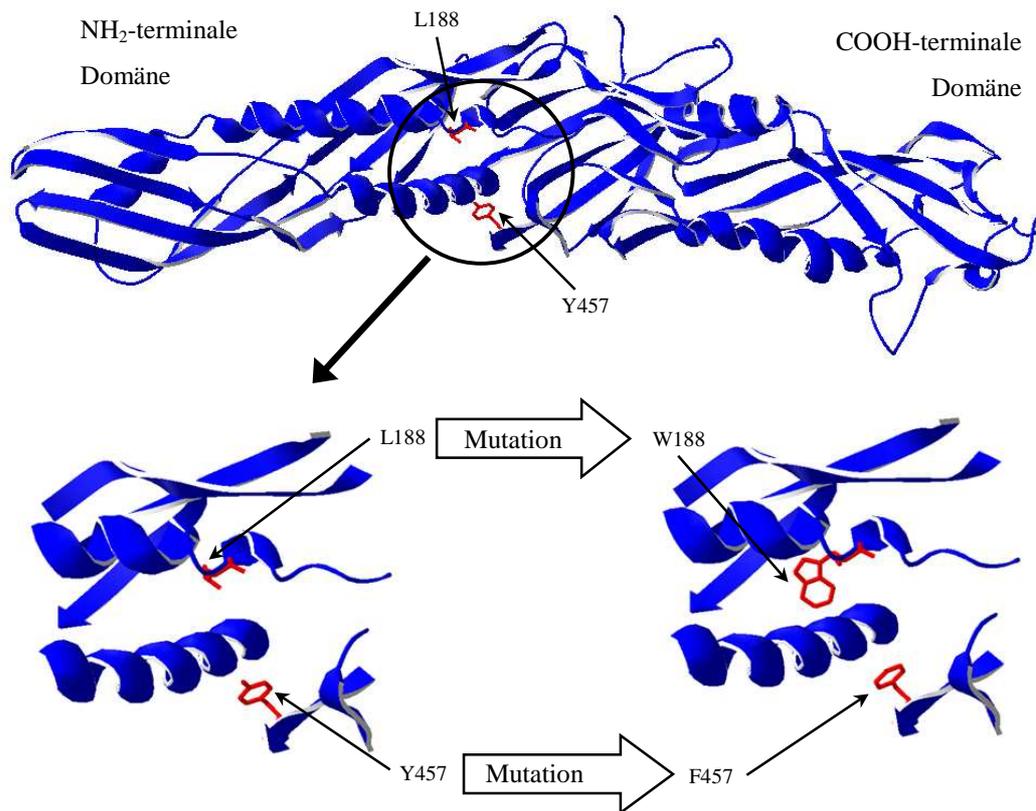


### III ERGEBNISSE

#### 1 Entwurf der Mutanten

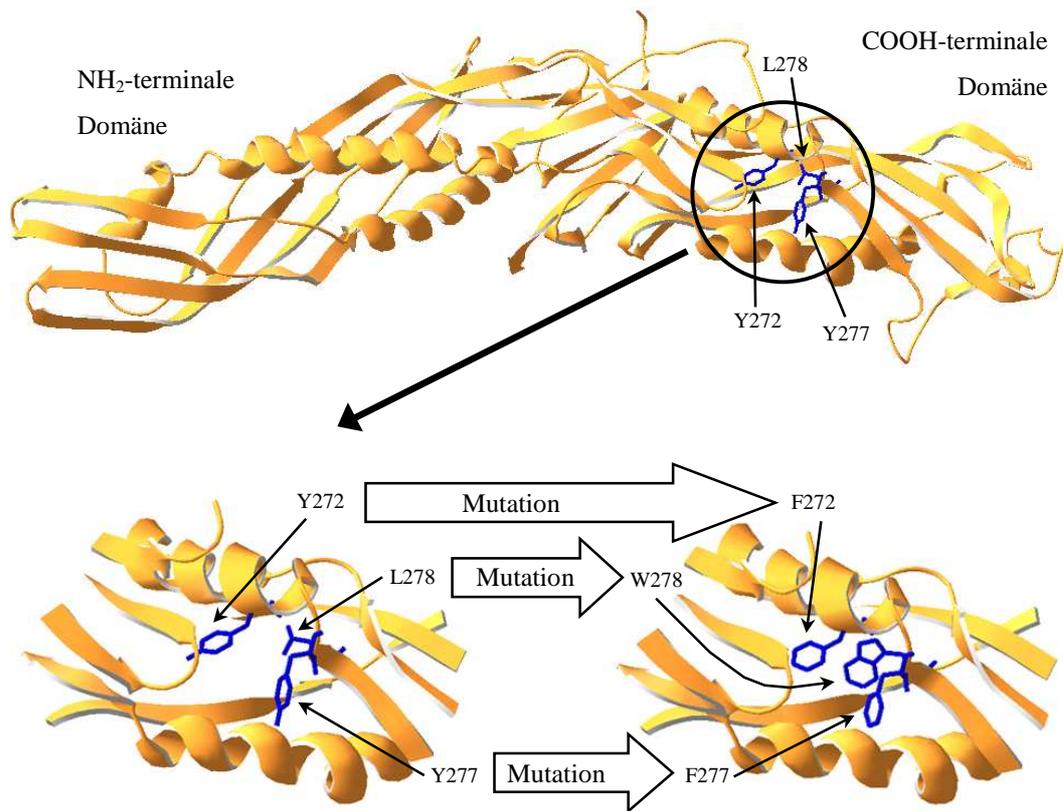
Auf der Abbildung 3 ist die Sekundär- und Tertiärstruktur des LBP-Moleküls vereinfacht dargestellt. Die Positionen der Mutationen sind durch Kugeln symbolisiert und liegen an den Eingängen der beiden postulierten Lipid-Binde-Taschen, welche sich an den Innenseiten der beiden Schenkel des Bumerangs befinden. Drei Mutationen sind an der c-terminal gelegenen Tasche lokalisiert, zwei weitere an der n-terminalen. Ziel der Mutationen ist die Erschwerung der vermuteten Bindung von LPS an die Lipid-Binde-Taschen von LBP. Daher wurden Vorschläge von Herrn Dr. Rolf Thieringer (Merck, Rahway, NJ, USA) übernommen, der zusammen mit Dr. Brian McKeever im dreidimensionalen Computermodell von LBP Aminosäurereste ausfindig machte, deren Mutation die Lipid-Bindungs-Taschen beeinträchtigen könnte. So wurde bei drei Mutanten an den Positionen 272, 277 und 457 jeweils ein polarer, hydrophiler Tyrosinrest in einen apolaren, hydrophoben Phenylalaninrest umgewandelt, da vermutet wurde, daß das Tyrosin eventuell eine Wasserstoffbrückenbindung mit Phosphatresten des Lipid A eingehen könnte. Bei zwei weiteren Mutanten wurde an den Positionen 188 und 278 ein apolarer Leucinrest gegen einen apolaren Tryptophanrest vertauscht, um durch die längere Seitenkette des Tryptophans den Eingang der Lipid-Bindungs-Taschen räumlich zu verbauen.

Abbildung 4 zeigt in der Übersicht und zusätzlich in einer Vergrößerung die Mutationen im Bereich der n-terminalen Tasche, Abbildung 5 verdeutlicht dies für die c-terminale.



**Abbildung 4: LBP-Modell mit den Positionen der Mutationen an der N-terminalen Lipid-Binde-Tasche**

An der N-terminalen Lipid-Binde-Tasche wurden zwei Aminosäuren verändert: Leucin (L) an der Position 188 wurde gegen Tryptophan (W) vertauscht. Anstelle von Tyrosin (Y) bei 457 wurde Phenylalanin (F) eingebaut.



