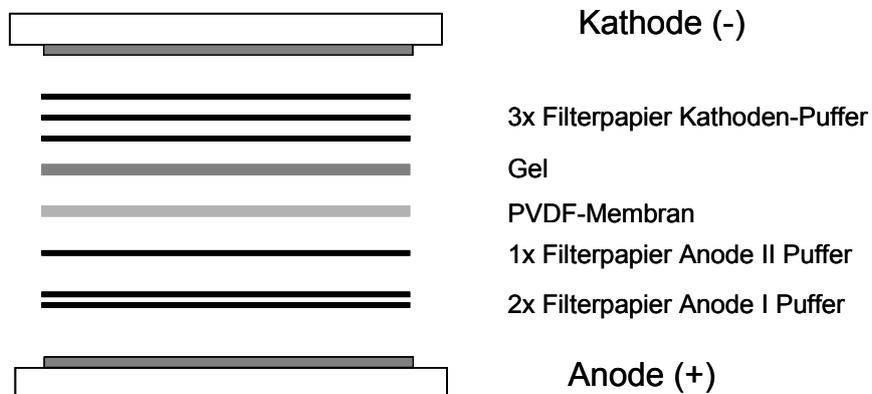
## 2.5 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine, in dem es durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken die Tertiär- und Sekundärstruktur auflöst. Begünstigt wird dies durch vorherige Behandlung mit 1,4-Dithiothreitol, das im Probenpuffer enthalten ist. Es spaltet die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen auf. Die Eigenladung der Proteine wird durch das SDS überdeckt und es entstehen negativ geladene Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. In einem porösen Polyacrylamidgel wandern die Proteine bei Anlegen eines elektrischen Feldes vom negativen zum positiven Pol und trennen sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Die verwendete Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels betrug aufgrund der zu erwartenden Größe des LBP-Proteins (58 - 60 kDa) 12,5 %. Das Trenngel wurde mit einem vierprozentigen Sammelgel überschichtet. Da es einen niedrigeren pH-Wert als das Trenngel besaß, wurden die Proben zu einer einheitlichen Lauffront zusammengezogen, bevor sie in das Trenngel einwanderten. Die Proteine wurden mit Probenpuffer versehen und 10 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Solange die Proben im Sammelgel liefen, betrug die angelegte Spannung 80 V, für den Lauf im Trenngel wurde sie auf 120 V erhöht. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, lief ein vorgefärbter Proteinstandard mit, der verschiedene Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthält. Man kann durch Anfärben mit Coomassie-Blau oder Detektion im Westernblot überprüfen, ob im Labor produzierte Proteine, wie z.B. Mutanten in ihrer Größe noch dem Original entsprechen oder ob es durch die eingefügte Veränderung zu Abweichungen gekommen ist. Dabei stellt der Westernblot (2.6) das sensitivere System dar und hat zu dem durch die Verwendung spezifischer Antikörper den Vorteil, dass man sich bei Proteingemischen auf das Protein von Interesse konzentrieren kann. Die Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Blau macht dagegen alle Proteine, die im SDS-Gel aufgetrennt wurden, sichtbar. Das Gel wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde der nicht gebundene Farbstoff mit der gleichen Lösung ohne Coomassie-Farbstoff ausgewaschen. Zur Aufbewahrung und Dokumentation wurden die Gele auf Zellglasfolie (Gel Drying Kit) getrocknet.

## 2.6 Westernblot

Im Westernblot erfolgte der immunologische Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Dazu wurden die Proteine aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran als feste Trägermatrix übertragen. Für den Transfer in einer Semidry-

Apparatur mussten Gel, Membran und Filterpapiere in spezifischen Puffern equilibriert werden. Das Gel wurde 15 min in Kathodenpuffer geschwenkt, die Filterpapiere nur ca. 2 min in der der zukünftigen Lage (Abb. 10) entsprechenden Lösung. Die Membran wurde zuerst 15 sec in 100 % Methanol geschwenkt, dann 2 min mit Aqua dest. gespült und im Anschluss mindestens 5 min im Anodenpuffer II inkubiert. Für den Transfer wurde das Gel auf die Membran gelegt und beides zwischen Filterpapier und den Platten der Transferapparatur fixiert. Das Gel lag auf der Kathodenseite (-) und die Membran auf der Anodenseite (+), so dass die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wie in der Gelelektrophorese, in Richtung des positiven Pols auf die PVDF-Membran wanderten.



**Abb. 10: Anordnung eines Westernblot in Relation zu den Elektroden**

Im Westernblot werden Proteine, die vorher in einem SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden, von diesem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Anlegen eines elektrischen Stroms, bewegen sich die Proteine wie in der SDS-PAGE vom negativ-geladenen Pol (Kathode) zum positiv-geladenen Pol (Anode) und so aus dem Gel auf die Membran. Auf dieser kann man die Proteine dann mittels spezifischer Antikörper detektieren.

Der Transfer fand über Nacht bei 80 mA statt. Nach dem Transfer wurden die restlichen freien Proteinbindungskapazitäten der Membran durch 60-minütige Inkubation mit Blocklösung abgedeckt. Während aller Inkubationsschritte wurde das Gefäß mit der Membran sanft bei Raumtemperatur geschwenkt. Um die Membran von allen nicht gebundenen Substanzen zu reinigen, wurde sie zwischen allen Inkubationsschritten 3 x 5 min in PBS-Tween (PBS-T) geschwenkt und die Lösung dann verworfen. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem primären Antikörper (AK, Tab. 2), der spezifisch gegen das Protein gerichtet war und in PBS / 5% Milchpulver verdünnt wurde. Die einstündige Inkubation mit dem Sekundärintikörper, der sich gegen den Primärintikörper richtete und an HRP gekoppelt war, fand ebenfalls in PBS / 5 %

Milchpulver statt. Beim letzten Waschschrift wurde PBS anstelle von PBS-T verwendet. Die Substratlösung wurde durch mischen gleicher Anteile von Lösung 1 und 2 frisch angesetzt und die Membran sofort für 5 min darin inkubiert. Die verwendete Menge reichte, um die Membran vollständig zu bedecken (5 ml für eine Membran der Größe 9 x 12 cm). Überschüssige Lösung wurde durch leichtes Abtupfen auf Zellstoff vor und nach der Inkubation in der Substratlösung entfernt und die Membran dann, eingeschlossen in Klarsichtfolie, in die Filmkassette gelegt, bzw. zur besseren Positionierung eingeklebt. In der Dunkelkammer wurde dann der Film für zunächst 4 min aufgelegt und entwickelt. Je nach Ergebnis wurde die Entwicklungszeit verlängert auf bis zu 2 h oder verkürzt auf bis zu 10 sec. Nach Beendigung wurde die Membran für 15 min in Striplösung von den verwendeten Antikörpern und übrig gebliebenem Substrat befreit, mindestens 10 min in PBS-T gewaschen und dann für 30 min erneut blockiert. Bei Etablierung dieser Prozedur war durch nochmalige Inkubation mit 1) nur Substrat und 2) Zweitantikörper und Substrat nebst anschließender Filmentwicklung getestet worden, bei welchen Inkubationszeiten und Schritten keine Antikörper mehr auf der Membran verblieben, so dass dies nicht jedes Mal überprüft werden musste. Dies diente sowohl der Optimierung der Reaktionsbedingungen, als auch dem seriellen Verwenden verschiedener Antikörper auf derselben Membran.

**Tab. 2: Westernblot-Antikörper, ihre Konzentration und Herkunft**

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Xoma polyklonaler AK 1:4000	anti-rabbit 1:20000
biG42 1:2000	anti-mouse 1:10000
Polyklonales Kaninchenserum (abcam) gegen hLBP 1:1000	anti-rabbit 1:10000
Polyklonales Kaninchenserum (R&D) gegen hLBP 1:500	anti-goat 1:10000

## 2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Der BCA-Test dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen in Lösungen. Er beruht auf der Biuret-Reaktion, bei welcher  $\text{Cu}^{2+}$  durch Proteine zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird. Die Reaktion des einwertigen Kupferkations mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure führt zu einem violetten Farbkomplex, der im Photometer bei 550 nm nachgewiesen wird. Die Stärke der Absorption steht in einem linearen Verhältnis zur Proteinkonzentration im Bereich von 20 µg/ml bis 2 mg/ml. Durch eine mitgeführte Standardreihe kann der Pro-

teingehalt der Proben über eine Ausgleichsgerade ermittelt werden. Der Test wurde auf 96-Loch-Flachbodenplatten mit je 25 µl Probe oder Standard exakt nach dem Protokoll des „BCA Protein Assay Kits“ (Pierce USA) durchgeführt.

## **2.8 Stimulation von Zellen aus immortalen Zelllinien**

### **2.8.1 RAW264.7**

Zellen der Zelllinie RAW264.7 wurden einen Tag vor Stimulation in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  pro Loch in einer 96-Loch-Flachbodenplatte in je 100 µl Medium ohne den Zusatz von FKS ausgesät. Am nächsten Tag waren die Zellen adhärent, das alte Medium konnte abgenommen und durch Medium mit Stimulationszusatz unter Zugabe oder Weglassen von LBP-Varianten oder entsprechendem Serum ausgetauscht werden. Die Zellen wurden dann 4 und 24 h inkubiert, bevor der Zellkulturüberstand im ELISA auf die Freisetzung von Zytokinen (mTNF- $\alpha$ , mIL-6) hin untersucht wurde.

### **2.8.2 THP1**

Die Zellen der Zelllinie THP1 sind Suspensionszellen, d.h. sie adhärten nicht oder nur schwach an Oberflächen. Zur Zellstimulation wurden diese monozytären Zellen durch Zugabe von Vitamin D3 zu Makrophagen ausdifferenziert, welche an Oberflächen adhärten. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Loch in einer 96-Loch-Flachbodenplatte in je 100 µl Komplettmedium unter Zugaben von 10 nM Vitamin D3 ausgesät. Nach 48 h wurden erneut 100 µl Medium zu den Zellen dazugegeben, da zu diesem Zeitpunkt das ursprüngliche Medium schon weitgehend verbraucht war. Nach Ablauf von insgesamt 72 h waren die Zellen ausdifferenziert und konnten stimuliert werden. Das Medium wurde komplett entfernt und durch Medium mit Stimulationszusatz unter Zugabe oder Weglassen von LBP-Varianten oder entsprechendem Serum ersetzt. Die Zellen wurden dann 20 h inkubiert, bevor der Zellkulturüberstand im ELISA auf die Freisetzung von Zytokinen (hIL-8, hIL-1 $\beta$ ) hin untersucht wurde.

### **2.8.3 Präparation und Stimulation humaner PBMCs**

Zur Präparation humaner PBMC wurden durch Venenpunktion von gesunden, freiwilligen Spendern 6 Röhrchen á 8 ml Blut entnommen. Die für die Aufreinigung verwendeten „Cell preparation tubes“ (CPT, Vacutainer) wurden innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur für 25 min bei 1750 g zentrifugiert. Oberhalb des gelartigen Trennmediums

befanden sich unterhalb des Plasmas die mononukleären Zellen (PBMC) und Thrombozyten in einer Schicht, während sich die Erythrozyten unterhalb des Trennmediums ansammelten. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die PBMC möglichst vollständig in ein neues Reaktionsgefäß (50 ml) überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Alternativ können die Zellen nach dem ersten Zentrifugationsschritt in den Vacutainern auch bis zu 24 h aufbewahrt und erst dann weiter verarbeitet werden. Dazu würden die mononukleären Zellen mit dem Plasma durch mehrmaliges Schwenken vermischt und bei Raumtemperatur waagrecht gelagert. In diesem Fall würden die Zellen inklusive des gesamten Plasmas für den ersten Waschschrift in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Auch alle weiteren Aufreinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Überpipettieren in das 50 ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (1. 15 min 300 g, 2. 10 min 300 g) zweimal gewaschen. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren vorsichtig abgesaugt und die Zellen erneut in 50 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. In einem dritten Waschgang wurden die Thrombozyten entfernt. Dafür wurden die Zellen mit 25 ml RPMI-Minimalmedium versetzt und 15 min bei 100 g zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 ml RPMI-Minimalmedium aufgenommen. Die Zahl der vitalen Zellen wurde in einer 1:100-Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die humanen PBMC sollten nach Stimulation mit verschiedenen Liganden und unter Zusatz der verschiedenen LBP-Varianten bzw. humanen Serums auf die Freisetzung von hTNF- $\alpha$  und hIL-6 hin untersucht werden. Dafür wurden je  $3 \times 10^5$  Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Nach zweistündiger Ruhezeit wurden alle nicht adhärennten Zellen entfernt und die übrig bleibenden Monozyten stimuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % für 4 h kultiviert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellkulturplatten bis zur Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert.

## **2.9 Doppel-Sandwich-Enzymgekoppelter Immuno-Absorptions-Assay (DS-ELISA)**

### **2.9.1 Allgemein**

Mit Hilfe des DS-ELISA konnte die Anwesenheit und Konzentration von Antigenen in Lösungen, z.B. Zellkulturüberständen bestimmt werden. Das grundlegende Procedere ist dabei sehr ähnlich, weswegen es hier zuerst allgemein beschrieben wird und dann für die einzelnen Antigene nur noch die Spezifitäten angegeben werden (Tab. 3). Im ELISA musste zuerst ein Antikörper an eine Oberfläche gebunden werden. Dazu wurde

eine 96-Loch-Platte (Immuno-Capture, Nunc) mit 50 µl pro Loch Erst-Antikörper-Lösung befüllt (Erst-Antikörper in Beschichtungspuffer). Die Platte wurde bei 4 °C mindestens 12 h und maximal eine Woche vor Verwendung gelagert. Um die Beschichtungszeit zu verkürzen ist auch eine Inkubation für 6 h bei Raumtemperatur möglich. Vor Inkubation mit den Proben müssen alle noch vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen auf der Platte mittels Blockpuffer abgesättigt werden. Zwischen allen weiteren Inkubationschritten wurde die Platte je dreimal gewaschen um nicht gebundenes Material zu entfernen. Nach einem initialen Entleerungsschritt wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer befüllt (200-300 µl pro Loch) und wieder entleert. Nach dem letzten Waschschrift wurde sie durch kräftiges Ausschlagen auf Zellstoff getrocknet. Bei der zweistündigen Inkubation von Proben und Standard bindet der auf der Platte immobilisierte Antikörper das in Probe und Standard enthaltene Antigen. In der Regel wurden Proben, Standard, zweiter Antikörper und die Peroxidase mit dem gleichen Inkubationsspuffer verdünnt und mit 50 µl pro Loch auf der Platte bei Raumtemperatur inkubiert. In der anschließenden einstündigen Inkubation sollte der zweite, mit Biotin markierte Antikörper an das Antigen binden. An das Biotin werden anschließend das Streptavidin und die daran gekoppelte Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) gebunden. Die Inkubation fand für 30 – 60 min statt. Nach nochmaligem sorgfältigen Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) pro Loch, wodurch es bei erfolgreicher Durchführung des ELISA zu einer Farbreaktion kam. Die Platte wurde solange lichtgeschützt stehen gelassen, bis der höchste Wert der Standardreihe dunkelblau und der kleinste Wert, verglichen mit dem Nullwert, möglichst leicht blau gefärbt war. Durch Zugabe von 50 µl Stopplösung je Loch wurde die Reaktion beendet und es kam zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Dieser konnte photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Die Intensität der Farbe stand in einem linearen Verhältnis zur Antigenkonzentration in der Lösung. Über eine mitgeführte Standardreihe und deren Ausgleichsgerade wurde mit der Software Tecan Magellan3 nun die Konzentration in den Proben bestimmt.

**Tab. 3: Ablauf eines ELISA im Überblick**

Arbeitsschritt	Verdünnung	Bedingungen
1. Beschichten mit Primärantikörper	1:500 – 1:1000 in Beschichtungspuffer	mindestens 12 h bei 4 °C, 50 µl pro Loch
2. Blockierung	Blockierungspuffer (Waschpuffer (PBS-T) + FKS, BSA oder Milchpulver)	1 h bei Raumtemperatur, 200 µl pro Loch

3. Proben / Standard		2 h bei Raumtemperatur, 50 µl pro Loch
4. Sekundärantikörper (biotinyliert)	1:1000 – 1: 2000 in Blockierungspuffer	1 h bei Raumtemperatur, 50 µl pro Loch
5. Streptavidin-HRP-Peroxidase	1:1000 in Blockierungspuffer	30 –60 min bei Raumtemperatur, 50 µl pro Loch
6. Substrat (TMB)		2 – 20 min bei Raumtemperatur, lichtgeschützt, 100 µl pro Loch
7. Stopplösung (1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )		50 µl pro Loch

## 2.9.2 Spezifikationen

### mTNF-α

Primär-Antikörper	1:166 in 0,1 M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6
Block- und Verdünnungspuffer	PBS T / 2,5 % FKS
Standard	2000 pg/ml - 31,25 pg/ml
Sekundär-Antikörper	1:1000

### mIL-6

Primär-Antikörper	1:250 in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,2
Block- und Verdünnungspuffer	PBS-T / 2,5 % FKS
Standard	2000 pg/ml - 31,25 pg/ml
Sekundär-Antikörper	1:500

### hTNF-α

Primär-Antikörper	1:250 in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,2
Block- und Verdünnungspuffer	PBS-T / 2,5 % FKS
Standard	20000 pg/ml - 312,5 pg/ml
Sekundär-Antikörper	1:500

### hIL-8

Primär-Antikörper	1:250 in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5
-------------------	--

Block- und Verdünnungspuffer	PBS-T / 2,5 %
Standard	1000 pg/ml - 15,625 pg/ml
Sekundär-Antikörper	1:500

### hIL-1 $\beta$

Primär-Antikörper	1:250 in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5
Block- und Verdünnungspuffer	PBS -T / 2,5 % FKS
Standard	500 pg/ml - 7,8125 pg/ml
Sekundär-Antikörper	1:125

### hLBP

Primär-Antikörper	biG412 1:500 in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5
Blockpuffer	PBS -T / 10 % Milchpulver
Verdünnungspuffer	Hepes / 1 % BSA
Standard	200 ng/ml - 3,125 ng/ml
Sekundär-Antikörper	biG48 (selbst biotinyliert, 2.9.4): 1:2000

#### 2.9.3 hLBP - Bindungsversuch

Beim hLBP-Bindungsversuch handelt es sich um eine an den ELISA angelehnte Methode. Dabei geht es nicht um die Bestimmung von Antigenkonzentrationen, sondern um das Bindungsverhalten von LBP gegenüber potentiellen Liganden. Statt der Erst-Antikörper wurden hierbei die entsprechenden Liganden auf der 96-Loch-Platte gebunden. Dies geschah durch Inkubation mit einer 30- $\mu$ g/ml-Lösung des Liganden in Beschichtungspuffer (50  $\mu$ l pro Loch) entweder für 6 h bei Raumtemperatur oder für mindestens 12 h bei 4 °C. Anschließend wurde die Platte mit Aqua dest. gespült, auf Zellstoff ausgeklopft und konnte dann bis zu 4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden. Bei Verwendung wurde die Platte als erstes durch eine 30-minütige Schüttel-Inkubation mit 200  $\mu$ l Hepes / 1 % BSA bei Raumtemperatur blockiert. Ohne zu waschen, wurden sofort die potentiellen Liganden in serieller Verdünnung mit Hepes / 0,1 % BSA auf die Platte aufgebracht (50  $\mu$ l pro Loch). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler wurde die Platte gewaschen und der selbst biotinylierte Zweit-Antikörper aus dem LBP-ELISA mit 50  $\mu$ l pro Loch in einer 1:2000 Verdünnung in Hepes / 0,1 % BSA aufgetragen. Nach weiteren 2 h Schüttelinkubation bei Raumtemperatur und nachfolgendem Waschen mit Hepes / 0,1 % BSA, wurde für 30 min je Loch 50  $\mu$ l Streptavidin-HRP-Peroxidase 1:1000 in Hepes / 0,1 %

BSA auf der Platte schüttelnd inkubiert. Daran schließt sich die Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  TMB-Substrat-Lösung je Loch und das Abstoppen der Farbreaktion mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  an. Der Farbumschlag nach gelb konnte dann im Photometer bei 450 nm gemessen werden. Es wurde keine Standardreihe mitgeführt, so dass die Messwerte der optischen Dichte miteinander verglichen und als Maß für die Bindungsstärke des jeweiligen Liganden an das LBP gewertet wurden. Analog wurde beim Vergleich verschiedener LBP-Varianten die optische Dichte als Maß für die Bindungsstärke gegenüber dem entsprechenden Bindungspartner gewertet und diese miteinander verglichen.

#### 2.9.4 Biotinylieren von Antikörpern

Für die Detektion des humanen LBP standen keine passenden biotin-markierten Antikörper (Sekundärantikörper) zur Verfügung. Deshalb wurden zur Etablierung dieses ELISA verschiedene polyklonale und monoklonale Antikörper erworben und biotinyliert. Um Antikörper biotinylieren zu können, mussten sie in einem Puffer gelöst sein, der keine amino-haltigen Gruppen, wie Tris, Glycin oder Azid enthielt. Diese Substanzen würden mit dem Biotin interagieren und die Reaktion stören. Deshalb wurde in einem ersten Schritt der gelöste Antikörper für mindestens 4 h bei 4 °C gegen PBS, pH 7,4 dialysiert. Dazu wurde eine Petrischale mit sterilem PBS gefüllt, eine semipermeable Membran vorsichtig auf die Oberfläche gelegt und die gewünschte Menge Antikörperlösung auf die Membranoberfläche pipettiert. Das Volumen betrug maximal 100  $\mu\text{l}$ , um zu verhindern, dass Antikörperlösung von der Membran in die Lösung floss. Nach der Dialyse wurde die Antikörperlösung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Biotin wurde in 100-fachem molekularem Überschuss zum Antikörper dazugegeben. Die benötigte Menge kann über das Molekulargewicht des Antikörpers ( $M_{\text{IgA}} = 150000 \text{ g/mol}$ ), seine Konzentration und das Molekulargewicht von Biotin ( $M_{\text{Biotin}} = 443,4 \text{ g/mol}$ ) berechnet werden. Das Biotin wurde frisch in einer 100 mg/ml-Konzentration in DMSO durch kräftiges Schütteln gelöst und dann so in PBS verdünnt, dass es gut pipettierbar zu dem Antikörper dazu gegeben werden konnte, ohne diesen zu sehr zu verdünnen. Bei einem Antikörpervolumen von 50  $\mu\text{l}$  waren das 2 - 5  $\mu\text{l}$ . Nach sorgfältigem Mischen wurde die Reagenzien bei 4 °C für mindestens 12 h inkubiert. Der Biotin-markierte Antikörper war dann verwendbar und wurde weiterhin bei 4 °C gelagert. Eine weitere Aufreinigung des Antikörpers war nicht notwendig, da das überschüssige Biotin zwar in der Lösung verblieb, im ELISA jedoch nicht störte, wie der Einsatz von Negativkontrollen zeigte.

### 3 Material und Geräte

#### 3.1 Puffer, Medien und Lösung

Die Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen) und Sigma (München) bezogen.

#### Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl add 1 l Aqua dest pH 7, 20 min bei 121 °C autoklavieren
LB-Agar	250 ml LB-Flüssigmedium 3,75 g Agar-Agar 20 min bei 121 °C autoklavieren
Ampicillin	100 µg/ml, Zugabe erst nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C
SOC-Flüssigmedium	Invitrogen
SOB-Agar-Platten	1 % Agar 2 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,05 % NaCl 10 ml einer 10 mM KCl-Lösung auf 1 l 20 min bei 121 °C autoklavieren 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung auf 1 l zugeben
SOB-Flüssigmedium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 min bei 121 °C autoklavieren 10 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 10 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
Kaliumacetatlösung, pH 7,5	0,982 g Kaliumacetat in 9 ml Aqua dest, pH auf 7,5 mit 2 M Essigsäure einstellen, auf 10 ml auffüllen mit Aqua dest 1 ml-Aliquots bei -80 °C lagern

FSB-Medium	10 mM Kaliumacetat, pH 7,5 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 100 mM KCl 3 mM Hexaminkobaltchlorid 10 % Glycerin nach Lösung der Salze in 20 ml Aqua dest, pH mittels 0,1 M HCL auf 6,4 einstellen, dann mit Aqua dest. auf 25 ml auffüllen.
------------	---

### Klonierung

5 x TBE-Puffer (1 l)	54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 3,7 g 0,5 M EDTA
6 x DNS-Probenpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
DNS-Größenstandard	
Gene Ruler 100 bp Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler DNS Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Fällungslösung (je Ansatz)	2 $\mu\text{l}$ 3 M Natriumacetat pH 5,2 2 $\mu\text{l}$ 100 mM EDTA pH 8 1 $\mu\text{l}$ Glykogen

### Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Säule (Kobalt-Sepharose)	Talon Metal Affinity Resin
Waschpuffer	Talon Waschpuffer 1x, pH 8
Talon Waschpuffer	5 x Equilibration/Wash Buffer
Elutionspuffer	Talon Elutionspuffer 1x, pH 5
Talon Elutionspuffer	10 x Elution Buffer
Dialysepuffer	PBS 1 x, pH 7,4

### SDS-PAGE

Sammegel, 4 % (10 ml, entsprechend zwei großen Gelen)	7,54 ml Aqua dest 1,26 ml 1 M Tris, pH 6,8 1 ml 40 % Acrylamid 100 $\mu\text{l}$ 10 % SDS-Lösung 100 $\mu\text{l}$ APS 10 $\mu\text{l}$ Temed
--	--

Trenngel, 12,5 % (30 ml, entsprechend zwei großen Gelen)	12,4 ml Aqua dest 7,6 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 9,4 ml 40 % Acrylamid 300 µl 10 % SDS-Lösung 300 µl APS 12 µl Temed
SDS-Laufpuffer 10x	30,2 g Tris Base 188 g Glycin add 1 l Aqua dest, pH 8,3
SDS-Laufpuffer 1x	100 ml 10x Puffer 10 ml 10 % SDS-Lösung add Aqua dest auf 1 l
4x Probenpuffer (reduzierend)	10 ml 1 M Tris pH 6,8 3,1 g 1,4-Dithiotreit (DTT) 0,2 g Bromphenolblau 30 ml Glycerin
Coomassie-Lösung	4 Tabletten Coomassie Brilliant Blau G250 in 250 ml der Entfärbelösung
Entfärbelösung	Methanol/Eisessig/Wasser (30/10/60; v/v/v)
Proteingrößenstandard	See Blue Plus2 (Invitrogen)

### Westernblot

Transferpuffer	
Anode I	0,3 M Tris 10 % Methanol pH 10,4
Anode II	25 mM Tris 10 % Methanol pH 10,4
Kathode	25 mM Tris 40 mM Glyzin 10 % Methanol pH 9,4
Blockpuffer/Inkubationspuffer (PBS / 5 % Milchpulver)	PBS 1 x, frisch zugesetzt 5 % Trockenmilchpulver
Waschpuffer (PBS-T)	PBS 1 x, 0,05% Tween20
Substrat	Super Signal West PICO Chemiluminescent Substrate, Pierce Thermo Fisher
Proteingrößenstandard	Cruz Marker TM Molecular Weight Standards (Santa Cruz)

**Zellkultur**

PBS pH 7,4	PAA
DMEM (HEK293)	Dulbecco's Mod Eagle Medium, enthält Natriumpyruvat und Pyridoxin
	PAA
Ham's F12 Medium (CHO)	PAA
RPMI 1640 (Raw 264.7, THP1 und PBMC)	PAA
Komplettmedium	DMEM, Ham's F12 oder RPMI 10 % FKS 1 % Natriumpyruvat 200mM L-Glutamin Penicillin/Streptomycin 1 x (entsprechend 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Minimalmedium	Komplettmedium ohne FKS
FKS	Biochrom
Natriumpyruvat	PAA
L-Glutamin (Glutamax)	PAA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
Hygromycin B	PAA
Vitamin D3 (1α, 25-Dihydroxy-cholecalciferol)	Sigma Aldrich, Taufkirchen

**Zellstimulation**

LPS von <i>Salmonella minnesota</i> Re 595	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LPS von <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pam <sub>2</sub> Cys-Ser-Lys <sub>4</sub>	EMC Microcollection
Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-Lys <sub>4</sub>	EMC Microcollection

**ELISA**

PBS 10 x	160 g NaCl 4 g KCl 28,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> add 2 l Aqua dest.
PBS-T	PBS 1 x, 0,05 % Tween20
PBS-T/ 2,5 % FKS	Waschpuffer, 2,5 % FKS frisch zugesetzt

Hepes-Puffer	0,05 M Hepes 0,15 M NaCl pH 7,4
Hepes/ 1%BSA	Hepes-Puffer, 1 % bovines Serumalbumin, Fraktion V, frisch zugesetzt
Hepes/ 0,1 % BSA	Hepes-Puffer, 0,1 % BSA frisch zugesetzt
Substrat	TMB, Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee OT Wolzig
Stopplösung	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Biotin	Sigma Aldrich, Taufkirchen

### 3.2 Antikörper

#### ELISA

biG412 (monoklonaler muriner anti-hLBP-Antikörper)	Stock 1 mg/ml Biometec, Greifswald
biG48 (monoklonaler muriner anti-hLBP-Antikörper)	Stock 1 mg/ml Biometec, Greifswald
anti-hTNF- $\alpha$ (Erstantikörper)	Stock 0,5 mg/ml. 551220, BD Pharmingen
muriner anti-hTNF- $\alpha$ , biotinyliert (Zweitantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 554511, BD Pharmingen
monoklonaler anti-hIL-8 (Erstantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 554716, BD Pharmingen
monoklonaler anti-hIL-8, biotinyliert (Zweitantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 554718, BD Pharmingen
anti-hIL-1 $\beta$ (Erstantikörper)	Stock 0,5 mg/ml R&D Systems, USA
polyklonaler anti-hIL-1 $\beta$ , biotinyliert (Zweitantikörper)	Stock 50 $\mu$ g/ml R&D Systems, USA
monoklonaler anti-mTNF- $\alpha$ (Erstantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 551225, BD Pharmingen
monoklonaler anti-mTNF- $\alpha$ , biotinyliert (Zweitantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 554415, BD Pharmingen
monoklonaler anti-mIL-6 (Erstantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 554400, BD Pharmingen
anti-mIL-6, biotinyliert (Zweitantikörper)	Stock 0,5 mg/ml 30936, BD Pharmingen
Westernblot	
monoklonaler Kaninschen-anti-hLBP AK	Xoma, USA

biG42 (monoklonal Maus-anti-hLBP AK)	Biometec, Greifswald
polyklonales Kaninchenserum	Biometec, Greifswald
polyklonales Kaninchenserum	Abcam, USA
polyklonales Ziegenserum	R&D Systems, USA

### 3.3 Standards, Primer und Enzyme

#### Standards

humanes LBP	Stock 250 µg/ml Biometec, Greifswald
humanes TNF-α	Stock 1 µg/ml R&D Systems, USA
humanes IL-8	Stock 20 µg/ml BD Pharmingen
humanes IL-1β	Stock 1 µg/ml Cellconcepts, Umkirch
murines TNF-α	Stock 2 µg/ml R&D Systems, USA
murines IL-6	Stock 100 µg/ml Pepro-Tech

#### Primer

Alle Primer und Sonden wurden von den Firmen MWG-Biotech (Berlin) und TIB MOLBIOL (Berlin) hergestellt.

