

IV DISKUSSION

1 Bindung der LBP-Mutanten an LPS und Lipid A

Das Computermodell von LBP, das aufgrund großer genetischer Ähnlichkeit in Analogie zur kristallographisch aufgedeckten Struktur von BPI (Beamer et al., 1997) gefertigt wurde, zeigt eine bumerangartige Struktur mit zwei pseudosymmetrischen Hälften. Diese beiden Hälften des LBP-Moleküls haben offenbar unterschiedliche Funktionen. So konnte anhand von Versuchen mit rekombinantem LBP, das an Position 197 trunziert wurde und somit nur die N-terminale Region des Proteins darstellt, gezeigt werden, daß diese Domäne von LBP eine hohe Affinität zu LPS besitzt. Dagegen ist sie aber nicht in der Lage, LPS an CD14 zu transferieren oder Makrophagen zu aktivieren. Daraus wurde gefolgert, daß diejenigen Strukturen des LBP, welche LPS-Effekte über CD14 vermitteln, in der carboxyterminalen Domäne lokalisiert sein müssen (Han et al., 1994; Theofan et al., 1994). Diese Auffassung wird durch Untersuchungen mit rekombinanten Fusionsproteinen aus den beiden Domänen von LBP und BPI unterstützt (Abrahmson et al., 1997). Weitere Untersuchungen legen nahe, daß LBP, BPI und LALF (Limulus anti-LPS Faktor, ein weiteres LPS-bindendes Protein aus dem Pfeilschwanzkrebs) über die gleichen endotoxinbindenden Domänen verfügen und daß diese sogar untereinander austauschbar sind (Schumann et al., 1997).

Einige Aminosäuren in der N-terminalen Region, die für die LPS-LBP-Interaktion von Bedeutung sind, konnten mit Hilfe von Mutationen bestätigt werden. Hierbei spielen besonders zwei positiv geladene Aminosäuren eine Rolle (Arg 94 & Lys 95), deren Mutation in negativ geladene Aminosäuren die LPS-Bindung, den LPS-Transfer an sCD14 und die Zell-Stimulationsaktivität von LBP komplett blockierte (Lamping et al., 1996). Diese Mutationen störten allerdings nicht die Fähigkeit von LBP, die Bindung von LPS-Aggregaten an Monozyten ohne nachfolgende Zellstimulation zu fördern. Auch die Aminosäure Lysin an Position 99 beeinflusst die LBP-LPS-Wechselwirkung, aber nicht in dem Maße wie die beiden anderen an Position 94 und 95. Es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß diese positiv geladenen Aminosäuren mit negativ geladenen Phosphatgruppen des LPS

wechselwirken könnten. Die oben erwähnten Untersuchungen zeigen die große Bedeutung dieser polaren Aminosäuren für die Funktion des LBP. Es schließt sich die Frage an, auf welche Weise die apolaren Lipidreste des Lipid A bei der Monomerisierung von LPS vor der wäßrigen Lösung des Blutplasmas verborgen werden. Eine freie Exposition der sechs hydrophoben Fettsäureketten, die eine Länge von etwa 14 C-Atomen besitzen, wäre energetisch äußerst ungünstig und mit der effektiven Katalyse von LPS-Monomeren durch LBP nicht in Einklang zu bringen.

Hierfür wurden die LBP-Mutanten hergestellt, deren Lipid-Binde-Taschen durch den Aminosäureaustausch zugebaut wurden. Die Bindung der LBP-Mutanten an LPS-Aggregate wurde untersucht mit immobilisiertem LPS von *Salmonella minnesota* und *Escherichia coli* und LBP-Mutanten bzw. Wildtyp-LBP in Lösung. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Bindungsaktivität zwischen Mutanten und Wildtyp-LBP. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, daß sich die Fettsäurereste des LPS im Aggregatzustand in Mizellenform zusammenlagern und nur die hydrophilen Zuckerreste dem wäßrigen Medium exponieren. An die Aggregate bindet LBP wahrscheinlich mit der Bindungsstelle im Bereich der positiv geladenen Aminosäuren 94, 95 und 99, die bei den hier benutzten Mutanten nicht verändert wurden. Trotzdem ist eine Involvierung der Lipid-Binde-Taschen auch in diesen Vorgang nicht von vornherein auszuschließen. Weiterhin zeigen diese beiden Versuche, daß die hergestellten rekombinanten Mutanten funktionstüchtige Proteine darstellen.

