

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

DISSERTATION

Die Auswirkungen von zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen  
im Lipopolysaccharid-bindenden Protein auf die Immunantwort

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Karoline Bald

aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. R. R. Schumann  
                             2. Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski  
                             3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Heine

Datum der Promotion: 23. Juni 2013

## Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungen</i>	<i>I</i>
<i>Eigenständigkeitserklärung</i>	<i>IV</i>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Infektion und Immunabwehr</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Gram-positive und Gram-negative Bakterien</b>	<b>4</b>
1.2.1 Allgemeine Struktur	4
1.2.2 Aufbau unterschiedlicher bakterieller Zellwandkomponenten	5
<b>1.3 Mechanismen des angeborenen Immunsystems</b>	<b>7</b>
1.3.1 Die Toll-like Rezeptoren	8
1.3.2 Signalkaskade der TLR	9
1.3.3 Funktion des LPS-bindenden Proteins	11
1.3.4 Dosisabhängige Wirkung des LBP	13
1.3.5 Interaktion zwischen ausgewählten Toll-like Rezeptoren und ihren Liganden	15
<b>1.4 Dreidimensionale Struktur des LBP</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Polymorphismen und ihre Auswirkungen</b>	<b>21</b>
1.5.1 Genetische Variabilität	21
1.5.2 SNP und Infektionen	23
<b>1.6 Bakterielle Meningitis</b>	<b>24</b>
<b>1.7 Herleitung der Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2 Materialien und Geräte</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Chemikalien</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Geräte</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Verbrauchsmaterial</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien</b>	<b>30</b>
<b>2.5 DNA-Extraktion und PCR</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Zellkultur</b>	<b>33</b>
<b>2.7 ELISA und Bindungsassays</b>	<b>34</b>
<b>2.8 Verwendete Software</b>	<b>35</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Genotypisierung</b>	<b>36</b>
3.1.1 Darstellung der Kollektive	36
3.1.2 PCR Light Cycler Technik	36
<b>3.2 Serumentnahme</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Gewinnung rekombinanter Proteine</b>	<b>43</b>
<b>3.4 ELISA</b>	<b>44</b>
3.4.1 Allgemein	44
3.4.2 Biotinylierung von Antikörpern	45
3.4.3 Spezifische ELISA-Protokolle	45
<b>3.5 LBP-Bindungsassays</b>	<b>46</b>
<b>3.6 Zellkultur</b>	<b>48</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>3.7 Erstellung dreidimensionaler Computermodelle für LBP</b>	<b>49</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Verteilung der LBP-Polymorphismen in einer gesunden Kontrollpopulation</b>	<b>50</b>
4.1.1 Verteilung des LBP-Polymorphismus c998t	50
4.1.2 Verteilung des LBP-Polymorphismus t1341c	51
<b>4.2 Dreidimensionale LBP-Modelle</b>	<b>53</b>
<b>4.3 Rekombinante Proteine und Seren</b>	<b>57</b>
<b>4.4 Bindungsassays</b>	<b>58</b>
<b>4.5 Stimulation der murinen Makrophagen-Zelllinie</b>	<b>69</b>
<b>4.6 Verteilung der LBP-Polymorphismen im Kollektiv der Meningitis-Patienten</b>	<b>77</b>
4.6.1 Verteilung des LBP-Polymorphismus c998t	78
4.6.2 Verteilung des LBP-Polymorphismus t1341c	79
4.6.3 Vergleich der Polymorphismusverteilung zwischen gesundem Kontrollkollektiv und Kindern mit Meningitis	80
<b>5 Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Funktionsanalyse des LBP</b>	<b>83</b>
<b>5.2 Auswirkungen der Polymorphismen in vitro</b>	<b>85</b>
<b>5.3 Populationsuntersuchungen zu den Polymorphismen</b>	<b>89</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>Anhang</b>	<b>a</b>
<b>I. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>a</b>
<b>II. Output Fisher-Exakt-Test</b>	<b>b</b>
<b>III. Lebenslauf</b>	<b>e</b>
<b>IV. Danksagung</b>	<b>i</b>

## Abkürzungen

AK	Antikörper
A	Adenin
BPI	<i>Bactericidal/Permeability-Increasing Protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CETP	Cholesterinester-Transfer-Protein
CpG(-DNA)	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (-DNA)
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> (zerebrospinale Flüssigkeit)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	<i>double-stranded</i> (doppelsträngige) RNA
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMEM	<i>Earle's Minimal Essential Medium</i>
FCS	<i>Fetal Calve's Serum</i> (fetales Kälberserum)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
h	human
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1 Protein</i>
ht	heterozygot
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1R-associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein

## Abkürzungen

---

LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
Leu	Leucin
LP <sub>2</sub>	diacyliertes Lipopeptid
LP <sub>3</sub>	triacyliertes Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich Repeats</i>
LTA	Lipoteichonsäure
MAL	<i>MyD88 Adaptor-like</i>
mCD14	membranständiges CD14
MD-2	Lymphozyten Antigen 96
min	Minuten
mut	homozygot
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE-DTPA	<i>Phosphoethanolamin-Diethylenetriaminepentaacetic Acid</i>
Phe	Phenylalanin
PLTP	Phospholipid-Transfer Protein
POD	Streptavidin-HRP-Peroxidase-Konjugat
Pro	Prolin
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
R-LPS	<i>rough LPS</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
sCD14	<i>soluble</i> (=lösliches) CD14
S-LPS	<i>smooth LPS</i>
ssRNA	<i>single-stranded</i> (einzelsträngige) RNA
T	Tyrosin

## Abkürzungen

---

TIR	Toll-IL1-R-Homologie-Domäne
TIRAP	<i>TIR-domain Containing Adaptor Protein</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (Toll-like Rezeptor)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNFR-associated Factor</i> (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor)
TRAM	<i>Toll Receptor-associated Molecule</i> (Toll-Rezeptor assoziiertes Molekül)
TRIF	<i>Toll Receptor-associated Activator of Interferon</i> (Toll-Rezeptor assoziierter Interferon-Aktivator)
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Eigenständigkeitserklärung**

„Ich, Lena Karoline Bald, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Auswirkungen von zwei Einzelnukleotidpolymorphismen im Lipopolysaccharid-bindenden Protein auf die Immunantwort“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift



# 1 Einleitung

## 1.1 Infektion und Immunabwehr

Der menschliche Körper muss sich ständig mit seiner Umwelt auseinandersetzen, wobei er sich mit einer großen Anzahl von Krankheitserregern konfrontiert sieht. Um sich vor diesen zu schützen, verfügt er über ein gut ausgebildetes Immunsystem, dessen Hauptaufgabe die Unterscheidung zwischen körpereigenem und körperfremdem, die Erkennung von schädlichem Material und die Eliminierung desselben ist. Es setzt sich neben äußeren Barrieren aus zwei Hauptkomponenten zusammen, dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem [1].