#### PCR / Sequenzierung

pCEPfor	5'-AGAGCTCGTTTAGTGAACCG
pCEPfor2	5'-ATTGACGTCAATGGGAGTTC
EBVrev	5'-GTGGTTTGTCCAAACTCA
EBVrev2	5'-ATACCACATTTGTAGAGGTTT
LBPfor	5'-TACAACAGAGATTGACAGTTT
LBPprev	5'-GTAGACCATTTTGTGTGTT'
LBPintern	5'-AAGGCATCTATCTCCAT
Mutagenese (mutierte Base ist hervorgehoben, Austausch C zu T)	
c998t	5'-AGCCAGGCTCTACCTCAACATG AACCTGGAAC

Antisense c998t	5'-TCCAGGTTTCATGTTGAGGTAGA GCCTGGCTAA
SNP-Analyse	
LBP F	CAACTTCCAGCTTTATCTGACTC
Primer R (=TIB-1)	CACAAAGGCATCTATCTCCATATA
LBP-Anker-Sonde (LNA, "locked nucleotid acid")	5'- C+C+C AGT+TAG+CC—FL (LNA sind die hinter dem + liegenden Nukleotide)
LBP-Sensor-Sonde	5'-Red640- GGCTCTACCCCAACATGAA—PH

### Enzyme und besondere Chemikalien

BamH1	New England Biolabs, USA
10 x Puffer für BamH1	New England Biolabs, USA
CIAP	New England Biolabs, USA
T4-Ligase	New England Biolabs, USA
10 x Puffer für T4-Ligase	New England Biolabs, USA
EcoRV	New England Biolabs, USA
Neb3 (Puffer für EcoRV)	New England Biolabs, USA
BSA 100 x (1:10 verdünnt)	New England Biolabs, USA
Gentherm Taq-Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin
Gentherm 10 x Puffer	Rapidozym GmbH, Berlin
Gentherm 50 mM MgCl <sub>2</sub>	Rapidozym GmbH, Berlin
Gentherm dNTPs	Rapidozym GmbH, Berlin
Gel-Red	Biotium, USA
Streptavidin-HRP-Peroxidase-Konjugat (POD)	Stock 1 mg/ml Sigma Aldrich, Taufkirchen

### 3.4 Zelllinien, *E. coli*-Stämme und Plasmide

#### Eukaryotische Zelllinien

HEK293 (humane embryonale Nierenzellen)	DSMZ, Braunschweig
CHO (Chinesische Hamster-Ovarzellen)	DSMZ, Braunschweig
RAW 246.7	DSMZ, Braunschweig
THP1	DSMZ, Braunschweig

***E. coli*-Stämme**

JM 109 <i>E. coli</i>	Promega
One Shot <i>E. coli</i>	Invitrogen

**Plasmide**

pUC19	Invitrogen
pCEP4	Invitrogen
pUC19-LBP-wt	AG Schumann, Charité Berlin
pCEP4-LBP-wt	AG Schumann, Charité Berlin
pUC19-LBP-E94/95	AG Schumann, Charité Berlin
pCEP4-LBP-E94/95	AG Schumann, Charité Berlin
pUC19-LBP-c998t	AG Schumann, Charité Berlin
pCEP4-LBP-c998t	AG Schumann, Charité Berlin

**3.5 Kommerzielle Kits und Lösungen**

Mini-Prep (Invisorb Spin Plasmid Mini Two)	Invitek, Berlin
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Maxi-Prep (Endo Free Plasmid Maxi Kit)	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
CEQ Dye Termination Cycle Sequencing Quick Start Kit (inkl. SLS-Lösung)	Beckman Coulter, Krefeld
CEQ Separation Buffer	Beckman Coulter, Krefeld
GenomeLab Separation Gel LPA	Beckman Coulter, Krefeld
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
Gel Drying Kit	Promega, Heidelberg
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Kobalt-Sepharose (Talon Metal Affinity Resins), Puffer (5x Equilibration/Wash Buffer, 10 x Elution Buffer) und Säulen (2 ml und 10 ml Disposable Columns)	Clontech Takara Biocompany, USA
Centricon Plus-20	Millipore, Schwalbach

ProMax Albumin-Removal Kit	Polysciences, Eppelheim
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Thermo Fischer Scientific, Bonn
QIAamp DNS Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.6 Spezielle Laborgeräte

Elektrophoresekammer für DNS	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer für Proteine	Biometra
Stromregler	Gibco BRL, Eggenstein
Transferapparatur (Blotter)	H. Hölzel, Wörth / Hörlkofen
12-Tube Magnet	Qiagen, Hilden
Mikroliterspritze	Hamilton, Schweiz
Reusable Autoclavable Vaccu-Pette/96™	Scienceware (Sigma Aldrich, Taufkirchen)
Ultraschall-Desintegrator Sonifier	Branson (G. Heinemann), Schwäbisch Gmünd
Ultraschallwasserbad	Unitra Unima, Olsztyn
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Photometer Spectra Fluor Plus (für Mikrotiterplatten)	Tecan, Crailsheim
BioPhotometer (für Küvetten)	Eppendorf, Hamburg
SpeedVac Univap 100 H	UniEquip, Martinsried/ München
Thermocycler	Biometra/Whatman, Göttingen
UV-Schnitttisch	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Geldokumentationsanlage inkl. Software GeneSnap	SynGene Bio Imaging Sys, Langenfeld
Kapillar-Sequenzierer CEQ 8000	Beckman Coulter, Krefeld
Kapillar-Light Cycler inkl. Software Version 3.5	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 3.7 Verbrauchsmaterial

Vacutainer	BD Bioscience, Heidelberg
Dialyseschläuche	Medicel
Einweg-Pipetten (5, 10 und 25 ml)	TPP, Schweiz
Kunststoff-Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (ungestopft)	Roth, Karlsruhe (100-1000 µl), Sarstedt, Nümbrecht (0,5-10 µl und 10-200 µl)

Pitpettenspitzen Filtertips (0,5-10 µl)	Neolab, Heidelberg
Pipettenspitzen Multiguard (20-200 µl und 100-1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Kunststoff-Reaktionsgefäße (bis 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
CELLine 350	Integra Bioscience, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten	TPP, Schweiz
96-Loch-Sequenzier-Platte	Beckmann Coulter, Krefeld
Mikrotiterplatte (weiß)	Nunc, Wiesbaden
Immobilion-P (PVDF-Membran)	Millipore, Schwalbach
Centricon Ultracell YM-30	Millipore, Schwalbach
Glasgefäße	Schott/Duran, Wertheim/Main

### 3.8 Verwendete Software

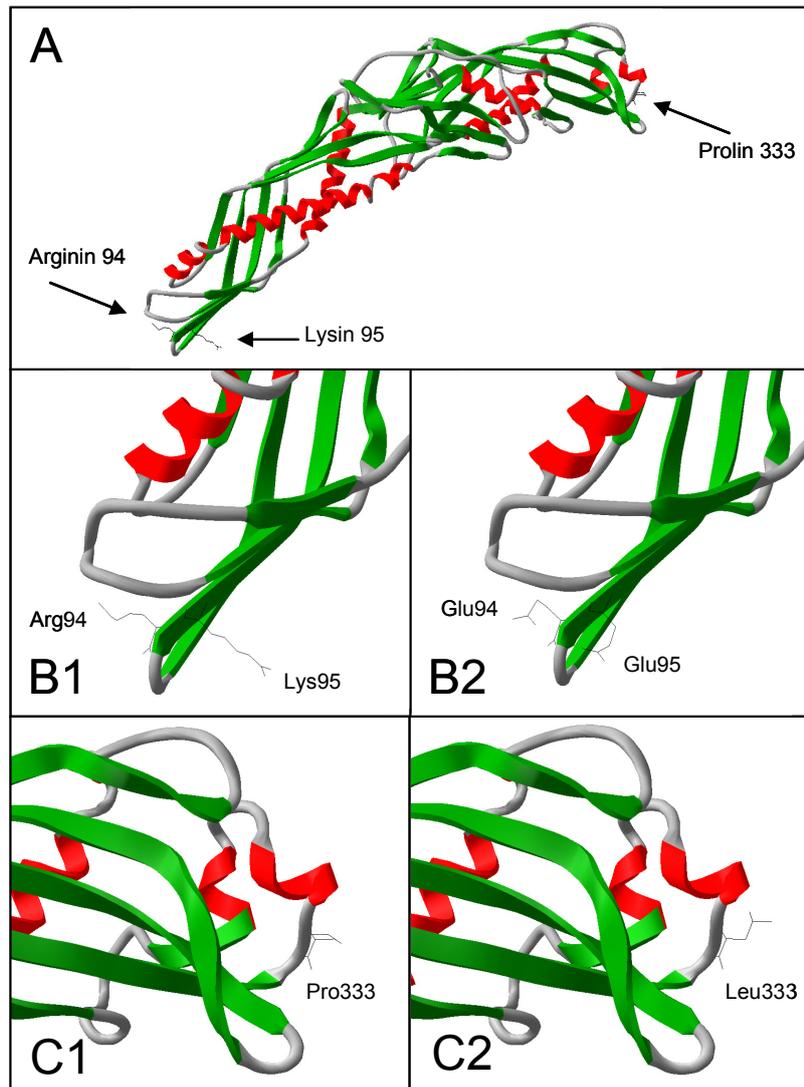
DeepView/ Swiss-PdbViewer Version 3.7	GlaxoSmithKline, München
GraphPad Prism Version 4.0	GraphPad Software, Inc, USA.
Magellan Version 3	Tecan, Crailsheim
Microsoft®Office	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Sequencher 4.6	Gene Codes Corporation, USA

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rekombinante Proteine

#### 4.1.1 Allgemeine Beschreibung

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Varianten des LBP verwendet (Abb. 11). Als LBP-wt wird im Folgenden das LBP bezeichnet, das von Schumann et al. 1990 beschrieben und mir für meine Arbeiten zur Verfügung gestellt wurde. Es lag im eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 (pCEP4-LBPwt) vor. Als zweite Variante wurde in den folgenden Untersuchungen das LBP-E94/95 verwendet. Dieses wurde zur Untersuchung der LPS-Bindungsstelle am LBP von Lamping et al. 1996 hergestellt und stand mir für diese Arbeit im prokaryotischen Vektor pUC19 (pUC19-LBP-E94/95) zur Verfügung. In diesem LBP ist in der Aminosäuresequenz an den Positionen 94 und 95 statt Arginin und Lysin jeweils Glutaminsäure eingebaut. Dies wird in der Nukleotidsequenz durch Austausch der Triplets CGC (Arg94) und AAG (Lys95) gegen GAA (Glu) bewirkt (siehe Anhang). Der Austausch der beiden basischen Aminosäuren gegen die saure Glutaminsäure führt zu einem Funktionsverlust von LBP: Es kann nicht mehr mit LPS interagieren. Für die Expression des Proteins in HEK293- und CHO-Zellen wurde es in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 kloniert (pCEP4-LBP-E94/95). Als dritte Variante wurde das LBP-c998t entworfen, rekombinant exprimiert, aufgereinigt und hier eingesetzt. Das LBP-c998t entspricht einer natürlich vorkommende Mutation, bei der es in der DNS-Sequenz durch einen Einzelnukleotidaustausch an Position 998 (Cytosin → Thymin) zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an der Position 333 kommt (siehe Anhang). Diese Mutante wurde bei Kindern entdeckt, die mit normalen diagnostischen Methoden (IMMULITE<sup>®</sup>, Siemens ehemals, DPC Biermann) kein LBP in ihrem Serum aufwiesen (Michael Kabesch, LMU München, persönliches Gespräch). Es wurde durch Mutagenese des LBP wt im Vektor pUC19 hergestellt und dann in den eukaryotischen Vektor pCEP4 kloniert (pCEP4-LBP-c998t). Alle LBP-Varianten wurden in den eukaryotischen Zelllinien HEK293 und CHO mit Hilfe verschiedener Zellexpressionssysteme exprimiert. Sowohl die unaufgereinigten Zellkulturüberstände als auch das aufgereinigte Protein wurden in Bindungs- und Zellversuchen eingesetzt.



**Abb. 11: Modelldarstellung des LBP wt mit den untersuchten Mutationen**

Die dreidimensionalen Darstellungen des LBP wurden erstellt mit dem Programm Deep View (Guex and Peitsch 1997). A- Ribbon-Darstellung des LBP-wt mit Lage der späteren Mutationen, B- Mutagenese von Arginin94 und Lysin95 zu Glutaminsäure in LBP-E94/95, C- Mutagenese von Prolin333 zu Leucin333 in LBP-c998t. B1 und C1 stellen die Zustände vor, B2 und C2 nach der Mutagenese dar.

#### 4.1.2 Protein-Expression in eukaryotischen Zellen

Die drei LBP-Varianten wurden in zwei verschiedenen eukaryotischen Zelllinien (HEK293 und CHO) mit zwei unterschiedlichen Zellkultursystemen exprimiert. In der regulären Zellkultur wurde der Zellkulturüberstand in sterilen 50-ml-Reaktionsgefäßen überführt und bei -20 °C gelagert. Das Volumen des Zellkulturüberstandes betrug bei Verwendung einer mittleren Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) 25 ml pro Zellpassage (Zellen verdünnen und mit neuem Medium versorgen). Das Versorgen der Zellen geschah in

unserem Labor dreimal pro Woche. In den CELLline-Kulturflaschen kam es aufgrund der besonderen Bauweise zu einer Aufkonzentrierung des LBP im Zellüberstand in einem geringeren Volumen. Dies betrug pro Zellversorgung 4 ml und die Zellen wurden nur einmal pro Woche passagiert. Hier wurde neben dem Zellkulturüberstand auch ein Teil der Zellen aus den Gefäßen entnommen und zusammen mit dem Überstand aufbewahrt. Die Konzentration von LBP im Überstand wurde mit dem hLBP-ELISA bestimmt. Die Ausbeuten waren dabei je nach Zelllinie und Protein sehr unterschiedlich (Tab. 4). Die höchste Ausbeute ergab sich in beiden Systemen für das LBP-wt, gefolgt von LBP-c998t im CELLline-System. Vom LBP-E94/95 wurden nur sehr geringe Mengen in den verwendeten Zelllinien produziert. Aus diesem Grund ist es in den meisten Versuchen nur in sehr kleinen Konzentrationen oder gar nicht eingesetzt worden.

**Tab. 4: Konzentration der rekombinanten Proteine in µg/ml**

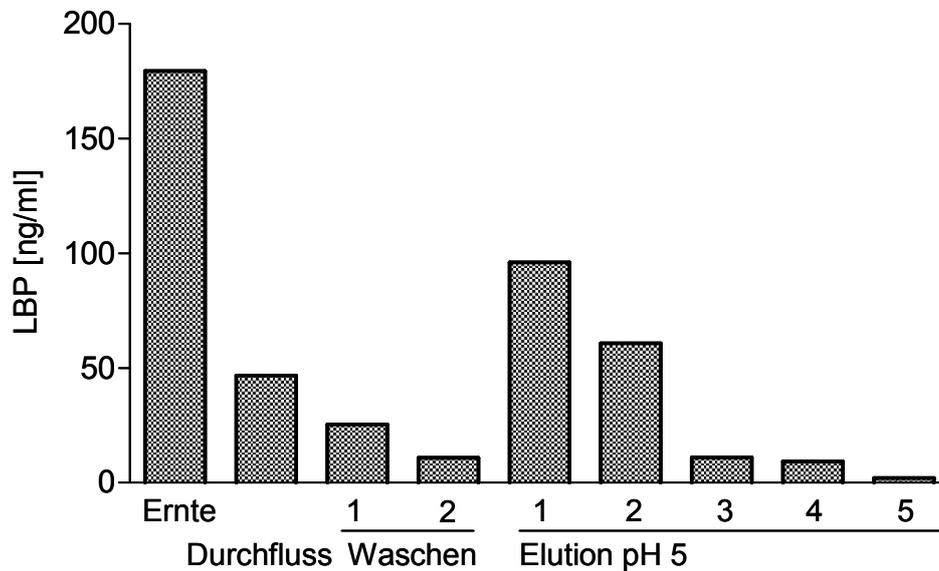
Die rekombinanten Proteine LBP-wt, LBP-c998t und LBP-E94/95 wurden in verschiedenen Zelllinien (HEK293 und CHO) mittels zweier verschiedener Expressionssysteme (Zellkultur und CELLline 350) exprimiert.

LBP-Variante	Kultivierung	HEK293	CHO
LBP-wt	Zellkultur	8,14	-
	CELLline 350	-	3576,7
LBP-c998t	Zellkultur	3,77	-
	CELLline 350	6,30	1,3
LBP-E94/95	Zellkultur	0,06	-
	CELLline 350	0,15	0,4

#### 4.1.3 Aufreinigung

Die Aufreinigung der drei LBP-Varianten erfolgte mittels Affinitätschromatographie nach einem Protokoll. Die Proteine wurden sowohl durch einen LBP-spezifischen ELISA (Konzentration, Abb. 12 und 13a), als auch durch SDS-PAGE (Grösse, Menge, Abb. 13b) überprüft. Zuerst wurde der Zellkulturüberstand mit der Kobalt-Sepharose-Matrix inkubiert. Der sechsfache Histidin-Anhang der rekombinanten Proteine bindet an das Kobalt. Alle nicht gebunden Bestandteile, wie Zelltrümmer und Mediumzusätze wurden durch mehrere Waschschrte von der Säule entfernt. Bei zu hoher Ausgangskonzentration (LBP-wt) kam es durch ein Überladen der Matrix vor, dass auch im Durchfluss und in der Waschlösung das rekombinante LBP detektiert wurde. Das Protein wurde mit einem pH 5-Puffer in Fraktionen von je einem Milliliter eluiert. Initial wurden 10

Fraktionen gesammelt. Die höchsten Konzentrationen von LBP konnte dabei in den Fraktionen 1-3 detektiert werden. Die Fraktionen 1 - 5 und 6 – 10 wurden für die LBPwt-Aufreinigung zusammengefasst (Abb. 13). Um Nebenwirkungen durch den sauren pH-Wert in den Zellstimulationsversuchen zu vermeiden, wurde das Eluat über Nacht gegen PBS mit pH 7,4 dialysiert.

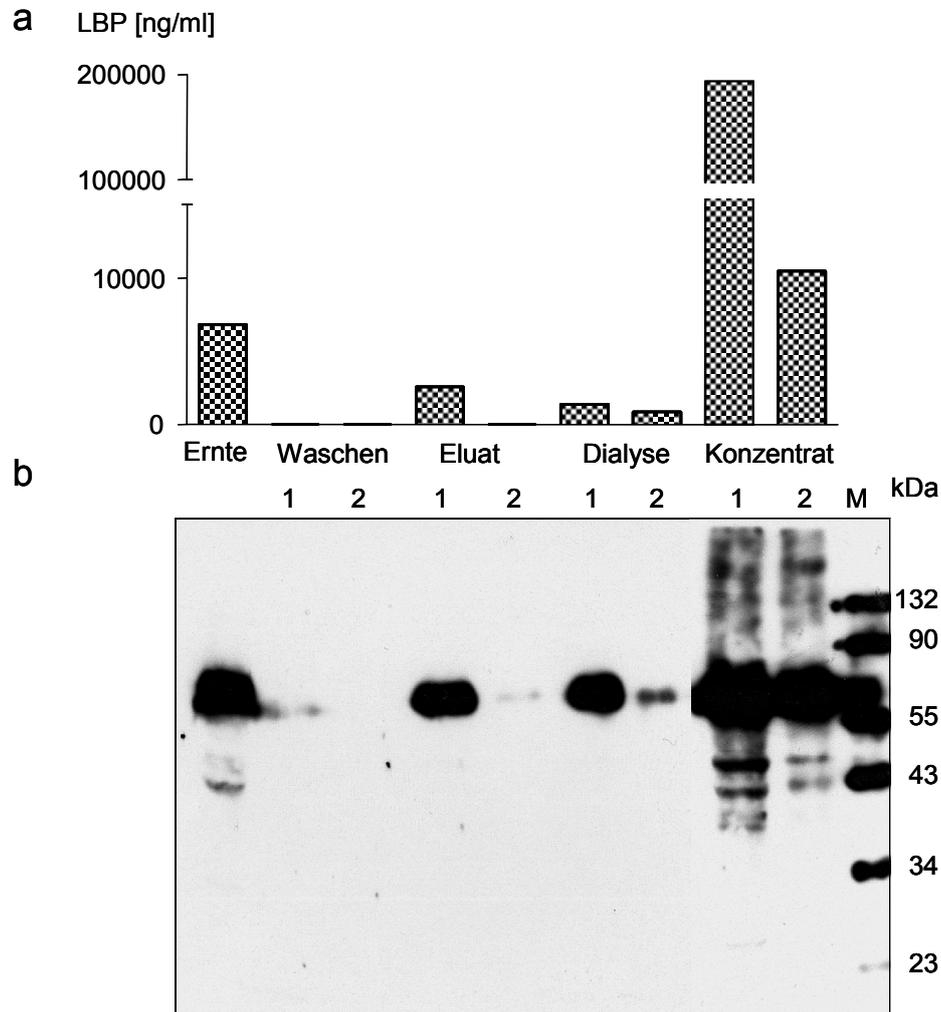


**Abb.12: LBP-Konzentration der Einzelschritte einer Proteinaufreinigung am Beispiel des LBP-E94/95**

Von links nach rechts ist chronologisch der Ablauf einer Proteinaufreinigung aufgetragen von der Ernte, über nicht an die Matrix gebundenes Material (Durchfluss), zu den zwei Waschsritten und der Elution bei pH 5 in fünf Fraktionen von je 1 ml. Die LBP-Konzentrationen wurden mittels eines LBP-spezifischem ELISA ermittelt.

Dazu wurden die Fraktionen 1 - 5 und für das LBP-wt auch die Fraktionen 6 - 10 vereinigt. Aufgrund der geringen Ausbeute sowohl bei den Ernten als auch bei der anschließenden Aufreinigung der LBP-Mutanten wurden die Proteine nachträglich aufkonzentriert. Aus Gründen der Gleichbehandlung geschah dies auch für das LBP-wt, obwohl hier schon das Eluat für Versuche ausreichend hohe Konzentrationen enthielt. Durch Zentrifugation in einem Reaktionsgefäß mit semipermeablem Filter der Ausschlussgröße 30 kDa (Centricon, Millipore) wurde das Volumen des Eluats verringert. Die Verringerung des Ausgangsvolumens auf ein Zehntel (5 ml → 500 µl) führte zu einer Konzentrationssteigerung um mindestens das 10-fache (Abb. 13). Die Stärke des Aufkonzentrierens konnte durch Dauer und Geschwindigkeit des Zentrifugationsschrittes beeinflusst werden, war jedoch durch die Menge des Ausgangsvolumens beschränkt. Die Endkonzentration des LBP-wt lag durchschnittlich mindestens um ein zehnfaches hö-

her als bei LBP-c998t. Auch für LBP-E94/95 wurde der Aufkonzentrierungsschritt durchgeführt, ergab aber keine für die Zellstimulation geeigneten Konzentrationen.



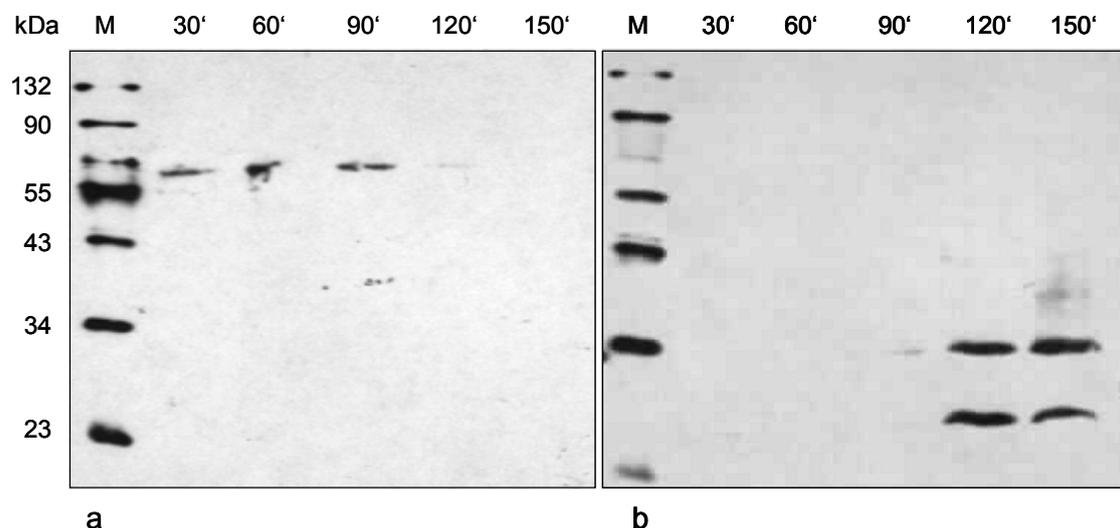
**Abb. 13: Vollständiger Ablauf einer Aufreinigung am Beispiel von LBP-wt**

LBP-wt wurde aus HEK293-Zellkulturüberstand aufgereinigt: a) LBP-Konzentrationen, die mittels LBP-spezifischem ELISA ermittelt wurden, b) Nachweis von LBP im Westernblot mit LBP-spezifischem polyklonalem Antikörper (abcam). Es wurden zwei Waschschriffe durchgeführt (1 und 2). Ab dem Eluierungsschritt bezeichnen 1 und 2 die zusammengefassten Elutionsfraktionen 1 - 5 und 6 - 10 von je einem Milliliter (Gesamtvolumen 5 ml). Diese wurden als zwei voneinander getrennte Proben weiterbearbeitet (Dialyse und Aufkonzentrieren).