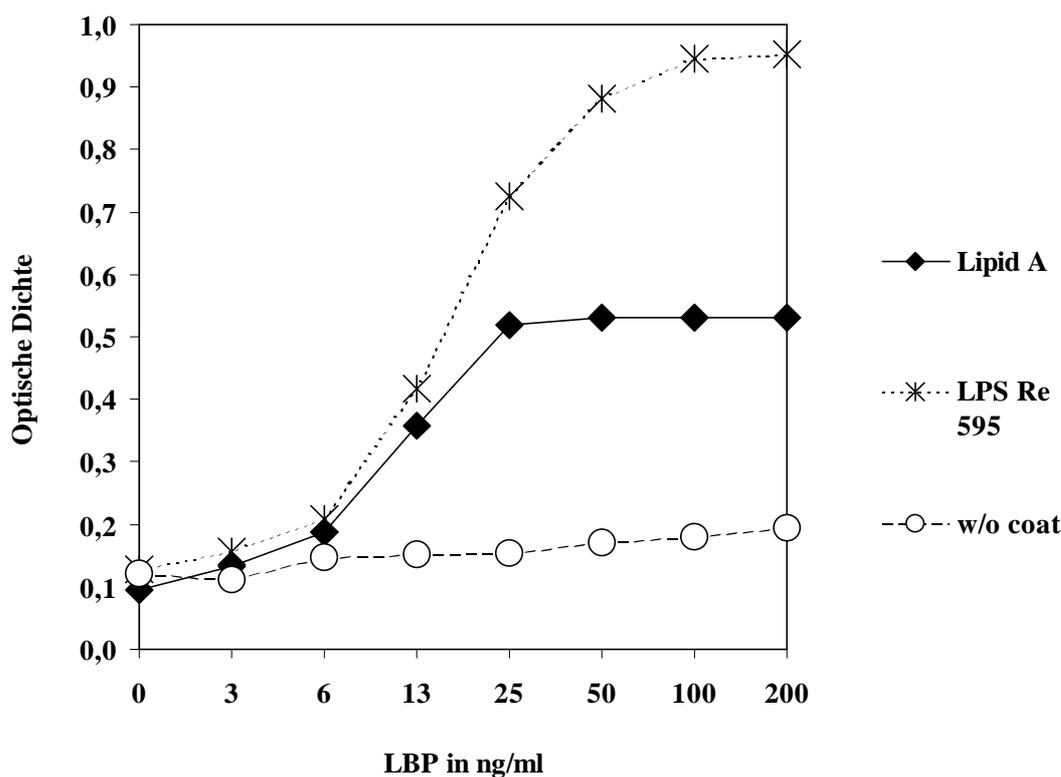
**Abbildung 5: LBP-Modell mit den Positionen der Mutationen an der C-terminalen Lipid-Binde-Tasche**

Im Bereich der C-terminalen Tasche wurden drei Aminosäuren mutiert: Zwei Tyrosinreste (Y) an den Positionen 272 und 277 wurden umgeändert in Phenylalaninreste (F). Ein Leucinrest (L) bei 278 wurde ausgetauscht gegen Tryptophan (W).

## 2 Funktionelle Tests mit den LBP – Mutanten

### 2.1 Vorversuche – Bindung von LBP an LPS, Lipid A und Phospholipide

Die Bindungsfähigkeit von LBP an LPS, Lipid A und Phospholipide kann durch einen ELISA gemessen werden, bei welchem die Bindungspartner von LBP auf einer Mikrotiterplatte fixiert werden. Wenn man LBP in verschiedenen Konzentrationen dazugibt und durch einen Antikörper mit anschließender Farbreaktion das gebundene LBP detektiert, zeigt sich eine dosisabhängige Bindung, wobei die gemessene optische Dichte ein Maß für die Menge des gebundenen LBP darstellt. Für jeden Messpunkt im Diagramm wurden je eine Messung in zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte durchgeführt und der Durchschnittswert gebildet.

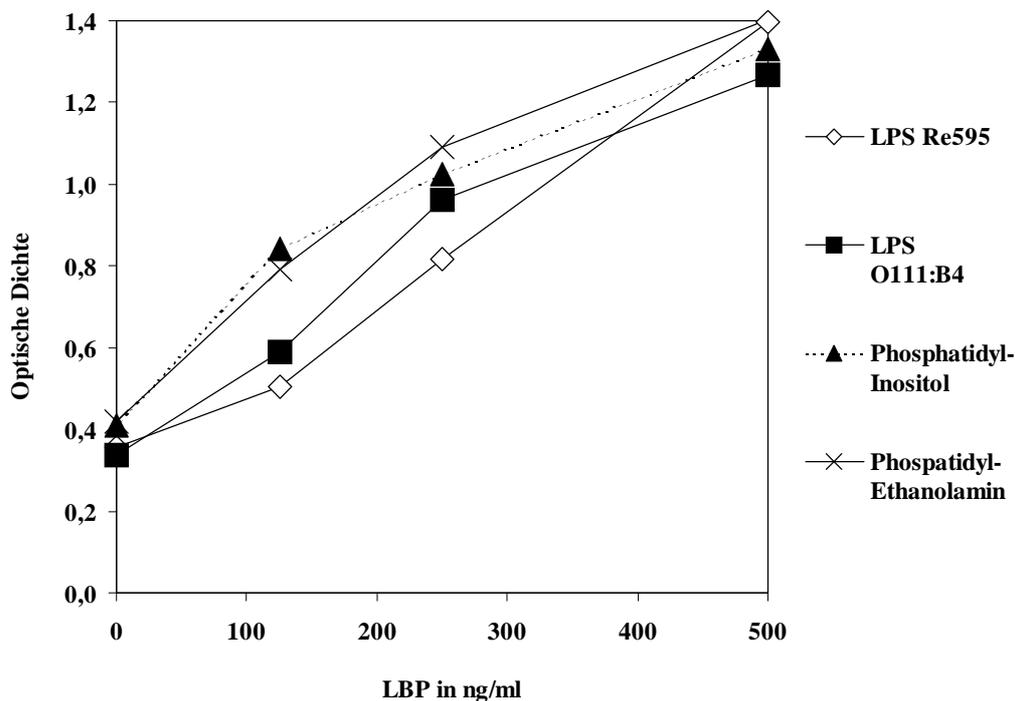


**Abbildung 6: Bindung von LBP an immobilisiertes LPS und Lipid A**

Unterschiedliche Konzentrationen von LBP wurden auf eine Mikrotiterplatte, die mit LPS bzw. Lipid A beschichtet war, inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Eine Meßreihe wurde nicht beschichtet (w/o coat).

In Abbildung 6 sieht man, wie LBP an LPS Re 595 von *Salmonella minnesota* und an den Lipid A – Teil von LPS bindet, wobei die Bindung an Lipid A hier schwächer erscheint als die Bindung an das komplette LPS-Molekül. Zusätzlich wurde – praktisch als Negativkontrolle - in einer Meßreihe auf eine Beschichtung verzichtet. Hier zeigt sich nur ein ganz geringer Anstieg der Meßwerte mit zunehmender LBP-Dosis als Ausdruck einer schwachen unspezifischen Bindung. Dabei bindet vermutlich ein kleiner Teil des LBP an Albumin, mit dem freie Bindungsstellen nach der Beschichtung blockiert wurden, oder an noch vakante Bindungsmöglichkeiten des Plastiks der Mikrotiterplatte.

Einen Vergleich der Bindung von LBP an je zwei verschiedene Arten von LPS und von Phospholipiden zeigt Abbildung 7. Dazu wurde LPS von *Salmonella minnesota* Re595, LPS von *Escherichia coli* O111:B4, Phosphatidyl-Inositol und Phosphatidyl-Ethanolamin verwendet. Phospholipide und LPS sind durch ihre Fettsäureketten und negativ geladene Phosphat-Gruppen chemisch einander ähnlich und so lassen sich auch Phospholipide auf Mikrotiterplatten fixieren. In Abbildung 7 zeigen sich keine großen Unterschiede in den Bindungsaffinitäten von LBP zu LPS versus Phospholipiden.