Das adaptive Immunsystem ist vor allem für die später erworbene, sehr spezifische und hocheffektive Immunantwort verantwortlich. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind Lymphozyten, die in weitere Untergruppen (T- und B-Lymphozyten) unterteilt werden können. Die T-Zellen haben vielfältige Funktionen und man unterscheidet weitere Subgruppen wie T-Helferzellen, T-Killerzellen oder regulatorische T-Zellen, welche eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Zytotoxizität, der Steuerung der humoralen Immunantwort, sowie der allergischen Reaktion spielen [2]. Die B-Lymphozyten produzieren durch klonale Selektion antigenspezifische Antikörper, die direkt und durch Opsonierung (Markierung der Antigene zur besseren Identifizierung durch Phagozyten und andere Zellen des Immunsystems) zur Erregerelimination beitragen. Außerdem wird durch das adaptive Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis gebildet, das eine lange, zum Teil lebenslange Immunität gegen einmal erkannte Pathogene ermöglicht.

Das angeborene Immunsystem stellt die schnelle und weniger spezifische Verteidigung gegen eingedrungene mikrobielle Erreger sicher, die hauptsächlich durch Phagozyten (unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen, DC, oder neutrophile Granulozyten) vermittelt wird. Diese lösen in Reaktion auf Erreger unter anderem die Ausschüttung von Zytokinen aus, was lokal zu einer inflammatorischen Reaktion und zur Chemoattraktion weiterer Immunzellen führt. Systemisch wird über das angeborene Immunsystem die sogenannte Akut-Phase-Reaktion ausgelöst, bei der die Leber durch die Produktion von Akut-Phase-Proteinen eine zentrale Rolle spielt. Zudem ist das angeborene Immunsystem über Antigenpräsentation und Chemoattraktion auch an der Aktivierung des adaptiven Immunsystems beteiligt, wobei für die Verzahnung beider Systeme unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen. Beispielsweise wird die T-Zell-Antwort auch über Teile des so genannten Komplementsystems moduliert [3] und Interaktionen zwischen

natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen beeinflussen sowohl Vorgänge des angeborenen wie auch des erworbenen Immunsystems [4]. Eine essentielle Rolle spielen auch Toll-like Rezeptoren (s. Kap. 1.3.1), die einerseits Funktionen dendritischer Zellen kontrollieren [5], aber auch Signalwege aktivieren, die für die Auslösung einer effektiven adaptiven Immunantwort wichtig sind [6].

Die Erkennung der mikrobiellen Organismen erfolgt über Bestandteile, die für die Funktion der Erreger essentiell sind, und die sich von wirtseigenen Molekülen unterscheiden. Diese werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) genannt und sind bei vielen Erregern in sehr ähnlicher Form vorhanden. Dadurch können die Zellen des angeborenen Immunsystems mit einer begrenzten Zahl von sogenannten *pattern-recognition receptors* (PRR) eine große Bandbreite an Erregern direkt erkennen [7]. Die zugrunde liegenden Abläufe werden im Abschnitt 1.3 genauer dargestellt.

Trotz einer funktionierenden Immunabwehr kommt es auch heute immer wieder zu bedrohlichen Infektionen. Diese sind auch im Zeitalter der effektiven Antibiotikatherapie ein großes klinisches Problem. Nosokomiale Infektionen mit schweren Verläufen bei zum Teil multimorbiden Patienten, die zunehmende Antibiotikaresistenz und schwer zu beherrschende Krankheitsbilder wie Sepsis sind nur einige Gründe, die verdeutlichen, warum ein umfassendes Verständnis der Abläufe des Immunsystems essentiell ist. Einem Teilbereich des angeborenen Immunsystems widmet sich die hier dargestellte Arbeit.

## **1.2. Gram-positive und Gram-negative Bakterien**

### ***1.2.1 Allgemeine Struktur***

Bakterien weisen einen für prokaryotische Organismen typischen Zellaufbau auf: Sie besitzen keinen echten Zellkern, sondern die DNA liegt in Form des Nukleoids frei im Zytoplasma vor. Bei der äußeren Form können stäbchenförmige, schraubenförmige und kugelförmige Bakterien (Kokken) unterschieden werden [8]. Alle Bakterien verfügen über eine innere Zellmembran, die von einer Lipiddoppelschicht gebildet wird. Bei dieser zeigen die hydrophilen Anteile nach außen, während die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten ins Innere der Membran gerichtet sind [9]. In die Zellmembran eingelagert sind Membranproteine, die für unterschiedliche Funktionen benötigt werden. Solche Oberflächenproteine dienen unter anderem der Abwehr von schädlichen Umwelteinflüssen (z.B. antiphagozytische Moleküle), dem Vorteil gegenüber anderen Spezies

durch z.B. Lysine oder im Falle der Adhesine dem Anheften an Strukturen des Wirtsorganismus [10].

Außerdem weisen Bakterien eine Zellhülle auf. Diese ist aus Peptidoglykan (auch als Murein bezeichnet) aufgebaut, bietet mechanischen Schutz und vermittelt bei den Gram-positiven Bakterien, denen die zweite Zellmembran fehlt, den ersten Kontakt mit dem Wirt [11]. Die Peptidoglykanschicht kann ein- oder mehrschichtig sein, was das Färbeverhalten beeinflusst. So lässt sich der Farbstoff Gentianaviolett bei Bakterien mit einer einschichtigen Mureinschicht durch einen Waschschrift wieder entfernen. Diese Bakterien werden in Bezug zu der nach ihrem Entwickler benannten Färbemethode nach Gram als Gram-negativ bezeichnet [12].