#### 4.1.4 Versuche in *E. coli*

Parallel zur Expression der rekombinanten Proteine in den HEK293- und CHO-Zellen wurden auch Versuche mit *E. coli* durchgeführt. Dazu wurden 100 ml-LB-Amp-Flüssigkultur mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 100 rpm in-

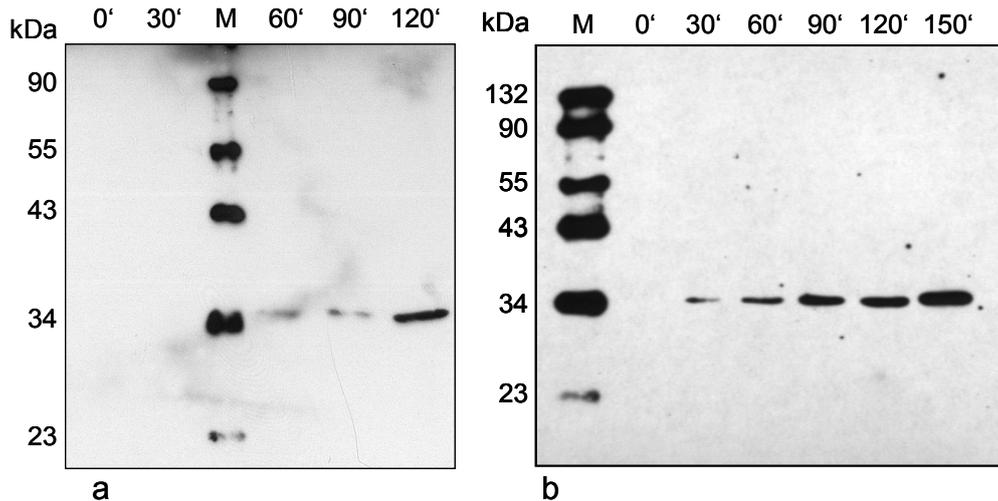
kubiert. Ab einer  $OD_{600}$  von 0,4 - 0,5 (logarithmische Wachstumsphase) wurde die Proteinexpression durch 2  $\mu\text{mol/ml}$  IPTG induziert und danach wurden alle 30 min Proben (1 ml) entnommen, pelletiert und in 100  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. 50  $\mu\text{l}$  jeder Probe wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit LBP-spezifischen Antikörpern detektiert (Westernblot). Die Expression in den Bakterien verlief deutlich schneller als in den eukaryotischen Zelllinien. Schon nach 30 min konnte für das LBP-E94/95 ein Protein mit einer Größe von 58 kDa detektiert werden (Abb. 14). Im eukaryotischen Zellsystem war dies aufgrund der geringen Expressionskonzentration nicht möglich gewesen. Nach 90 min konnte das 58-kDa-Protein nicht mehr detektiert werden. Zeitgleich wurden jedoch Fragmente mit einer Größe von ca. 27 und 33 kDa sichtbar.



**Abb. 14: Westernblot mit verschiedenen LBP-spezifischen Antikörpern**

In diesem Westernblot wurde die Expression von LBP-E94/95 in *E. coli* mittels verschiedener Antikörper überprüft (a: abcam und b: R&D). Auf jeder Membran ist an der linken Seite der Proteingrößenstandard (M) in kDa aufgetragen, dann folgen je 50  $\mu\text{l}$  Proben der Zeitpunkten 30, 60, 90, 120 und 150 min nach Beginn der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600\text{nm}} = 0,4$ ) der Bakterien.

Das größere der beiden Fragmente (34 kDa) konnte auch für die Mutante c998t und das LBP-wt im *E. coli*-Expressionssystem gezeigt werden. Anfangs wurde auch hier das vollständige Protein (55 kDa) produziert (nicht gezeigt). Die Bande war dann jedoch nicht mehr detektierbar und wurde nach 60 min (Abb. 15) vom 34 kDa-Fragment abgelöst.



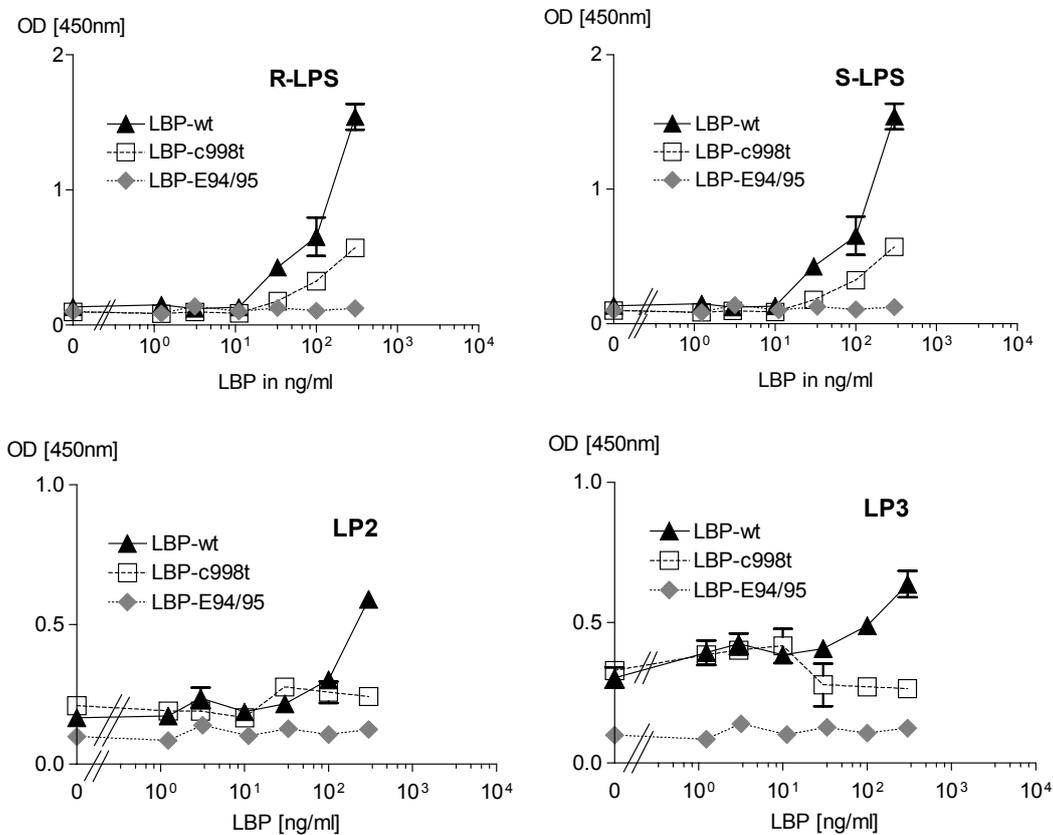
**Abb. 15: Westernblot mit LBP-spezifischem Antikörper (R&D) zur Expression von LBP**

Dargestellt sind hier Westernblots zur Expression von LBP-wt (a) und LBP-c998t (b) in *E. coli*. In der Spur M ist jeweils der Größenstandard aufgetragen. Die Proben (50 µl) wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90, 120 und 150 min (nur für LBP-c998t) am bzw. nach Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase der *E. coli* entnommen.

#### 4.2 Bindungsverhalten der LBP-Varianten

Alle LBP-Varianten wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber verschiedenen Liganden hin untersucht und miteinander verglichen. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Affinität des aufgereinigten LBP gegenüber den verwendeten 96-Loch-ELISA-Platten sehr hoch ist und auch durch verschiedenen Blockierungspuffer nicht unterbunden werden konnte. So wurden für die Bindungsversuche keine aufgereinigten Proteine verwendet, sondern das im Zellkulturüberstand gelöste LBP (Zellernte). Als TLR4-Liganden wurden die Lipopolysaccharide LPS Re 595 von *Salmonella (S.) minnesota* (R-LPS) und LPS B4:0111 von *E. coli* (S-LPS) getestet. Die verwendeten TLR2-Liganden waren das diazylierte (LP2) und triazylierte (LP3) Lipopeptid. Für das LBP-wt wurde die Interaktion mit LPS und Lipopeptiden bereits mehrfach beschrieben. Dies konnte auch in unseren Versuchen bestätigt werden. Eine Bindung konnte abhängig vom Liganden ab einer Konzentration von 10-100 ng/ml nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Bindungskurve für die rekombinanten Proteine zeigte einen stetig aufwärtssteigenden Verlauf. Aufgrund der geringen Ausbeute der LBP-E94/95-Ernte in der Zellkultur konnten die Versuche für diese Variante nur in einem eingeschränkten Konzentrationsbereich von 0 bis 300 ng/ml stattfinden. Innerhalb dieser Konzentrationen konnte keine Bindungsaktivität des LBP-E94/95 gegenüber den Lipopeptiden oder den LPS-Varianten festgestellt werden. Die Mutante LBP-c998t zeigte in diesem Bereich eine

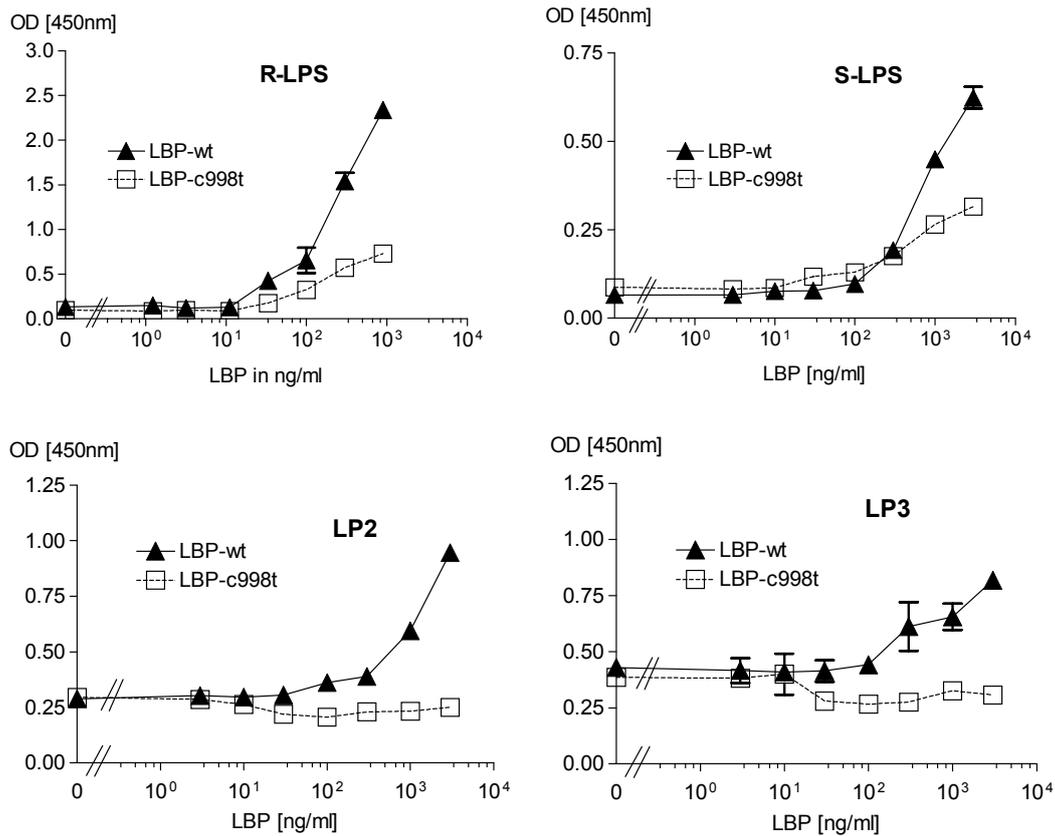
schwache Bindungsaktivität gegenüber LPS, es konnte jedoch keine Bindung an die Lipopeptide festgestellt werden.



**Abb. 16: Bindung der LBP-Varianten an bakterielle Liganden**

Es wurde das Bindungsverhalten von rekombinantem unaufgereinigtem LBP (LBP-wt: schwarzes Dreieck, LBP-c998t: weißes Quadrat und LBP-E94/95: grauer Diamant) gegenüber verschiedenen auf einer 96-Loch-Flachboden-Platte immobilisierten TLR2- (LP2 und LP3) und TLR4-Liganden (R- und S-LPS) untersucht. Die LBP-Konzentration (bis 300 ng/ml) war beschränkt durch die Menge an verfügbarem LBP-E94/95. Dargestellt ist je ein repräsentatives Beispiel aus drei nacheinander durchgeführten Experimenten. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Doppelbestimmungen.

Um zu untersuchen ob der beobachtete Effekt konzentrationsabhängig ist, wurden die Versuche für das LBP-wt und LBP-c998t auch mit höheren Konzentrationen (Abb. 17 bis 3  $\mu$ g/ml) wiederholt. Auch hier zeigte sich verglichen mit dem LBP-wt eine verminderte Bindung des LBP-c998t gegenüber den LPS-Varianten, eine Bindung an die Lipopeptide konnte wieder nicht festgestellt werden.



**Abb. 17: Vergleich der Bindung von LBP-wt und LBP-c998t an bakterielle Liganden**

Untersucht wurde das Bindungsverhalten von rekombinantem nicht aufgereinigtem LBP-wt (schwarzes Dreieck) und LBP-c998t (weißes Quadrat) gegenüber verschiedenen auf einer 96-Loch-ELISA-Platte immobilisierten TLR2- (LP2 und LP3) und TLR4-Liganden (R- und S-LPS) mit LBP-Konzentrationen bis 3 µg/ml. Dargestellt ist je ein repräsentatives Beispiel aus drei nacheinander durchgeführten Experimenten. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus Doppelbestimmung.

#### 4.3 Die Mutante LBP-c998t

##### 4.3.1 Populationsdaten zu SNP c998t

Mit Hilfe von SNP-Analysen kann man die Verteilung von Genvarianten in der Bevölkerung bestimmen. Der Polymorphismus c998t wird in der NCBI-Datenbank mit der Nummer rs2232613 geführt. Er wurde bisher in neun verschiedenen Kollektiven mit relativ kleinen Fallzahlen (6-120 Patienten) untersucht, deren Daten in der Datenbank hinterlegt sind ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2231613](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2231613)). Der Polymorphismus kommt sowohl in europäischen, wie auch in afrikanischen bzw. afrikanisch-amerikanischen Bevölkerungsgruppen in der heterozygoten Ausprägung vor

(Frequenz zwischen 0,125 und 0,2). Menschen mit homozygoter Mutation wurden nur in zwei europäischen Kollektiven gefunden (Frequenz 0,017 und 0,056). Bei zwei Studien in asiatischen Kollektiven konnte die Mutation nicht detektiert werden. Wir untersuchten ein Kollektiv aus 627 freiwilligen gesunden europäischen Probanden, mit einem deutlich höheren Anteil von Männern als Frauen (Tab. 5). Der SNP c998t kam mit 13,7 und 15,7 % (Allelfrequenz 0,072) in der heterozygoten Ausprägung bei beiden Geschlechtern annähernd gleich häufig vor. Es konnten keine Träger mit homozygoten Allelen in unserem Kollektiv gefunden werden. Einigen Probanden wurde zur Serumgewinnung Blut abgenommen und dieses in Zell- und Bindungstests verwendet.

**Tab. 5: Verteilung des SNP c998t in einem Kontrollkollektiv aus gesunden freiwilligen Probanden**

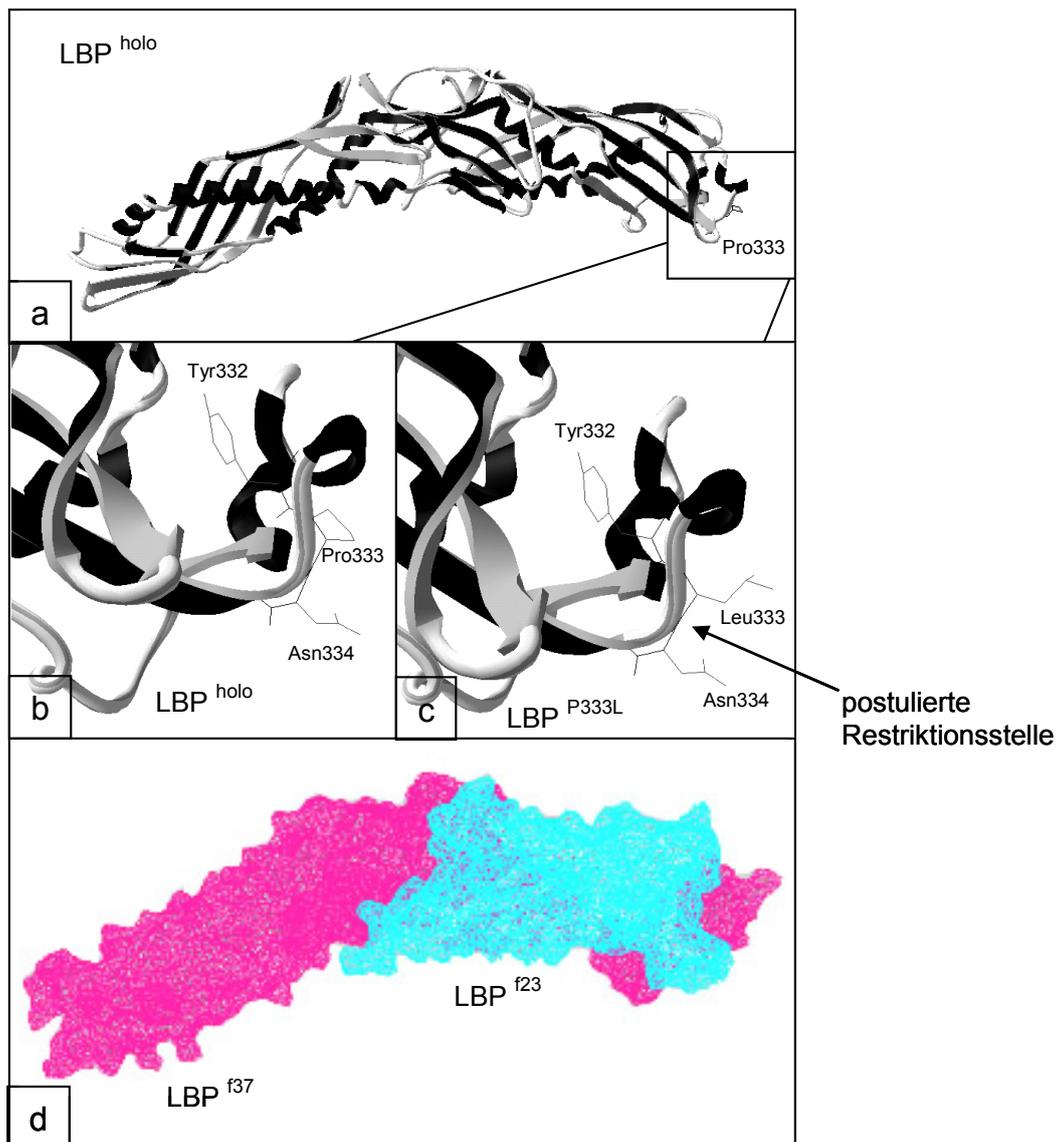
Der SNP ist in beiden Geschlechtern gleich verteilt. Homozygote Polymorphusträger wurden nicht gefunden. CC: homozygot LBP-wt, CT: heterozygot, je ein Allel LBP-wt und ein Allel LBP-c998t, TT: homozygot LBP-c998t

	CC	CT	TT
Weiblich (161)	139 (86,3 %)	22 (13,7 %)	0 (0 %)
Männlich (466)	393 (84,3 %)	73 (15,7 %)	0 (0 %)
Gesamt (627)	532 (84,8 %)	95 (15,2 %)	0 (0 %)

#### 4.3.2 Bioinformatische Analyse

Zur theoretischen Untersuchung von Proteinen bzw. Proteinvarianten steht eine Vielzahl von Programmen online zur Verfügung. Viele von diesen sind unter <http://www.expasy.ch/tools/> zu finden. Über Algorithmen versuchen sie, Vorhersagen über die Auswirkung von Mutationen auf das biochemische oder biologische Verhalten von Proteinen mit bekannter AS-Sequenz zu treffen. Für die Mutante LBP-c998t wurden so einige Merkmale untersucht, um abzuschätzen, wie sehr die Mutation das Protein verändert hat. Das Programm ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) macht u.a. Aussagen über das Molekulargewicht, den theoretischen isoelektrischen Punkt, die geschätzte Halbwertszeit und die Stabilität von Proteinen (Gasteiger et al. 2005). Bei diesen Untersuchungen gab es keine, bzw. nur sehr geringe Unterschiede zwischen LBP-wt und LBP-c998t (siehe Anhang). So lag das errechnete Molekulargewicht aufgrund des Aminosäureaustauschs für LBP-wt bei 52,93 g/mol und für LBP-c998t bei 52,95 g/mol. Der isoelektrische Punkt, die Stabilität und die Halbwertszeit wurden als unverändert angegeben. Mit NetOGlyc

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) und NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) können Aussagen über post-translationale Modifikationen durch Glykosylierung getroffen werden (Julenius et al. 2005). Durch die Mutation c998t kam es nicht zu einer Veränderung in der Anzahl der potentiellen Glykosylierungsstellen (siehe Anhang).



**Abb. 18: Modell des LBP-c998t**

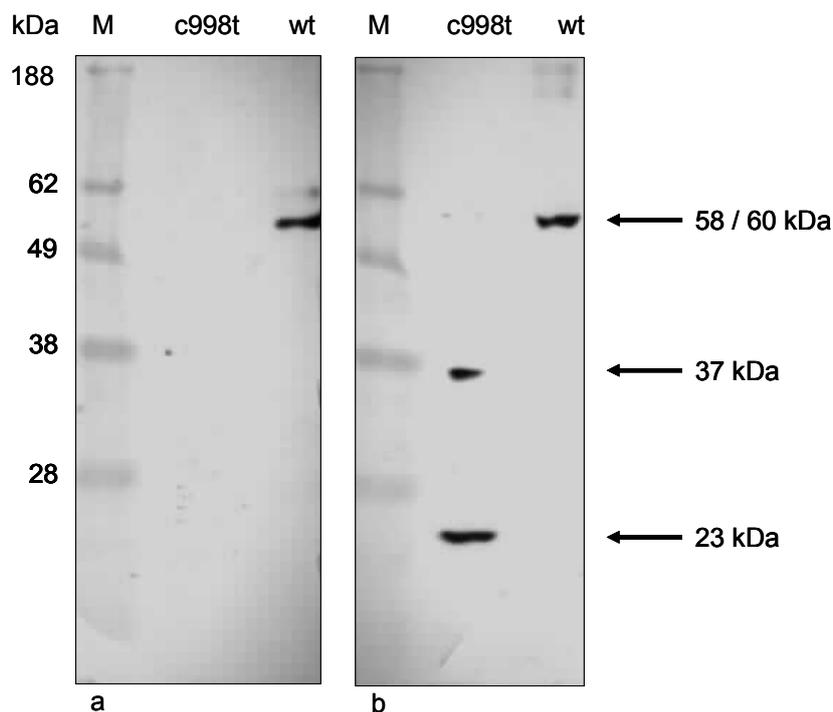
Darstellung der Tertiärstruktur des LBP-c998t (erstellt mit Swiss-Pdb-Viewer (Guex and Peitsch 1997)): a) Gesamtprotein mit Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix: schwarz,  $\beta$ -Faltblatt: hellgrau) mit Lage der Mutation c998t, b) und c) Detaildarstellung der Mutation mit angrenzenden Aminosäuren: b) unmutiert an Position 333 Prolin, c) mutiert: an Position 333 Leucin, d) postulierte Fragmente nach Restriktion an der neuen Restriktionsstelle.

Das Programm Deep View (Download möglich von <http://www.expasy.org/spdbv/>) in Kooperation mit der Internetseite Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) bietet die Möglichkeit, eine räumliche Darstellung (Tertiärstruktur) des untersuchten Proteins anzufertigen (Guex and Peitsch 1997). Diese dreidimensionalen Modelle, an denen man auch den Austausch von Aminosäuren simulieren kann, werden auf der Grundlage von Röntgen-Kristallstrukturanalysen verwandter Proteine erstellt. Für LBP wurden die Informationen der kristallographischen Analyse von BPI als Basis verwendet. Der Austausch der Aminosäure Prolin gegen Leucin an Position 333 führte in diesem Programm nicht zu einer Veränderung der Gesamtstruktur (Abb. 18 a - c). Das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren innerhalb eines Proteins beeinflusst die Möglichkeit des Angriffs durch eine Proteinase. Nach dem Programm „PeptideCutter“ (<http://expasy.org/tools/peptidecutter/>) (Gasteiger et al. 2005) könnten durch das Auftreten von Leucin an der Position 333 (Abb. 18c und d) die Proteinasen Chymotrypsin, Pepsin und Proteinase K die Peptidkette schneiden (siehe Anhang). Auch für die davor liegende Aminosäure Tyrosin 332 erweitert sich das Spektrum potentiell angreifender Restriktionsenzyme. Durch eine Restriktion könnte das Protein in zwei Teile (AS 1 – 333 und AS 334 – 452) zerfallen. Die errechnete Größe der Fragmente liegt bei 33,9 kDa für die Aminosäuren 1 - 333 (abzüglich der 25 AS des Signalpeptids und berechnet mit einem ungefähren Molekulargewicht von 110 Da pro AS) und 15.8 kDa (AS 334 - 452). Zusammen ergibt sich damit die Größe für unglykosiliertes LBP (50 kDa) wie es in *E. coli* oder bei gehemmter Glykosylierung exprimiert werden würde (Ramadori et al. 1990). Für das LBP sind fünf Glykosylierungsstellen vorhergesagt. Eine im Bereich der AS 1 - 333 und 4 im Bereich der AS 334 - 452 (Schumann et al. 1990). Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1,8 - 2 kDa für jede Glykol-Seitenkette mit ca. 10 verschiedenen Oligosacchariden (Oligosaccharide haben ein Molekulargewicht von ca. 180-200 Da), erhöht sich die potentielle Größe der Fragmente auf 35.7 kDa und 23 kDa. Ob es tatsächlich zur Restriktion kommt, ist abhängig von vielen äußeren Umständen, wie z.B. dem Vorhandensein der Proteinase, dem vorherrschenden pH-Wert und der Temperatur.

Insgesamt scheint die Mutation c998t keinen größeren Einfluss auf das Protein und seine Struktur haben. Trotzdem wird diese LBP-Variante vom Programm „PolyPhen Report“ als vermutlich schädigend eingestuft mit Auswirkungen auf die Struktur oder die Funktion des Proteins (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/index.html> und Anhang).

### 4.3.3 Darstellung der Mutante LBP-c998t im Westernblot

In der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Man kann durch Anfärben mit Coomassie-Blau oder Detektion im Westernblot überprüfen, ob im Labor produzierte Proteine, wie z.B. Mutanten in ihrer Größe noch dem Original entsprechen oder ob es durch die eingefügte Veränderung zu Abweichungen gekommen ist. Dabei stellt der Westernblot das sensitivere System dar und hat zudem durch die Verwendung spezifischer Antikörper den Vorteil, dass man sich bei Proteingemischen auf das relevante Protein konzentrieren kann. Beim Vergleich der Proteine LBP-wt und LBP-c998t konnten so Unterschiede zwischen Original und Mutante gezeigt werden. Je nach verwendetem Antikörper konnten für das LBP-c998t zwei Fragmente der Größe 37 kDa und 23 kDa (Abb. 19) oder ein intaktes Protein auf der Höhe der 55 kDa-Bande des Größenstandards (Abb. 20) detektiert werden. Der monoklonale Antikörper biG 42 erkennt zwar die zwei verschiedenen Glykosilierungsformen des LBP-wt (Doppelbande bei 58 und 60 kDa), die Mutante wurde jedoch nicht detektiert (Abb. 19).

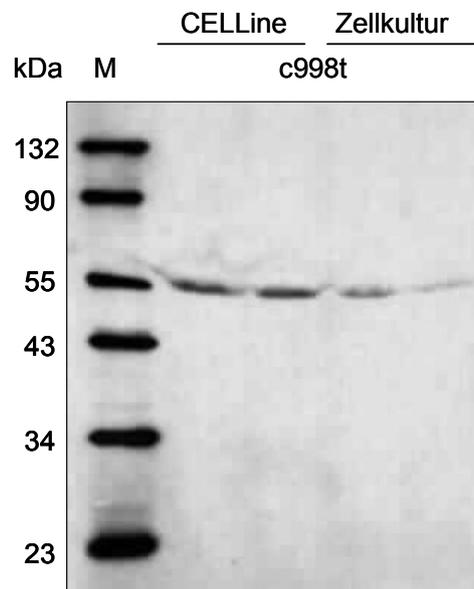


**Abb. 19: Darstellung von LBP-wt und LBP-c998t aus Zellkulturüberständen im Westernblot**

In den Westernblots wurden unterschiedliche Antikörper verwendet: a: monoklonal (biG42), b: polyklonal (Xoma). Es wurden je 50 µl Zellernte aufgetragen, die Probe für LBP-wt wurde aufgrund der höheren Ausgangskonzentration vorher 1:50 in PBS verdünnt, LBP-c998t wurde unverdünnt verwendet. M: Proteingrößenstandard in kDa.