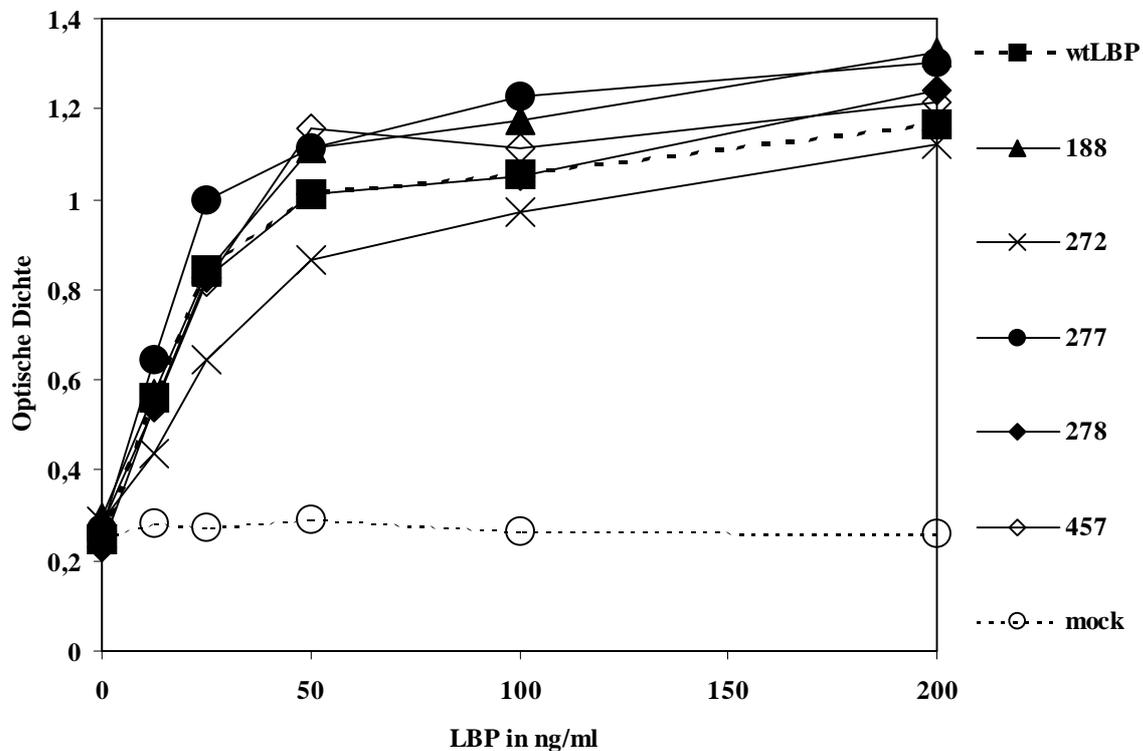
**Abbildung 7: Bindung von LBP an immobilisiertes LPS und an Phospholipide**

Unterschiedliche Konzentrationen von LBP wurden auf eine Mikrotiterplatte, die mit LPS bzw. Phospholipiden beschichtet war, inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt.

## 2.2 Bindung der LBP-Mutanten an LPS Re 595

Um zu untersuchen, ob auch die LBP-Mutanten in der Lage sind, an LPS zu binden, wurde LPS von *Salmonella minnesota* Re595 auf Mikrotiterplatten fixiert und mit LBP-Mutanten in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle diente das nicht veränderte Wildtyp-LBP (wtLBP), als Negativkontrolle Kulturmedium von CHO-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor ohne das LBP-Gen transfiziert worden waren – hier als „mock“ bezeichnet von englisch *mock* = Attrappe, Fälschung. Gebundenes LBP wurde mit Hilfe polyklonaler biotinylierter Antikörper und anschließender Farbreaktion detektiert. Als Maß der Bindung von LBP an LPS dient die optische Dichte. Jeder Messpunkt im Diagramm entspricht dem Durchschnittswert von je einer Messung in zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für vier unabhängige Versuche.

In der Abbildung 8 sieht man, daß die LBP-Mutanten dosisabhängig an das fixierte LPS binden, wobei sich mit steigender LBP-Dosis eine Sättigungscharakteristik zeigt. Die optische Dichte bei der Negativkontrolle ändert sich nicht. Zwischen LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP zeigen sich keine Unterschiede.

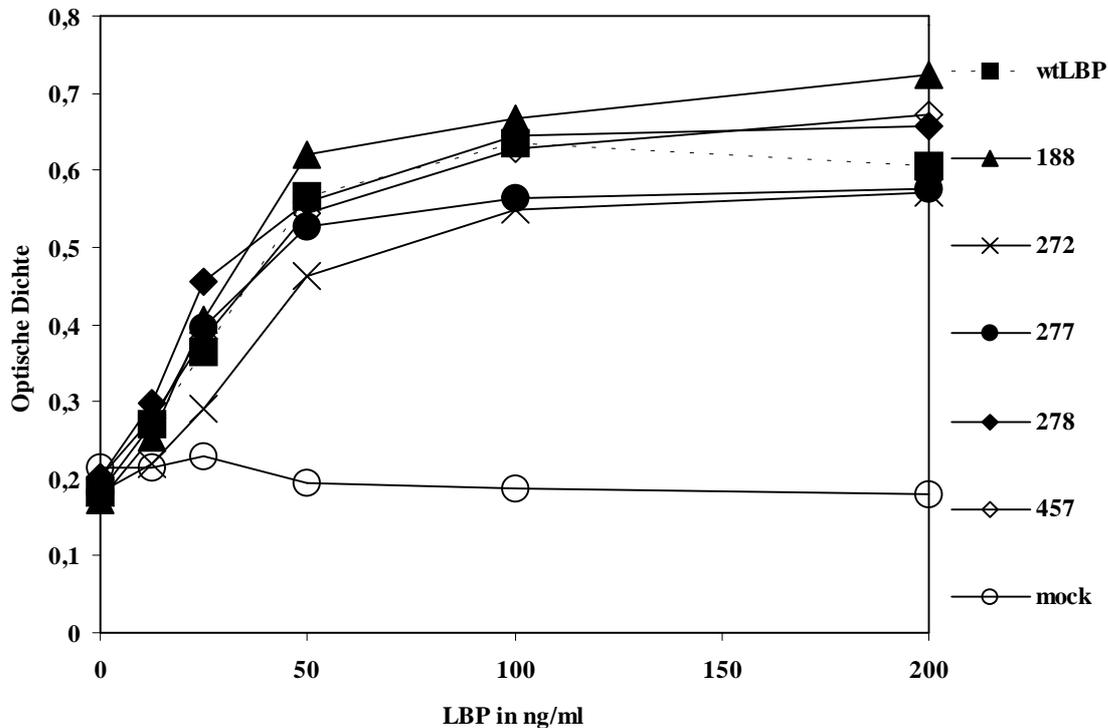


**Abbildung 8: Bindung der LBP-Mutanten an immobilisiertes LPS Re595**

Unterschiedliche Konzentrationen der LBP-Mutanten wurden auf LPS-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“).

### 2.3 Bindung der Mutanten an LPS O111:B4

Der eben beschriebene Versuch wurde hier noch einmal mit dem LPS von *Escherichia coli* O111:B4 wiederholt. Auch hier in Abbildung 9 zeigen sich keine Unterschiede zwischen den LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP in der Bindung an LPS.

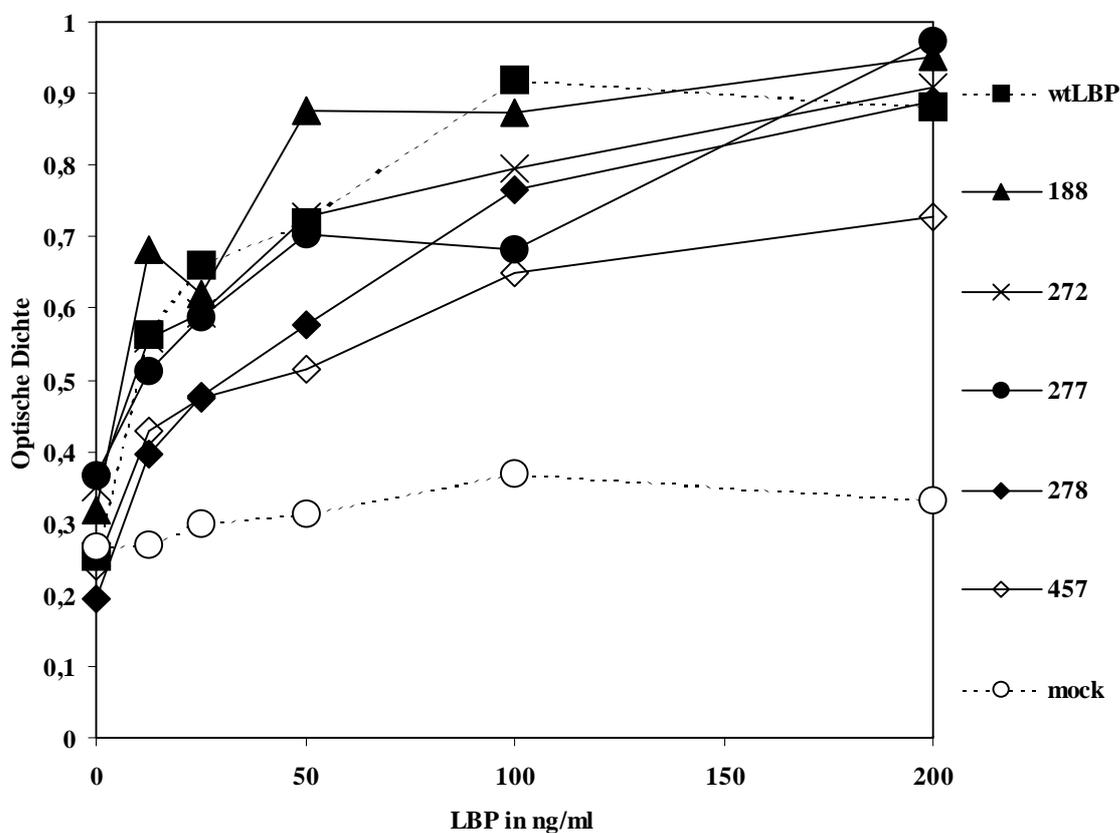


**Abbildung 9: Bindung der LBP-Mutanten an immobilisiertes LPS O111:B4**

Unterschiedliche Konzentrationen der LBP-Mutanten wurden auf LPS-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“).