Im Gegensatz dazu weisen Gram-positive Bakterien eine mehrschichtige, sehr dicke Peptidoglykanschicht auf und lassen sich mit Gentianaviolett dauerhaft blau anfärben. Die Differenzierung in Gram-positive und Gram-negative Bakterien hat klinische Konsequenzen, da sich bei verschiedenen Bakterienuntergruppen zum Beispiel die Reaktion auf Antibiotika unterscheidet.

Gram-negative Bakterien besitzen eine weitere äußere Membran, die Lipopolysaccharide und Lipoproteine enthält [9]. Diese Bestandteile spielen eine große Rolle in der Pathogenität Gram-negativer Bakterien. Besonders Lipopolysaccharide (LPS) sind wichtige Komponenten, mit denen das Immunsystem interagiert.

Gram-positive Bakterien weisen keine äußere Membran, also auch keine Lipopolysaccharide auf. Stattdessen sind wichtige pathogene Bestandteile ihrer Zellwand die Lipoteichonsäure, sowie Lipoproteine [13, 14]. Diese Strukturen gehören zu den im Abschnitt 1.1 erwähnten PAMPs.

### **1.2.2 Aufbau unterschiedlicher bakterieller Zellwandkomponenten**

Bei Lipopolysacchariden handelt es sich um Glykolipide, die aus einem hydrophoben Lipidanteil (dem Lipid A), einem Kern-Polysaccharid und variablen hydrophilen Polysaccharidketten aufgebaut sind [15]. Die Polysaccharidketten können auch gänzlich fehlen (Abb. 1). Nach der Länge ihrer Polysaccharid-Einheiten werden Lipopolysaccharide in S- und R-Formen unterteilt. S-LPS, z.B. von *E. coli* verfügt über lange sich wiederholende Oligosaccharid-Einheiten und lässt Bakterienkolonien auf Kulturmedien glatt und glänzend erscheinen (englisch „smooth“). Bei R-LPS-Formen fehlen die Oligosaccharide und Bakterienkolonien haben eine raue Oberfläche (englisch „rough“, z.B. LPS Re595 aus *Salmonella minnesota*). Der Aufbau des Kernpolysaccharids ist in verschiedenen Bakterienarten generell sehr ähnlich [16].

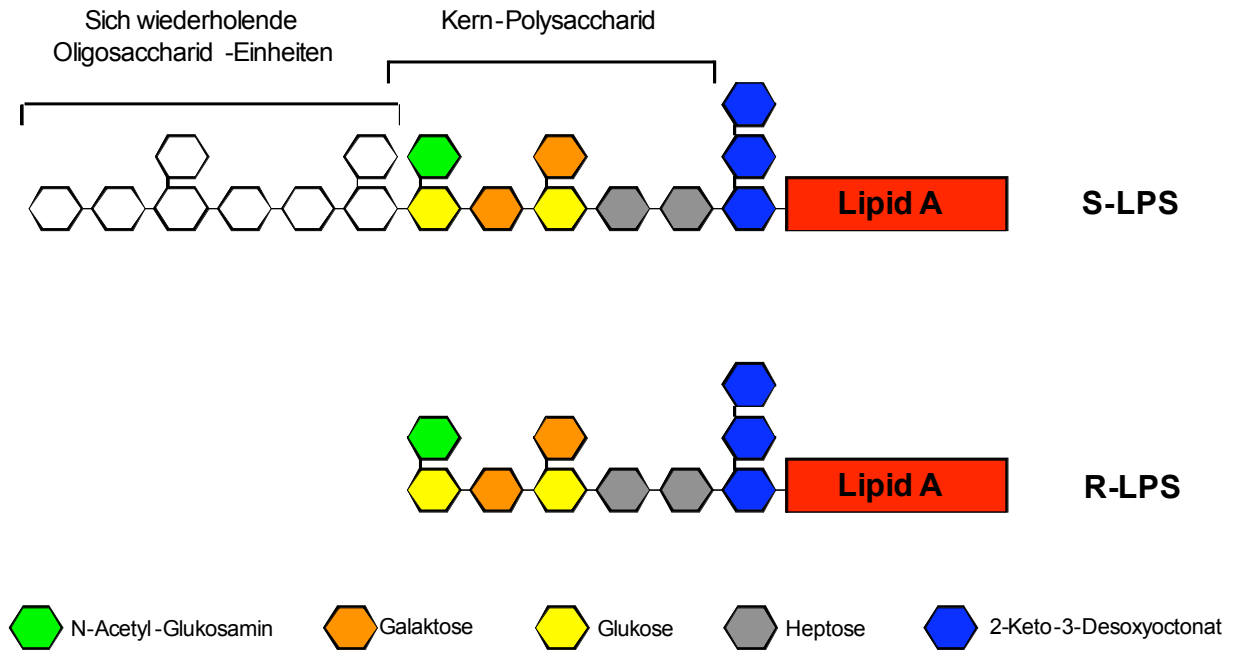


Abb. 1 Schematischer Aufbau unterschiedlicher LPS-Formen

Dargestellt sind exemplarisch ein S-LPS mit langen sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, die variabel sind und ein R-LPS, bei dem diese völlig fehlen. Alle Lipopolysaccharide weisen als identische Struktur das Lipid A und das Kern-Polysaccharid auf, das sich bei verschiedenen Bakterienspezies nicht wesentlich unterscheidet.

Die pathogene Wirkung des LPS wird vor allem über das hoch konservierte Lipid A vermittelt, weshalb es auch als das endotoxische Prinzip des LPS bezeichnet wird [7].

Gram-positive Bakterien vermitteln ihre pathogene Wirkung unter anderem über Lipoproteine, wobei auch Gram-negative Erreger, sowie z.B. Mykoplasmen, Lipoproteine aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Lipoproteine unterschiedlicher Krankheitserreger die immunaktivierende Wirkung vor allem über bestimmte lipidhaltige Strukturen vermittelt wird. So beinhaltet das Lipoprotein von *Borrelia burgdorferi* N-terminal die Struktur N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyll, die als Pam<sub>3</sub>Cys bezeichnet wird [17]. Dieselbe Struktur ist auch in *E. coli* (Gram-negativ) vorhanden [18]. Andere Erreger wie *Mycoplasma fermentans* enthalten stattdessen diacylierte Lipopeptide (Pam<sub>2</sub>Cys).

