

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Rolle der Aminosäuren
L188, Y272, Y277, L278 und Y457
auf den Phospholipid- und Lipopolysaccharidtransfer
des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP)
durch Mutagenese**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Johannes Christoph Amberger
geboren am 25.12.1975 in Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. R. Schumann
2. Prof. Dr. R. Jack
3. Prof. Dr. W. A. Buurman

Datum der Promotion: 23.06.2006

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	6
1	Problemfall Sepsis	6
2	Angeborene Immunität	7
3	Struktur des LPS	8
3.1	O-Antigen.....	9
3.2	Kern-Polysaccharid	10
3.3	Lipid A	10
4	Erkennung von LPS	11
5	Biologische Wirkungen von LPS	12
5.1	Lokale Entzündungsreaktion.....	12
5.2	Systemische Reaktion - Sepsis.....	14
6	CD14.....	15
7	Funktionen von LBP.....	17
7.1	LPS-Transfer zum CD14.....	17
7.2	LPS-Transfer in Phospholipid-Membrane und HDL.....	19
7.3	Phospholipid-Transfer.....	20
8	Struktur des LBP.....	20
9	Aufgabenstellung	24
II	MATERIAL UND METHODEN.....	26
1	Herstellung der LBP – Mutanten	26
1.1	Mutante 188 (L=>W)	27
1.2	Mutante 272 (Y=>F)	28
1.3	Mutante 277 (Y=>F)	28
1.4	Mutante 278 (L=>W)	29
1.5	Mutante 457 (Y=>F)	30
2	Transfektion von CHO-K1-Zellen mit LBP-Mutanten, Wildtyp-LBP und unkloniertem Vektor	30
3	Herstellung stabiler Klone der transfizierten CHO-K1-Zellen.....	31
4	Messung der LBP-Konzentration im Zellkulturüberstand durch ELISA	32

5	Transfer von BODIPY-LPS an CD14 und Phosphatidyl-Ethanolamin durch LBP	32
6	LPS- und Phospholipid-Bindungs-Versuche	34
7	Aufreinigung der LBP-Mutanten durch Ionen-Austausch-Chromatographie .	35
8	Software für die Auswertung	36
III	ERGEBNISSE	37
1	Entwurf der Mutanten	37
	Funktionelle Tests mit den LBP – Mutanten	40
2.1	Vorversuche – Bindung von LBP an LPS, Lipid A und Phospholipide ...	40
2.2	Bindung der LBP-Mutanten an LPS Re 595	42
2.3	Bindung der Mutanten an LPS O111:B4	44
2.4	Bindung der Mutanten an Lipid A	45
2.5	Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an sCD14 durch die Mutanten	46
2.6	Bindung der LBP-Mutanten an Phospholipide	49
2.7	Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an Phospholipide durch die Mutanten	53
2.8	Aufreinigung der LBP-Mutanten	58
IV	DISKUSSION.....	59
1	Bindung der LBP-Mutanten an LPS und Lipid A	59
2	Transfer von LPS-Monomeren an CD14 durch die Mutanten	61
3	Bindung der LBP-Mutanten an Phospholipide.....	64
4	Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an Phospholipide durch die Mutanten	65
5	Aufreinigung der LBP-Mutanten.....	67
6	Schlußfolgerung und Ausblick	69
V	LITERATURVERZEICHNIS	70
VI	ANHANG	86
1	Zusammenfassung	86
2	Erklärung an Eides Statt	88
3	Danksagung	89
4	Lebenslauf.....	90

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

BODIPY	Boron Dipyrromethen Difluorid
BPI	bactericidal/permeability increasing protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD14	cluster of differentiation 14
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CRP	C-Reaktives Protein
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
HDL	high density lipoprotein
IL	Interleukin
kD	kilo Dalton
LBP	Lipopolysaccharid-Binde-Protein
LPS	Lipopolysaccharid (=Endotoxin)
mCD14	membranständiges CD14
NF- κ B	nuclear factor- κ B (Transkriptionsfaktor)
PC	Phosphatidyl-Cholin
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PI	Phosphatidyl-Inositol
PS	Phosphatidyl-Serin
PBS	phosphate buffered saline
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
sCD14	lösliches CD14 (<i>engl.: soluble</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	toll like receptor
Wt-LBP	Wildtyp-LBP (rekombinantes, in CHO-Zellen exprimiertes, nicht mutiertes LBP)