Auf die gleiche Weise wie die Bindungsversuche an komplettes LPS wurde die Bindungsaktivität der LBP-Mutanten an das Lipid A untersucht. Beim Lipid A fehlen im Vergleich zum ganzen LPS-Molekül die polaren Zuckereinheiten von O-Antigen und Kernregion. Die einzigen polaren Strukturen des Lipid A werden durch das N-Glucosamin-Gerüst mit zwei anhängenden Phosphatgruppen gebildet. Man könnte meinen, daß gerade in diesem Fall die hydrophoben Fettsäureketten eine wichtige Rolle für die Bindung an LBP darstellen. Aber auch hier zeigen die Versuche keine Unterschiede zwischen den LBP-Mutanten und dem Wildtyp-LBP. Hierfür scheinen drei Erklärungen möglich: Erstens könnte es sein, daß LBP mit den polaren Aminosäuren an Position 94 und 95 an die beiden Phosphatgruppen des N-

N-Glucosamin-Gerüsts des Lipid A bindet und keine Interaktionen zwischen den Fettsäureketten des Lipid A und dem LBP-Molekül stattfinden. Diese Erklärung wird unterstützt durch die Tatsache, daß sich Lipid A im wäßrigen Medium zu Aggregaten zusammenlagert und so wie komplette LPS-Moleküle nur seine – allerdings extrem verkürzten – polaren Strukturen exponiert. Diese Auffassung würde den beiden Phosphatgruppen des Lipid A den Hauptteil der Bindung zwischen LBP und Lipid A zusprechen. Zweitens wäre denkbar, daß der Lipidteil von Lipopolysaccharid an andere apolare Regionen des LBP-Moleküls bindet, die hier nicht mutiert wurden. Drittens läßt sich nicht ausschließen, daß vielleicht die Fettsäurereste des Endotoxins an die mutierten Lipid-Binde-Taschen binden, aber möglicherweise die einzelnen Mutationen unbedeutend sind für die Bindungsaffinität. Da aber die gleichen Mutationen im PLTP-Molekül die Bindung von Phospholipiden stark herabsetzte (Huuskonen et al., 1999), scheint diese Erklärung unwahrscheinlich, wie weiter unten noch näher erläutert wird.

2 Transfer von LPS-Monomeren an CD14 durch die Mutanten

Bei den bisherigen Versuchen mit fixiertem LPS und Lipid A wurde die Bindung von LBP an Lipopolysaccharid-Aggregate untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen nichtmutiertem und mutiertem LBP festgestellt, was unter anderem dadurch erklärt werden kann, daß die Lipid-Binde-Taschen vielleicht keine Rolle spielen für die Bindung an LPS in Aggregatform. Denn amphiphile Moleküle wie LPS finden in der Zusammenlagerung eine Möglichkeit, ihren hydrophoben Teil vor der wäßrigen Lösung zu verbergen. Bei der Hauptfunktion von LBP aber, der Monomerisierung von LPS und dem Transfer der Monomere an CD14, ist anzunehmen, daß LBP die apolaren LPS-Anteile vor dem wäßrigen Medium abschirmen sollte. Um die Frage zu beantworten, ob dabei die Lipid-Binde-Taschen eine Rolle spielen, wurde der Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS durch die LPB-Mutanten an CD14 über die Zeit beobachtet. Dabei sind keine Unterschiede zwischen den LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP auszumachen. Auch hier wäre eine denkbare Möglichkeit, daß die Fettsäureketten des Endotoxins an andere apolare