Diese Lipopeptide sind notwendig für die immunaktivierende Wirkung der Lipoproteine. Abbildung 2 stellt synthetisch hergestellte diacylierte oder triacylierte Lipopeptide dar, welche die gleiche Wirkung auslösen wie aus Bakterien isolierte Lipopeptide [19].

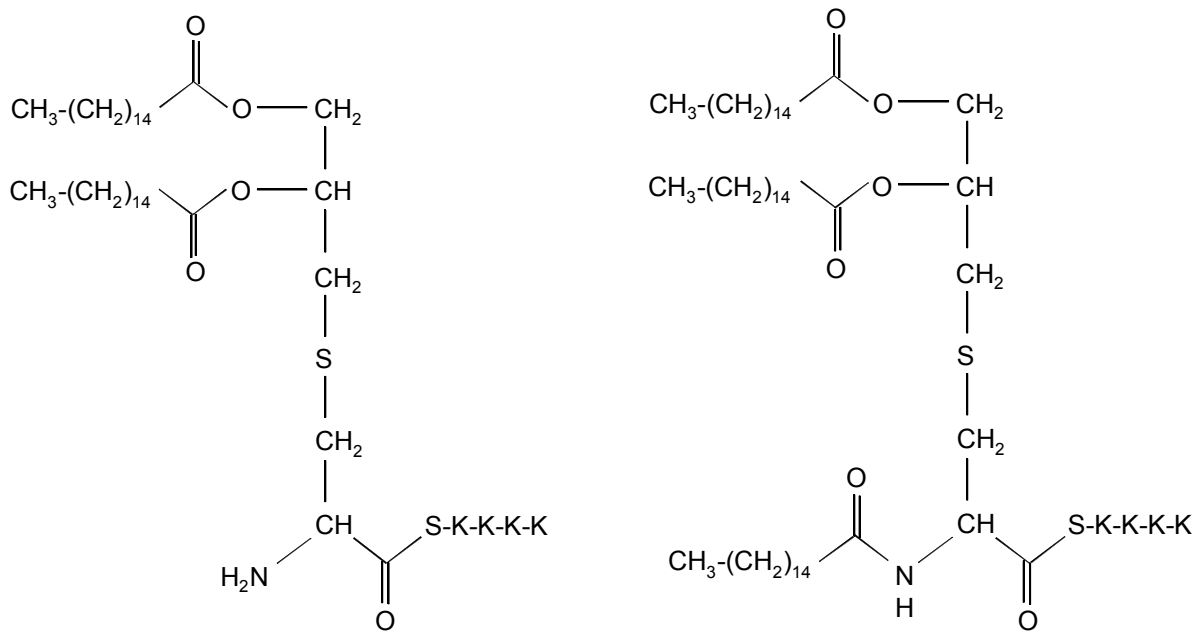


Abb. 2 **Strukturformeln der synthetischen Lipopeptide Pam<sub>2</sub>Cys und Pam<sub>3</sub>Cys.**

Dargestellt sind die Strukturformeln der Lipopeptide, die als Bestandteil von Lipoproteinen einen Teil der pathogenen Wirkung von Bakterien auslösen. Sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer Acylketten, wobei Pam<sub>2</sub>Cys (links) über zwei und Pam<sub>3</sub>Cys (rechts) über drei Acylketten verfügt. Synthetisch hergestellte Lipopeptide können im Rahmen von Experimenten anstelle von Lipoproteinen verwendet werden, da sie ebenso immunaktivierend wirken.

### 1.3 Mechanismen des angeborenen Immunsystems

Nachdem die Bakterien trotz erster Barrieren, wie z.B. der Haut, in den menschlichen Körper eingedrungen sind, muss das angeborene Immunsystem diese Pathogene erkennen. Die oben erwähnten bakteriellen Zellwandkomponenten gehören zu den so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), einer Gruppe in hohem Maße konservierter pathogener Muster. In diesem Zusammenhang muss man natürlich erwähnen, dass auch nicht pathogene Bakterien der so genannten Standortflora über ähnliche Bestandteile verfügen, weswegen der Begriff „*pathogen associated*“ nicht exakt ist. Trotzdem hat sich diese Bezeichnung durchgesetzt und wird im Folgenden weiter verwendet. Die Erkennung der Komponenten erfolgt über so genannte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRR), die intra- und extrazellulär vorliegen können. Die PRR müssen dabei Strukturen erkennen, die von mikrobiellen Erregern, aber nicht von Säugetierzellen exprimiert werden [20]. Eine wichtige Gruppe der PRR sind die so genannten Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Immunzellen. Diese interagieren,

ergänzt durch verschiedene lösliche Mediatoren, mit jeweils spezifischen PAMP, was zur Auslösung unterschiedlicher Signalkaskaden führt. Dies resultiert im weiteren Verlauf in der Ausschüttung von Zytokinen, beispielsweise von TNF- $\alpha$  und verschiedenen Interleukinen.

### ***1.3.1 Die Toll-like Rezeptoren***

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zur Familie der Typ-1-Transmembran-Proteine und zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Toll-Protein der *Drosophila*, nach dem sie benannt sind. In *Drosophila* wurde das Protein zunächst als wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung entdeckt [21], später konnte allerdings gezeigt werden, dass es auch in der Abwehr gegen Pilzinfektionen eine wichtige Rolle spielt [22].

Es wurden bisher zehn humane TLR identifiziert, die unterschiedliche Liganden erkennen (s. Tab. 1) und entscheidend zur Funktion des angeborenen Immunsystems beitragen [7]. TLR werden von verschiedenen Zellen extra- oder intrazellulär exprimiert, darunter Makrophagen und dendritische Zellen, aber auch B-Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen [1]. Die intrazellulären TLR sind meist endosomal lokalisiert, was bedeutet, dass Liganden zunächst endosomal aufgenommen werden müssen.