## 2.4 Bindung der Mutanten an Lipid A

Da die ausgetauschten Aminosäuren der LBP-Mutanten an den apolaren, lipophilen Bindungstaschen des LBP-Moleküls liegen, ist der Lipidanteil des LPS von besonderem Interesse für die Bindung zwischen LPS und den LBP-Mutanten. Im folgenden Versuch, der genauso durchgeführt wurde wie die beiden vorherigen, wurde anstelle des kompletten LPS-Moleküls nur der Lipidteil von LPS - das Lipid A - verwendet. Die Abbildung 10 zeigt einen von drei durchgeführten Versuchen. Das hier erkennbare etwas schwächere Signal der Mutante 457 konnte in den anderen Versuchen nicht reproduziert werden. Ansonsten sind auch hier keine Unterschiede zwischen LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP in der Bindung an Lipid A zu erkennen.



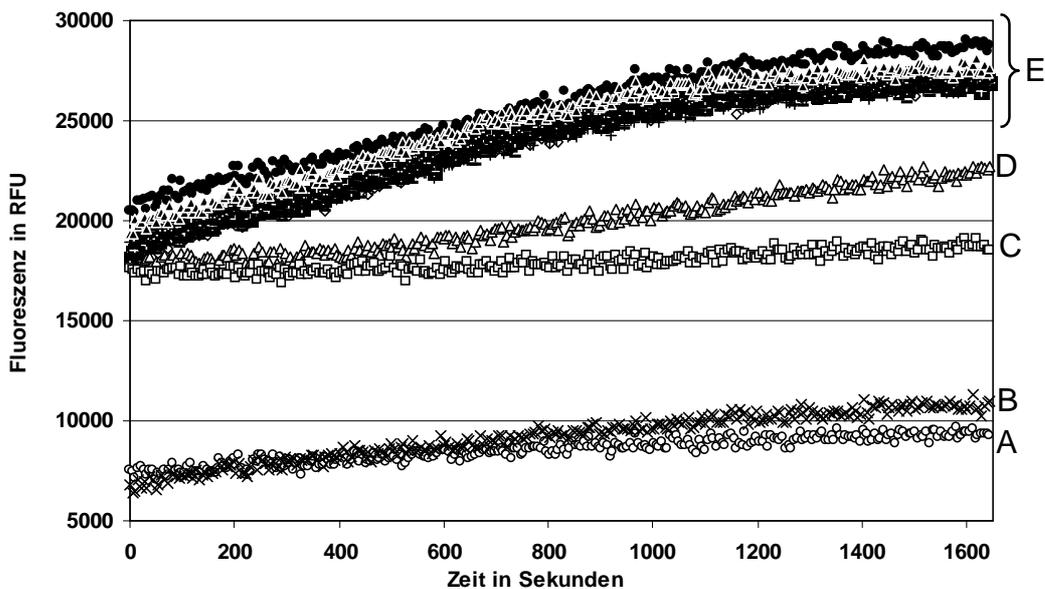
**Abbildung 10: Bindung der LBP-Mutanten an immobilisiertes Lipid A**

Unterschiedliche Konzentrationen der LBP-Mutanten wurden auf LPS-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“).

## 2.5 Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an sCD14 durch die Mutanten

In den vorherigen Versuchen wurde die Bindung der LBP-Mutanten an LPS-Polymere untersucht. Eine wichtige Aufgabe von LBP ist hingegen die Monomerisierung von LPS-Mizellen und der Transfer der LPS-Monomere an CD14. Dies ist ein entscheidender Schritt zur Aktivierung immunkompetenter Zellen beim Befall des Organismus durch gram-negative Bakterien. Daraus ergibt sich die Frage, ob die LBP-Mutanten die LPS-Monomerisierung in gleicher Weise erfüllen können wie Wildtyp-LBP. Im folgenden Versuch wurde LPS, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff „BODIPY“ markiert wurde, mit sCD14 als Akzeptor und mit den LBP-Mutanten inkubiert. Die BODIPY-LPS-Moleküle lagern sich in der wäßrigen Lösung zu Mizellen zusammen und senden bei Anregung nur wenig Licht aus, da durch die enge Zusammenlagerung die einzelnen Fluoreszenzen sich gegenseitig abdämpfen. Werden diese LPS-Aggregate aufgelöst durch den Transfer einzelner LPS-Moleküle zum CD14 durch LBP, steigt die Fluoreszenz an. Dieser Fluoreszenzanstieg ist ein Maß für die Katalyse-Leistung von LBP. Die Zunahme der Fluoreszenz stellt ein Maß dar für den Transfer von LPS an CD14 und wurde über einen Zeitraum von fast 30 Minuten gemessen.

Die Abbildung 11 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Versuchen. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz in „Relative Fluorescence Units“ (RFU), auf der Abszisse die Zeit in Sekunden aufgetragen. In der breiten, mit „E“ gekennzeichneten Kurve verlaufen 6 einzelne Kurven, welche dem Wildtyp-LBP und den 5 LBP-Mutanten, jeweils mit BODIPY-LPS und CD14, entsprechen. Man sieht, daß Wildtyp-LBP und die einzelnen LBP-Mutanten (E) die stärkste Fluoreszenzzunahme zeigen, die vier verschiedenen Negativkontrollen (A-D) dagegen steigen nur leicht an. Zwischen Wildtyp-LBP und den Mutanten sind keine Unterschiede erkennbar. Der Abstand zwischen den beiden unteren Kurven (A, B), die bei etwa 8000 RFU beginnen, und den restlichen darüberliegenden Kurven (C, D, E), die bei etwa 18000 RFU beginnen, liegt vermutlich daran, daß die Proben der beiden unteren Kurven in farblosem PBS verdünnt wurden, während die anderen Kurven rotes Zellkulturmedium enthielten. Es ist anzunehmen, daß sich die rote Farbe auf die Fluoreszenzintensität auswirkt.

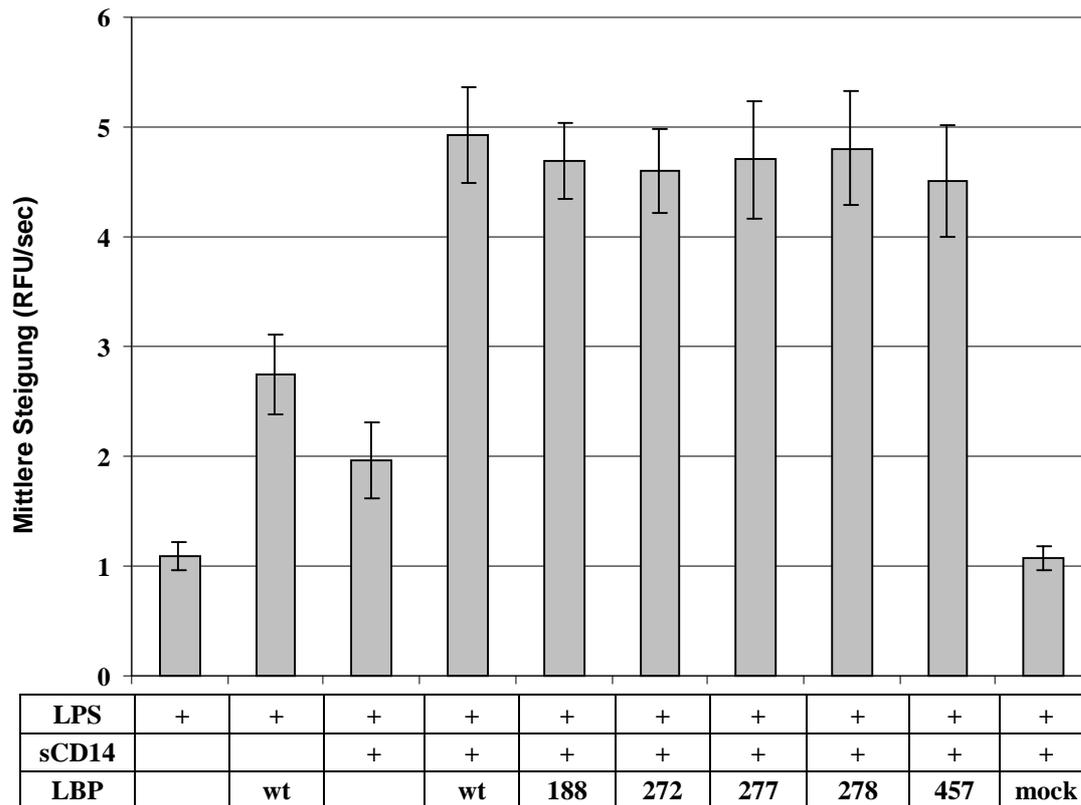


- A: LPS
- B: LPS + CD14
- C: LPS + CD14 + mock
- D: LPS + wt-LBP
- E: LPS + CD14 + wt-LBP bzw. LBP-Mutanten