Bereiche des LBP-Moleküls binden und die mutierten Lipid-Binde-Taschen irrelevant für die Bindung sind. Die zweite mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluß der mutierten Stellen auf den LPS-Transfer wurde bereits erwähnt und besagt, daß LPS zwar an die Lipid-Binde-Taschen binden könnte, aber die mutierten Aminosäuren in dieser Region einen zu geringen Anteil an der Bindung hätten um Unterschiede in funktionellen Tests hervorzurufen. Diese Erklärung erscheint jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: Beim Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP), das große Ähnlichkeit mit LBP aufweist, wurden drei Aminosäuren mutiert, die genau drei der beim LBP mutierten Aminosäuren entsprechen. Durch die Mutationen im PLTP-Molekül konnte gezeigt werden, daß diese Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen beim Transfer von Phosphatidylcholin durch PLTP. Außerdem konnte ein Einfluß der Mutationen auf die Bindung des PLTP an HDL nachgewiesen werden (Huuskonen et al., 1999):

Lipid-Binde-Tasche	Mutation im LBP	Mutation im PLTP	Inhibition des Phosphatidylcholin-Transfers durch die PLTP-Mutation	Änderung der Bindung an HDL durch die PLTP-Mutation
N-terminal	L188W	L196W	~ 75 %	Keine Änderung
C-terminal	L278W	L286W	>90 %	Leicht gesteigert
N-terminal	Y457F	F464E	~85 %	~ 80 % vermindert

Phospholipide und der Lipid A-Teil des LPS weisen gewisse strukturelle Ähnlichkeiten auf: Beide besitzen erstens mehrere parallel ausgerichtete Fettsäureketten: Phospholipide zwei und Lipopolysaccharid sechs. Zweitens verfügen beide Moleküle über eine negativ geladene Kopfgruppe, die beim Phospholipid durch eine und beim Lipopolysaccharid durch zwei Phosphatgruppen gestaltet ist. Die Abbildung 20 zeigt die Struktur des Lipid A-Teils von LPS im Vergleich zu der Struktur des Phosphatidylcholins.