Tabelle 1 **Toll-like Rezeptoren und ausgewählte Liganden** [1]

Rezeptor	Ligand
TLR 2 / 1	Triacylierte Lipopeptide (Bakterien/Mykobakterien)
TLR 2 / 6	Diacylierte Lipopeptide LTA (z.B. Streptokokken der Gruppe B)
TLR 4	LPS Glycoinositolphospholipide
TLR 5	Flagellin (flagellierte Bakterien)
TLR 3	dsRNA (Viren)
TLR 7	Imiquimod, ssRNA (RNA-Viren)
TLR 8	ssRNA (RNA-Viren)
TLR 9	CpG-DNA (z.B. Bakterien/Mykobakterien) DNA (Viren)
TLR 11	Uropathogene Bakterien (genauer Ligand unbekannt), Profilin ( <i>Toxoplasma gondii</i> )

TLR-1, 2, 4 und 6 sind in besonderem Maße an der Erkennung von bakteriellen Krankheitserregern beteiligt, wobei TLR-2 als Heterodimer entweder mit TLR-1 oder -6 vorliegt [23, 24]. TLR-4 bildet Homodimere und liegt in Verbindung mit dem Lymphozyten Antigen 96 (MD-2) vor, welches essentiell für die Reaktion auf LPS ist [25, 26]. Der Kontakt zu den jeweiligen Liganden der TLR führt zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade, die im nächsten Abschnitt dargestellt wird.

### **1.3.2 Signalkaskade der TLR**

Transmembran-Proteine verfügen über eine extrazelluläre Domäne und eine zytoplasmatische Region. Über diese findet die Signalübertragung von der Außenseite der Zelle ins Innere statt. Im Falle der TLR besteht die extrazelluläre Domäne wie beim Toll-Protein der Drosophila aus sich wiederholenden Leucin-reichen Einheiten (*leucine-rich repeats*, LRR). Die zytoplasmatische Region ist homolog zu der Signal-übertragenden Domäne des Interleukin-1-Rezeptors und wird Toll/IL-1R-Homologie-Domäne (TIR-Domäne) genannt [27].

Während der in Abb. 3 dargestellten Signaltransduktion in die Zelle binden Adapterproteine an die TIR-Domäne der TLR. Ein zentrales Adapterprotein ist der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88). Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl die Reaktion auf LPS [28], als auch die Zellaktivierung durch TLR-2-Liganden von MyD88 abhängen [29, 30]. Weitere Adapterproteine sind das TIR-Domäne enthaltende Adapterprotein (TIRAP) [31] und das Toll-Rezeptor assoziierte Molekül (TRAM) [32].

Über den TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6) [33] und verschiedene IL-1-Rezeptor assoziierte Kinasen (IRAK1 und IRAK4) wird das Signal intrazellulär vermittelt, was zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt [34]. Auch das kostimulatorische Molekül B7.1 wird sezerniert, welches für die Aktivierung naiver T-Zellen benötigt wird [35]. So wird eine weitere Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem hergestellt.

Abgesehen vom TLR-3 vermitteln alle TLR ihre Wirkung über diesen MyD88-abhängigen Weg. In Ergänzung dazu wurde bei MyD88-knock-out-Mäusen ein weiterer, zusätzlicher Mechanismus gefunden, über den die Wirkung von doppelsträngiger Virus-RNA über TLR-3 vermittelt wird und ebenso ein Teil der LPS-Wirkung über TLR-4 [36, 37]. Dieser Mechanismus wird MyD88-unabhängiger Weg genannt. Die Signaltransduktion verläuft in diesem Fall über TRAM und den TLR-assoziierten Aktivator von Interferon (TRIF) [38]. Er führt über IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Produktion [39].



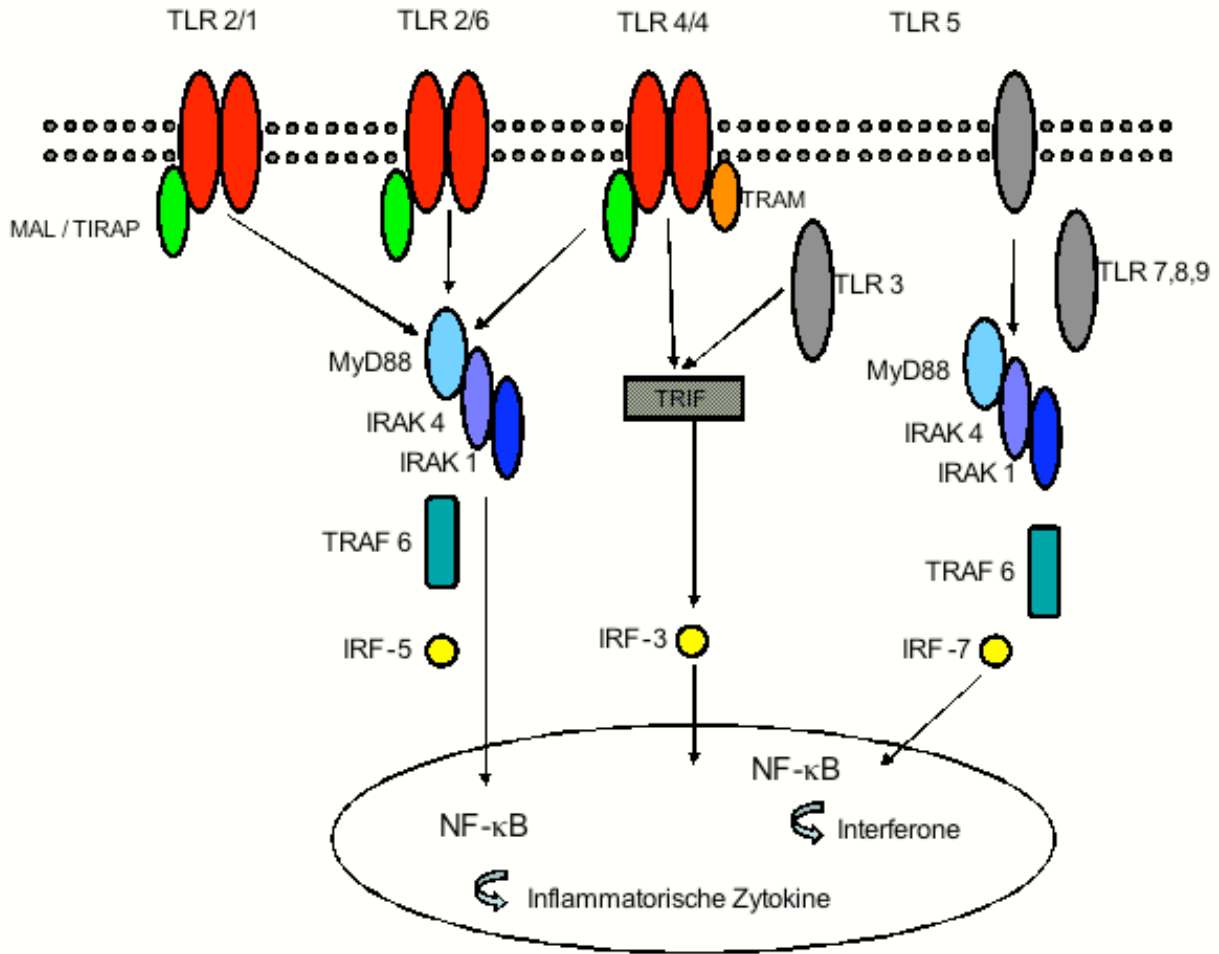


Abb. 3 **Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren**

Dargestellt sind die intrazellulären Vorgänge, die durch Aktivierung der jeweiligen TLR ausgelöst werden. Die Adapterproteine und an der Signalkaskade beteiligten Faktoren unterscheiden sich in Abhängigkeit vom TLR.