### Abbildung 11: LBP-katalysierter Transfer von BODIPY-LPS an sCD14

BODIPY-LPS wurde mit sCD14 und den LBP-Mutanten bei 37 °C inkubiert und die Fluoreszenz wurde über die Zeit gemessen. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“). Als Kontrolle wurde einmal LPS nur mit Wildtyp-LBP inkubiert und ein andermal nur mit sCD14. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Versuch von drei durchgeführten.

Die Absolutwerte der Fluoreszenz spielen keine entscheidende Rolle, denn der LPS-Transfer stellt eine enzymatische Funktion dar und Enzyme bewirken einen schnelleren Ablauf einer Reaktion. Das bedeutet, daß die LBP-Funktion - der Transfer von LPS an CD14 - durch die Zunahme der Fluoreszenz widerspiegelt wird und das entspricht der Steigung der in Abbildung 11 dargestellten Kurven. Daher zeigt die nächste Abbildung 12 die mittlere Steigung der einzelnen Messungen über den gesamten Meßzeitraum. Es handelt sich hierbei um Durchschnittswerte der drei durchgeführten Versuche. In dieser Darstellung ist auch besser zu sehen, daß zwischen Wildtyp-LBP und den einzelnen Mutanten kein Unterschied im Transfer von BODIPY-LPS an CD14 besteht.



**Abbildung 12: Mittlere Steigung der Kurven des Transfers von BODIPY-LPS an sCD14**

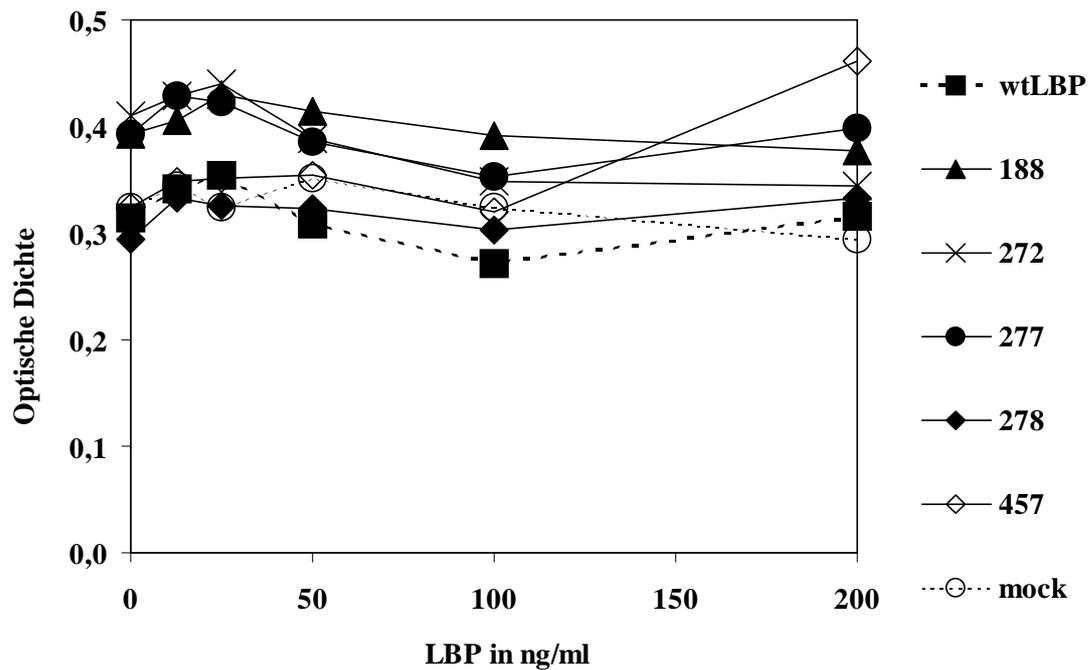
Die Zunahme der Fluoreszenz stellt ein Maß dar für den durch LBP katalysierten LPS-Transfer an CD14. Zur besseren Übersicht der Fluoreszenzzunahme ist hier die mittlere Steigung der einzelnen Kurven von Abbildung 11 über den gesamten Messungszeitraum abgebildet. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der drei durchgeführten Versuche gezeigt.

## 2.6 Bindung der LBP-Mutanten an Phospholipide

Mit dem gleichen Versuch, mit dem die Bindungsfähigkeit von LBP an LPS-Aggregate überprüft werden kann, ist es auch möglich, die Bindung an Phospholipide zu messen. Dazu werden die jeweiligen Phospholipide genauso wie LPS auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Der weitere Ablauf des ELISA funktioniert genauso wie mit LPS, alle verwendeten Reagenzien und Antikörper sind gleich. In dem hier durchgeführten ELISA wurden zwei verschiedene Phospholipide verwendet: Phosphatidyl-Inositol und Phosphatidyl-Ethanolamin. In den Vorversuchen - siehe Abbildung 7 - hatte sich gezeigt, daß LBP in diesem Versuch ähnlich stark an diese beiden Phospholipide wie an LPS bindet.

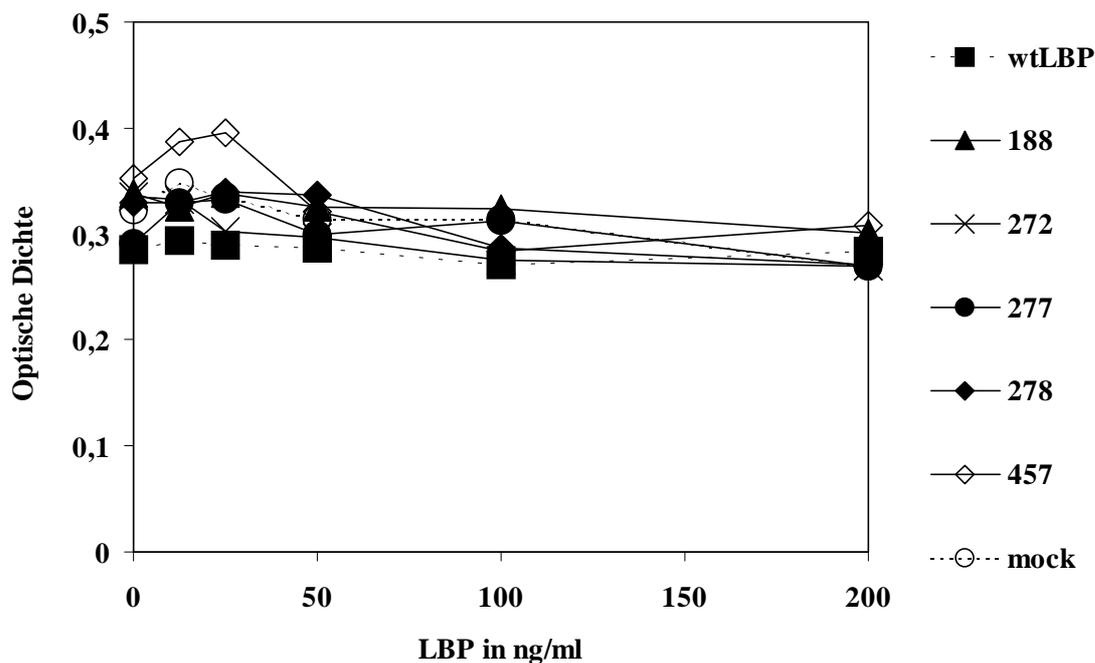
So war es sehr verwunderlich, daß dieser ELISA mit Phospholipiden und den LBP-Mutanten nicht funktionierte. Trotz mehrmaliger Wiederholung und Überprüfung zeigte sich meistens bei der Entwicklung eine gleichmäßig hellgelb verfärbte Mikrotiterplatte, bei der nicht einmal die Standardreihe auswertbar war. Die wenigen Versuche, bei welchen in der Standardreihe Konzentrationsunterschiede auszumachen waren, ergaben sinnlose Ergebnisse. Beispiele dafür bieten die nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 13 und 14). Sie zeigen, daß erstens die Kurve der Positivkontrolle (Wildtyp-LBP) größtenteils unterhalb der Negativkontrolle (mock) verläuft, zweitens kein Anstieg der optischen Dichte mit zunehmender Konzentration erfolgt und drittens die optische Dichte zwischen 0,3 und 0,4 liegt, während sie bei den Versuchen mit LPS und im Vorversuch mit Phospholipiden Werte zwischen 0,7 und 1,4 erreichte.