Die zwei kleineren Proteinbanden (23 und 37 kDa) passen in ihrer Größe, genau zu den in der biometrischen Analysen vorhergesagt nach der Restriktion an AS 333 entstehenden Fragmente des LBP-c998t. Summiert entspricht dies mit 58,7 kDa der erwarteten Größe des LBP-wt, was ebenfalls die These unterstützt, dass die gesamte Peptidkette des LBP-c998t zwar gebildet wird, durch die Mutation jedoch in zwei Teile zerfällt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zellkultursystem zur Expression der LBP-Varianten verwendete. Um zu überprüfen ob dieses einen Einfluss auf die Produktion der Proteine hat, wurden die unterschiedlichen Zellkulturen mittels Westernblot verglichen. Es konnten keine Ungleichheiten festgestellt werden. Die Proteine unterschieden sich weder in der Größe (Abb. 20) noch im Auftreten möglicher Fragmente.



**Abb. 20: Unterschiedlichen Methoden der LBP-Expression**

Abgebildet ist ein Westernblot in dem verschiedene Methoden der LBP-Expression am Beispiel des LBP-c998t verglichen werden. Detektiert wurde mit einem polyklonalen LBP-spezifischen Antikörper (R&D). Aufgetragen wurden je Spur 50 µl Zellkulturüberstand. In der Spur M ist ein Proteingrößenstandard aufgetragen.

#### 4.4 Beschreibung der humanen Seren

Der SNP rs2232613 von LBP kommt heterozygot in einer gesunden Population bei bis zu 15 % der Beteiligten vor. Um die Ergebnisse aus den Versuchen mit rekombinanten Proteinen zu überprüfen, wurde einigen dieser Probanden Blut zur Serumgewinnung entnommen. Zusätzlich standen uns die Seren von Teilnehmern einer Studie der LMU

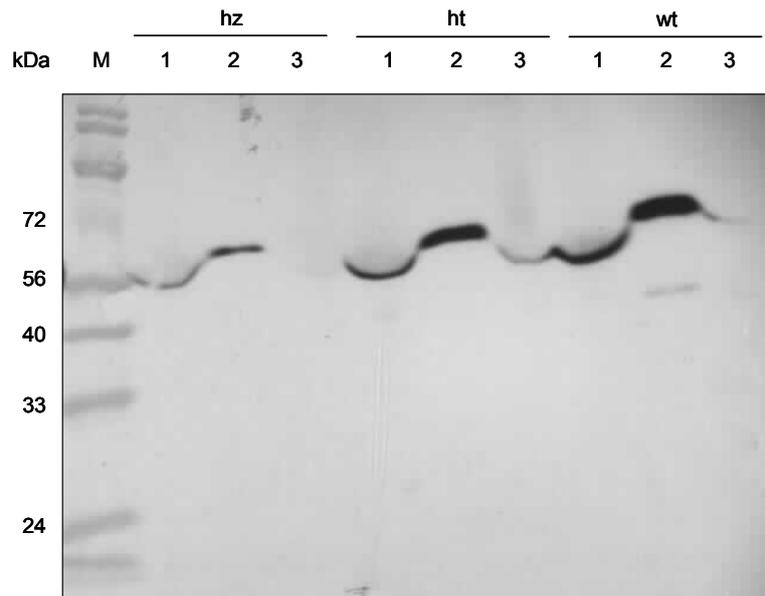
München (Michael Kabesch) zur Verfügung. Bei diesen Teilnehmern handelt es sich um Kinder, die aufgrund einer Lungenerkrankung an der dortigen medizinischen Fakultät behandelt wurden. Unter diesen befanden sich auch zwei Patienten mit homozygotem Genotyp von LBP-c998t. Alle diese Seren wurden wie die rekombinanten Proteine mit verschiedenen Methoden untersucht und getestet. Die durchschnittliche LBP-Konzentration lag bei 5,4 µg/ml (2,3 - 8,4 µg/ml). Es konnten keine auffälligen Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen des LBP-c998t-Allels festgestellt werden (Tab. 6).

**Tab. 6: Serumkonzentration von LBP exemplarisch für 9 Probanden aus verschiedenen Probandenkollektiven**

IMH- freiwillige Probanden des Instituts für Mikrobiologie der Charité, AG Ralf Schumann, M-Probanden der LMU München, AG Michael Kabesch mit Angaben zum Genotyp und der LBP-Konzentration

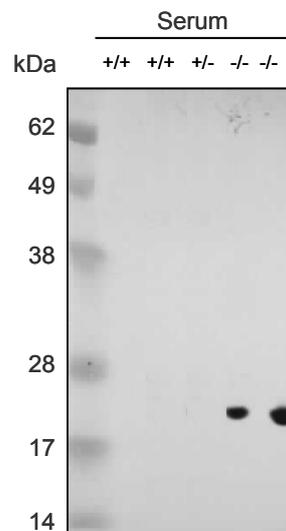
Serum	Genotyp LBP-SNP rs2232613	LBP-Konzentration in µg/ml
IMH15	CC	8,4
IMH19	CC	4,0
M003	CC	6,0
IMH14	CT	4,4
IMH43	CT	6,8
M004	CT	5,6
M0641225	TT	2,3
M2844165	TT	6,1
M3441039	TT	4,9
Mittelwert		5,4

Die Darstellung der humanen Seren in der SDS-PAGE erwies sich anfangs als schwierig. Eine ähnliche Größe wie das LBP hat das im Serum befindliche Serumalbumin (60 kDa). Aufgrund seiner hohen Konzentration von 35,2 bis 50,4 mg/ml (Dörner 2003), überlagerte es das LBP und verhinderte eine gute Detektion im Westernblot. Oft zeigte sich hier eine nach unten verdrängt wirkende Proteinbande, welche unter der erwarteten Größe lag. Durch eine vorherige Aufarbeitung des Serums, bei der das Albumin depletiert wurde, ließ sich dieses Problem jedoch weitgehend lösen (Abb. 21). Durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper konnten verschiedene Phänomäne beobachtet werden. So konnten mittels des monoklonalen Antikörpers biG42 für die humanen Seren aller Genotypen Proteinbanden der Größe 58/60 kDa detektiert werden.



**Abb. 21: Westernblot von humanen Seren**

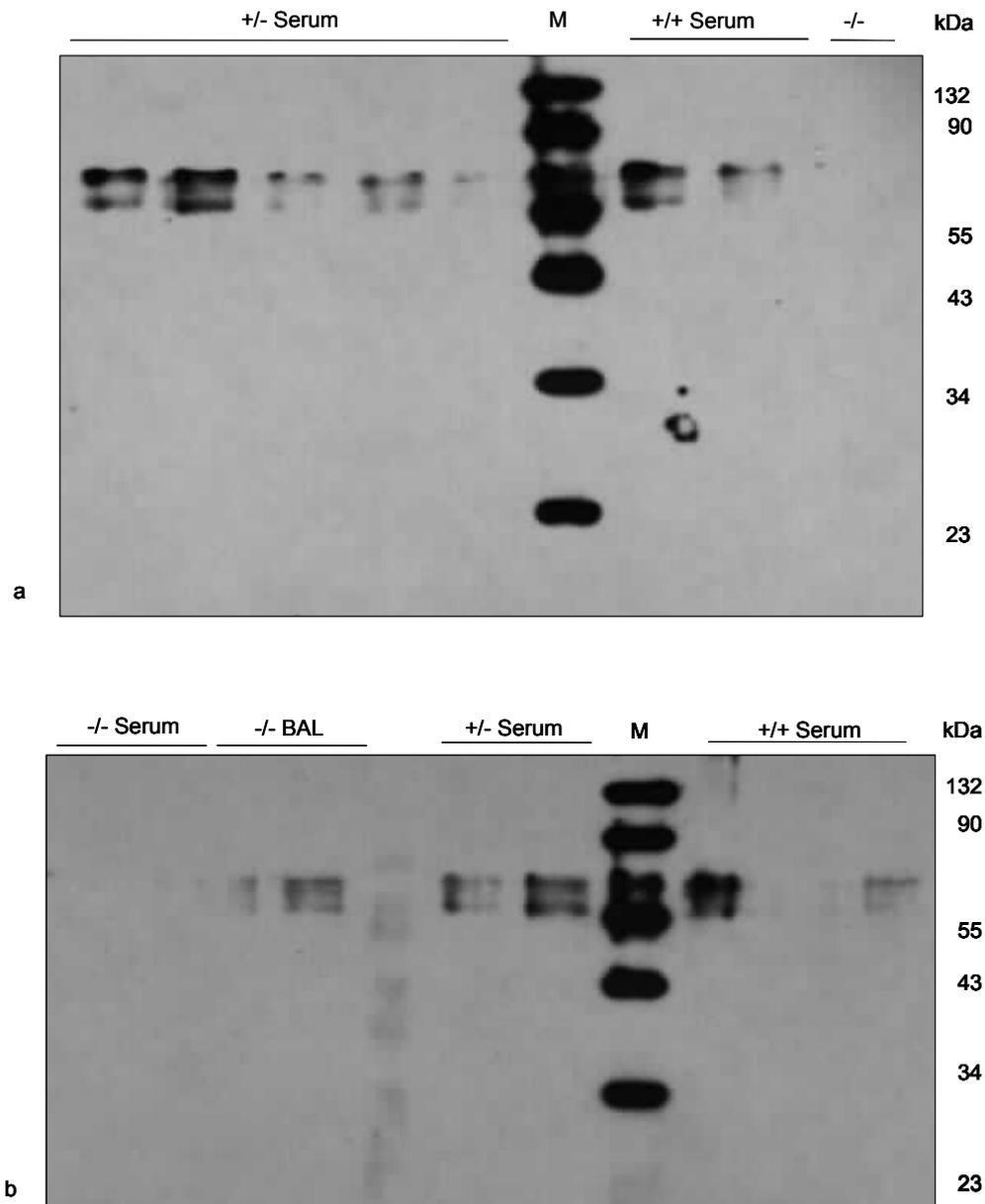
In diesem Westernblot sind humane Seren unterschiedlichen LBP-Genotyps (hz- homozygote LBP-c998t-Allele, ht- heterozygot bezüglich LBP-c998t, wt- Träger zweier LBP-wt-Allele) vor (1) und nach Albumindepletion (2) dargestellt (3: ist der Durchfluss bzw. Waschpuffer). Detektiert wurde mit dem monoklonalen anti-humanem LBP-Antikörper biG42.



**Abb. 22: Westernblot von humanen Seren mit unterschiedlichem LBP-Genotyp**

Die Seren wurden mit einem anti-LBP polyklonalen Antiserum (Xoma) detektiert. Plus- und Minuszeichen weisen auf die An- oder Abwesenheit des LBP-wt-Allels hin: +/+ homozygot LBP-wt, +/- heterozygot für LBP-998t und -/- homozygot für LBP-c998t

Die Verwendung eines anderen polyklonalen LBP-Antikörpers (XOMA) führte zur Entdeckung einer einzelnen kleineren Proteinbande in den Seren von Probanden mit homozygotem LBP-c998t-Genotyp (Abb. 22). Die Größe entspricht mit ungefähr 23 kDa dem kleineren, der in den Westernblots mit rekombinantem LBP-c998t gefundenen Fragmente.



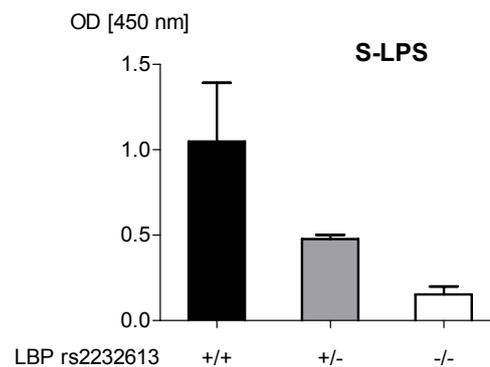
**Abb. 23: Westernblots von humanen Seren und Bronchiallavage (BAL)**

Im Westernblot wurden humanen Seren (a und b) und Bronchiallavage (nur b) von Probanden mit unterschiedlichem LBP-Genotyp (Probanden-Kollektiv München) verglichen. Detektiert wurde mit einem polyklonalen anti-humanen LBP-Antiserum (abcam) (-/- homozygote LBP-c998t-Allele, +/- heterozygot bezüglich LBP-c998t, +/+ Träger zweier LBP-wt-Allele). Die zwei BAL-Proben auf dem unteren Gel (b) stammen von den gleichen Patienten, wie die Seren homozygoten LBP-c998t-Genotyps, die in den zwei Spuren davor aufgetragen sind.

Die Detektion mit dem polyklonalen anti-human LBP-Antiserum (abcam) ergab für die Seren von Probanden mit heterozygotem oder Wildtyp-Genotyp ebenfalls die erwartete Doppelbande bei 58/60 kDa (Abb. 23). Für die Seren mit homozygoten LBP-c998t-Genotyp konnte hier kein Protein erkannt werden. Überraschend war, dass bei den Probanden mit homozygoten Genotyp in der Bronchiallavage (BAL) derselben Patienten-

ten im Gegensatz zu den Seren, die LBP-Doppelbande gezeigt werden konnte (Abb. 23b).

Es sollte anschließend gezeigt werden, ob die Seren im Bindungsversuch ähnliche Ergebnisse zeigen wie die rekombinanten Proteine. Dabei wurden Seren von Probanden verglichen, die entweder das LBP-wt in homozygoter Ausprägung trugen oder das LBP c998t in heterozygoter oder homozygoter Ausprägung. Wie in Abb. 24 exemplarisch für die Bindung an das LPS 0111:B4 dargestellt ist, lag die Bindungsstärke der heterozygoten Seren zwischen denen des Wildtyp-Serums und des homozygoten Serums.

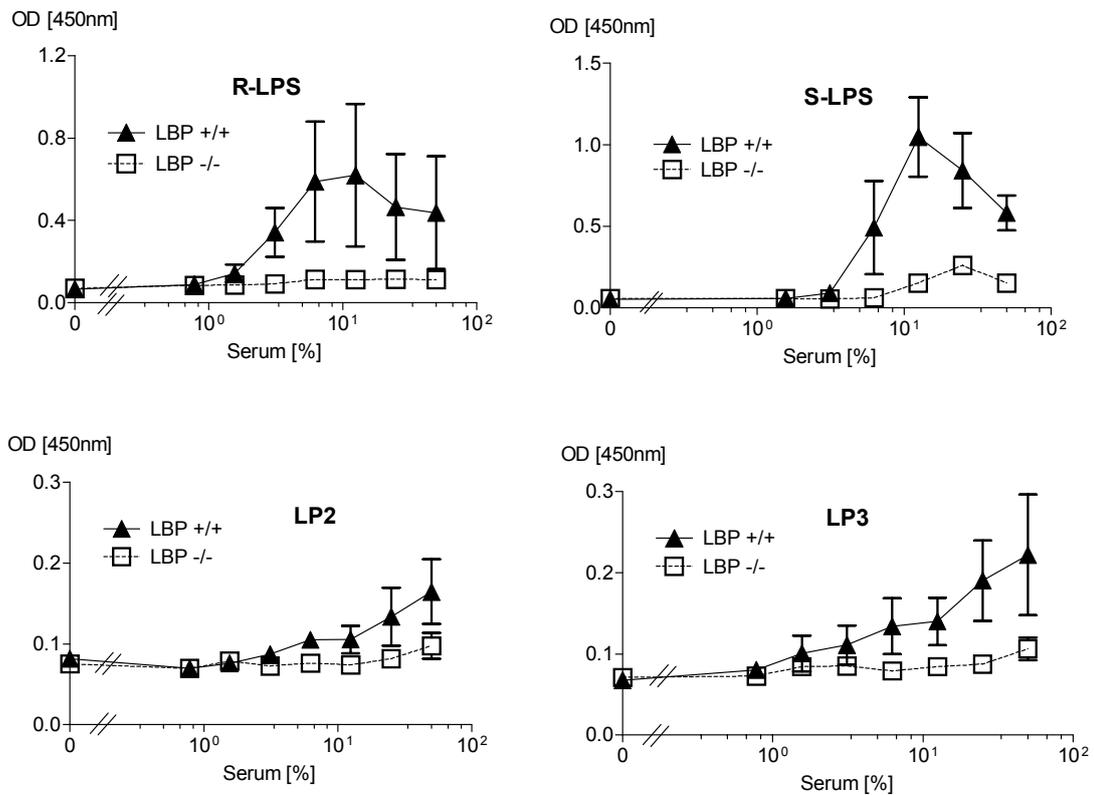


**Abb. 24: Bindung von humanen Seren verschiedener LBP-Genotypen an S-LPS**

Exemplarisch dargestellt, ist die Bindung von Seren (12,5 %) aller Genotypen an S-LPS 0111:B4, auf einer 96-Loch-Flachbodenplatte immobilisiert. Es wurden jeweils die Ergebnisse von drei verschiedenen Probanden desselben Genotyps als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Aus darstellungstechnischen Gründen sind die Experimente mit heterozygoten Seren im Folgenden (Abb. 25) nicht gezeigt. In den Versuchen mit dem Serum gesunder Probanden konnte die Bindung für das LBP-wt-Serum ab einem Prozentsatz von 2 % nachgewiesen werden. Dies entspricht bei einem durchschnittlichen LBP-Gehalt von 5 - 6  $\mu\text{g/ml}$  einer Konzentration von 120 ng/ml und bietet damit eine gute Möglichkeit des Vergleichs zu den Ergebnissen mit den rekombinanten Proteinen. Die homozygoten LBP-c998t-Seren zeigten, verglichen mit den Wildtyp-Seren, nur eine sehr schwache Bindung an die LPS-Varianten und keine Bindung an die Lipopeptide (Abb. 25). Dadurch wurden die Ergebnisse der Bindungsversuche mit rekombinanten Proteinen bestätigt. Die Rest-Bindungsaktivität des LBP-c998t gegenüber dem LPS ist jedoch schwächer als bei den rekombinanten Proteinen. Im Vergleich zu den rekombinanten Bindungsversuchen zeigte die Bindung der Seren ein Maximum bei 10 % Serum. Bei

weiterer Erhöhung der Serumkonzentration lag die gemessene OD<sub>450nm</sub> darunter. Die Menge an gebundenem LBP verringerte sich also.



**Abb. 25: Bindung von Seren mit unterschiedlichem LBP-Genotyp an bakterielle Liganden**

Bindungsverhalten von Seren mit verschiedenem Genotyp (homozygot LBP-wt entspricht LBP +/+ und homozygot LBP-c998t entspricht LBP -/-) an die Liganden R-LPS (Re595), S-LPS (0111:B4), LP2 und LP3. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Seren verschiedener Probanden.

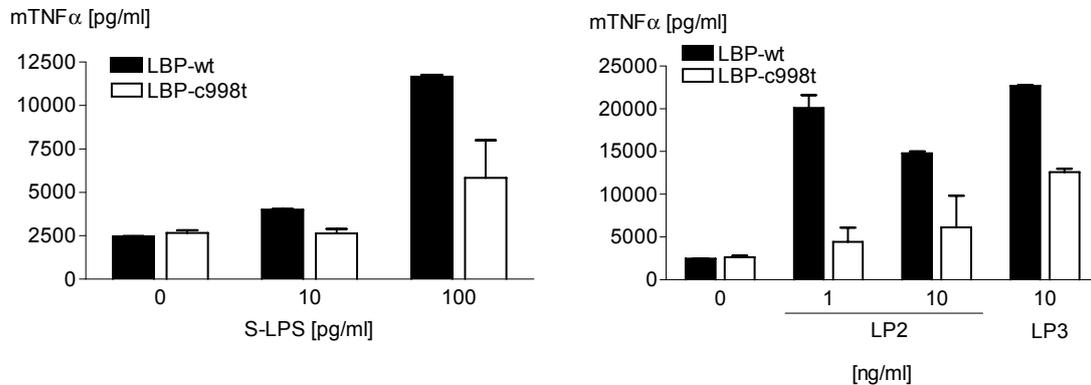
#### 4.5 Zellstimulation

In verschiedenen Zell-Stimulationsversuchen wurden sowohl die rekombinanten Proteine als auch die Seren der genetisch verschiedenen Spender untersucht. Es sollte geprüft werden, ob die Verwendung des LBP-c998t statt des LBP-wt zu einer Veränderung in der Signaltransduktion führt. Dazu wurden in verschiedenen Zellstimulationen sowohl die rekombinanten Proteine, als auch die Seren der genetisch unterschiedlichen Individuen verwendet. Im Zellkulturüberstand wurden verschiedene Zytokine mittels ELISA gemessen, je nach Zellart murin (RAW264.7) oder human (THP1 und Monozyten). Die innerhalb eines Versuchs verwendeten Seren hatten immer gleich lange

Lagerungszeiten. Meist wurden sie sofort nach dem Aufbereiten in Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und erst zum Versuch wieder aufgetaut.

#### 4.5.1 RAW264.7

RAW264.7 ist eine monozytäre Mausemakrophagenzelllinie. Diese Zellen sind einfach zu kultivieren und können ohne Vorbehandlung oder Ausdifferenzierung stimuliert werden. Sie wurden in FKS-freiem Medium in 96-Loch-Zellkulturplatten mit einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Loch für 24 h kultiviert und dann für 24 h mit S-LPS 0111:B4 und den Lipopeptiden LP2 und LP3 stimuliert. Die Stimulation erfolgte unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen LBP-wt und LBP-c998t (Abb. 26) oder Serum (Abb. 27). Im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA murines (m)TNF- $\alpha$  nachgewiesen. Auf Versuche mit LBP-E94/95 wurde aufgrund der negativen Ergebnisse aus den Bindungsversuchen und der geringen Verfügbarkeit verzichtet. Die Konzentration des verwendeten LBP-wt und LBP-c998t war aufgrund der geringen Aufreinigungsausbeute für das LBP-c998t auf maximal 100 ng/ml beschränkt. Die Verwendung höherer Konzentrationen führte für das LBP-c998t zu hohen Grundstimulationen in Versuchen ohne Stimuli.

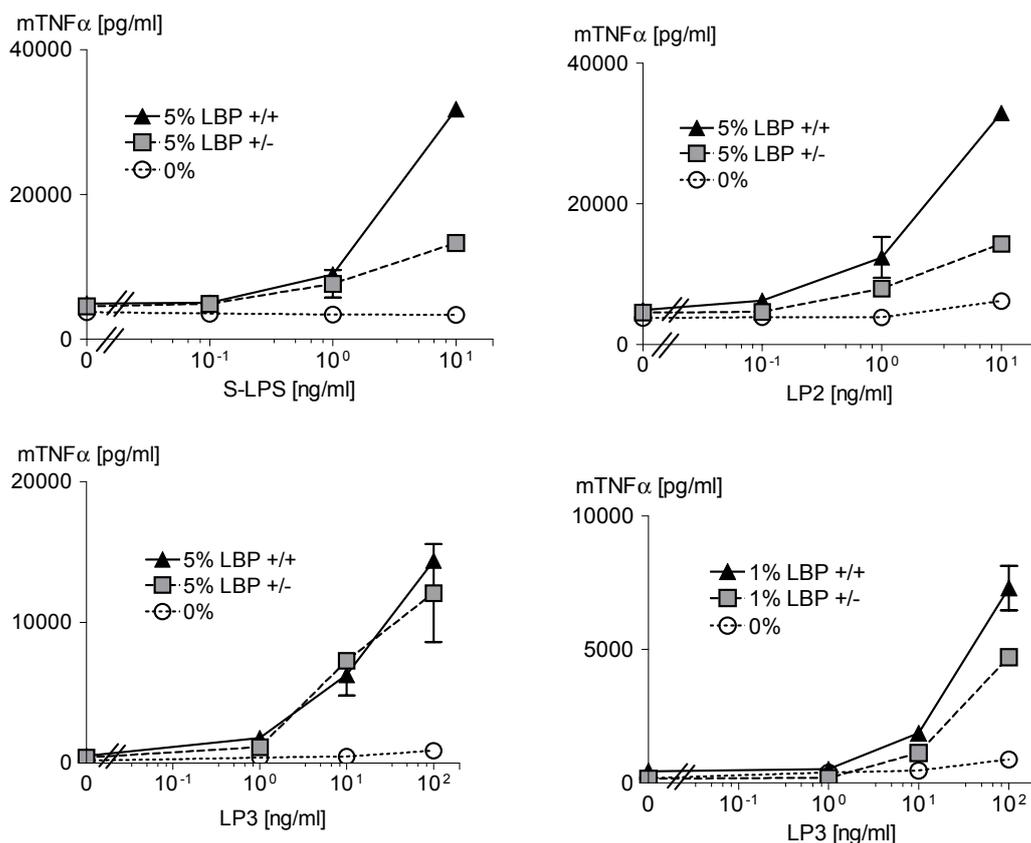


**Abb. 26: Stimulation von RAW264.7 mit bakteriellen Liganden und LBP**

Nach Stimulation von RAW264.7 für 24 h mit LPS 0111:B4, LP2 und LP3 unter Zugabe von 100 ng/ml LBP-wt bzw. -c998t wurde die mTNF $\alpha$ -Sekretion mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist je ein repräsentatives Beispiel aus drei nacheinander durchgeführten Experimenten. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Doppelbestimmung.

In den Zellstimulationsversuchen gezeigt werden, dass es bei steigender Konzentration von LBP-wt zu einem deutlichen Anstieg der mTNF- $\alpha$ -Ausschüttung kam, der für die Mutante LBP-c998t nicht oder nur schwach ausgeprägt war. Dieser Effekt war auch schon nach 4 h und bei anderen Ligandenkonzentrationen erkennbar (Daten nicht ge-

zeigt), jedoch schwächer ausgeprägt. Für die Stimulationsversuche mit Seren stand nur das Serum von LBP-wt-Trägern und heterozygoten LBP-c998t-Trägern in ausreichender Menge zur Verfügung, so dass zum Serum homozygoter LBP-c998t-Träger keine Ergebnisse vorliegen. Schon die heterozygoten LBP c998t-Seren zeigten eine deutlich eingeschränkte Aktivität gegenüber den LBP-wt-Seren (Abb. 27). Dieser Effekt variierte jedoch bei den einzelnen Liganden: Für das S-LPS 0111:B4 und das LP2 konnte bei Verwendung von einprozentigem Serum keine Zytokinreduktion von LBP-c998t gegenüber LBP-wt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), ab 5 % jedoch sehr deutlich. Im Vergleich dazu, war der Einfluss für das LP3 deutlich schwächer oder gar nicht vorhanden. Bei Verwendung von einprozentigem Serum konnte für die Stimulation mit LP3 noch ein leichter Unterschied zwischen LBP-wt- und LBP-c998t-enthaltendem Serum detektiert werden, ab 5 %-Serum war dieser nicht mehr vorhanden (Abb. 27).