- MAL = MyD88 adaptor-like
- TIRAP = TIR-domain containing adaptor protein
- TRAM = toll receptor-associated molecule
- MyD88 = myeloid differentiation factor 88
- NF-κB = nuclear factor NF-κB
- IRAK = IL-1R-associated kinase
- TRAF = TNFR-associated factor
- TRIF = toll receptor-associated activator of interferon
- IRF = interferon regulatory factor

### 1.3.3 Funktion des LPS-bindenden Proteins

Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) ist ein Akutphase-Protein, dessen Produktion, die vornehmlich in der Leber, aber z.B. auch in Alveolar- und Intestinalepithelien stattfindet,

durch IL-1 $\beta$ , IL-6 und Dexamethason induziert wird [40]. Es liegt im Serum in den Größen 58 und 60,5 kD vor. Dabei stellt die 60,5 kD große Variante etwa 90 % der Gesamtmenge des LBP dar [41].

LBP bindet unterschiedliche bakterielle Bestandteile im Serum und vermittelt die Interaktion mit den TLR, wie in Abbildung 4 illustriert ist [42]. Zunächst wurde bekannt, dass LBP eine Bindungsstelle für Lipid A besitzt [43], welches als der endotoxische Teil innerhalb des LPS-Moleküls beschrieben wird [44]. An dieses Lipid A bindet LBP [45], um das LPS zu dem Oberflächenprotein CD14 (mCD14) auf Monozyten zu transportieren [46]. Zudem vermittelt LBP auch die Komplexbildung zwischen LPS und löslichem CD14 (sCD14) [47], was wiederum Makrophagen und Neutrophile stimuliert [48]. Für Infektionen durch Gram-negative Erreger konnte gezeigt werden, dass LBP für die Bekämpfung und Begrenzung der Infektion benötigt wird [49]. Es hat sich aber mittlerweile herausgestellt, dass LBP auch in der Lage ist, Lipopeptide unabhängig von ihrem Acylierungsmuster zu CD14-tragenden Monozyten zu transportieren [50]. Aus diesen Ergebnissen kann man entnehmen, dass LBP eine große Bandbreite von Mikroorganismen erkennt.

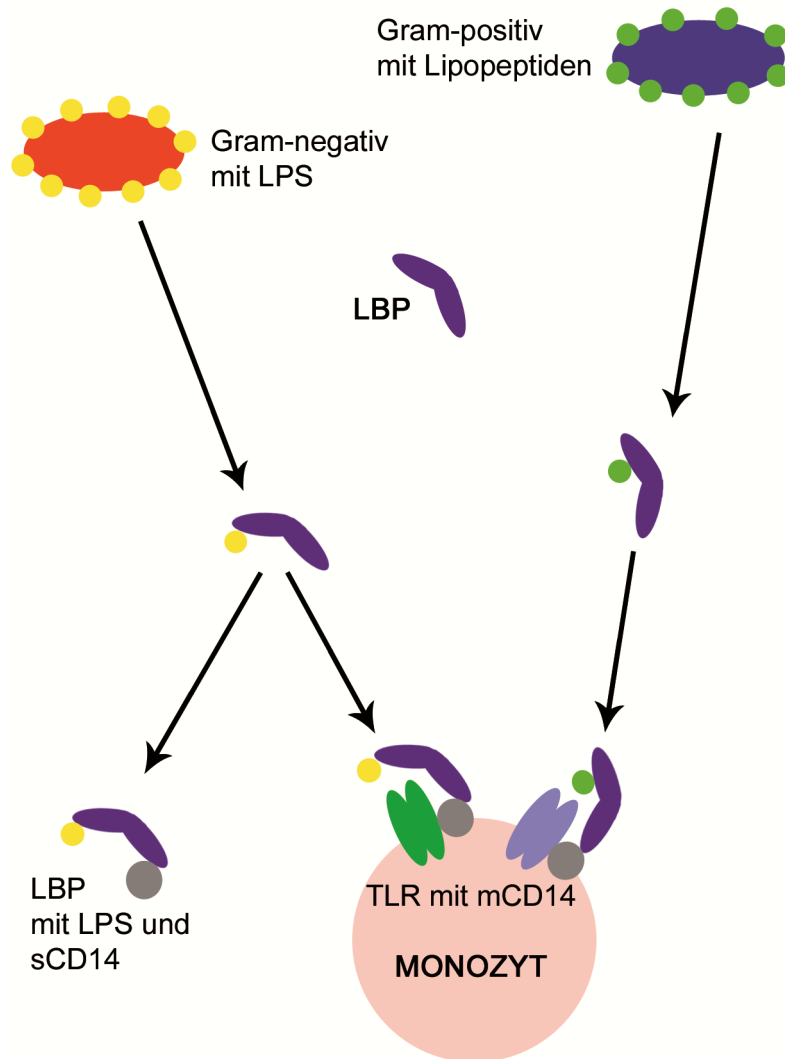


Abb. 4 Schema der Funktion von LBP

Vereinfacht dargestellt ist die Funktion von LBP, welches bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS und Lipopeptide bindet und im Serum transportiert. Es vermittelt die Interaktion zwischen diesen und beispielsweise löslichem und membranständigem CD14 und TLR auf Zellen des angeborenen Immunsystems, hier beispielhaft einem Monozyten.

#### 1.3.4 Dosisabhängige Wirkung des LBP

Über die im Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Mechanismen ist LBP an der Stimulation von Immunzellen beteiligt und hat somit eine pro-inflammatorische Wirkung und zwar sowohl in Reaktion auf Gram-negative als auch auf Gram-positive Bakterien.