Es mußte hier also ein Fehler vorliegen, obwohl exakt dieselben Reaktionsbedingungen wie in den LPS-ELISA verwendet wurden und obwohl in den Vorversuchen – siehe Abbildung 7 – die Bindung von LBP sowohl an Phosphatidyl-Inositol als auch an Phosphatidyl-Ethanolamin problemlos funktioniert hatte.



**Abbildung 13: Bindung der LBP-Mutanten an immobilisiertes Phosphatidyl-Ethanolamin**

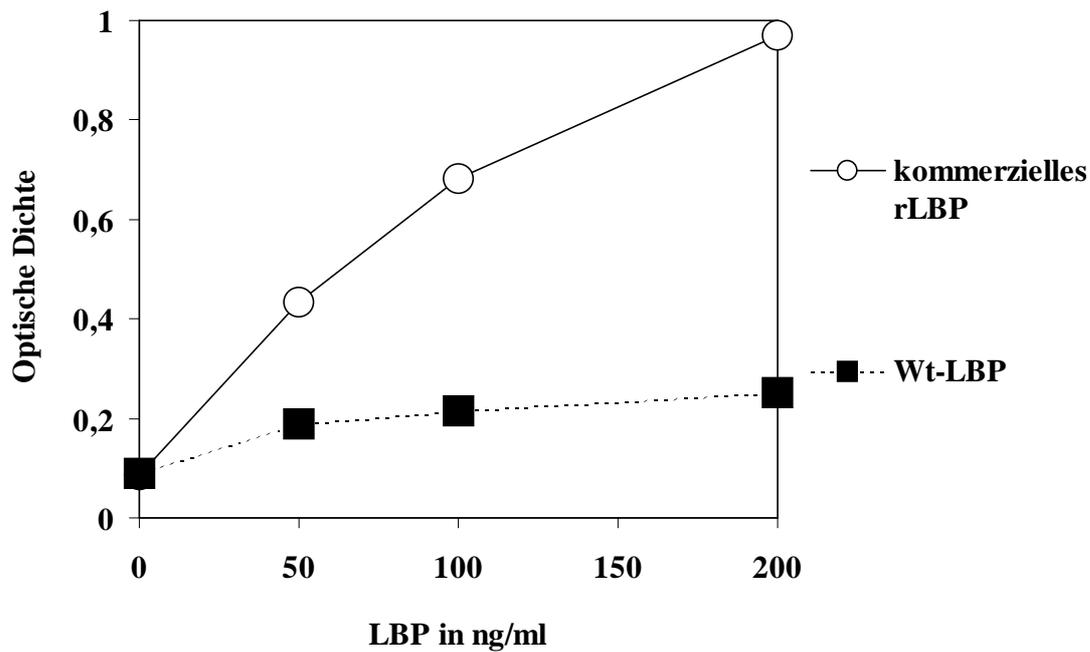
Unterschiedliche Konzentrationen der LBP-Mutanten wurden auf Mikrotiterplatten, die mit Phospholipiden beschichtet waren, inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“).



**Abbildung 14: Bindung der LBP-Mutanten an immobilisiertes Phosphatidyl-Inositol**

Unterschiedliche Konzentrationen der LBP-Mutanten wurden auf Mikrotiterplatten, die mit Phospholipiden beschichtet waren, inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt. Wildtyp-LBP diente als Positivkontrolle, die Negativkontrolle bildete Kulturüberstand von Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert worden waren („mock“).

Die einzigen Unterschiede zwischen dem Vorversuch, der in Abbildung 7 dargestellt ist, und den hier durchgeführten Versuchen liegen im verwendeten LBP und im Medium. In den Vorversuchen zu den Phospholipiden wurde gekauftes rekombinantes LBP der Firma XOMA verwendet, das in dem für den ELISA vorgesehenen Inkubationspuffer verdünnt worden war. Für die Versuche hier wurden die Mutanten und Wildtyp-LBP benutzt, in Mock-Medium gelöst. Daher wurde ein weiterer ELISA mit einem immobilisierten Phospholipid, diesmal Phosphatidyl-Serin, durchgeführt, bei welchem das kommerzielle rLBP im Inkubationspuffer gegen das Wildtyp-LBP im Mock-Medium verglichen wurde. Die folgende Darstellung (Abbildung 15) zeigt, daß das Wildtyp-LBP im Mock-Medium wesentlich schlechter an das fixierte Phospholipid bindet als das kommerzielle LBP im Inkubationspuffer.

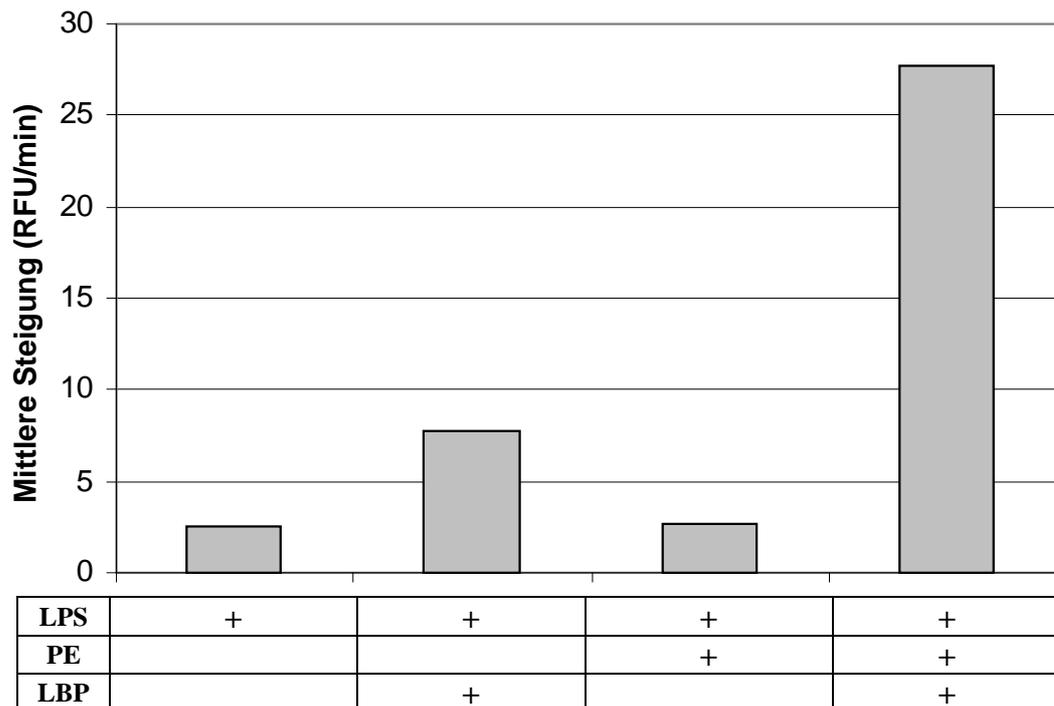


**Abbildung 15: Bindung von LBP an immobilisiertes Phosphatidyl-Serin. Vergleich zwischen kommerziellem rLBP in Inkubationspuffer und Wildtyp-LBP in Mock-Medium**

Unterschiedliche Konzentrationen von LBP wurden auf Mikrotiterplatten, die mit Phospholipiden beschichtet waren, inkubiert bei 37 °C. Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper detektierte das gebundene LBP, nach einer Farbreaktion wurde dann durch Extinktionsmessung die optische Dichte bestimmt.