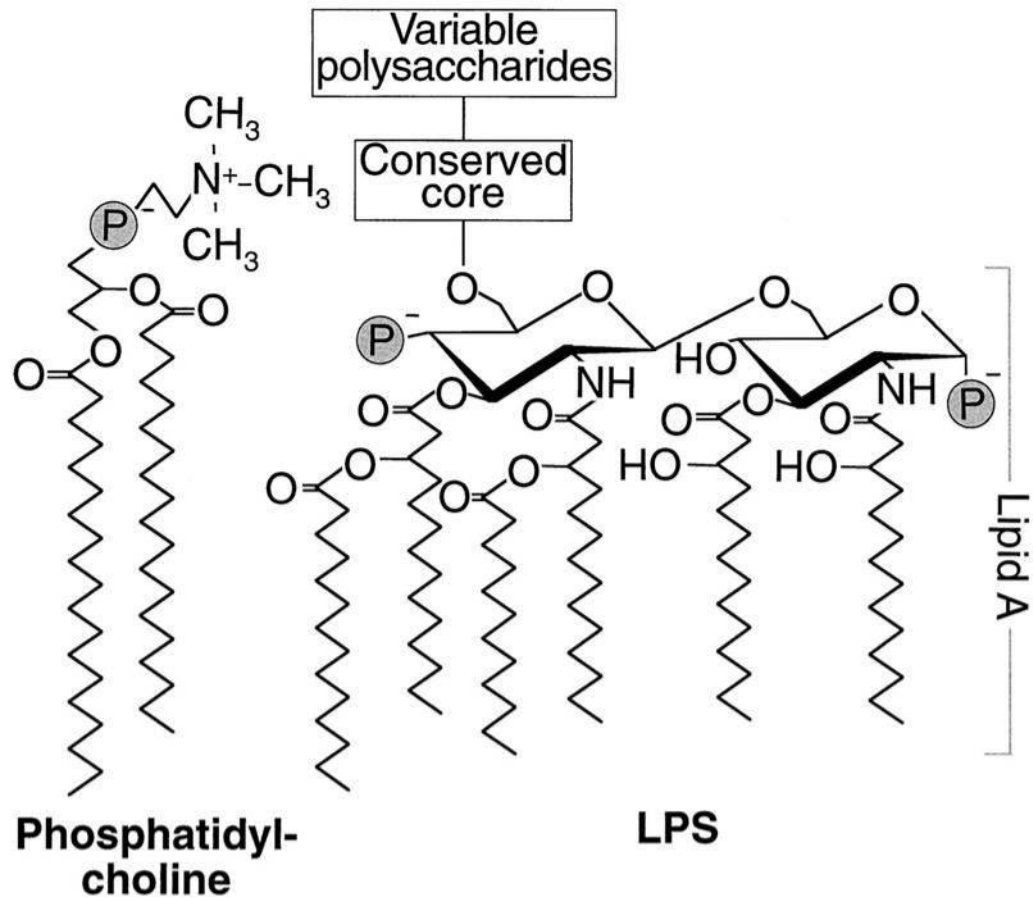


Abbildung 20: Strukturen von Phosphatidylcholin und LPS im Vergleich

Die Darstellung zeigt vereinfacht die chemische Struktur von Phosphatidylcholin und Lipopolysaccharid (LPS). Fettsäureketten und negativ geladene Phosphatgruppen fallen als strukturelle Ähnlichkeiten auf. Die Abbildung wurde entnommen aus Beamer et al., 1999.

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten und weil LBP und PLTP beide sowohl LPS als auch Phospholipide binden können, entstand die Hypothese, daß auch LPS in den Lipid-Binde-Taschen der beiden Proteine binden könnte. Wenn diese Hypothese stimmen sollte, wäre es unwahrscheinlich, daß die gleichen Mutationen, welche beim PLTP den Phospholipid-Transfer stark beeinträchtigen, den LPS-Transfer beim LBP hingegen unbeeinflusst lassen. So läßt sich vermuten, daß die Fettsäureketten von LPS an anderer Stelle des LBP-Moleküls gebunden werden als an den hier untersuchten Lipid-Binde-Taschen.

3 Bindung der LBP-Mutanten an Phospholipide

In Anbetracht der in den vorherigen Kapiteln angestellten Betrachtungen besteht der dringende Verdacht, daß LBP in seinen postulierten Lipid-Binde-Taschen Phospholipide bindet. Denn erstens sind Phospholipide ein bekannter Bindungspartner von LBP (Schromm et al., 1996; Yu et al., 1997), zweitens wurden Phospholipide in den Lipid-Binde-Taschen des kristallographierten BPI-Moleküls gefunden (Beamer et al., 1997) und es besteht eine ausgeprägte Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit innerhalb dieser Proteinfamilie (Beamer et al., 1998) und drittens haben Mutationen an analogen Positionen des PLTP-Moleküls eine deutliche Blockierung des Phospholipid-Transfers verursacht (Huuskonen et al., 1999).

Um diese These zu überprüfen wurden die beiden folgenden Experimente angewendet: Zum einen ein ELISA, bei welchem Phospholipide auf dem Boden einer Mikrotiterplatte fixiert wurden und anschließend gebundenes LBP mit Hilfe eines Antikörpers und einer Farbreaktion gemessen wurde. Der Versuch sollte die Bindungsfähigkeit der LBP-Mutanten an Phospholipid-Polymere zeigen. Zum anderen wurde durch fluoreszenzkinetische Tests der Transfer von fluoreszenzmarkierten LPS-Monomeren an Phospholipid-Membranen untersucht. Dieser Vorgang geht mit einem Austausch des LPS-Moleküls durch ein Phospholipid-Molekül einher (Yu et al., 1997) und läßt daher einen Einfluß der durchgeführten Mutationen erwarten. Der Versuch wird im nächsten Kapitel beschrieben.

In den Vorversuchen (siehe Kapitel III.2.1) hatte sich gezeigt, daß LBP ähnlich stark an immobilisiertes Phosphatidyl-Inositol und –Ethanolamin bindet wie an fixiertes LPS. So war es sehr erstaunlich, daß die Experimente mit Phospholipiden und den LBP-Mutanten nicht funktionierten. Die ELISA mit käuflich erworbenem rLBP und fixierten Phospholipiden hatten gut funktioniert und auch diejenigen mit den LBP-Mutanten und fixiertem LPS. Sobald aber die LBP-Mutanten und Phospholipide für den ELISA benutzt wurden, kamen sinnlose Ergebnisse heraus. Durch zahlreiche Wiederholungen der Versuche und Überprüfung der Reaktionsbedingungen konnte ein zufälliger Fehler weitgehend ausgeschlossen werden. Ein direkter Vergleich auf einer mit Phospholipiden beschichteten Mikrotiterplatte machte deutlich, daß das