Allerdings konnte in aktuellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Wirkung von LBP dosisabhängig ist. Während LBP konstitutiv in Konzentrationen zwischen 5 und 15 µg/ml im Serum vorliegt, werden während der Akut-Phase-Reaktion Konzentrationen von bis zu 200 µg/ml

erreicht [51-53]. Es hat sich herausgestellt, dass LBP in so hohen Konzentrationen bei Mäusen die inflammatorischen Effekte hemmt [54]. Das führt dazu, dass ein Anstieg der Zytokinproduktion verhindert wird. Durch die Reduktion der dadurch hervorgerufenen Leberschäden wird die LPS-induzierte Mortalität reduziert.

Dieser hemmende Effekt konnte allerdings nur für die Stimulation mit LPS und Lipoteichonsäure (LTA) [55] gezeigt werden, bei der Stimulation mit Lipopeptiden fehlt er hingegen [50]. Auch bei Patienten mit schwerer Sepsis und sehr hoher LBP-Serumkonzentration sind die LPS-Transfer-Aktivität und die ausgelöste TNF- $\alpha$ -Sekretion im Vergleich zu Gesunden vermindert, was auf LBP zurückzuführen ist [53]. Für den hemmenden Effekt gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Beispielsweise interagiert das LBP nicht nur mit bakteriellen Bestandteilen, sondern auch mit Plasmalipoproteinen, darunter das *high-density lipoprotein* (HDL) [56]. Es ist mit ApoA- und ApoB-beihaltenden Lipoproteinen assoziiert und kann LPS zu *high-density lipoproteins* (HDL) und *low-density lipoproteins* (LDL) transferieren, was zu einer Neutralisierung der LPS-Aktivität führt [57]. Dies wurde als mögliche Erklärung für die hemmende Wirkung des LBP gewertet. Allerdings wurde gezeigt, dass LBP *in vivo* nicht für die Entfernung von LPS aus dem Blutstrom nötig ist [49]. Zudem beobachtet man die Hemmung der LPS-Effekte durch LBP auch unter serumfreien Bedingungen [54], unter denen keine Lipoproteine zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse bedeuten, dass es erstens für den Transfer von LPS zu Lipoproteinen einen LBP-unabhängigen Mechanismus geben muss und dass zweitens auch LBP über andere Mechanismen verfügt, um LPS zu neutralisieren.

Für den ersten Punkt spielt möglicherweise das Phospholipid Transfer Protein (PLTP) eine Rolle. Dieses ist ebenfalls in der Lage, LPS in HDL-Partikel zu transportieren und damit das LPS zu neutralisieren. Es kann aber nicht mit CD14 interagieren und somit auch keine LPS-induzierte Immunantwort auslösen [58]. Des Weiteren ist auch sCD14 in der Lage, die Monozytenantwort auf LPS zu hemmen, indem es zellgebundenes LPS von Monozyten löst und zu Plasmalipoproteinen transferiert [59]. Bezüglich des LBP konnte mittlerweile gezeigt werden, dass es auch die Effekte von bereits an Zellen gebundenem LPS hemmen kann [60]. LBP entfernt dabei bis zu 75 % des zellgebundenen LPS von mCD14 und eine signifikante Menge LPS von MD-2. Außerdem bildet zellgebundenes LPS einen Komplex mit LBP, der mit den Zellen verbunden bleibt, wobei die genaue Lokalisation der Komplexe noch nicht aufgeklärt ist. Entweder bleiben die Komplexe an CD14 gebunden und verlieren ihre stimulatorische Wirkung allein durch die Komplexbildung oder aber sie werden zu einer anderen Lokalisation auf der Zelle verlagert, wo

sie aufgrund des fehlenden Kontakts zu mCD14 nicht mehr in der Lage sind, ihre stimulatorische Wirkung zu entfalten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Funktion von LBP auf der einen Seite die Einleitung einer schnellen Immunantwort ist, welche eine weitere Vermehrung und Ausbreitung der Erreger verhindern soll. Auf der anderen Seite ist LBP anscheinend Teil einer Immunregulation, die den Wirt vor der überschießenden Immunreaktion schützen soll. Diese kann sonst zu septischen Komplikationen führen, welche mit Organversagen, Schock und Tod verbunden sein können.

Zunächst wird das Hauptinteresse aber auf der Aktivierung des Immunsystems liegen, für die auch die Toll-like Rezeptoren essentiell sind.

### ***1.3.5 Interaktion zwischen ausgewählten Toll-like Rezeptoren und ihren Liganden***

Im Folgenden wird erläutert, welche genauen Mechanismen durch eine Bindung des jeweiligen Liganden an die TLR ausgelöst werden. Da LPS, Lipopeptide und Phospholipide zu den wichtigsten bakteriellen Liganden gehören, wird ausschließlich auf die TLR eingegangen, die für die Erkennung dieser Strukturen wichtig sind (TLR-4-Homodimere, TLR-2/TLR-1- und TLR-2/TLR-6-Heterodimere).

#### **TLR-4/MD-2**

Der TLR-4 liegt im Komplex mit MD-2 vor und vermittelt das durch LPS ausgelöste Signal durch die Plasmamembran [61, 62]. MD-2 ist ein rein extrazelluläres Protein, von dem angenommen wird, dass es die mit LPS-interagierende Komponente innerhalb des TLR-4/MD-2-Komplexes ist [26].

Dabei ist das Lipid A das zentrale Erkennungsprotein im LPS-Rezeptor-Komplex [63], welches in den hydrophoben Kern des MD-2 eingebettet wird, was zu einer Vernetzung zweier TLR-4/MD-2-Komplexe führt [64]. Kristallographisch wurde nachgewiesen, dass der LPS-Antagonist Eritoran mit seinen vier Acylketten in die hydrophobe Bindungstasche des MD-2 eingebettet wird, während es nicht mit dem TLR-4 interagiert [65]. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass LPS im Gegensatz zu Eritoran nach Bindung an MD-2 zu einer Dimerisierung der TLR-4/MD-2-Komplexe führt. Diese ist abhängig von der zentralen und/oder C-terminalen Region des TLR-4 [65]

Für die Aktivierung des TLR-4-Rezeptorkomplexes ist die Anwesenheit von LBP und CD14 erforderlich [46, 66], wobei kürzlich gezeigt werden konnte, dass LBP eine essentielle Rolle in der Vermittlung der Dimerisierung von TLR-4 durch LPS und der folgenden Einleitung der Signaltransduktion spielt [67].