## 2.7 Transfer von fluoreszenzmarkiertem LPS an Phospholipide durch die Mutanten

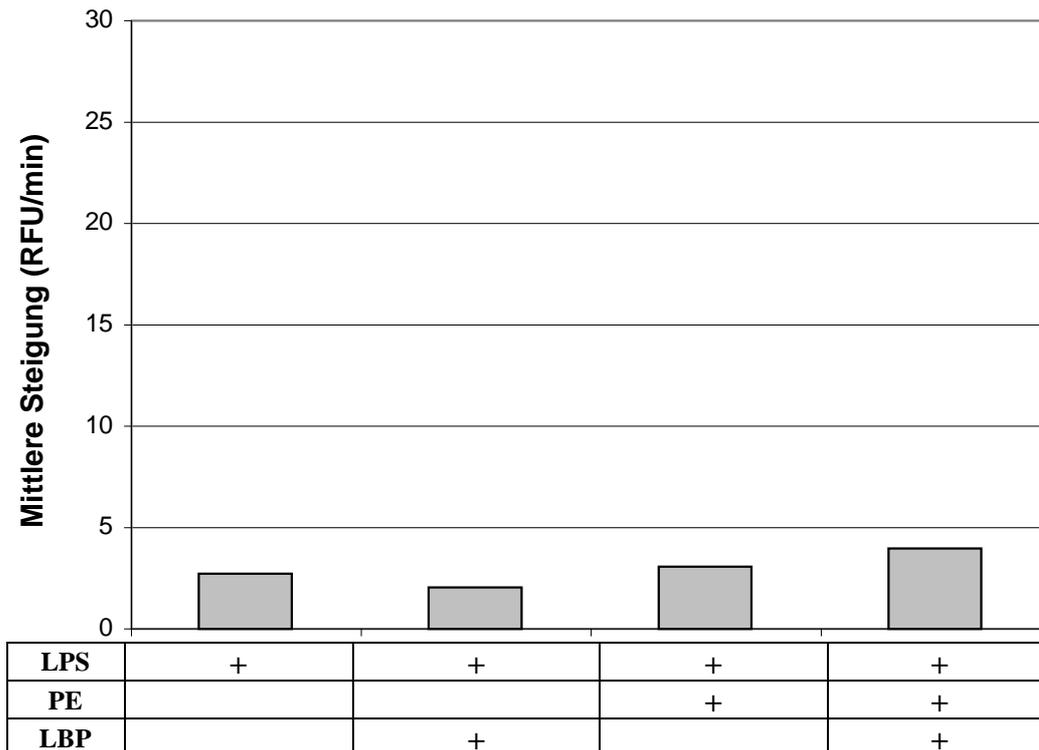
LBP ist nicht nur in der Lage, LPS zu monomerisieren und an CD14 zu transferieren, genauso kann es LPS-Monomere in Phospholipid-Membrane einfügen (Wurfel, Wright, 1997). Um zu untersuchen, ob sich die Mutationen im Bereich der Lipid-Binde-Taschen von LBP auf diesen Vorgang auswirken, wurde, analog zum LPS-Transfer an CD14, mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY markiertes LPS mit dem Phospholipid Phosphatidyl-Ethanolamin und LBP inkubiert und die Fluoreszenz gemessen. Die Phospholipide lagern sich dabei aufgrund ihrer amphiphilen Struktur im wäßrigen Medium zu Membranen zusammen und bilden einen Akzeptor für LPS-Monomere. Bei der Abgabe eines LPS-Moleküls an die Phospholipidmembran nimmt LBP im Tausch ein Phospholipid-Molekül wieder auf (Yu et al., 1997). Der Versuchsaufbau gleicht dem in Kapitel 2.5 beschriebenen, nur daß anstelle von CD14 als Akzeptor Phosphatidyl-Ethanolamin Verwendung fand. Es wurde jeweils die mittlere Steigung des Fluoreszenzanstieges in „Relative Fluorescence Units“ pro Minute (RFU/min) über den gesamten Meßzeitraum berechnet und in den folgenden Diagrammen abgebildet. Im Vorversuch fand gekauftes rekombinantes LBP der Firma XOMA Verwendung. Als Puffer diente PBS. Das Ergebnis ist in der Abbildung 16 dargestellt und zeigt deutlich den Transfer von BODIPY-LPS an die Phospholipid-Aggregate.



**Abbildung 16: Mittlere Steigung der Kurven des Transfers von BODIPY-LPS an Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) durch kommerzielles rLBP**

LPS, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY markiert ist, wurde mit kommerziellem rLBP und/oder Phosphatidyl-Ethanolamin inkubiert. Die Fluoreszenz wurde gemessen über die Zeit und die Steigung dieser Funktion berechnet. Diese spiegelt die Zunahme der Fluoreszenz wider und stellt ein Maß dar für den durch LBP katalysierten LPS-Transfer an das Phospholipid

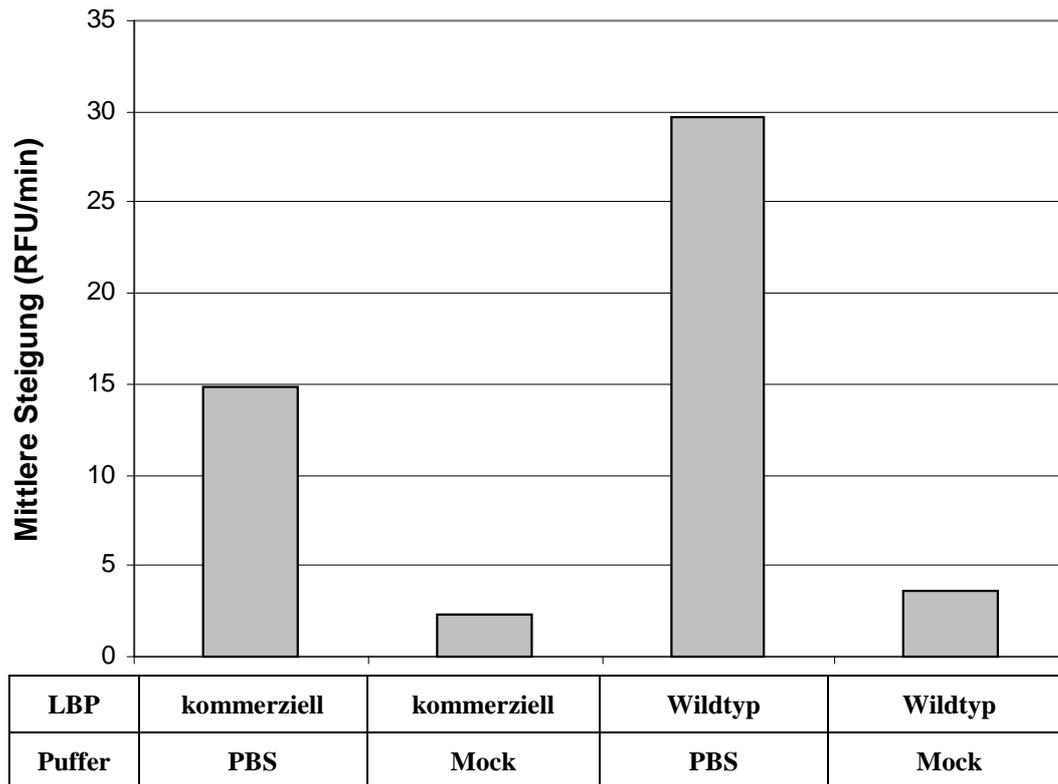
Dieser Versuch wurde wiederholt und angesichts der im vorigen Kapitel geschilderten Schwierigkeiten wurde diesmal Wildtyp-LBP, das in Mock-Medium verdünnt war, gebraucht. Aus der Abbildung 17 kann man ersehen, daß in dieser Konstellation kein LPS-Transfer stattfindet.



**Abbildung 17: Mittlere Steigung der Kurven des Transfers von BODIPY-LPS an Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) durch Wildtyp-LBP**

LPS, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY markiert ist, wurde mit Wildtyp-LBP und/oder Phosphatidyl-Ethanolamin inkubiert. Die Fluoreszenz wurde gemessen über die Zeit und die Steigung dieser Funktion berechnet. Diese spiegelt die Zunahme der Fluoreszenz wider und stellt ein Maß dar für den durch LBP katalysierten LPS-Transfer an das Phospholipid.