**Abb. 27: Stimulation von RAW264.7 mit bakteriellen Liganden und Serum**

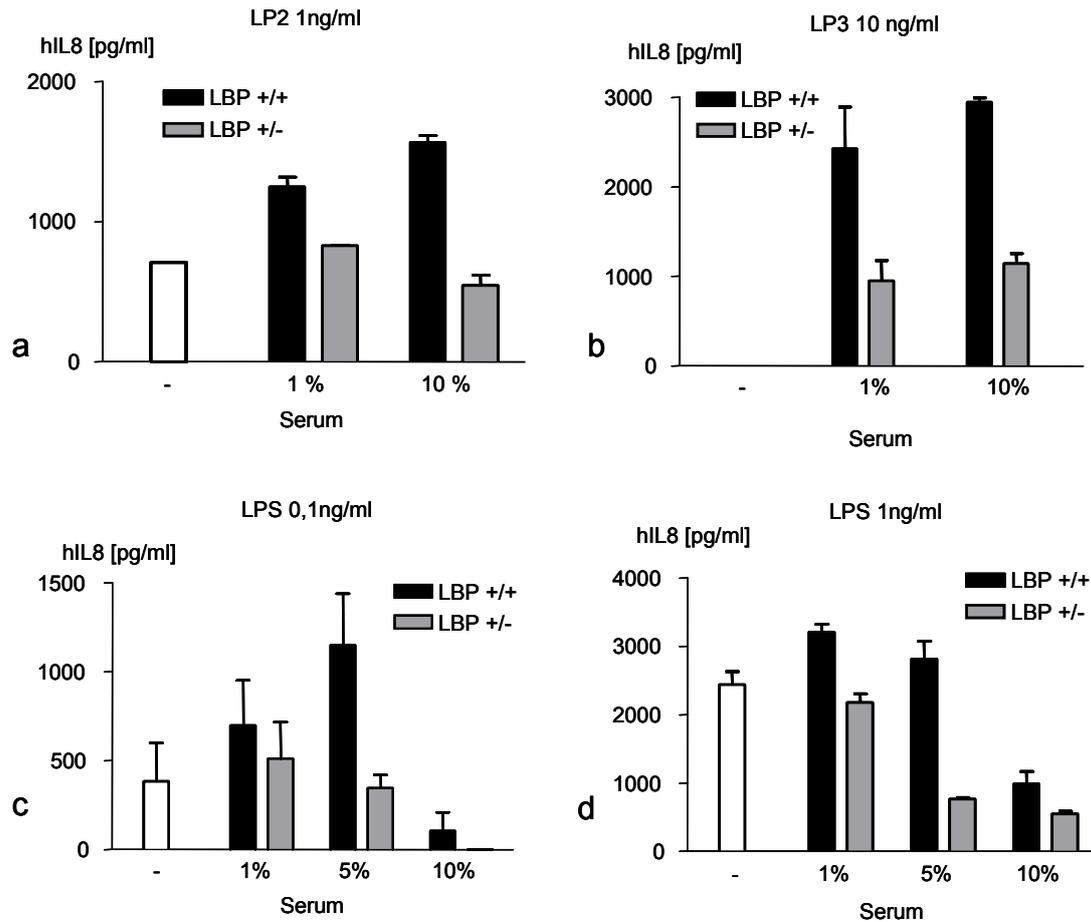
Nach der Stimulation von RAW264.7 für 4 h mit S-LPS 0111:B4, LP2 und LP3 unter Zugabe von Seren unterschiedlichen Genotyps (ht- Seren von Probanden mit heterozygotem LBP-c998t-Allel, wt- Seren von Probanden mit homozygoten LBP-wt-Allelen) wurde mTNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Experiments von drei in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Es wurde auch murines IL-6 in diesen Zellüberständen bestimmt (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieses war jedoch nach 4 h, dem in dieser Arbeit verwendeten Zeitrahmen nur in geringen Mengen und nur bei hohen LPS-Konzentrationen nachzuweisen. In diesen Fällen wurden die Ergebnisse der mTNF- $\alpha$ -Bestimmung bestätigt.

#### 4.5.2 THP1

Im Gegensatz zu RAW264.7 handelt es sich bei den THP1-Zellen um eine humane Monozytenzelllinie. Diese kann man durch Kultivierung in Vitamin D3-haltigem Medium zu Makrophagen ausdifferenzieren. Im Zellkulturüberstand wurden nach 20 h Stimulation die Zytokine hIL-8 und hIL-1 $\beta$  gemessen. In diesen Stimulationsversuchen wurde nur mit Seren und den bakteriellen Liganden kostimuliert (Abb. 28). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die THP1-Zellen sehr sensibel auf die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der LBP-Aufreinigungen reagierten. Der Unterschied betrug durch die unterschiedliche Ernte- und Aufreinigungsausbeute z.T. eine bis zwei Log-Stufen (LBP-wt: 200  $\mu$ g/ml versus LBP-c998t: 3  $\mu$ g/ml, siehe auch 4.1.3).

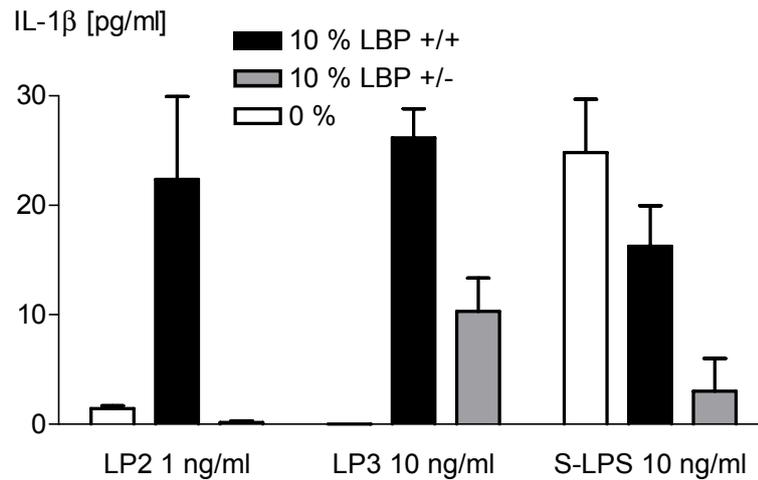
Ähnlich wie in den RAW264.7-Zellversuchen konnte durch Gabe verschiedener Konzentrationen LBP-wt-Serums die Zytokinsekretion der THP1-Zellen erhöht werden (Abb. 28 a-c). Wurde den Zellen Serum mit heterozygotem LBP-c998t zugegeben, blieb die hIL-8-Sekretion auf dem Niveau der Stimulation ohne Serumzusatz (Abb. 28 a und c) bzw. war gegenüber den mit LBP-wt-Serum stimulierten Zellen deutlich verringert (Abb. 28 b). Für die Stimulation mit LPS konnte noch ein weiterer Effekt beobachtet werden. Wurde die LPS-Konzentration erhöht (1 ng/ml), zeigte sich durch Zugabe von Serum mit LBP-wt (1 und 5 %) nur noch eine schwache Erhöhung der Zytokinsekretion (Abb. 28 d). Der Hemmeffekt durch das heterozygote LBP-c998t-Serum war sogar im Vergleich mit den Zellen ohne Serumzugabe immer noch zu erkennen. Bei weiterer Erhöhung der Serumkonzentration (10 %) wurde er begleitet von einem eben solchen Hemmeffekt durch das LBP-wt-Serum. Die ermittelten Konzentrationen der Zytokinausschüttung lagen sogar unter denen, die für die Stimulation ohne Serumzugabe ermittelt wurden.



**Abb. 28: Stimulation von THP1-Zellen mit bakteriellen Liganden und Serum**

Die Zellen wurden mit Vitamin D3 für 72 h ausdifferenziert und für 20 h mit LP2 (a), LP3 (b) und LPS 0111:B4 (c und d) unter Zugaben des Serums stimuliert. Die Stimulation zeigte eine unterschiedliche Wirkung der Seren mit homozygotem LBP-wt (LBP +/+) bzw. heterozygotem LBP-c998t (LBP +/-) auf die hIL-8-Ausschüttung durch THP1-Zellen. Der erste Wert (-) jeder Abbildung zeigt die Stimulation mit den bakteriellen Liganden, aber ohne Zugabe von Serum. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Versuches aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

Wie auch für die RAW264.7-Zellen sollte untersucht werden, ob die Stimulationsergebnisse der THP1-Zellen spezifisch für IL-8 sind oder ob der beobachtete Effekt auch andere Zytokine betrifft. Ein weiteres Zytokin, das von THP1-Zellen nach Stimulation ausgeschüttet wird, ist das hIL1- $\beta$ . Es konnte in diesem Assay jedoch nur in sehr geringen Mengen bestimmt werden. Die wenigen positiven hIL-1 $\beta$ -Messungen bestätigten jedoch die hIL-8-Ergebnisse hinsichtlich aller beobachteten Phänomene (Abb. 29).

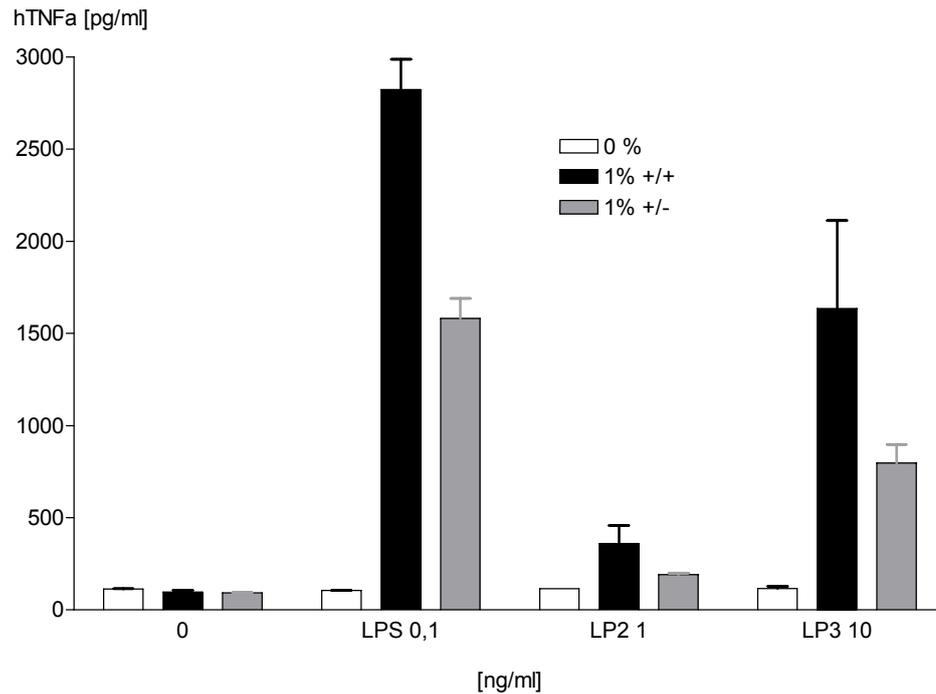


**Abb. 29: Stimulation von THP1-Zellen mit bakteriellen Liganden und Serum**

Bestimmung des Zytokin hIL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand von THP1-Zellen nach Stimulierung (20 h) mit LP2, LP3 und LPS in An- oder Abwesenheit von Serum verschiedenen Genotyps. Die Zellen wurden mit Vitamin D3 für 72 h ausdifferenziert und für 20 h stimuliert. LBP +/+ steht für das homozygote Vorkommen von LBP-wt, LBP +/- steht für das Vorhandensein eines Allels LBP-wt und eines Allels LBP-c998t. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Versuches aus drei in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

#### 4.5.3 Humane Monozyten

PBMC wurden aus dem Blut freiwilliger gesunder Spender, die einen LBP-wt-Genotyp besitzen, aufgereinigt. Um die oben genannten Probleme mit dem rekombinanten Protein zu umgehen, wurden auch hier nur die humanen Seren unterschiedlichen LBP-Genotyps als LBP-Quelle genutzt. Verglichen wurden Seren von Probanden mit heterozygotem LBP-c998t-Genotyp mit denen von Probanden mit LBP-wt-Genotyp. Die TLR2-Liganden LP2 und LP3 und der TLR4-Ligand LPS wurden jeweils zusammen mit 1 % Serum für 30 min bei 37 °C in Zellkulturmedium vorinkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 4 h mit den Monozyten inkubiert, um dann hTNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand zu bestimmen (Abb. 30). Die Zellen, die mit heterozygotem LBP-c998t-Serum kostimuliert wurden, zeigten eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit die hTNF- $\alpha$ -Ausschüttung zu verstärken im Vergleich zum LBP-wt-Serum. Dieser Effekt war, wie schon in den Versuchen mit immortalen Zelllinien, für alle verwendeten Liganden deutlich.



**Abb. 30: Stimulation humaner Monozyten mit bakteriellen Liganden und humanem Serum**

Bestimmung des Zytokins hTNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand von humanen Monozyten nach Stimulierung mit LP2, LP3 und LPS in An- oder Abwesenheit von Serum verschiedenen Genotyps (LBP +/+ steht für das homozygote Vorkommen von LBP-wt, LBP +/- steht für das Vorhandensein eines Allels LBP-wt und eines Allels für LBP-c998t). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Versuches aus zwei in Doppelbestimmung durchgeführten Versuchen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswirkung und Bedeutung der LBP-Mutation c998t

In dieser Arbeit wurden erstmalig die funktionellen Auswirkungen eines natürlich vorkommenden Polymorphismus von LBP beschrieben. Die Mutation wurde bei Kindern entdeckt, die bei Verwendung des in der Diagnostik üblichen LBP-ELISA (IMMULITE<sup>®</sup>, Siemens ehemals, DPC Biermann) kein LBP im Serum zeigten. Daraufhin wurde das LBP-Gen dieser Kinder sequenziert. Bei diesem Polymorphismus ist in der DNS-Sequenz an der Position 998 ein Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dies führt in der Aminosäuresequenz zu einem Wechsel der Aminosäure Prolin gegen Leucin an Position 333.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, verändert die Mutation c998t die Struktur und Funktion von LBP. So zeigte das mutierte LBP (LBP-c998t) eine deutlich reduzierte Bindung gegenüber S- und R-LPS und den synthetischen Lipopeptid-Analoga mit verschiedener Azylierung. Dieser Effekt konnte sowohl für das rekombinante Protein gezeigt werden, als auch für humane Seren von freiwilligen Spendern, die Träger dieses Polymorphismus (heterozygot oder homozygot) sind.

Die Darstellung des mutierten LBP mittels Westernblot weist daraufhin, dass die strukturelle Stabilität des LBP-c998t beeinträchtigt zu sein scheint. So konnte zwar das Holo-Protein der Größe 58/60 kDa nachgewiesen werden, es tauchten jedoch sowohl im rekombinanten Expressionssystem, als auch in den humanen Seren kleinere Fragmente auf. Deren Molekulargewichte stimmen mit denen für eine Teilung des Proteins an Position 333 ermittelten LBP-Teilstücken (23 und 37 kDa) überein und die Aufsummierung dieser Fragmente entspricht der Gesamtgröße des LBP-wt (60 kDa). Dies lässt auf einen Zerfall des mutierten Proteins schließen. Eine genaue Identifizierung der Fragmente durch Sequenzierung wird hier Gewissheit schaffen und zurzeit unternommen. Die Tatsache, dass nie beide Fragmente im Serum gefunden werden konnten, weist daraufhin, dass es wie üblich bei degenerierten und funktionsbeeinträchtigten Proteinen vermutlich zu einem weiteren Abbau der Fragmente kommt. Da auch in einigen Seren homozygoter Polymorphismusträger das vollständige Protein nachgewiesen werden konnte, scheint es wie bei der Expression in Zelllinien dort ebenfalls initial gebildet und ins Serum ausgeschüttet zu werden. Es ist jedoch offensichtlich instabiler als das normale LBP und zerfällt oder wird durch Proteasen geschnitten. Analysen des dreidimensionalen Modells von LBP-c998t zeigten keine Änderungen der generellen

Tertiärstruktur. Die Faltung des Proteins scheint durch die Mutation nicht beeinträchtigt zu sein.

Mittels bio-informatischer Analysen wurde in der Aminosäuresequenz des LBP-c998t eine neue potentielle Restriktionsstelle für die Proteasen Pepsin, Proteinase K und Chymotrypsin identifiziert. Die Proteinase K, als Protease des Pilzes *Tritirachium album* spielt hierbei sicher keine Rolle, die Proteinasen Pepsin und Chymotrypsin kommen als Verdauungsenzyme im Magen bzw. Dünndarm des Menschen vor. Des Weiteren gibt es in menschlichen Zellen, auch den Immunzellen, Proteasomen, die zumindest eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität aufweisen. Beim Abbau von Proteinen in den Proteasomen kann es denn auch zu Zwischenprodukten kommen, die den von uns gefundenen Fragmenten entsprechen könnten (Orlowski and Wilk 2000). Funktionelle Studien an genetischen Varianten des CYP2C8, einem Protein der Cytochrom P450 (CYP) -Familie, welches am Abbau von Medikamenten beteiligt ist, zeigten dass der Austausch von Aminosäuren neben verringerten Expressionsspiegel auch zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Proteinase K führen kann (Singh et al. 2008). Die Ursache lag vermutlich in der Fehlfaltung des Proteins. Diese verursachte eine Änderungen der Konformation, die den Zugang der Protease zu möglichen Restriktionsstellen verbesserte. Dieser initiale Zerfall führt dann zu Generierung proteolytischer Fragmente, die nach dem Zusammenbruch der Tertiärstruktur weiter abgebaut wurden. Ob es im Fall des LBP-c998t ebenfalls eine initiale Restriktion ist, die dann zum Abbau des Proteins führt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Versuche mit verschiedenen Proteinase-Inhibitoren während der rekombinaten Proteinexpression und –aufreinigung könnten diese vielleicht klären.

Eine wichtige Rolle für die Stabilität von Proteinen spielt neben der Aminosäuresequenz auch die post-translationale Glykosylierung. Sie erhöht generell die Stabilität der Proteine durch eine Verringerung der strukturellen Dynamik und verhindert deren proteolytischen Abbau (Vegarud and Christensen 1975b, 1975a; Solá et al. 2007). Ein Beispiel für den Einfluss von Mutationen auf Glykosylierung und die strukturelle Stabilität von Proteinen wurde kürzlich beschrieben (Meng et al. 2007). Dabei konnte für eine Genvariante des CD23, eines IgE-Rezeptors, gezeigt werden, dass durch gezielte Mutagenese eines Nukleotids (wie im LBP-c998t handelte es sich dabei um einen Cytosin→Thymin-Wechsel) vermutlich eine N-Glykosylierungsstelle am Protein verschwindet. Die fehlende Glykosylierung zeigte Auswirkung auf die Stabilität und Funktion des CD23. Im Gegensatz zu den für das LBP-c998t besprochenen möglichen neuen Restriktionsstellen, kommt es im CD23 jedoch zu Resistenzen gegenüber Proteasen, die dieses Protein normalerweise schneiden können. LBP verfügt über fünf potentielle N-

Glykosilierungsstellen (Schumann et al. 1990), an den Positionen 300, 350, 355, 386 und 394. Wie Analysen im dreidimensionalen Modell zeigten, liegt keine dieser Aminosäuren in räumlicher Nähe zur Mutation (Daten nicht gezeigt), so dass die Glykosylierung des LBP nicht gestört sein sollte.

Die Mutation LBP-c998t führt vermutlich also nur indirekt zum Verlust der Bindungsaktivität. Sie hat wahrscheinlich vor allem Auswirkung auf die Gesamtstruktur und damit indirekt auch auf alle anderen potentiellen Bindungsbereiche. Ein gut charakterisiertes Beispiel wären hier die Phospholipide, deren zwei Bindungstaschen am LBP als in der konkaven Seite der Bumerang-Struktur liegend vorgeschlagen wurden (Beamer et al. 1998). In Bindungsversuchen zwischen Phospholipiden und dem mutierten Protein sollte es ebenfalls zu einer Beeinträchtigung kommen, obwohl die Mutation deutlich außerhalb der Phospholipidtaschen liegt.

Ein Nebenergebnis dieser Arbeit stellt das Verhalten des LBP-wt-Serums dar. Bei Verwendung der Seren fiel auf, dass in ihren Bindungskurven mit dem LPS ab einer Serumkonzentration von 10 % keine weitere Zunahme der Bindung auftrat wie bei den rekombinanten Proteinen, sondern eine Hemmung. Mit einer zunehmenden Serumkonzentration steigt nicht nur die Menge an verfügbarem LBP, sondern auch die Konzentration anderer Serumbestandteile. Daraus resultieren zwei mögliche Erklärungen: Es könnte sich einerseits um eine direkte Hemmung der Aktivität von LBP durch andere im Serum vorhandene Moleküle handeln. Solch ein Verhalten konnte für negativ geladene Phospholipide gezeigt werden, die sowohl die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion von Makrophagen inhibierten, als auch zu einer Reduktion des LBP-vermittelten LPS-Transports und die Einbettung in Membranen führten (Mueller et al. 2005). Andererseits sind im Serum auch andere LPS-bindende Substanzen enthalten, wie BPI und lösliches CD14, die ab einer gewissen Konzentration auch an das immobilisierte LPS binden und mit dem LBP darum konkurrieren könnten. Für die Lipopeptide konnte ein solches Verhalten nicht gezeigt werden. Hier stieg für rekombinante Proteine und Seren die Bindungsaffinität mit steigender LBP-Konzentration immer weiter an.

Um zu untersuchen, ob die eingeschränkte Bindung von TLR2- und TLR4-Liganden an LBP-c998t auch funktionelle Auswirkungen hat, wurden verschiedene Immunzelllinien mit diesen Stimulanzen in An- und Abwesenheit von rekombinantem LBP bzw. humanem Serum von Personen verschiedenen Genotyps stimuliert. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Seren mit homozygotem Genotyp, wurde auf ihre Verwendung weitestgehend verzichtet. Je nach Zelltyp wurden im Zellkulturüberstand die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$  bestimmt. Die Verringerung der Zytokinsekretion war für alle verwendeten Liganden gleich deutlich, sowohl in der murinen, als auch in der humanen

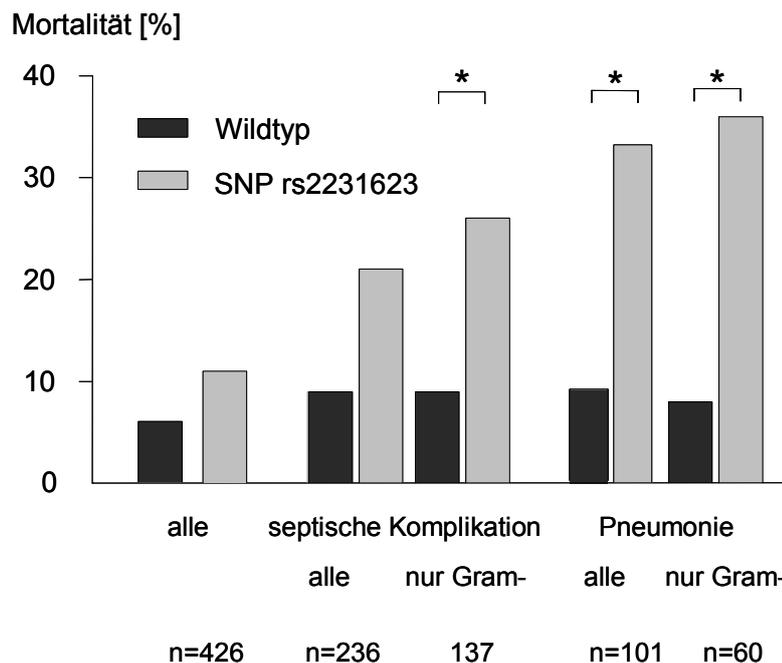
Zelllinie. Da immer wieder kritisiert wird, dass Zelllinien ein sehr künstliches System für funktionale Untersuchungen darstellen, wurden auch Versuche mit humanen Monozyten freiwilliger Spender durchgeführt. In den bisherigen Versuchen wurden hier nur die Seren als LBP-Quelle verwendet. Auch in diesem System konnten die Ergebnisse zur Reduktion der Zytokinsekretion bei Verwendung von mutiertem LBP (Serum von Spendern die heterozygot für den untersuchten LBP-SNP waren) bestätigt werden. Bei der Verwendung des heterozygoten Serums wurde noch eine Restaktivität festgestellt, die Reduktion betrug ca. 50 %. Im Serum von Personen mit heterozygotem LBP-c998t-Genotyp liegen je ein Allel für das mutierte und ein Allel für das LBP-wt vor. Vermutlich werden beide im gleichen Maße exprimiert. Die Restaktivität könnte über das vom zweiten Allel gebildete funktional normale LBP vermittelt werden. Es gibt allerdings auch Hinweise auf membrangebundenes LBP in Monozyten und Makrophagen (Müller et al. 2003). Da die aufgereinigten Monozyten von Spendern mit LBP-wt-Genotyp stammen, könnte membranäres LBP-wt eine Restaktivität vermitteln und so die Ergebnisse beeinflussen. Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, wäre es nötig Versuche mit den PBMC von Spendern mit heterozygotem LBP-c998t-Genotyp vergleichend zu LBP-wt-Trägern und ohne den Zusatz externen LBPs durchzuführen. Dies war innerhalb dieser Arbeit nicht mehr möglich, wird jedoch im Rahmen einer weiteren Dissertation vorbereitet.

Im Laufe der Versuche gab es immer wieder Probleme mit der Verwendung des rekombinanten LBP-c998t. Es kam zu hohen Eigenstimulationswerten (ohne Zugabe von Liganden), was Vergleiche mit dem Wildtyp-Protein erschwerten. Dies führte außerdem dazu, dass in dieser Arbeit nur die verstärkende Funktion von LBP auf die LPS-Wirkung, die bei niedrigen Konzentrationen beobachtet wird, untersucht werden konnte. Einen Einfluss auf die ebenfalls beschriebene Funktion der LPS-Neutralisierung, die bei hohen LBP-Konzentrationen auftritt, konnte mit den zur Verfügung stehenden LBP-Konzentrationen nicht gezeigt werden. Dieser Effekt ist erst ab Konzentrationen über 1 µg/ml zu beobachten (Hamann et al. 2005). Die Ursache für dieses Problem liegt vermutlich im Aufreinigungsprozess. Da das mutierte LBP nicht in denselben hohen Konzentrationen wie das LBP-wt exprimiert worden war, wurde nach der Aufreinigung ein Aufkonzentrierungsschritt eingefügt. Trotz der spezifischen Aufreinigung über einen sechsfachen Histidinanhang waren im Eluat vermutlich noch Verunreinigungen enthalten. Dabei könnte es sich z.B. um Albumin aus dem FKS der Zellkultur handeln, welches im Serum in sehr hohen Konzentrationen vorhanden ist (Dörner 2003). Diese Verunreinigungen wurden dann möglicherweise zusammen mit dem LBP aufkonzentriert. Einen Hinweis auf eine derartige Proteinverunreinigung lieferte der Vergleich von

Proteinkonzentrationsdaten aus dem LBP-spezifischen ELISA und einem Test zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA). Dabei wiesen LBP-wt und LBP-c998t Proteinkonzentrationen auf, die jene des spezifischen ELISAs weit übertrafen (Daten nicht gezeigt). Sollte es sich bei dem verunreinigenden Protein tatsächlich um Albumin handeln, könnte eine Albumindepletion wie bei den Seren für die Westernblots helfen. Man könnte auch versuchen, dem Problem schon sehr frühzeitig, während der rekombinanten Expression dadurch entgegenzuwirken, dass für die Zellkultur ein serumfreies Kulturmedium, welches speziell auf die Bedürfnisse der Proteinexpression abgestimmt ist, verwendet wird.

Wie die Zellstimulationsversuche gezeigt haben, beeinflusst die hier beschriebene Mutation des LBP die Signaltransduktion über TLR2 und -4 und die daran anschließende Immunreaktion. Die Ausschüttung wichtiger inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  bleibt aus. Eine der Hauptaufgaben von LBP ist jedoch die Sensibilisierung des Organismus gegenüber Bakterien und die daraufhin erfolgende Einleitung der Immunantwort. Findet dies nicht mehr statt, können sich Mikroorganismen länger als normal vermehren und ausbreiten und den Organismus potentiell schädigen. Dies kann Auswirkungen auf die Art und Weise, wie Krankheiten bekämpft werden, haben. Während es für den Transfer LPS-CD14-TLR4/MD2 nur LBP als interagierendes Protein gibt, sind für die Signaltransduktion LP-TLR2 verschiedene Interaktionspartner beschrieben worden. So sind neben LBP noch mindestens zwei weitere Proteine beschrieben, die verstärkend auf die Signaltransduktion durch TLR2 wirken: Vitronectin und CD36. CD36 interagiert spezifisch mit dem diazylierten Lipoprotein Malp2 und LTA (Hoebe et al. 2005). Beides sind Diglyzeride und ihre Signaltransduktion wird über TLR2/6 vermittelt. Das Vitronectin hingegen verstärkt die Signaltransduktion von triazylierten Lipopeptiden über den TLR2/1-Komplex (Gerold et al. 2008). Diese Unterschiede in der Verfügbarkeit von Immunantwort-verstärkenden Proteinen, könnte eine Erklärung bieten für SNP-Analyse-Daten, die im Rahmen einer weiteren Dissertation (K. Gürtler, unveröffentlicht) in unserem Labor erhoben wurden. An der Studie waren 426 Patienten einer chirurgischen Intensivstation beteiligt. Diesen wurde vor der Operation Blut entnommen, dass auf das Vorhandensein des SNP rs2231623 hin untersucht wurde. Es wurden Daten zu aufgetretenen Infektionen und daraus resultierenden Komplikationen, wie Sepsis erhoben und mit den SNP-Ergebnissen korreliert (Abb. 31). Von den 426 Patienten trugen 61 den hier untersuchten LBP-SNP (57 heterozygot, 4 homozygot), was einer Allelfrequenz von 0,076 entspricht und damit keinen signifikanten Unterschied zu den Daten des Kontrollkollektivs darstellt (Tab. 7 Berlin, Allelfrequenz 0,072). Patienten mit der LBP-Mutation zeigten eine deutlich höhere Mortalität in Abhängigkeit

vom verursachenden Pathogen und dem Ort der Entzündung. Der Effekt war am deutlichsten in Patienten mit einer von Gram-negativen Bakterien verursachten Pneumonie. Die Mortalität war hier statistisch signifikant erhöht ( $p=0.02$ , Abb. 32). Das Fehlen eines funktionellen LBP könnte somit deutlich größere Auswirkungen auf eine Infektion mit Gram-negativen Erregern, als auf eine Infektion mit Gram-positiven Erregern und ihren Verlauf haben, obwohl die funktionellen Daten für die Bestandteile beider Bakteriengruppen eine Beeinträchtigung in der Signaltransduktion zeigen.