kommerzielle LBP, gelöst im für den ELISA verwendeten Inkubationspuffer, eine gute dosisabhängige Bindungsaffinität aufwies, während das von CHO-Zellen exprimierte Wildtyp-LBP, gelöst in Mock-Medium, praktisch nicht an das Phospholipid band. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Erstens könnte das Wildtyp-LBP fehlerhaft sein, was unwahrscheinlich erscheint, da die Versuche mit LPS und Wildtyp-LBP gut funktioniert hatten. Weiterhin wäre es möglich, daß das Mock-Medium entweder zweitens die Interaktion zwischen LBP und den Phospholipiden stört oder drittens die Bindung des Antikörpers zur Detektion von LBP blockiert. Auch zur weiteren Fehlersuche wurden daher Transferversuche mit Phospholipiden durchgeführt.

4 Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an Phospholipide durch die Mutanten

Wie bereits beschrieben, kann LBP einzelne LPS-Monomere nicht nur an CD14 transferieren, sondern auch an Phospholipid-Membranen. Dieser Vorgang läßt sich messen in einem Versuchsaufbau mit fluoreszenzmarkiertem LPS, LBP und hochdosierten Phospholipiden (Wurfel und Wright, 1997). Eine Zunahme der Fluoreszenz zeigt eine erfolgreiche Monomerisierung der BODIPY-LPS-Aggregate. Im Vorversuch mit käuflich erworbenem LBP, das in PBS gelöst war, zeigte sich ein deutlicher LPS-Transfer durch LBP (siehe Abbildung 16). Dabei war der Fluoreszenzanstieg in der Meßreihe mit LPS, LBP und Phosphatidyl-Ethanolamin mehr als 3,5 mal so groß wie in der Meßreihe ohne Akzeptor. Daraufhin wurde der gleiche Versuch durchgeführt unter der Verwendung von Wildtyp-LBP, in Mock-Medium gelöst. Ähnlich wie im ELISA mit fixiertem Phospholipid funktionierte diesmal der Versuch auch nicht. So konnte eine der im vorigen Kapitel diskutierten Fehlerursachen ausgeschlossen werden: Die Beeinflussung der Bindung zwischen LBP und detektierendem Antikörper im ELISA durch das Mock-Medium. Denn in diesem fluoreszenzkinetischen Versuch wurde kein Antikörper gebraucht. Es blieben noch zwei Fehlerursachen übrig: Entweder das Wildtyp-LBP ist fehlerhaft und dieser Fehler zeigt sich nur in Experimenten mit Phospholipiden, nicht aber mit LPS. Oder

das Mock-Medium blockiert die Bindung von LBP an Phospholipide, nicht aber an LPS. Damit lag der Aufbau des nächsten Versuches auf der Hand: kommerzielles LBP und Wildtyp-LBP wurden sowohl in Mock-Medium als auch in PBS verdünnt und die Katalyse-Fähigkeit in Anwesenheit von Phospholipiden wurde gemessen. Das Ergebnis zeigt klar, daß der Fehler, der alle Experimente mit LBP und Phospholipiden blockiert, im Mock-Medium liegt und keinesfalls im LBP. In diesem Versuch war die Transferleistung durch Wildtyp-LBP sogar deutlich stärker als durch kommerzielles LBP, wenn PBS verwendet wurde.

So tauchte nun die nächste Frage auf, ob das serumfreie Kulturmedium der CHO-Zellen selbst (CHO-S-SFM-II) die Interaktion zwischen LBP und den Phospholipiden blockierte, oder ob der störende Faktor vielleicht erst von den CHO-Zellen in das Medium sezerniert wird. Daher wurde im nächsten Experiment LBP einmal in unterschiedlichen Mock-Lösungen verdünnt, die zu verschiedenen Zeitpunkten aus verschiedenen Zellkulturflaschen entnommen und eingefroren worden waren, und zum anderen in CHO-S-SFM-II und in PBS. Damit wurde derselbe Versuch mit BODIPY-LPS und Phosphatidyl-Ethanolamin wiederholt. Der Vergleich bestätigt noch einmal, daß der LPS-Transfer bei Verwendung von PBS durchaus funktioniert, nicht aber mit Mock-Medium. Zusätzlich wird deutlich, daß das Zellkulturmedium CHO-S-SFM-II am stärksten den Transfer blockiert und somit der störende Faktor nicht von den CHO-Zellen produziert wird sondern im CHO-S-SFM-II-Medium bereits enthalten ist.