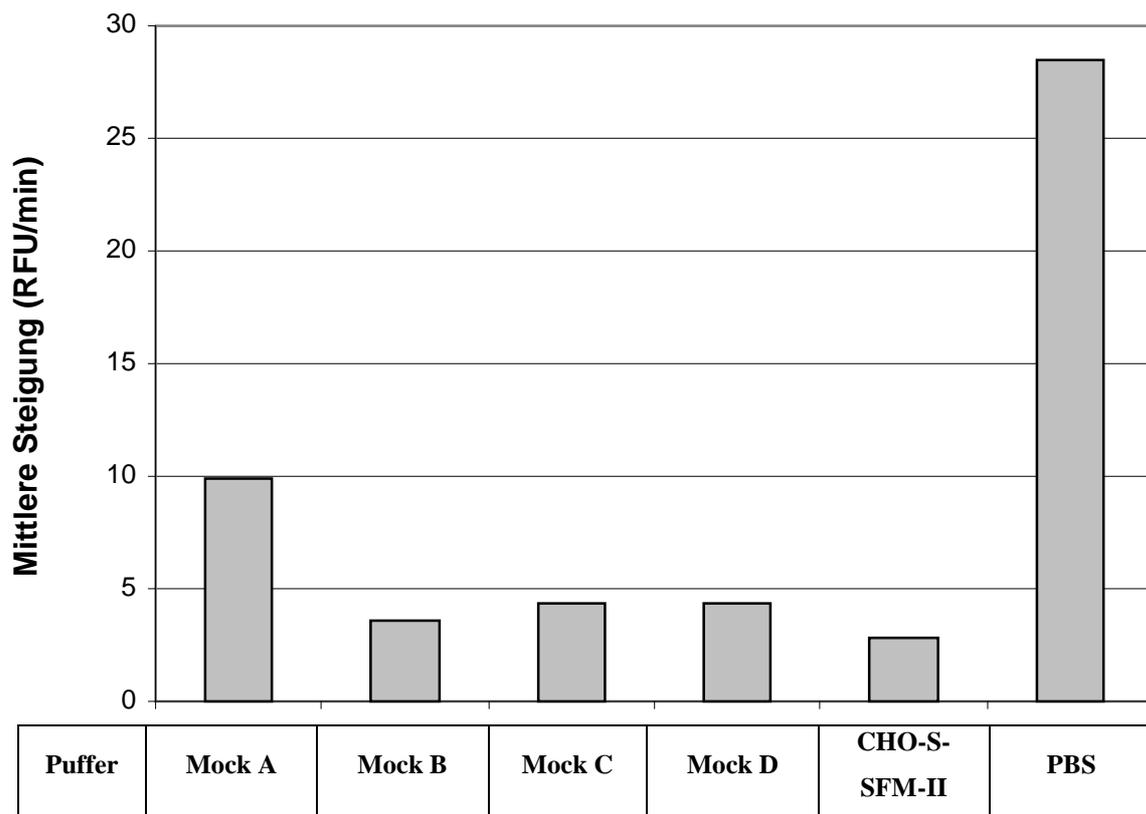
Die beiden vorherigen Versuche unterscheiden sich durch zwei Parameter, nämlich durch das verwendete LBP und den Puffer, in welchem LBP gelöst ist. Um nun herauszufinden, in welchem der beiden Parameter das Problem steckt, das den LPS-Transfer verhindert, wurde im nächsten Test die beiden LBP-Typen in jeweils beiden Pufferlösungen verdünnt und gegeneinander verglichen. Der Versuchsaufbau war ansonsten genau wie in den vorherigen Tests. In allen vier Versuchsreihen befand sich BODIPY-LPS und Phosphatidyl-Ethanolamin als Akzeptor für das LPS. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis: Beide Arten von LBP können LPS monomerisieren und an das Phospholipid transferieren, wenn sie in PBS gelöst sind. Sobald sie in Mock-Medium verdünnt werden, funktioniert der Versuch nicht.



**Abbildung 18: Mittlere Steigung der Kurven des Transfers von BODIPY-LPS an Phosphatidyl-Ethanolamin (PE). Vergleich von Wildtyp-LBP und kommerziellem LBP in unterschiedlichen Pufferlösungen**

LPS, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY markiert ist, wurde mit Phosphatidyl-Ethanolamin inkubiert. Als Katalysator dienen zwei verschiedene Arten LBP, die in zwei unterschiedlichen Medien gelöst waren und gegeneinander verglichen wurden. Die Fluoreszenz wurde gemessen über die Zeit und die Steigung dieser Funktion berechnet. Diese spiegelt die Zunahme der Fluoreszenz wider und stellt ein Maß dar für den durch LBP katalysierten LPS-Transfer an das Phospholipid.

Offensichtlich befindet sich irgend etwas im Mock-Medium, das die Interaktion von LBP mit Phospholipiden stört. Daraus ergibt sich die nächste Frage, ob dieser Störfaktor von den CHO-Zellen exprimiert wird oder sich bereits im Zellmedium CHO-S-SFM-II befindet. Daher wurden im nächsten Versuch Mock-Lösungen, die zu verschiedenen Zeiten aus unterschiedlichen Zellkulturflaschen entnommen und eingefroren worden waren, mit CHO-S-SFM-II und PBS als Puffer verglichen.



**Abbildung 19: Mittlere Steigung der Kurven des Transfers von BODIPY-LPS an Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) durch LBP. Vergleich von unterschiedlichen Pufferlösungen.**

LPS, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY markiert ist, wurde mit Phosphatidyl-Ethanolamin inkubiert. Als Katalysator diente LBP, das in unterschiedlichen Medien gelöst war, die gegeneinander verglichen wurden. Mock A-D bezeichnet Mock-Medium, das zu unterschiedlichen Zeiten aus unterschiedlichen Zellkulturen geerntet worden war. CHO-S-SFM-II ist das Zellkulturmedium der CHO-Zellen, die zur Expression der LBP-Mutanten Verwendung fanden. Die Fluoreszenz wurde gemessen über die Zeit und die Steigung dieser Funktion berechnet. Diese spiegelt die Zunahme der Fluoreszenz wider und stellt ein Maß dar für den durch LBP katalysierten LPS-Transfer an das Phospholipid.

Bei den in Abbildung 19 dargestellten Ergebnissen zeigt sich wie in den vorherigen Versuchen, daß PBS als Puffer den Versuch nicht stört im Gegensatz zu den verschiedenen Mock-Lösungen. Außerdem wird deutlich, daß das Zellkulturmedium CHO-S-SFM-II den LPS-Transfer an Phospholipid-Aggregate durch LBP am effektivsten hemmt. Der Störfaktor wird also offenbar nicht von den CHO-Zellen exprimiert, sondern befindet sich bereits im Zellkulturmedium.

## 2.8 Aufreinigung der LBP-Mutanten

Um die LBP-Mutanten aus dem Zellkultur-Medium mit dem Störfaktor herauszuholen, wurde eine Protein-Aufreinigung durch Ionen-Austausch-Chromatographie in Angriff genommen. Es wurden unterschiedliche Ansätze ausprobiert, wobei sowohl SP-Sepharose als auch Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) als Matrix Verwendung fanden. Dabei trat die Schwierigkeit auf, daß das Eluat, welches eigentlich das aufgereinigte LBP enthalten sollte, fast kein Protein enthielt. Dies konnte entweder daran liegen, daß LBP bei den Waschungen der Sepharose ausgespült worden war oder noch an die Sepharose gebunden und nicht eluiert worden war. Eine Proteinbestimmung der gebrauchten Waschlösung und der proteinbeladenen Sepharose ergab, daß das Protein noch an die Matrix ligiert und nicht ausgewaschen worden war. Daher wurden die Parameter der Eluierung verändert und es wurde mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,2 – 1,2 M in 0,2 M-Schritten) und verschiedenen Einwirkzeiten des Eluierungspuffers (10 min. und 60 min.) versucht, das LBP aus der Sepharose zu lösen. Außerdem wurden SP- und Q-Sepharose gegeneinander verglichen. Trotzdem wurden nur sehr unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Trotz unterschiedlicher Eluierungsmethoden blieb der größte Teil des LBP in der Matrix gebunden. Zusätzlich traten noch weitere Probleme auf: Die Mutanten L188 und Y457 ließen sich nur mit Q-Sepharose, die übrigen nur mit SP-Sepharose aufreinigen. In funktionellen Versuchen (nicht gezeigt) mit den aufgereinigten LBP-Mutanten wurde deutlich, daß die beiden in Q-Sepharose aufgereinigten Mutanten einen deutlich höheren LPS-Transfer leisteten als die übrigen drei Mutanten. Außerdem war das aufgereinigte Wildtyp-LBP funktionell sehr schwach und bewirkte fast keinen LPS-Transfer mehr.