**Abb. 31: Einfluss des LBP SNP rs2232613 auf Pneumonie**

Das Tragen des LBP-SNP rs2232613 hat einen negativer Einfluss auf den Verlauf von Gram-negativer Pneumonie bei Patienten einer Intensivstation. Die Daten wurden mittels RT-PCR erhoben (siehe 2.2). Die statistische Auswertung wurde mit dem Mantel-Haenzel-Test durchgeführt. \* statistisch signifikant mit  $p < 0.05$

Schon länger war bekannt, dass auch Epithelzellen der Lunge LBP synthetisieren können (Dentener et al. 2000). Aber erst kürzlich wurde gezeigt, dass es nach einer lokalen Infektion der Lunge sowohl dort als auch systemisch zur Bildung von LBP kommt (Gamble et al. 2008). Das Plasma-LBP wurde in der Leber gebildet, initiiert durch von der Lunge gebildetes IL-6. Die Daten der LBP-SNP-Analyse unterstützen die Wichtigkeit der Lunge als Initiator einer Immunantwort.

Zu Beginn der Untersuchungen zum LBP-SNP rs2231623 haben wir seine Verbreitung in der gesunden Bevölkerung bestimmt (Tab. 7 Berlin).

**Tab. 7: Verbreitung des SNP rs2231623 im LBP in gesunden Populationen**

Während sich die Studienpopulation Berlin weitestgehend aus Probanden zwischen 20 und 60 Jahren zusammensetzt (Oh et al. 2008), handelt es sich bei den Probanden der Studien Dresden und München um Kinder der 4. Klassenstufe im Alter von 9-11 Jahren (Kormann et al. 2008).

Studienpopulation (Anzahl Probanden)	CC	CT	TT
Berlin (627)	532 (84,8 %)	95 (15.2 %)	0
Dresden (1940)	985 (86,25 %)	151 (13.22 %)	6 (0,53 %)
München (1159)	1608 (83,79 %)	303 (15,79 %)	8 (0,42 %)

In einem Probandenkollektiv von 627 Freiwilligen und Blutspendern wies der untersuchte SNP eine Allelfrequenz von 0,072 auf. Dies entspricht den bisher veröffentlichten Daten (NCBI-Datenbank) kleinerer Kollektive. Der SNP ist in beiden Geschlechtern gleich verteilt. Es wurden keine homozygoten Polymorphismusträger gefunden. Beim Vergleich unserer Daten mit denen der Arbeitsgruppe Kabesch aus München (Tab. 7 Dresden und München) fiel auf, dass dort homozygote SNP-Träger entdeckt wurden. Während sich unser Kollektiv aus Menschen zwischen 20 und 60 Jahren zusammensetzte (Oh et al. 2008), bestanden die Kohorten München und Dresden aus Kindern der vierten Klasse im Alter von 9-11 Jahren, deren DNS im Rahmen von Vergleichsstudien entnommen worden war (Kormann et al. 2008).

Das Fehlen der homozygoten Mutation (LBP-SNP rs2231623) in der Erwachsenen-Kohorte, könnte dadurch erklärt werden, dass sie einen Risikofaktor auf dem Weg zum Erwachsensein darstellt. Die Ergebnisse der funktionellen Analyse, die Verbreitungsdaten und die bisher erhobenen Daten zur Korrelation des SNP rs2231623 weisen auf einen negativen Einfluss des Polymorphismus auf die Fähigkeit des Wirtes Krankheiten zu erkennen und zu bekämpfen hin. Dies unterstützt auch die Aussage des Proteinanalyseprogramms PolyPhenReport, dass diese Mutation eine als schädigend einzustufende Veränderung des LBP mit sich bringt.

Ein weiterer zu betrachtender Aspekt beschäftigt sich mit der Rolle des LBP in der Labordiagnostik. Die Tatsache, dass ein Protein, bei einem Teil der Bevölkerung mittels diagnostischer Routine-ELISA nicht detektierbar ist, sollte Auswirkungen auf seinen Wert als diagnostischen Marker haben. LBP wurde lange Zeit als prognostischer Marker für Sepsis und septische Komplikationen diskutiert (Schumann and Zweigner 1999). Sollten sich unsere Ergebnisse bezüglich der Detektierbarkeit von LBP-c998t mittels Routine-ELISA bestätigen, kann dieser für einen, wenn auch kleinen Teil der Bevölkerung nicht verwendet werden. Und dieser kleine Teil (homozygote SNP-Träger)

betrifft ausgerechnet Kinder, für die der Wert von LBP als prognostischer Marker für eine bakterielle Sepsis auch in neueren Studien nachgewiesen werden konnte (Pavcnik-Arnol et al. 2007; Ubenauf et al. 2007). Für den Bereich der Erwachsenen-diagnostik wurde LBP als prognostischer Marker schon länger in Frage gestellt (Pavcnik-Arnol et al. 2004) und andere an der Inflammation beteiligte Proteine, wie das CD36 und IL-6 wurden diskutiert (Gaini et al. 2008). Zudem ist noch unklar, wie die Messungen im Falle des heterozygoten Vorkommens des LBP-SNP aussehen, und dies betrifft immerhin ca. 15 % der Bevölkerung. Hier werden möglicherweise verringerte Konzentrationen nachgewiesen, die, da der LBP-Spiegel unterschätzt würde, zu Falschdiagnosen führen könnten.

## 5.2 Interaktion der TLR-Liganden mit LBP

In zweiten Teil dieser Arbeit ging es um die Betrachtung des Akutphaseproteins LBP und seiner Interaktion mit TLR2- und TLR4-Liganden. Es ging darum, zu beurteilen, ob diese strukturell sehr verschiedenen Moleküle die gleiche Bindungsstelle von LBP verwenden oder ob es mehr als eine Interaktionsstelle für Liganden gibt. Die Bindungsstelle für LPS wurde 1996 von Lamping et al. beschrieben. In Wettbewerbsversuchen, in denen verschiedene LBP-Peptide mit dem LBP um das LPS konkurrierten, konnte gezeigt werden, dass der Bereich um die Aminosäuren Arginin 94 und Lysin 95 essentiell für die Interaktion mit LPS ist und ein Austausch dieser Aminosäuren gegen die negativ geladene Glutaminsäure zu einem völligen Funktionsverlust des LBP führt (LBP-E94/95). Diese LBP-Mutante konnte kein LPS mehr binden, der Weitertransport zum CD14 und die Signalkette, welche normalerweise zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt, waren unterbunden. Dass auch TLR2-Liganden, wie LTA (Schröder et al. 2000) mit LBP interagieren, erweiterte dessen Funktionsspektrum erheblich und es stellte sich die Frage, wie dies durch ein einziges Molekül vermittelt werden kann. Erste Hinweise auf eine gemeinsame Bindungsstelle von TLR2- und TLR4-Liganden gab es durch Wettbewerbsversuche mit synthetischen Lipopeptid-Analoga und LPS um die Bindung an LBP (Schröder et al. 2004). Bei der gleichzeitigen Inkubation von LBP und den als TLR2-Liganden bekannten Lipopeptiden mit immobilisiertem LPS, waren nur die diazylierten Lipopeptide fähig, die Bindung von LBP an LPS zu unterdrücken. Dies weist auf eine gemeinsame Bindungsstelle hin. Für das triazylierte Lipopeptid konnte dies nicht gezeigt werden. In vorhergehenden Untersuchungen, war jedoch für beide Lipopeptide eine Bindung an das LBP und dadurch eine Verstärkung ihrer immunstimulatorischen Fähigkeit gezeigt worden. Es stellt sich nun die Frage, ob es tatsächlich eine zweite Bindungsstelle für das LP3 am LBP gibt, oder

ob das mangelnde Kompetitionsvermögen nur durch eine niedrigere Affinität des LP3 zum LBP verursacht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung dieser Fragestellung zwei verschiedene LBP-Mutanten vergleichend zum Wildtyp-Protein verwendet. Die Mutationen LBP-E94/95 und LBP-c998t stellen Veränderungen an entgegengesetzten Seiten des postuliert Bumerang-förmigen LBP dar. Diese Bereiche sind durch unterschiedliche Funktionen charakterisiert. Die Mutation E94/95 liegt N-terminal im Bereich der LPS-Bindungsstelle des LBP. Mit der dazugehörigen Mutante (LBP-E94/95) konnte durch die hier vorgelegte Arbeit gezeigt werden, dass die Aminosäuren 94 und 95 ebenso essentiell für die Interaktion mit den TLR2-Liganden LP2 und LP3 sind, wie für das LPS. In Bindungsversuchen mit immobilisiertem LPS und Lipopeptiden wurde gezeigt, dass bei Verwendung des LBP-E94/95 keine Bindung mehr stattfand. Aufgrund der geringen Ausbeute in der Ernte des LBP-E94/95 konnte dies nur bis zu einer Konzentration von 300 ng/ml LBP untersucht werden. Unsere und die Ergebnisse von Schröder et al. 2004 scheinen darauf hinzudeuten, dass es für die gemeinsame Bindungsstelle von LBP Abstufungen hinsichtlich der Affinität der Liganden gibt. Die stärkste Bindung weist das LPS auf, gefolgt vom diazylierten Lipopeptid und dem triazylierten Lipopeptid. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es beim Einsatz höherer Konzentration noch zu einer Restbindungsaktivität kommt, die jedoch deutlich unter der des LBP-wt liegen würde. Leider war es aufgrund der geringen Ausbeute bei der Zellkultur nicht möglich, diese Mutante aufzureinigen und in adäquaten Konzentrationen in Zellstimulationsversuchen einzusetzen. Es wäre interessant zu sehen, ob es auch hier zu einem kompletten Ausfall der Proteinfunktion kommt oder ob noch Aktivität vermittelt wird.

Die Ursache für die geringe Expression der Mutante LBP-E94/95 liegt vermutlich nicht in der angewandten Methode begründet. Die Nukleotidsequenz wurde überprüft und die Verwendung des für die Proteine LBP-wt und -c998t erfolgreichen Expressionssystems sollte ein Beweis für die Funktionalität und Qualität desselben sein. Allerdings gab es auch bei dieser Expression deutliche Konzentrationsunterschiede in der Ausbeute. Schon in früheren Arbeiten unseres Labors zur Expression von LBP und daraus abgeleiteten Mutanten kam es zu Ungleichheiten in der Expressionseffizienz. Vor allem bei der Expression von Mutanten ergaben sich geringere Expressionsspiegel, so dass eine weitere Verwendung ausgeschlossen werden musste (Latz 2001). Es ist möglich, dass durch die Mutation Kontrollmechanismen der Zelle aktiviert werden, die entweder auf Translations- oder auf Transkriptionsebene die Expression ver- bzw. behindern. Dies soll im natürlichen System vermutlich verhindern, dass degenerierte und dadurch möglicherweise inaktive oder schädliche Proteine in den Zellstoffwechsel oder den

Organismus gelangen. Andere Systeme zur Expression von Proteinen stellen *E. coli*, Hefezellen und das Bakulovirus/Insekten-Zellsystem dar. Die Expression in *E. coli* ist wegen der nicht zu vermeidenden LPS-Kontamination nicht ratsam, wurde jedoch in einzelnen Untersuchungen zum LBP schon erfolgreich verwendet (Kohara et al. 2006). In *E. coli* werden allerdings keine post-translationalen Modifikationen durchgeführt, was Auswirkungen auf die Funktionalität der Proteine haben kann. Da sowohl die Hefe-, als auch die Insekten-Zellen eukaryotisch sind, besteht in beiden Systemen die Möglichkeit der post-translationalen Modifikation. Die Unterschiede liegen hier im Aufwand, der Ausbeute und kleineren Unterschieden der Modifikationen (Sarramegna et al. 2003). Das Hefe-Zellsystem ist relativ anspruchslos, preiswert und einfach in der Handhabung. Die Zellen unterscheiden sich jedoch in der Komposition und Quantität der N-Glykosylierung und auch in der Zusammensetzung der Lipide der Hefemembran ist eine andere. Dazu kommt, dass die Zellen von einer Zellwand umgeben sind, die es aufzubrechen gilt, bevor Proteine extrahiert werden können. Das Bakulovirus-Insekten-Zellsystem ist aufwendig und teuer in der Handhabung. Wenn es angepasst ist an das jeweilige Protein und unter optimalen Bedingung läuft, kann es jedoch zu deutlich höheren Expressionsraten führen. Dies kann unter Umständen zu einem Nachteil werden, wenn es den Zellen nicht möglich ist, die post-translationalen Modifikationen, wie Glykosylierung und Phosphorylierung im selben Maße wie die Expression durchzuführen. Dies würde zu einem Proteingemisch mit unterschiedlichen Modifikationen führen. Es gilt also bei der Entscheidung für ein Expressionssystem genau abzuwägen, ob hohe Expressionslevel oder eine einheitliche Proteinlösung wichtiger sind. Das natürlichste System stellt diesbezüglich immernoch die Expression in Säugetierzellen, wie HEK293- oder CHO-Zellen dar, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, aber mit den oben genannten Einschränkungen.

Die Verwendung der zweiten Mutante (LBP-c998t) ergab keine weiteren Hinweise bezüglich der Hypothese von einer gemeinsamen Bindungsstelle der Lipopeptide und des LPS am LBP. Die Mutation liegt an einer Stelle, welche die direkte Bindung von LBP mit dem LPS nicht beeinflussen sollte. Sie würde eher in die anschließende Interaktion mit dem CD14 eingreifen. Wie in 5.1 beschrieben, sind die Veränderungen im Bindungsverhalten des LBP gegenüber den Liganden eher auf Beeinträchtigungen in der Struktur zurückzuführen, als auf eine tatsächlich geschwächte Interaktion.

Es stellt sich die Frage, wie die Bindung der unterschiedlichen Moleküle LPS, LP2 und LP3 an das LBP vermittelt wird. Durch Bindungs- und Stimulationsversuche mit einem trunkierten LBP, das nur den N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz enthielt (AS 1-197), wurde bereits früh vorgeschlagen, dass die LPS-Bindungsstelle des LBP in

diesem Bereich liegt (Han et al. 1994; Theofan et al. 1994). Im Limulus-Anti-LPS-Faktor (LALF) wurde der für die LPS-Bindung wichtige Bereich durch die Analyse seiner dreidimensionalen Struktur auf die Aminosäuren 86-104 eingegrenzt (Hoess et al. 1993). Sie bilden ein alternierendes Muster aus hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren mit positiver Ladung. Diese bilden eine Schleifen-ähnliche Formation, welche die beteiligten Aminosäuren in eine zur Liganden-Bindung exponierte Lage bringen. Eine solche Struktur wurde auch für das LBP nachgewiesen (Schumann et al. 1997). Die dort an der LPS-Bindung essentiell beteiligten Aminosäuren Arginin 94 und Lysin 95 sind positiv geladen, was sie zur Interaktion mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des Diglykosamin-Rückrats des Lipid A befähigt (Lamping et al. 1996). Der Austausch der AS Arginin 94 und Lysin 95 gegen neutral geladenes Alanin verringerte die Stärke der LPS-Bindung, aber erst der Austausch gegen die negativ geladene Glutaminsäure blockierte die Bindung komplett. Er bewirkte eine deutliche Abschwächung des ursprünglich stark positiv geladenen Bereichs der Spitze der N-terminalen Proteinhälfte (Latz 2001), was vermutlich die Bindung zu den negativ geladenen phosphorylierten Zuckergruppen des LPS schwächt und zu ihrem Verlust führt.

Im Gegensatz zum LPS bestehen Lipopeptide aus Fettsäuren, einem Zucker-Anker und einem Proteinanteil. Die negativ geladenen Phosphatgruppen fehlen. Da sowohl die Fettsäuren, als auch der Zucker eine neutrale Ladung aufweisen, richtet sich die Gesamtladung des Lipopeptids immer nach dem enthaltenen Protein, kann also variieren und stellt somit kein festes Muster zur Erkennung durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems dar. Es gibt drei Möglichkeiten der nicht-kovalenten Bindung in biologischen Systemen, elektrostatische Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Bindungen (Berg et al. 2002). Bei den elektrostatischen Bindungen zieht die geladene Gruppe eines Moleküls, die entgegengesetzt geladene Gruppe eines zweiten Moleküls an. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung zwischen den positiven AS von LBP und den negativen Phosphatgruppen des LPS. Wasserstoffbrückenbindungen können zwischen ungeladenen und geladenen Molekülen entstehen. Dabei teilen sich zwei Atome ein Wasserstoffatom. Sie stabilisieren zum Beispiel die  $\alpha$ -Helix-Struktur in Proteinen. Wasserstoffbrückenbindungen sind stärker als Van-der-Waals-Bindungen, aber schwächer als kovalente Bindungen. Für den Rezeptorkomplex TLR2/1 konnte mittels Röntgen-Kristallographie neben der reinen Strukturaufklärung auch die Bindung seines Liganden, des triazylierten Lipopeptids, geklärt werden (Jin et al. 2007). Die Interaktion des LP3 mit dem TLR2/1 erfolgt über die Fettsäureketten des Lipopeptids. Die zwei Ester-gebundenen Lipidketten sitzen in der von TLR2 gebildeten Tasche, während die dritte, amid-gebundene Fettsäure in einem von TLR1 gebildeten

Kanal liegt. Da diese ungeladen sind und keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, festigen hier vermutlich Van-der-Waals-Kräfte die Interaktion. Für BPI, ein dem LBP nahe verwandten Protein, sind an der konkaven Seite des Moleküls Bindungstaschen für Phospholipide beschrieben worden. Sie sind mit hydrophoben AS-Resten bedeckt und unpolar (Beamer et al. 1998). Dies entspräche den Gegebenheiten im TLR1/2-Rezeptorkomplex.

Wie das LPS sind auch die Phospholipide amphiphile Moleküle, d.h. sie besitzen einen polaren Kopfteil, bestimmt durch die negative geladenen Phosphatgruppen, und einen apolaren Schwanzteil aus im Phospholipid zwei und im LPS bis zu sechs Azygruppen. Im Gegensatz zum LPS bindet jedoch das Phospholipidmolekül mit seinen apolaren Azy-Kohlenstoff-Ketten (Fettsäure) an das BPI. Sie tauchen in den „Kern“ des Proteins ein (Beamer et al. 1999). Auch hierbei kommt es zur Ausbildung umfangreicher Van-der-Waals-Bindungen zwischen den Kohlenstoff-Ketten und den apolaren Seitenketten des Proteins. Die Van-der-Waals-Kräfte sind im Vergleich zu den elektrostatischen Bindungen und den Wasserstoffbrückenbindungen, von allen in biologischen Systemen wichtigen nicht-kovalenten Wechselwirkungen die schwächsten und unspezifischsten (Berg et al. 2002). Ihr Auftreten beruht auf der Tatsache, dass die Verteilung der Elektronenladung um ein Atom über die Zeit variiert. Diese zeitabhängige Asymmetrie der Elektronenladung um ein Atom regt eine ähnliche Asymmetrie in der Elektronenverteilung um die Nachbaratome an. Sie treten auf, wenn Moleküle 0,3 - 0,4 nm voneinander entfernt sind. Eine einzelne Van-der-Waals-Bindung richtet nicht viel aus. Sie spielen erst eine Rolle, wenn viele Atome eines Moleküls zur gleichen Zeit vielen Atomen eines zweiten Moleküls nahe kommen. Dies geschieht wenn beide Moleküle in ihrer Gestalt wie zwei Puzzleteile zusammenpassen. Da die Kontaktfläche zwischen BPI und den gebundenen Phospholipiden zum größten Teil zwischen apolaren Atomen stattfindet, und daher geometrisch unspezifisch ist, scheint es möglich, dass die Taschen durch die Variabilität der den Liganden umgebenden Seitenketten, sich einer Vielzahl von apolaren Liganden anpassen könnten (Beamer 2003).

Dies könnte zum Beispiel bei LBP und seinen Nicht-Phospholipid-Liganden der Fall sein. Der Lipid A-Anteil des LPS besteht aus einer Disaccharid-Kopfgruppe und einer variablen Anzahl an Kohlenstoffketten, meist sechs (Raetz 1990). Wie oben beschrieben, wird die Bindung des LPS an das LBP über den N-terminalen Bereich des LBP vermittelt, aber es wäre denkbar, dass zusätzlich einige der Kohlenstoffketten des Lipid A in eine der apolaren Taschen passen. Ähnlich ist es auch für die Phosphatidylcholine beobachtet worden (Beamer et al. 1999). Dies würde die apolaren hydrophoben Anteile des LPS vor dem wässrigen Medium abschirmen.

In einer weiteren in unserem Labor durchgeführten Doktorarbeit wurden gezielt Einzelmutationen im Bereich der Phospholipidtaschen eingeführt (Amberger 2002). Unter der Annahme, dass die Bindung der Phospholipide an die Taschen über apolare Atome mittels Van-der-Waals-Kräften vermittelt wird, wurden polare gegen apolare Aminosäuren ausgetauscht. Es wurden auch Aminosäuren gleicher Apolarität ausgetauscht, die aber durch längere Seitenketten sterische Störungen in den Bindungstaschen bewirken könnten. Diese Versuche wurden analog zu Experimenten mit dem PLTP, ein mit dem LBP ebenfalls verwandtes Protein, durchgeführt (Huuskonen et al. 1999). Dort wurden einige Aminosäuren derselben Lokalisation in den Phospholipidtaschen mutiert. Dies führte zu einer Reduktion des Phosphatidylcholin-Transfers zum HDL um bis zu 90 %. Bei Amberger 2002 wurden die verschiedenen LBP-Mutanten in CHO-Zellen exprimiert und in den Überstand sezerniert. Mit den proteinhaltigen Zellkulturüberständen wurde dann sowohl die Bindung an R- und S-LPS untersucht als auch der Transfer des LPS zum CD14. Für keinen der Prozesse konnte eine Beeinträchtigung durch eine der Mutanten gezeigt werden. Dies könnte daraufhin weisen, dass die Phospholipidtaschen nicht an der Interaktion mit dem LPS beteiligt, bzw. nicht essentiell dafür sind. Eventuell reichen aber einzelne Mutationen bei so unspezifischer Bindung wie der Van-der-Waals-Bindung nicht für eine Störung aus. Denn für die Interaktion LPS-LBP ist bereits eine Bindungsstelle beschrieben worden (Lamping et al. 1996). Und diese scheint durch die elektrostatische Interaktion der negativ geladenen Phosphatgruppen des LPS und den positiv geladenen AS 94 und 95 deutlich stärker und damit möglicherweise auch wichtiger als die schwache unspezifische Bindung der Phospholipidtaschen zu sein.

Interessant wäre es hier, Doppel- oder Mehrfachmutanten im Bereich der Taschen zu entwerfen, die auch im PLTP eine noch mal stärkere Reduktion bewirkten, um eine Interaktion dieses Bereichs mit dem LPS endgültig auszuschließen. Ob die Azykellen des LPS an der Bindung überhaupt beteiligt sind, wird kontrovers diskutiert. Unterstützung erhält die Hypothese der Interaktion von LPS-Azykellen mit den Taschen durch Ergebnisse mit einem trunkierten, in *E. coli* exprimierten LBP (Kohara et al. 2006). Dort wurde gezeigt, dass bei Zugabe von Detergenzien die Bindung zwischen dem trunkierten LBP (AS 1 - 212) und dem LPS verschwindet und dass ein LPS mit nur fünf Fettsäureketten schwächer an das LBP bindet als ein LPS mit sechs. Dass sowohl die Azykellen als auch die N-terminale Spitze des LBP zur Bindung beitragen, wird jedoch bezweifelt (Jerala 2007). Die Größe der Phospholipidtaschen wird als zu schmal für die Fettsäureketten eingeschätzt und es wird postuliert, dass der Abstand zwischen beiden Bindungsstellen zu groß für eine gleichzeitige „Nutzung“ ist. Genauere Angaben dazu

fehlen leider. Möglich wäre auch, dass es vielleicht nicht zu einer gleichzeitigen, aber zu einer seriellen, also nacheinander erfolgenden Nutzung der Bindungsstellen im Verlauf der Interaktion von LPS mit LBP, CD14 und HDL kommt. Lipopeptide besitzen, je nach Azylierungsgrad zwei bis drei apolare Fettsäureketten, die wie die Phospholipide im BPI in den analogen Taschen im LBP binden könnten. Bis auf die Arbeiten aus unserem Labor (Schröder et al. 2004) gibt es bisher keine Untersuchungen bezüglich der Bindung von Lipopeptiden an LBP. Vorstellbar wäre, dass die Bindung von Lipopeptiden an LBP eine Mischung aus der bisher gezeigten Bindung von LPS und der Bindung von Phospholipiden, die CD14-abhängig auch für das LBP nachgewiesen wurde, darstellt (Yu et al. 1997). Obwohl es diesbezüglich bisher keine Veröffentlichungen gibt, scheint es wahrscheinlich, dass in Analogie zum BPI-Modell auch im LBP die Phospholipide in den an der konkaven Molekülseite liegenden Taschen binden. Für die Interaktion LBP-Lipopeptid würde das bedeuten, dass es sowohl eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich um die Aminosäuren 94 und 95 gibt, wie unsere Untersuchungen nahe legen, als auch eine Bindung in den „Phospholipidtaschen“. Für letztere gibt es zwar bisher keine Nachweise, aber Untersuchungen mit den von Amberger verwendeten Mutanten, welche genau in diesem Bereich mutiert sind, könnten hier wertvolle Informationen liefern.

In dieser Arbeit wurde die LBP-Seite der Bindung Protein-Ligand betrachtet. Bei den Liganden gibt es nur für das LPS eine Vorstellung davon, welche Bereiche mit dem LBP interagieren. Wichtig sind hier die negativ geladenen Phosphatgruppen. Es ist aber immer noch die Frage offen, wie die Bindung der Lipopeptide an den positiv geladenen N-terminalen LBP-Bereich vermittelt wird. Der Peptidanteil der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Lipopeptid-Analoga ist durch den Hersteller (EMC Microcollections) genau definiert. Er besteht aus den polaren und hydrophilen Aminosäuren Cystin und Serin und vier positiv geladenen Lysin (-CSK<sub>4</sub>). Über diese wird die hier gezeigte Bindung an die positiv geladenen Aminosäuren Arginin 94 und Lysin 95 im LBP sicher nicht vermittelt, was eine Bedeutung des Proteinanteils von Lipoproteinen daran unwahrscheinlich macht.

## 6 Ausblick

Für die natürlich vorkommende Mutation c998t des LBP, konnte in dieser Arbeit eine Beeinträchtigung von Funktion und Struktur gezeigt werden. Ergänzende Arbeiten zeigen, dass das Vorkommen dieser Mutation negative Auswirkungen auf den Verlauf von Pneumonien, die durch Gram-negative Erreger ausgelöst wurden, haben. In nachfolgenden Studien sollte untersucht werden, welchen Einfluss dieser LBP-Polymorphismus auf das Auftreten und den Verlauf anderer Krankheit hat, und ob sein Auftreten ein Risiko für Kinder auf dem Weg zum Erwachsenwerden darstellt. Es stellt sich auch die Frage, ob ein Polymorphismus der heterozygot bei 15 % einer gesunden Population zu finden ist, auch eine positive Auswirkungen in der Erkennung von Pathogenen bzw. im Verlauf von Krankheiten haben kann. Funktionell wären u.a. noch die Fragen zu klären, ob es auch zu einer Beeinträchtigung des Hemmeffekts von LBP auf die LPS-vermittelte Zytokinausschüttung bei hohen LBP-Konzentrationen kommt und welchen Einfluss die Mutation auf die Interaktion des LBP mit CD14 oder HDL hat. Es wäre weiterhin interessant, die im Westernblot gefundenen Fragmente exakt zu identifizieren und die Ursachen für den Zerfall des Proteins zu ergründen. Die Expression der einzelnen Fragmente und deren funktionelle Untersuchung könnten weitere Einblicke in die Funktionsweise des LBP von der Ligandenbindung bis zur Zytokinsekretion geben. Trotz eines totalen Bindungsverlustes des LBP-E94/95 gegenüber Liganden, was auf eine gemeinsame Interaktionsstelle dieser hinweist, stellt sich im Rahmen der aktuellen Literatur weiter die Frage nach einer möglichen zweiten Bindungsstelle für bakterielle Liganden. Dafür könnten andere, in unserem Labor hergestellte Mutanten, verwendet werden. Interessant sind hier vor allem LBP-Varianten mit Mutationen im Bereich der potentiellen Phospholipidbindungstaschen. Sie könnten auf ihre Bindung hinsichtlich der Lipoproteine untersucht werden. Doppel- oder Mehrfachmutationen in diesem Bereich könnten die Frage der Bindung von LPS in diesem Bereich endgültig klären. Es bleibt weiterhin zu klären, wie die Lipopeptide, welche sich strukturell deutlich von LPS unterscheiden, mit LBP interagieren. Möglicherweise spielt hier die molekulare Form der Liganden eine Rolle.