Bei dem Zellkulturmedium CHO-S-SFM-II-Medium (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) handelt es sich um ein speziell für die Proteinexpression in CHO-Zellen entwickeltes Nährmedium. Es bietet den Vorteil, daß kein Serum zugegeben muß (SFM= serum-free medium), denn bei der normalen Zellkultur wird 5 % fetales Kälberserum zugegeben, um die Zellen mit notwendigen Proteinen zu versorgen. Für die Proteinexpression stört das Serum, denn es enthält wahrscheinlich auch bovines LBP und noch zahlreiche andere Serumproteine, wenn auch in geringer Konzentration. Diese Faktoren können die Ergebnisse von funktionellen Tests mit dem zu untersuchenden rekombinanten Protein möglicherweise verfälschen. Darum wird bei der Proteinexpression gerne auf Serum verzichtet.

Trotzdem befinden sich im Kulturmedium natürlich zahlreiche Nährstoffe für die Zellen, die man als potentielle Verursacher von Artefakten bei Experimenten im Hinterkopf behalten muß. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß die CHO-Zellen neben dem rekombinanten Protein noch andere physiologische Proteine produzieren und sezernieren. Auch muß man bedenken, daß abgestorbene Zellen ihren Inhalt in das Kulturmedium entleeren. Die Erfahrung zeigt aber, daß das rekombinante Protein, das durch die Ablesung der transfizierten Plasmid-DNA synthetisiert und sezerniert wird, den mit Abstand größten Anteil ausmacht und andere Proteine meist zu vernachlässigen sind. Dies wird auch durch die Auswahl von hochproduktiven Zellklonen nach der Transfektion bewirkt. Aber dennoch muß man versuchen, hypothetischen Nebeneffekten durch Substanzen im Zellmedium entgegenzuwirken. Dazu gehört, daß die LBP-Mutanten, die in unterschiedlichen Konzentrationen im Kulturmedium gelöst sind, bei der Verdünnung auf gleiche Konzentrationen auch im gleichen Medium schwimmen. Dies geht nur, wenn man die LBP-Mutanten und den LBP-Wildtyp im Mock-Medium verdünnt. Denn Mock-Medium war genauso lang mit den CHO-Zellen in Kontakt, wie das Medium auf den LBP-produzierenden CHO-Zellen und müßte somit die gleiche Konzentration an Nebenprodukten enthalten wie dieses. Durch die Verdünnung mit Mock-Medium befinden sich im Endeffekt alle Mutanten und der Wildtyp in gleicher Konzentration im gleichen Lösungsmittel und theoretisch denkbare Nebeneffekte durch Zusatzstoffe im Medium sind für alle Mutanten und den Wildtyp gleich. Der einzige Unterschied zwischen den jeweiligen Mutanten und dem Wildtyp liegt dann in der ausgetauschten Aminosäure, die untersucht werden soll.

Da das Zellkulturmedium nun leider die Bindung zwischen Phospholipiden und LBP störte, wurde der Versuch unternommen, die LBP-Mutanten aus dem Medium herauszuholen.

5 Aufreinigung der LBP-Mutanten

Wie bereits beschrieben, sollte durch Ionen-Austausch-Chromatographie eine Trennung von LBP und Kulturmedium erfolgen. Dabei trat das Problem auf, daß sich