## 7 Anhang

### Nukleotidsequenz des LBP inklusive der Mutationen E94/95 und c998t

Diese Sequenz entspricht allen in dieser Arbeit verwendeten und zu Kontrollzwecken sequenzierten LBP-Varianten.

```

ATG GGG GCC TTG GCA AGA GCC CTG CCG TCC ATA CTG CTG GCA TTG CTG
CTT ACG TCC ACC CCA GAG GCT CTG GGT GCC AAC CCC GGC TTG GTC GCC
AGG ATC ACC GAC AAG GGA CTG CAG TAT GCG GCC CAG GAG GGG CTA TTG
GCT CTG CAG AGT GAG CTG CTC AGG ATC ACG CTG CCT GAC TTC ACC GGG
GAC TTG AGG ATC CCC CAC GTC GGC CGT GGG CGC TAT GAG TTC CAC AGC
CTG AAC ATC CAC AGC TGT GAG CTG CTT CAC TCT GCG CTG AGG CCT GTC
CCT GGC CAG GGC CTG AGT CTC AGC ATC TCC GAC TCC TCC ATC CGG GTC
CAG GGC AGG TGG AAG GTG CGC AAG (GAA GAA = E94/95)
TCA TTC TTC AAA CTA CAG GGC TCC TTT GAT GTC AGT GTC AAG GGC ATC
AGC ATT TCG GTC AAC CTC CTG TTG GGC AGC GAG TCC TCC GGG AGG CCC
ACA GTT ACT GCC TCC AGC TGC AGC AGT GAC ATC GCT GAC GTG GAG GTG
GAC ATG TCG GGA GAC TTG GGG TGG CTG TTG AAC CTC TTC CAC AAC CAG
ATT GAG TCC AAG TTC CAG AAA GTA CTG GAG AGC AGG ATT TGC GAA ATG
ATC CAG AAA TCG GTG TCC TCC GAT CTA CAG CCT TAT CTC CAA ACT CTG
CCA GTT ACA ACA GAG ATT GAC AGT TTC GCC GAC ATT GAT TAT AGC TTA
GTG GAA GCC CCT CGG GCA ACA GCC CAG ATG CTG GAG GTG ATG TTT AAG
GGT GAA ATC TTT CAT CGT AAC CAC CGT TCT CCA GTT ACC CTC CTT GCT
GCA GTC ATG AGC CTT CCT GAG GAA CAC AAC AAA ATG GTC TAC TTT GCC
ATC TCG GAT TAT GTC TTC AAC ACG GCC AGC CTG GTT TAT CAT GAG GAA
GGA TAT CTG AAC TTC TCC ATC ACA GAT GAC ATG ATA CCG CCT GAC TCT
AAT ATC CGA CTG ACC ACC AAG TCC TTC CGA CCC TTC GTC CCA CGG TTA
GCC AGG CTC TAC CCC (CTC 7% natürliches Vorkommen= c998t)
AAC ATG AAC CTG GAA CTC CAG GGA TCA GTG CCC TCT GCT CCG CTC CTG
AAC TTC AGC CCT GGG AAT CTG TCT GTG GAC CCC TAT ATG GAG ATA GAT
GCC TTT GTG CTC CTG CCC AGC TCC AGC AAG GAG CCT GTC TTC CGG CTC
AGT GTG GCC ACT AAT GTG TCC GCC ACC TTG ACC TTC AAT ACC AGC AAG
ATC ACT GGG TTC CTG AAG CCA GGA AAG GTA AAA GTG GAA CTG AAA GAA
TCC AAA GTT GGA CTA TTC AAT GCA GAG CTG TTG GAA GCG CTC CTC AAC
TAT TAC ATC CTT AAC ACC TTC TAC CCC AAG TTC AAT GAT AAG TTG GCC
GAA GGC TTC CCC CTT CCT CTG CTG AAG CGT GTT CAG CTC TAC GAC CTT
GGG CTG CAG ATC CAT AAG GAC TTC CTG TTC TTG GGT GCC AAT GTC CAA

```



## Ergebnisse des Programms ProtParam für LBP-wt

ExPASy ProtParam tool

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>

[ExPASy Home page](#) [Site Map](#) [Search ExPASy](#) [Contact us](#) [Proteomics tools](#) [Swiss-Prot](#)

Search  for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete our [online survey!](#)

## ProtParam

### User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGALARALPS ILLALLLTSI FEALGANPGL VARITDKGLQ YAAQEGLLAI QSELLRITLP

      70      80      90     100     110     120
DFTGDLRIPH VGRGRYEFHS LNIHSCCELLH SALRPVPGQG LSLISIDSSI RVQGRWKVRK

     130     140     150     160     170     180
SFFKLQGSFD VSVKGISISV NLLGSESSG RPTVTASSCS SDIADVEVDM SGDLGWLLNL

     190     200     210     220     230     240
FHNQIESKFPQ KVLESRICEM IQKSVSSDLQ PYLQTLPTVT EIDSFADIDY SILVEAPRATA

     250     260     270     280     290     300
QMLEVMPKGE IFHRNHRSEV TLLAAVMSLP EEHNKMVYFA ISDYVENTAS LUYHEEGYLN

     310     320     330     340     350     360
FSITDDMIFP DSNIRLITKS FRPFVPRLAR LYPNMNLELQ GSVPSAPLLN FSPGNLSVDF

     370     380     390     400     410     420
YMEIDAFVLL PSSSKEPVER LSVATNVSAT LTFNTSKITG FLKPGKVKVE LKESKVGLEN

     430     440     450     460     470
AELLEALLNY YILNTFYPKF NDKLAEGFPL PLLKRVQLYD LGLQIHKDFE SRRDHP

```

[References](#) and [documentation](#) are available.

**NEW** Please note the [modified algorithm](#) for extinction coefficient.

Number of amino acids: 476

Molecular weight: 52836.8

Theoretical pI: 6.28

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	29	6.1%
Arg (R)	23	4.8%
Asn (N)	20	4.2%
Asp (D)	23	4.8%
Cys (C)	3	0.6%
Gln (Q)	15	3.2%
Glu (E)	26	5.5%
Gly (G)	26	5.5%
His (H)	11	2.3%
Ile (I)	24	5.0%
Leu (L)	69	14.5%
Lys (K)	22	4.6%
Met (M)	10	2.1%
Phe (F)	25	5.3%
Pro (P)	30	6.3%

ExPASy ProtParam tool

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>

Ser (S)	50	10.5%
Thr (T)	22	4.6%
Trp (W)	2	0.4%
Tyr (Y)	14	2.9%
Val (V)	32	6.7%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 49  
 Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 45

**Atomic composition:**

Carbon	C	2390
Hydrogen	H	3780
Nitrogen	N	626
Oxygen	O	696
Sulfur	S	13

Formula: C<sub>2390</sub>H<sub>3780</sub>N<sub>626</sub>O<sub>696</sub>S<sub>13</sub>  
 Total number of atoms: 7505

**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} cm^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient      31985  
 Abs 0.1% (=1 g/l)    0.605, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient      31860  
 Abs 0.1% (=1 g/l)    0.603, assuming NO Cys residues appear as half cystines

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
 >20 hours (yeast, in vivo).  
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 49.50  
 This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 101.79

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.002

 [ExPASy Home page](#) [Site Map](#) [Search ExPASy](#) [Contact us](#) [Proteomics tools](#) [Swiss-Prot](#)

Search  for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExPASy and complete our [online survey!](#)

## Ergebnisse des Programms ProtParam für LBP-c998t

ExpPASy ProtParam tool

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>

[ExpPASy Home page](#) [Site Map](#) [Search ExpPASy](#) [Contact us](#) [Proteomics tools](#) [Swiss-Prot](#)

Search  for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExpPASy and complete our [online survey!](#)

## ProtParam

### User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGALARALPS ILLALLLTSTS PEALGANFGLS VARITDKGLSQS YAAQEGLLALS QSELLRITLFP
      70      80      90     100     110     120
DFTGDLRIPH VGRGRYEFHSS LNIHSCELLH SALRPFVPQG LSLSISDSSSIS RVQGRWKVRKR
     130     140     150     160     170     180
SFFKLQGSFDS VSVKGISSISVS NLLGSESSGS RPTVTASSCSSS SDIADVEVEM SGDLGWLLNL
     190     200     210     220     230     240
FHNQIESRFQ KVLESRICEMS IQKSVSSDLLQ PYLQTLFVTTS EIDSFADIDY SLVEAPRATAS
     250     260     270     280     290     300
QMLEVMFKGE IFHRNHRSFVS TLLAAVMSLP EEHNKMVYFAS ISDYVENTAS LVYHEEGYLNS
     310     320     330     340     350     360
FSITDDMIPFS DSNIRLTTKS FRFVPRLARS LYLNMNLELLQ GSVPSAPLLNS FSPGNLSVDF
     370     380     390     400     410     420
YMEIDAFVLLS FSSSKEPVFRS LSVATNVSAT LTFNTSKITG FLKPGKVKVES LKESKVGLFNS
     430     440     450     460     470
AELLEALLNY YILNTFYFKF NDKLAEGFFL PLLKRVQLYD LGLQIHKDFF SRRDHPP

```

[References](#) and [documentation](#) are available.

**new** Please note the [modified algorithm for extinction coefficient](#).

Number of amino acids: 477

Molecular weight: 52950.0

Theoretical pI: 6.28

Amino acid composition:

Ala (A)	29	6.1%
Arg (R)	23	4.8%
Asn (N)	20	4.2%
Asp (D)	23	4.8%
Cys (C)	3	0.6%
Gln (Q)	15	3.1%
Glu (E)	26	5.5%
Gly (G)	26	5.5%
His (H)	11	2.3%
Ile (I)	24	5.0%
Leu (L)	70	14.7%
Lys (K)	22	4.6%
Met (M)	10	2.1%
Phe (F)	25	5.2%
Pro (P)	30	6.3%

ExpASY ProtParam tool

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>

Ser (S)	50	10.5%
Thr (T)	22	4.6%
Trp (W)	2	0.4%
Tyr (Y)	14	2.9%
Val (V)	32	6.7%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 49

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 45

#### Atomic composition:

Carbon	C	2396
Hydrogen	H	3791
Nitrogen	N	627
Oxygen	O	697
Sulfur	S	13

Formula: C<sub>2396</sub>H<sub>3791</sub>N<sub>627</sub>O<sub>697</sub>S<sub>13</sub>

Total number of atoms: 7524

#### Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient      31985  
Abs 0.1% (=1 g/l)    0.604, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient      31860  
Abs 0.1% (=1 g/l)    0.602, assuming NO Cys residues appear as half cystines

#### Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
>20 hours (yeast, in vivo).  
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

#### Instability index:

The instability index (II) is computed to be 49.56  
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 102.39

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.010

 [ExpASY Home page](#) [Site Map](#) [Search ExpASY](#) [Contact us](#) [Proteomics tools](#) [Swiss-Prot](#)

Search  for

Please help us to better understand your needs and expectations regarding ExpASY and complete our [online survey!](#)





## Ergebnisse des Programms NetOGlyc für LBP-wt

NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface/?jobid=netOglyc,4874C9...>



### NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

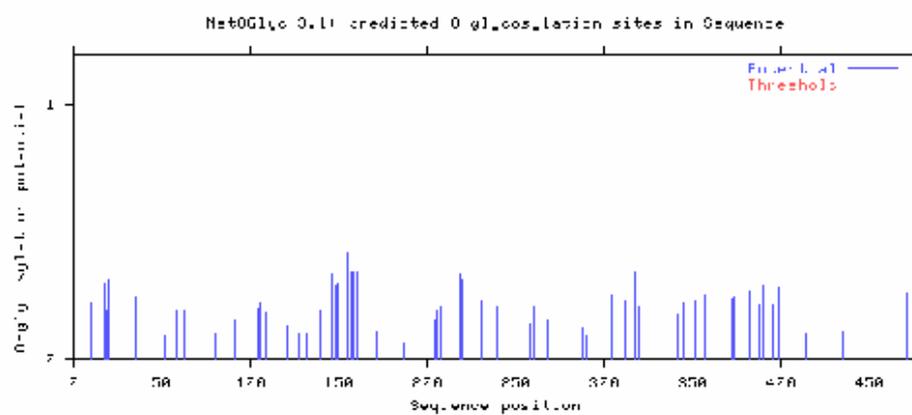
Name: Sequence Length: 477  
 MGALARALPSILLALLLTSTPEALGANPGLVARITDKGLQYAAQEGLLALQSELLRITLPDFTGDLRIPHVGRGRYEFHS  
 LNIHSCCELLHSALRFVPGQLSLISIDSSIRVQGRWKVRKSFRLQGSFDVSVKGISISVNLGSESSGRPTVTASSCS  
 SDIADVEVDMSGDLGWLNLNLFHNQIESKFKVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLFVTTTEIDSFADIDYSLVEAPRATA  
 QMLEVMFKGEIFHRNHRSPVTLAAVMSLPEEHNKMYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLNFSITDDMIPPDSNIRLTTKS  
 FRPVPRLARLYFNMNLELQGSVPSAPLNFSPGNLSVDPFYMEIDAFVLLPSSSKPEVFRLSVATNVSATLTFNTSKITG  
 FLKPGKVKVELKRESKVGLEFNAELLEALLNYIILNTFYPKFNDRKLAEGFPLPLLRVQVLYDLGLQIHKDFPSRRDHP

Name	S/T	Pos	G-score	I-score	Y/N	Comment
Sequence	S	10	0.222	0.176	.	-
Sequence	T	18	0.302	0.142	.	-
Sequence	S	19	0.191	0.052	.	-
Sequence	T	20	0.311	0.050	.	-
Sequence	T	35	0.243	0.157	.	-
Sequence	S	52	0.094	0.057	.	-
Sequence	T	58	0.191	0.046	.	-
Sequence	T	63	0.193	0.079	.	-
Sequence	S	80	0.104	0.063	.	-
Sequence	S	85	0.132	0.053	.	-
Sequence	S	91	0.154	0.042	.	-
Sequence	S	102	0.191	0.062	.	-
Sequence	S	104	0.198	0.028	.	-
Sequence	S	106	0.221	0.051	.	-
Sequence	S	108	0.186	0.017	.	-
Sequence	S	109	0.183	0.032	.	-
Sequence	S	121	0.131	0.018	.	-
Sequence	S	128	0.099	0.049	.	-
Sequence	S	132	0.102	0.064	.	-
Sequence	S	137	0.149	0.074	.	-
Sequence	S	139	0.192	0.081	.	-
Sequence	S	146	0.336	0.053	.	-
Sequence	S	148	0.286	0.034	.	-
Sequence	S	149	0.298	0.071	.	-
Sequence	T	153	0.448	0.111	.	-
Sequence	T	155	0.417	0.311	.	-
Sequence	S	157	0.345	0.024	.	-
Sequence	S	158	0.344	0.025	.	-
Sequence	S	160	0.356	0.062	.	-
Sequence	S	161	0.343	0.054	.	-
Sequence	S	171	0.107	0.141	.	-
Sequence	S	187	0.062	0.028	.	-
Sequence	S	195	0.104	0.070	.	-
Sequence	S	204	0.153	0.025	.	-
Sequence	S	206	0.192	0.078	.	-
Sequence	S	207	0.207	0.039	.	-
Sequence	T	215	0.308	0.062	.	-
Sequence	T	219	0.339	0.081	.	-
Sequence	T	220	0.316	0.145	.	-
Sequence	S	224	0.225	0.034	.	-
Sequence	S	231	0.229	0.022	.	-
Sequence	T	239	0.204	0.207	.	-
Sequence	S	258	0.141	0.040	.	-
Sequence	T	261	0.202	0.048	.	-
Sequence	S	268	0.151	0.149	.	-

NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface/?jobid=netOglyc,4874C9...

Sequence	S	282	0.120	0.037	.	-
Sequence	T	288	0.126	0.061	.	-
Sequence	S	290	0.092	0.028	.	-
Sequence	S	302	0.161	0.025	.	-
Sequence	T	304	0.248	0.060	.	-
Sequence	S	312	0.228	0.021	.	-
Sequence	T	317	0.344	0.058	.	-
Sequence	T	318	0.367	0.064	.	-
Sequence	S	320	0.209	0.028	.	-
Sequence	S	342	0.174	0.062	.	-
Sequence	S	345	0.220	0.345	.	-
Sequence	S	352	0.225	0.054	.	-
Sequence	S	357	0.246	0.058	.	-
Sequence	S	372	0.240	0.056	.	-
Sequence	S	373	0.240	0.022	.	-
Sequence	S	374	0.244	0.186	.	-
Sequence	S	382	0.273	0.048	.	-
Sequence	T	385	0.433	0.042	.	-
Sequence	S	388	0.216	0.066	.	-
Sequence	T	390	0.295	0.295	.	-
Sequence	T	392	0.330	0.077	.	-
Sequence	T	395	0.297	0.066	.	-
Sequence	S	396	0.214	0.030	.	-
Sequence	T	399	0.284	0.062	.	-
Sequence	S	414	0.103	0.026	.	-
Sequence	T	425	0.108	0.025	.	-
Sequence	S	471	0.263	0.234	.	-



[Graphics in PostScript](#)

[Explain](#) the output. Go [back](#).

## Ergebnisse des Programms NetOGlyc für LBP-c998t

NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface?jobid=netOglyc,4874C7...>



### NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

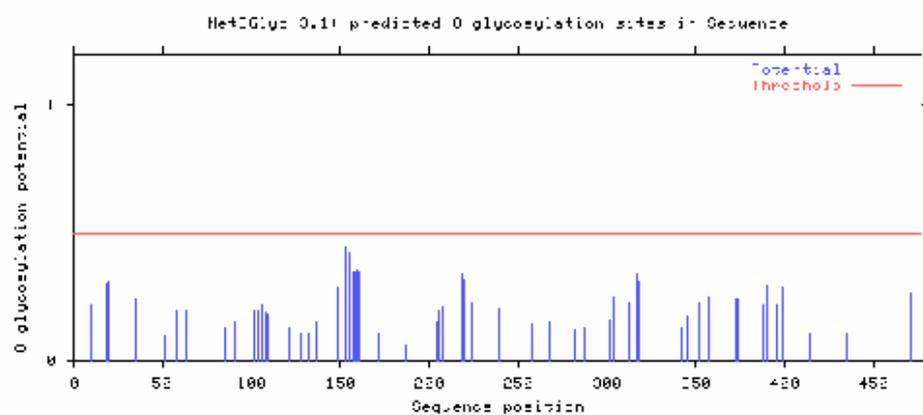
Name: Sequence Length: 477  
 MGALARALPSIILLALLTSTPEALGANPGLVARITDRGLQYAAQEGLLALQSELLRITLPDFTGDLRIPHVGRGRYEFHS  
 LNIHSCCELLHSALRPVPGQLSLSDSSIRVQGRWKVRSFFRLQGSFVSVKGISISVNLGLGSESSGRFTVTASSCS  
 SDIADVEVDMSSGDLGWLNLNLFHNQIESKPKQVLESRICEMIQKSVSSDLQPYLQTLFVTEIDSFADIDYSLVEAPRATA  
 QMLEVMEFKGEIFHRNHRSPVITLLAAVMSLPEEHNKGVYFAISDYVFNTASLVYHEEGYLNFSITDDMIPPDNIRLTTKS  
 FRPFVPRLARLYLNMNLELQGSVPSAPLLNFSPGNLSVDPYMEIDAFLVLLPSSSKEPVFRLSVATNVSATLTFNTSKITG  
 FLKPGKVKVELKESKVGLEFNAELLEALLNYIINTFYPKFNDRKLAEGFPLLLKRVQLYDLGLQIHKDFPSRRDHP

Name	S/T	Pos	G-score	I-score	Y/N	Comment
Sequence	S	10	0.222	0.176	-	-
Sequence	T	18	0.302	0.142	-	-
Sequence	S	19	0.191	0.052	-	-
Sequence	T	20	0.311	0.050	-	-
Sequence	T	35	0.243	0.157	-	-
Sequence	S	52	0.094	0.057	-	-
Sequence	T	58	0.191	0.046	-	-
Sequence	T	63	0.193	0.079	-	-
Sequence	S	80	0.104	0.063	-	-
Sequence	S	85	0.132	0.053	-	-
Sequence	S	91	0.154	0.042	-	-
Sequence	S	102	0.191	0.062	-	-
Sequence	S	104	0.198	0.028	-	-
Sequence	S	106	0.221	0.051	-	-
Sequence	S	108	0.186	0.017	-	-
Sequence	S	109	0.183	0.032	-	-
Sequence	S	121	0.131	0.018	-	-
Sequence	S	128	0.099	0.049	-	-
Sequence	S	132	0.102	0.064	-	-
Sequence	S	137	0.149	0.074	-	-
Sequence	S	139	0.192	0.081	-	-
Sequence	S	146	0.336	0.053	-	-
Sequence	S	148	0.286	0.034	-	-
Sequence	S	149	0.298	0.071	-	-
Sequence	T	153	0.448	0.111	-	-
Sequence	T	155	0.417	0.311	-	-
Sequence	S	157	0.345	0.024	-	-
Sequence	S	158	0.344	0.025	-	-
Sequence	S	160	0.356	0.062	-	-
Sequence	S	161	0.343	0.054	-	-
Sequence	S	171	0.107	0.141	-	-
Sequence	S	187	0.062	0.028	-	-
Sequence	S	195	0.104	0.070	-	-
Sequence	S	204	0.153	0.025	-	-
Sequence	S	206	0.192	0.078	-	-
Sequence	S	207	0.207	0.039	-	-
Sequence	T	215	0.308	0.062	-	-
Sequence	T	219	0.339	0.081	-	-
Sequence	T	220	0.316	0.145	-	-
Sequence	S	224	0.225	0.034	-	-
Sequence	S	231	0.229	0.022	-	-
Sequence	T	239	0.204	0.207	-	-
Sequence	S	258	0.141	0.040	-	-
Sequence	T	261	0.202	0.048	-	-
Sequence	S	268	0.151	0.149	-	-

NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface?jobid=netOglyc,4874C7...>

Sequence	S	282	0.120	0.037	.	-
Sequence	T	288	0.126	0.061	.	-
Sequence	S	290	0.092	0.028	.	-
Sequence	S	302	0.161	0.025	.	-
Sequence	T	304	0.248	0.060	.	-
Sequence	S	312	0.228	0.021	.	-
Sequence	T	317	0.342	0.058	.	-
Sequence	T	318	0.309	0.064	.	-
Sequence	S	320	0.167	0.028	.	-
Sequence	S	342	0.129	0.062	.	-
Sequence	S	345	0.171	0.344	.	-
Sequence	S	352	0.225	0.054	.	-
Sequence	S	357	0.246	0.058	.	-
Sequence	S	372	0.240	0.056	.	-
Sequence	S	373	0.240	0.022	.	-
Sequence	S	374	0.244	0.186	.	-
Sequence	S	382	0.273	0.048	.	-
Sequence	T	385	0.433	0.042	.	-
Sequence	S	388	0.216	0.066	.	-
Sequence	T	390	0.295	0.295	.	-
Sequence	T	392	0.330	0.077	.	-
Sequence	T	395	0.297	0.066	.	-
Sequence	S	396	0.214	0.030	.	-
Sequence	T	399	0.284	0.062	.	-
Sequence	S	414	0.103	0.026	.	-
Sequence	T	425	0.108	0.025	.	-
Sequence	S	471	0.263	0.234	.	-



[Graphics in PostScript](#)

[Explain the output.](#) [Go back.](#)

**Ergebnisse des Programms PeptideCutter LBPwt**

Position of cleavage site	Name of cleaving enzyme(s)	Resulting peptide sequence	Peptide length [aa]	Peptide mass [Da]
330	Arg-C proteinase Clostripain Thermolysin Trypsin	R	1	174.203
331	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Proteinase K	L	1	131.175
332	Proteinase K	Y	1	181.191
334	Thermolysin	PN	2	229.236
335	CNBr Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	1	149.208
336	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Thermolysin	N	1	132.119
337	Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Proteinase K	L	1	131.175

**Ergebnisse des Programms PeptideCutter LBP-c998t**

Position of cleavage site	Name of cleaving enzyme(s)	Resulting peptide sequence	Peptide length [aa]	Peptide mass [Da]
330	Arg-C proteinase Clostripain Thermolysin Trypsin	R	1	174.203
331	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Proteinase K	L	1	131.175
332	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Proteinase K Thermolysin	Y	1	181.191
333	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Proteinase K	L	1	131.175
334	Thermolysin	N	1	132.119
335	CNBr Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	1	149.208
336	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Thermolysin	N	1	132.119
337	Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Proteinase K	L	1	131.175

## Ergebnisse des Programms PolyPhen

PolyPhen: results for dnSNP rs2232613

<http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/pph/pph4dbSNP.cgi>

# PolyPhen report

Bork Group Sunyaev Lab

New Prediction

Citation

Help

refSNP

Predictions found for proteins:

rs2232613

NP\_004130.2

### Query

Acc number	Position	AA1	AA2	Description
NP_004130.2	333	P	L	lipopolysaccharide-binding protein precursor [Homo sapiens] gi 10443246 emb CAC10462.1  LBP [Homo sapiens]

### Prediction

**This variant is predicted to be probably damaging**

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.846

### Details

#### PSIC PROFILE SCORES FOR TWO AMINO ACID VARIANTS

Score1	Score2	Score1-Score2	Observations	Diagnostics	Multiple alignment around substitution position
+1.997	-0.849	2.846	9		Sequences: <input type="checkbox"/> all <input checked="" type="checkbox"/> Flanks: <input type="text" value="25"/> <input type="button" value="Show alignment"/>

#### MAPPING OF THE SUBSTITUTION SITE TO KNOWN PROTEIN 3D STRUCTURES

Database	Initial number of structures	Number of structures
PQS	2	



## Literatur

Alberti, C., Brun-Buisson, C., Chevret, S., Antonelli, M., Goodman, S.V., Martin, C., Moreno, R., Ochagavia, A.R., Palazzo, M., Werdan, K., & Le Gall, J.R. (2005). Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 171, 461-468. In eng.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., & Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.

Amberger, J.C. (2002). Doktorarbeit: "Untersuchung der Rolle der Aminosäuren L188, Y272, Y277, L278 und Y457 auf den Phospholipid- und Lipopolysaccharidtransfer des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) durch Mutagenese." Berlin: Charité-Universitätsmedizin. In Deutsch.

Anderson, K.V., Jürgens, G., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, 42, 779-789.

Barber, R.C., & O'Keefe, G.E. (2003). Characterization of a single nucleotide polymorphism in the lipopolysaccharide binding protein and its association with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 1316-1320.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., & Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9237-9242.

Baumann, H., & Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today*, 15, 74-80.

Beamer, L.J. (2003). Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*, 31, 791-794. In eng.

Beamer, L.J., Carroll, S.F., & Eisenberg, D. (1997). Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science*, 276, 1861-1864. In eng.

Beamer, L.J., Carroll, S.F., & Eisenberg, D. (1998). The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci*, 7, 906-914.

Beamer, L.J., Carroll, S.F., & Eisenberg, D. (1999). The three-dimensional structure of human bactericidal/permeability-increasing protein: implications for understanding protein-lipopolysaccharide interactions. *Biochem Pharmacol*, 57, 225-229.

Becker, C.E., & O'Neill, L.A. (2007). Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol*, 29, 239-248.

Bell, J.K., Botos, I., Hall, P.R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D.M., & Davies, D.R. (2005). The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10976-10980.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2002). *"Biochemistry"*. New York: W.H. Freeman and Company.

- Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234, 177-186.
- Brunkhorst, F.M. (2004). *Sepsis fordert mehr Todesopfer als gedacht*, Newsletter. In Deutsch.
- Brunkhorst, F.M., Engel, C., Ragaller, M., Welte, T., Rossaint, R., Gerlach, H., Mayer, K., John, S., Stuber, F., Weiler, N., Oppert, M., Moerer, O., Bogatsch, H., Reinhart, K., Loeffler, M., & Hartog, C. (2008). Practice and perception-A nationwide survey of therapy habits in sepsis. *Crit Care Med*, 36, 1-6. In Eng.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., & Ulmer, A.J. (2005). Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol*, 35, 282-289. In eng.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., & Ulmer, A.J. (2006). TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem*, 281, 9049-9057. In eng.
- Canny, G., Levy, O., Furuta, G.T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R.B., Serhan, C.N., & Colgan, S.P. (2002). Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3902-3907.
- Chien, J.W., Boeckh, M.J., Hansen, J.A., & Clark, J.G. (2008). Lipopolysaccharide binding protein promoter variants influence the risk for Gram-negative bacteremia and mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 111, 2462-2469.
- Choe, J., Kelker, M.S., & Wilson, I.A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309, 581-585.
- Claessens, Y.E., & Dhainaut, J.F. (2007). Diagnosis and treatment of severe sepsis. *Crit Care*, 11 Suppl 5, S2. In eng.
- Creely, S.J., McTernan, P.G., Kusminski, C.M., Fisher, M., Da Silva, N.F., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A.L., & Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292, E740-747.
- Dentener, M.A., Vreugdenhil, A.C., Hoet, P.H., Vernooy, J.H., Nieman, F.H., Heumann, D., Janssen, Y.M., Buurman, W.A., & Wouters, E.F. (2000). Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: Implications for local defense to bacterial endotoxins. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23, 146-153.
- Dörner, K. (2003). *"Klinische Chemie und Hämatologie"*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. In Deutsch.
- Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M., & Reinhart, K. (2007). Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33, 606-618. In eng.

Fang, C.W., Yao, Y.M., Zhai, H.X., Yu, Y., Wu, Y., Lu, L.R., Sheng, Z.Y., & Sheng, C.Y. (2004). Tissue lipopolysaccharide-binding protein expression in rats after thermal injury: potential role of TNF-alpha. *Burns*, *30*, 225-231.

Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K.H., & Ulmer, A.J. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol*, *83*, 692-701. In eng.

Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J., & Singh, S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev*, *19*, 3-19.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A., & O'Neill, L.A. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, *413*, 78-83.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., & Golenbock, D.T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, *198*, 1043-1055.

Frey, E.A., Miller, D.S., Jahr, T.G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B.B., & Wright, S.D. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*, *176*, 1665-1671.

Froon, A.H., Dentener, M.A., Greve, J.W., Ramsay, G., & Buurman, W.A. (1995). Lipopolysaccharide toxicity-regulating proteins in bacteremia. *J Infect Dis*, *171*, 1250-1257.

Gaini, S., Pedersen, S.S., Koldkjaer, O.G., Pedersen, C., Moestrup, S.K., & Møller, H.J. (2008). New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol*, *151*, 423-431.

Gamble, L., Bagby, G.J., Quinton, L.J., Happel, K.I., Mizgerd, J.P., Zhang, P., & Nelson, S. (2008). The Systemic and Pulmonary Lipopolysaccharide Binding Protein Response to Intratracheal Lipopolysaccharide. *Shock*. In Eng.

Gasteiger, E., Hooglan, C., A., G., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server". In Walker, J.M. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana Press.

Gazzano-Santoro, H., Meszaros, K., Birr, C., Carroll, S.F., Theofan, G., Horwitz, A.H., Lim, E., Aberle, S., Kasler, H., & Parent, J.B. (1994). Competition between rBPI<sub>23</sub>, a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and gram-negative bacteria. *Infect Immun*, *62*, 1185-1191. In eng.

Gazzano-Santoro, H., Parent, J.B., Grinna, L., Horwitz, A., Parsons, T., Theofan, G., Elsbach, P., Weiss, J., & Conlon, P.J. (1992). High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, *60*, 4754-4761.

Gerold, G., Ajaj, K.A., Bienert, M., Laws, H.J., Zychlinsky, A., & de Diego, J.L. (2008). A Toll-like receptor 2-integrin beta<sub>3</sub> complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat Immunol*, *9*, 761-768. In eng.

- Gioannini, T.L., Teghanemt, A., Zhang, D., Levis, E.N., & Weiss, J.P. (2005). Monomeric endotoxin: protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. *J Endotoxin Res*, *11*, 117-123.
- Gray, P.W., Corcorran, A.E., Eddy, R.L., Jr., Byers, M.G., & Shows, T.B. (1993). The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics*, *15*, 188-190. In eng.
- Guex, N., & Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*, 2714-2723.
- Gutsmann, T., Haberer, N., Carroll, S.F., Seydel, U., & Wiese, A. (2001). Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol Chem*, *382*, 425-434. In eng.
- Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., & Wright, S.D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*, *179*, 269-277.
- Hallatschek, W., Fiedler, G., Kirschning, C.J., Creutzburg, F., Lamping, N., Nüssler, A., & Schumann, R.R. (2004). Inhibition of hepatic transcriptional induction of lipopolysaccharide-binding protein by transforming-growth-factor  $\beta$  1. *Eur J Immunol*, *34*, 1441-1450.
- Hamann, L., Alexander, C., Stamme, C., Zähringer, U., & Schumann, R.R. (2005). Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms. *Infect Immun*, *73*, 193-200. In eng.
- Han, J., Mathison, J.C., Ulevitch, R.J., & Tobias, P.S. (1994). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem*, *269*, 8172-8175. In eng.
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R., & Goyert, S.M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*, *141*, 547-552.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zähringer, U., & Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, *433*, 523-527. In eng.
- Hoess, A., Watson, S., Siber, G.R., & Liddington, R. (1993). Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *Embo J*, *12*, 3351-3356.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., & Taniguchi, T. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*, 15416-15421.
- Horng, T., Barton, G.M., & Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, *2*, 835-841.

Hotamisligil, G.S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes, 27 Suppl 3*, S53-55.

Hubacek, J.A., Buchler, C., Aslanidis, C., & Schmitz, G. (1997). The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved. *Biochem Biophys Res Commun, 236*, 427-430. In eng.

Hubacek, J.A., Stüber, F., Fröhlich, D., Book, M., Wetegrove, S., Ritter, M., Rothe, G., & Schmitz, G. (2001). Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med, 29*, 557-561.

Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Beutler, B., Galanos, C., & Freudenberg, M.A. (2006). R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol, 36*, 701-711.

Huuskonen, J., Wohlfahrt, G., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Teleman, O., & Olkkonen, V.M. (1999). Structure and phospholipid transfer activity of human PLTP: analysis by molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Lipid Res, 40*, 1123-1130.

Iovine, N.M., Elsbach, P., & Weiss, J. (1997). An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*, 10973-10978.

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

Janeway Jr., C.A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M.J. (2001). *"Immunobiology"*. New York: Garland Publishing.

Jerala, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol, 297*, 353-363.

Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., & Beutler, B. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol, 6*, 565-570.

Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H., & Lee, J.O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell, 130*, 1071-1082.

Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology, 15*, 153-164.

Kagan, J.C., & Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell, 125*, 943-955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nat Immunol, 9*, 361-368.

Kaisho, T., & Akira, S. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta, 1589*, 1-13.

- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, *13*, 816-825.
- Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsuhashima, N., Lee, H., Yoo, O.J., & Lee, J.O. (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, *130*, 906-917.
- Kirk, P., & Bazan, J.F. (2005). Pathogen recognition: TLRs throw us a curve. *Immunity*, *23*, 347-350.
- Kohara, J., Tsuneyoshi, N., Gauchat, J.F., Kimoto, M., & Fukudome, K. (2006). Preparation and characterization of truncated human lipopolysaccharide-binding protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, *49*, 276-283. In eng.
- Kopp, E.B., & Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*, *11*, 13-18.
- Korhonen, T., Grauling-Halama, S., Halama, N., Silvennoinen-Kassinen, S., Leinonen, M., & Saikku, P. (2006). Rapid genotyping of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) C<sub>1341</sub>-->T (Leu<sub>436</sub>-->Phe) polymorphism by LightCycler real-time PCR. *J Immunol Methods*, *317*, 171-174.
- Kormann, M.S.D., Depner, M., Hartl, D., Klopp, N., Illig, T., Adamski, J., Vogelberg, C., Weiland, S.K., von Mutius, E., & Kabesch, M. (2008). Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *122*, 86-92, 92 e81-88.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., & Choi, S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med*, *39*, 421-438.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lamping, N., Dettmer, R., Schröder, N.W., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R., & Schumann, R.R. (1998). LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest*, *101*, 2065-2071. In eng.
- Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T.C., Kirschning, C.J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S.D., Herrmann, F., & Schumann, R.R. (1996). Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol*, *157*, 4648-4656. In eng.
- Latz, E. (2001). Doktorarbeit: "Struktur- und Funktionsanalyse des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP)". Promotion. Berlin: Charité-Universitätsmedizin. In Deutsch.
- Lauw, F.N., Caffrey, D.R., & Golenbock, D.T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol*, *26*, 509-511.
- Lazar, M.A. (2005). How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*, *307*, 373-375.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, *86*, 973-983.

Loppnow, H., Dürrbaum, I., Brade, H., Dinarello, C.A., Kusumoto, S., Rietschel, E.T., & Flad, H.D. (1990). Lipid A, the immunostimulatory principle of lipopolysaccharides? *Adv Exp Med Biol*, 256, 561-566.

Martin, T.R., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Letúrcq, D.J., Moriarty, A.M., Maunder, R.J., & Ulevitch, R.J. (1992). Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest*, 90, 2209-2219.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2, 253-258.

Meng, J.F., McFall, C., & Rosenwasser, L.J. (2007). Polymorphism R62W results in resistance of CD23 to enzymatic cleavage in cultured cells. *Genes Immun*, 8, 215-223.

Miyake, K. (2004). Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*, 12, 186-192. In eng.

Moynagh, P.N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends Immunol*, 26, 469-476.

Mueller, M., Brandenburg, K., Dedrick, R., Schromm, A.B., & Seydel, U. (2005). Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein. *J Immunol*, 174, 1091-1096. In eng.

Mühlhardt, C. (2003). *Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag. In Deutsch.

Müller, M., Scheel, O., Lindner, B., Gutschmann, T., & Seydel, U. (2003). The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. *J Endotoxin Res*, 9, 181-186. In eng.

Munford, R.S., Hall, C.L., & Grimm, L. (1984). Detection of free endotoxin in cerebrospinal fluid by the *Limulus* lysate test. *Infect Immun*, 45, 531-533.

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Koguchi, A., Kimoto, M., & Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 3, 667-672.

Nyström, P.O. (1998). The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother*, 41 Suppl A, 1-7.

O'Neill, L.A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*, 18, 3-9.

Oh, D.Y., Taube, S., Hamouda, O., Kücherer, C., Poggensee, G., Jessen, H., Eckert, J.K., Neumann, K., Storek, A., Pouliot, M., Borgeat, P., Oh, N., Schreier, E., Pruss, A., Hattermann, K., & Schumann, R.R. (2008). A Functional Toll-Like Receptor 8 Variant Is Associated with HIV Disease Restriction. *J Infect Dis*.

- Omueti, K.O., Beyer, J.M., Johnson, C.M., Lyle, E.A., & Tapping, R.I. (2005). Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem*, *280*, 36616-36625. In eng.
- Orlowski, M., & Wilk, S. (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*, *383*, 1-16. In eng.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*, 13766-13771.
- Pavcnik-Arnol, M., Hojker, S., & Derganc, M. (2004). Lipopolysaccharide-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infection: comparison with procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Intensive Care Med*, *30*, 1454-1460.
- Pavcnik-Arnol, M., Hojker, S., & Derganc, M. (2007). Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med*, *33*, 1025-1032.
- Pickup, J.C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *27*, 813-823.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, *282*, 2085-2088.
- Prucha, M., Herold, I., Zazula, R., Dubska, L., Dostal, M., Hildebrand, T., & Hyaneek, J. (2003). Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. *Crit Care*, *7*, R154-159.
- Pugin, J., Heumann, I.D., Tomasz, A., Kravchenko, V.V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S., & Ulevitch, R.J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, *1*, 509-516.
- Raetz, C.R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem*, *59*, 129-170.
- Ramadori, G., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Tobias, P.S., Mathison, J.C., & Ulevitch, R.J. (1990). Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology*, *58*, 89-94.
- Reichel, P.H., Seemann, C., Csernok, E., Schröder, J.M., Müller, A., Gross, W.L., & Schultz, H. (2003). Bactericidal/permeability-increasing protein is expressed by human dermal fibroblasts and upregulated by interleukin 4. *Clin Diagn Lab Immunol*, *10*, 473-475.
- Reinhart, K., Brunkhorst, F.M., Bone, H.G., Gerlach, H., Gründling, M., Kreymann, G., Kujath, P., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stüber, F., Weiler, N., Welte, T., & Werdan, K. (2007). "Diagnose und Therapie der Sepsis", Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. . Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. In Deutsch.
- Ren, L., Jin, L., & Leung, W.K. (2004). Local expression of lipopolysaccharide-binding protein in human gingival tissues. *J Periodontal Res*, *39*, 242-248.

- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., & Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*, 588-593.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., & Milon, A. (2003). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci*, *60*, 1529-1546.
- Schröder, N.W., Heine, H., Alexander, C., Manukyan, M., Eckert, J., Hamann, L., Göbel, U.B., & Schumann, R.R. (2004). Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol*, *173*, 2683-2691.
- Schröder, N.W., Opitz, B., Lamping, N., Michelsen, K.S., Zähringer, U., Göbel, U.B., & Schumann, R.R. (2000). Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol*, *165*, 2683-2693.
- Schromm, A.B., Lien, E., Henneke, P., Chow, J.C., Yoshimura, A., Heine, H., Latz, E., Monks, B.G., Schwartz, D.A., Miyake, K., & Golenbock, D.T. (2001). Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med*, *194*, 79-88. In eng.
- Schultz, H., Hume, J., Zhang de, S., Gioannini, T.L., & Weiss, J.P. (2007). A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells. *J Immunol*, *179*, 2477-2484.
- Schumann, R.R., Kirschning, C.J., Unbehauen, A., Aberle, H.P., Knopf, H.P., Lamping, N., Ulevitch, R.J., & Herrmann, F. (1996). The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol*, *16*, 3490-3503.
- Schumann, R.R., Lamping, N., & Hoess, A. (1997). Interchangeable endotoxin-binding domains in proteins with opposite lipopolysaccharide-dependent activities. *J Immunol*, *159*, 5599-5605.
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., & Ulevitch, R.J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, *249*, 1429-1431.
- Schumann, R.R., & Zweigner, J. (1999). A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clin Chem Lab Med*, *37*, 271-274.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, *189*, 1777-1782.
- Singh, R., Ting, J.G., Pan, Y., Teh, L.K., Ismail, R., & Ong, C.E. (2008). Functional role of Ile264 in CYP2C8: mutations affect haem incorporation and catalytic activity. *Drug Metab Pharmacokinet*, *23*, 165-174.

- Solá, R.J., Rodríguez-Martínez, J.A., & Griebenow, K. (2007). Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications. *Cell Mol Life Sci*, *64*, 2133-2152. In eng.
- Su, G.L., Freeswick, P.D., Geller, D.A., Wang, Q., Shapiro, R.A., Wan, Y.H., Billiar, T.R., Twardy, D.J., Simmons, R.L., & Wang, S.C. (1994). Molecular cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding protein. Evidence for extrahepatic expression. *J Immunol*, *153*, 743-752.
- Takeuchi, F., Yanai, K., Inomata, H., Kuzuya, N., Kajio, H., Honjo, S., Takeda, N., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Shirasawa, S., Sasazuki, T., & Kato, N. (2007). Search of type 2 diabetes susceptibility gene on chromosome 20q. *Biochem Biophys Res Commun*, *357*, 1100-1106.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., & Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, *13*, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., & Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, *169*, 10-14.
- Tall, A. (1995). Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*, *64*, 235-257.
- Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., & Miyake, K. (2008). Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, *368*, 94-99.
- Theofan, G., Horwitz, A.H., Williams, R.E., Liu, P.S., Chan, I., Birr, C., Carroll, S.F., Mészáros, K., Parent, J.B., Kasler, H., Aberle, S., Trown, P.W., & Gazzano-Santoro, H. (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., Soldau, K., Gegner, J.A., Mintz, D., & Ulevitch, R.J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem*, *270*, 10482-10488.
- Tobias, P.S., Soldau, K., Iovine, N.M., Elsbach, P., & Weiss, J. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J Biol Chem*, *272*, 18682-18685.
- Tobias, P.S., Soldau, K., & Ulevitch, R.J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*, *164*, 777-793. In eng.
- Tobias, P.S., Soldau, K., & Ulevitch, R.J. (1989). Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem*, *264*, 10867-10871.
- Ubenauf, K.M., Krueger, M., Henneke, P., & Berner, R. (2007). Lipopolysaccharide binding protein is a potential marker for invasive bacterial infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, *26*, 159-162.
- Vegarud, G., & Christensen, T.B. (1975a). Glycosylation of Proteins: a new method of enzyme stabilization. *Biotechnol Bioeng*, *17*, 1391-1397. In eng.

Vegarud, G., & Christensen, T.B. (1975b). The resistance of glycoproteins to proteolytic inactivation. *Acta Chem Scand B*, 29, 887-888. In eng.

Vesy, C.J., Kitchens, R.L., Wolfbauer, G., Albers, J.J., & Munford, R.S. (2000). Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun*, 68, 2410-2417.

Viriyakosol, S., Tobias, P.S., Kitchens, R.L., & Kirkland, T.N. (2001). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 276, 38044-38051. In eng.

Visintin, A., Latz, E., Monks, B.G., Espevik, T., & Golenbock, D.T. (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem*, 278, 48313-48320.

Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.A., & Segal, D.M. (2001). Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12156-12161. In eng.

Vogel, S.N., Fitzgerald, K.A., & Fenton, M.J. (2003). TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv*, 3, 466-477.

Weiss, J., & Olsson, I. (1987). Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood*, 69, 652-659.

White, M.L., Ma, J.K., Birr, C.A., Trown, P.W., & Carroll, S.F. (1994). Measurement of bactericidal/permeability-increasing protein in human body fluids by sandwich ELISA. *J Immunol Methods*, 167, 227-235. In eng.

WHO (2006). WHO fact sheet No. 308 [online]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/> [accessed 25.8.2008].

Wilde, C.G., Seilhamer, J.J., McGrogan, M., Ashton, N., Snable, J.L., Lane, J.C., Leong, S.R., Thornton, M.B., Miller, K.L., Scott, R.W., & Marra, M.N. (1994). Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation. *J Biol Chem*, 269, 17411-17416. In eng.

Williams, T.N., Mwangi, T.W., Wambua, S., Alexander, N.D., Kortok, M., Snow, R.W., & Marsh, K. (2005). Sick cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis*, 192, 178-186.

Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D., Wittig, B.M., & Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*, 178, 5973-5981.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., & Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433. In eng.

Wurfel, M.M., Kunitake, S.T., Lichenstein, H., Kane, J.P., & Wright, S.D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*, 180, 1025-1035. In eng.

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., & Akira, S. (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, *420*, 324-329.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, *4*, 1144-1150.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002b). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, *169*, 6668-6672.
- Yamamoto, M., Takeda, K., & Akira, S. (2004). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*, *40*, 861-868.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., & Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, *308*, 1626-1629.
- Yu, B., Hailman, E., & Wright, S.D. (1997). Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest*, *99*, 315-324. In eng.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., & Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, *303*, 1522-1526.
- Zhang, D.X., & Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol*, *12*, 563-584.
- Zughaier, S.M., Zimmer, S.M., Datta, A., Carlson, R.W., & Stephens, D.S. (2005). Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun*, *73*, 2940-2950.
- Zweigner, J., Gramm, H.J., Singer, O.C., Wegscheider, K., & Schumann, R.R. (2001). High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood*, *98*, 3800-3808.
- Zweigner, J., Schumann, R.R., & Weber, J.R. (2006). The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect*, *8*, 946-952.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
add	hinzufügen (lat. additiv)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser (lat. aqua destilata)
AS	Aminosäure
BAL	Bronchiallavage
BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
bp	Basenpaar
BPI	engl. bactericidal/permeability-increasing protein
BSA	bovines Serumalbumin
B-Zellen	Immunzellen die beim Mensch im Knochenmark (engl. bone marrow) und bei Vögeln in der Bursa fabricii gebildet werden
C-terminal	Ende einer Polypeptidkette (Kohlenstoff der COOH-Gruppe eines Polypeptids)
CD	Oberflächenrezeptor auf Immunzellen anhand derer diese unterschieden und eingeordnet werden können (engl. cluster of differentiation), z.B. CD4 <sup>-</sup> und CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CHO	Chinesische Hamster-Ovar-Zellen (engl. Chinese Hamster Ovary cells)
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (engl. Calf Intestine Alkaline Phosphatase)
CRP	C-reaktives Protein
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-reiche DNS-Sequenz
CTTP	engl. cytoplasmic transductional-transcriptional processor
CYP	Cytochrom P450-Proteinfamilie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxy ribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DS-ELISA	Doppel-Sandwich-Enzymgekoppelter Immuno-Absorptions-Assay
DS-RNS	doppelsträngige RNS
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl. enhanced chemilumineszenz)
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (lat. et alii)
FKS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf sera)
FSB	Transformationspuffer
g	Gramm (bei Massen)
g	Erdbeschleimigung
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
GlcNac	N-Acetyl-Glukosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	human (Bsp. h-TNF- $\alpha$ steht für humanes TNF- $\alpha$ )
h	Stunde (bei Zeitangaben)
Hb	Hämoglobin
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. High Density Lipoprotein)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (humane embryonic kidney cells) 293
Hep	Heptose
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMGB1	engl. high mobility group box protein 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horse radish peroxidase)
HSP	Hitze-Schock-Protein
ht	heterozygot
hz	homozygot
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin Klasse G
IKK	Inhibitor des NF $\kappa$ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziiert Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDO	2-Keto-3-Desoxyoctonat
kPa	Kilopascal
L	Liter
LALF	Limulus-Anti-LPS-Faktor
LB	Nährmedium für Bakterien (engl. lysogeny broth)

LBP	LPS-bindendes Protein
LBP-wt	Wildtyp-LBP
LBP-c998t	LBP mit einem Nukleotidaustausch in der DNS-Sequenz an Position 998 (Cytosin→Thymin), welche zu einem Austausch von Prolin zu Leucin in der Aminosäuresequenz des Proteins führt
LBP-E94/95	LBP mit Doppelmutation: Austausch der Aminosäuren Arginin und Lysin an Position 94 und 95 gegen Glutaminsäure
LNA	Verschlossene Nukleinsäuren (engl. locked nucleotid acid)
LP	Lipoprotein
LP2	diazyliertes Lipoprotein
LP3	triazyliertes Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche sich wiederholende Sequenzen in Proteinen
LRRs	Mehrzahl LRR (engl. leucin rich repeats)
LTA	Lipoteichonsäure (engl. lipo teichoic acid)
m	murin, aus der Maus stammend (Bsp. mTNF- $\alpha$ steht für murines TNF $\alpha$ )
M	Molekulargewicht oder Molar
mA	Milliamper
Mal	MyD88-Adaptor ähnlich (engl. MyD88 adaptor like)
Malp2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid 2 (engl. macrophage-activating lipopeptide 2) von <i>Mycoplasma fermentas</i>
mCD14	membranständiges CD14
MCS	engl. Multiple Cloning site
meso-DAP	Meso-Di-aminopimelinsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNS	Boten- (engl. messenger) RNS, Zwischenschritt der Proteinsynthese
MyD88	engl. myeloid differentiation primary response protein 88
N	Anzahl (engl. number)
NF $\kappa$ B	Transkriptions oder Kernfaktor (engl. nuclear factor) kappa B
ng	Nanogramm

NLR	engl. nucleotide binding domain and leucine-rich repeat containing gene family
nm	Nanometer
N-terminal	Anfang einer Polypeptidkette (N aus der NH <sub>2</sub> -Gruppe eines Peptids)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei $\lambda=600$ nm
P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )-Druck (P) in der Atmung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen associated molecular pattern)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS + Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pH	Stärke des Wasserstoffs ( lat. potentia hydrogenii)
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
pmol	Pikomol
Poly-IC	Synthetisches Polymer aus vielen Inosinen und Cytosinen (engl. polyriboinosinic and polyribocytidylic acid), welches die RNS von infektiösen Viren ähnelt
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptor)
PRRs	Mehrzahl PRR (engl. pattern recognition receptors)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAW264.7	Murine Maus-Makrophagenzelllinie (engl. mouse leukaemic monocyte macrophage cell line)
R-LPS	raues (engl. rough) LPS
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT-PCR	Echt-Zeit-PCR (engl. real-time PCR)
sCD14	lösliches (engl. soluble) CD14 im Blut/Serum
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
si-RNS	kleine interferierende RNS (engl. small interfering) mit Funktion in der Regulation von zellulären Prozessen
SIRS	Systemische Entzündungsreaktion (engl. systemic inflammatory response)
S-LPS	glattes (engl. smooth) LPS

sMD2	lösliches (engl. soluble) MD2
SN	Zellkulturüberstand (engl. supernatant)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)
SNPs	Mehrzahl SNP (engl. single nucleotide polymorphisms)
SOB	Nährmedium zur Bakterientransformation (engl. super optimal broth)
SOC	Nährmedium zur Bakterientransformation mit zusätzlicher Glykose (C für engl. catabolite repression)
ss-RNS	Einzelsträngige RNS (engl. single strand)
T-Zellen	Thymus-abhängige Immunzelle
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBK	TANK-bindende Kinase (ähnlich IKK)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THP1	Humane Monocytenzelllinie (engl. human acute monocytic leukemia cell line)
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Homolog
TIRAP	engl. TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLRs	Mehrzahl TLR (engl. Toll-like receptors)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Einheit (engl. unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
x	mal (Vielfältiges)
$\mu$ g	Mikrogramm
$\lambda$	Wellenlänge
$\infty$	Unendlich
$^{\circ}$ C	Grad Celcius

Chemische Elemente und Verbindungen sowie Nukleotide wurden gemäß den Empfehlungen der Internationalen Vereinigung für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) abgekürzt.

### Symbole für Aminosäuren (Einzel- und Drei-Buchstaben-Kode)

Ein-Buchstaben-Kode	Drei-Buchstaben-Kode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

## Danksagung

Prof. Dr. R.R. Schumann danke ich für die Überlassung des Themas, seinem Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft. Prof. E. Schneider danke ich für die Übernahme meiner Betreuung und seine Unterstützung bei allem Organisatorischen.

Fränzi und Diana danke ich für die fachliche und moralische Unterstützung in allen Bereichen innerhalb und auch außerhalb des Labors und für ein tolles Arbeitsklima. Dazu beigetragen haben auch Djin-Ye (du fehlst hier), Janine, Miriam, Cordula, Evelyn, Konstantin, Lena, Gernot, André, Stefan, Michael, Gunthard, Lutz, Tim,... Ich hatte und habe eine tolle Zeit!!

Ein großes Dankeschön an alle die mir durch Korrektur, Diskussion, Hinweise, Ratschläge und manchmal auch ein bisschen Druck bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Ich möchte allen Freunden und guten Bekannten danken, besonders

Ela, mit der ich immer noch gemeinsam lachen und weinen kann.

Katja, die zwar nicht mehr mit mir zusammen wohnt, aber zusammen mit ihrer Familie (Danke Lovis, Danke kleine Greta) immer noch Teil meines Lebens und Arbeitens ist.

Na-Ri, die zwar fern, aber doch ganz nah ist.

Yu-Gie, der den Fernsehturm Alex nennt. Du bist noch nicht lange Teil meines Lebens, hast es aber schon sehr geprägt. Ich freue mich auf das, was die Zukunft uns bringt.

Und nicht zu vergessen ein riesengroßes Dankeschön an meine Eltern, meine Schwestern, Nichte, Neffen, Omas, Opas und den Rest der Familie, die mich einfach so nehmen wie ich bin, mich unterstützen und obwohl sie nicht immer verstehen was ich tue, mich einfach machen lassen.

Sollte ich jemanden vergessen, übergangen oder nicht namentlich erwähnt haben, immer dran denken:

Eigentlich danke ich allen!

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Jana Kristin Eckert, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, den