LBP, wenn es einmal an die Sepharose gebunden hatte, kaum aus der Matrix wieder lösen wollte. Änderungen der Reaktionsbedingungen durch Verlängerung der Einwirkzeit und Erhöhung des Salzgehaltes des Elutionspuffers brachten keine Verbesserung. Dazu kam noch die Schwierigkeit, daß sich die Mutanten L188 und Y457 nur mit Q-Sepharose, die übrigen nur mit SP-Sepharose aufreinigen ließen. Probeweise durchgeführte LPS-Transfer-Versuche ergaben, daß das aufgereinigte Wildtyp-LBP fast kein LPS mehr transferieren konnte und die beiden in Q-Sepharose gereinigten LBP-Mutanten einen viel stärkeren Transfer leisteten als die drei LBP-Mutanten, die mit SP-Sepharose Kontakt gehabt hatten. In der Zusammenschau dieser Befunde und im Vergleich mit dem Verhalten der nicht aufgereinigten LBP-Mutanten in Transferversuchen kann man davon ausgehen, daß es sich bei den beobachteten Auffälligkeiten um Artefakte der Proteinaufreinigung handelt. Somit kamen die aufgereinigten LBP-Mutanten für die Verwendung in funktionellen Tests nicht in Betracht.

Der nächste Schritt wäre gewesen, die mit LBP-DNA transfizierten CHO-Zellen in einem Medium, das die Versuche nicht blockiert, zu kultivieren. Während der Herstellung stabiler Zellklone zu Beginn der Arbeit waren von jedem Klon Zellen eingefroren worden, praktisch als Sicherungskopie. Diese hätte man auftauen und neu in Kultur bringen können. Leider war es einmal dazu gekommen, daß eine Zeit lang nicht genügend flüssiger Stickstoff im Kühlbehälter gewesen war und die Zellen daher aufgetaut und tot waren. Um nun weiterzuarbeiten und die Frage zu klären, ob sich die durchgeführten Mutationen im Bereich der postulierten Lipid-Bindetaschen des LBP auf dessen Bindungsaffinität zu Phospholipiden auswirken, hätte jetzt noch einmal die Plasmid-DNA überprüft und vermehrt werden und dann wieder eine Transfektion und Selektion von CHO-Zellen erfolgen müssen. Dies würde einem beinahe kompletten Neubeginn der Dissertation entsprechen. Davon habe ich abgesehen.

6 **Schlußfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die durchgeführten Mutationen im Bereich der hypothetischen Lipid-Binde-Taschen des Lipopolysaccharid-Binde-Proteins weder die Bindung an LPS-Aggregate noch den Transfer von LPS-Monomeren an CD14 beeinflussen. Als wahrscheinlichste Erklärung dafür läßt sich vermuten, daß bei der Bindung von LPS an LBP die apolaren Fettsäureketten des LPS an anderen Stellen als den mutierten binden, was sich als Gegenstand weiterer Untersuchungen anbietet.

Neben LPS stellen Phospholipide einen wichtigen Bindungspartner von LBP dar. Daher sollte untersucht werden, ob Phospholipide in den postulierten Lipid-Binde-Taschen des LBP binden. Die Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht beantwortet werden, da das verwendete Zellkulturmedium CHO-S-SFM-II, in dem die LBP-Mutanten gelöst waren, die Versuche mit LBP und Phospholipiden blockierte und die Trennung von LBP und Kulturmedium mißlang. Für eine Wiederholung der ergebnislosen Versuch wäre es ratsam, vorher in funktionellen Experimenten zu überprüfen, ob es Kulturmedien für die Proteinexpression in CHO-Zellen gibt, die keine nachteiligen Wirkungen auf die Bindung zwischen LBP und Phospholipiden haben, und ein solches zu verwenden. Als Alternative bieten sich andere Möglichkeiten der Proteinaufreinigung an, um LBP und Puffer zu trennen.

Interessant wäre auch eine Untersuchung der Bindungsaffinität der PLTP-Mutanten (Huskonen et al., 1999) an LPS. Vielleicht würde sich dabei herausstellen, daß die Lipid-Binde-Taschen der Lipid-Transfer-Proteine für die Bindung von Phospholipiden zuständig sind, was auch durch die zufällige Entdeckung von zwei Phosphatidylcholin-Molekülen in den Taschen bei der Kristallisation von BPI (Beamer et al., 1997) unterstützt würde, während Lipid A an anderer Stelle bindet. Ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen der LPS-Erkennung ist nicht nur auf Grund des schweren Krankheitsbildes der Sepsis von großer Bedeutung, sondern betrifft grundsätzliche Vorgänge der Interaktion zwischen Wirt und Infektionserreger und bildet die Basis für die Entwicklung effizienter Medikamente.