### **TLR-2-Heterodimere**

Untersuchungen ergaben, dass TLR-2 entweder mit TLR-1 oder -6 assoziiert vorliegt und sowohl Lipoproteine als auch diacylierte (TLR-2/TLR-6-Heterodimere) und triacylierte Lipopeptide (TLR-2/TLR-1-Heterodimere) zahlreicher Erreger erkennt [68]. TLR-2 tragende Zellen werden außerdem durch das Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus* stimuliert [69]. Die Immunantwort auf Lipopeptide ist dabei mit der Expression von TLR-2 korreliert, dessen Empfindlichkeit gegenüber Lipopeptiden etwa zehnmal höher ist als gegenüber LPS [70]. Auch bei den ebenfalls erkannten Lipopeptiden von Mykobakterien hängt die Reaktion der unterschiedlichen Heterodimere vom Acylierungsmuster der Lipopeptide ab [23, 24].

Weiteren Aufschluss über die genauen Vorgänge bei der Ligandenbindung sollen kristallographische Untersuchungen liefern. Dabei konnte von Jin *et al.* gezeigt werden, dass TLR-1, -2 und -4 aus drei Domänen aufgebaut sind (N-terminal, zentral und C-terminal) [71]. Sie bilden eine konvexe Form und lagern sich in der Mitte der Heterodimere aneinander, sodass eine M-förmige Struktur entsteht.

Bei der Bindung von triacylierten Lipopeptiden durch TLR-2/TLR-1-Heterodimere werden zwei der Lipidketten des Lipopeptids in einer Tasche des TLR-2 eingebettet, während die dritte Lipidkette in einer Art Tunnel des TLR-1 liegt. Dadurch überbrückt das Lipopeptid die beiden TLR [71]. Die diacylierten Lipopeptide, die von dem TLR-2/TLR-6-Heterodimer gebunden werden, besitzen keine Amid-gebundenen Lipidketten, mit denen sie die TLR überbrücken können. Deshalb wurde bereits vermutet, dass in der Signaltransduktion durch die diacylierten Lipopeptide die Kopfgruppe und die Randgruppen eine größere Rolle spielen. Kürzlich wurde in diesem Zusammenhang die Kristallstrukturen von folgenden Komplexen aufgeklärt: TLR-2/TLR-6/diacylierte Lipopeptide, TLR-2/Lipoteichonsäure und TLR2-PE-DTPA („*phosphoethanolamin-diethylenetriaminepentaacetic acid*“) [72]. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass die Spezifität des TLR-2/TLR-6-Komplexes für diacylierte Lipopeptide durch eine Blockierung des Lipidkanals durch zwei Phenylalanine zustande kommt. Eine Mutation beider Phenylalanine resultiert in einer vollständigen Reaktivität des TLR-2/TLR-6 auch auf triacylierte Lipopeptide. Im Falle des ursprünglichen TLR-2/TLR-6-Komplexes wird die fehlende Amid-Lipid-

Interaktion anscheinend durch eine um 80 % erhöhte hydrophobe Dimerisierung kompensiert. Die Strukturen der TLR-2/LTA- und TLR-2/PE-DTPA-Komplexe weisen schließlich darauf hin, dass eine genaue Interaktion von Kopfgruppen für die Immunantwort der TLR-2-Heterodimere essentiell ist.

Durch die Dimerisierung der Rezeptorkomplexe wird die in Abb. 3 dargestellte Signalkaskade ausgelöst.

Auch die TLR-2-vermittelte Zytokinantwort ist abhängig von LBP. Dieses bindet außer Lipopeptiden auch die LTA Gram-positiver Bakterien [73], wobei auch die Aktivierung des TLR-2 durch die LTA von *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* von der Anwesenheit von LBP und CD14 abhängig ist [55].

### 1.4 Dreidimensionale Struktur des LBP

Für die Funktion von Proteinen ist ihre dreidimensionale Struktur entscheidend. Im Rahmen dieser Arbeit werden Mutationen innerhalb von LBP und eventuelle funktionelle Auswirkungen behandelt. Deshalb ist es wichtig, zunächst die ursprüngliche Struktur des Proteins zu kennen, die dem aktuellen Kenntnisstand entsprechend dargestellt wird.

Abgesehen vom LBP gibt es drei weitere Proteine mit ähnlicher Funktion: das Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP), das Cholesterol-Ester-Transfer-Protein (CETP) und das Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI). Diese Proteine werden als Lipid-Transfer- und LPS-bindende Proteine zusammengefasst [74]. Auf der cDNA-Ebene zeigen diese Proteine eine Übereinstimmung von 45 - 65 % [75], wobei es bestimmte konservierte Regionen gibt, die alle Proteine teilen. So wurde im CETP ein C-terminales Oktapeptid identifiziert, das Lipoprotein-Partikel bindet und das auch in den drei anderen Proteinen nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren beinhalten alle vier Proteine vier Prolin- und zwei Cystein-Restgruppen, die dem Transport lipidhaltiger Strukturen in wässriger Umgebung dienen. Diese konservierten Cysteingruppen werden auch in anderen Proteinen gefunden, die mit den bereits genannten eine größere Gruppe entfernt verwandter Säugetierproteine bilden. Im Einzelnen sind dies PLUNC (*palate, lung and nasal epithelial clone*) und PSP (*parotid secretory protein*), die den BPI-Proteinen in Größe und Sequenz ähneln und mit diesen zur BPI/PLUNC/PSP-Familie zusam-

mengefasst werden [76]. Besonders groß ist die Übereinstimmung dabei zwischen LBP und BPI. Laut den Untersuchungen von Hubacek *et al.* ist die Exon-Verteilung und -Länge in der LBP- und der BPI-Sequenz fast identisch. Das LBP-Gen besteht demnach aus 14 Exons und hat eine Länge von 28.5 kb, das BPI-Gen hat eine Länge von 31.5 kb und besteht aus 15 Exons. Beide Gene sind auf dem Chromosom 20q12-q13.1 lokalisiert [77]. Auf Exon 3 und 4 wird ein besonders konservierter Aminosäurerest kodiert, der eine ungewöhnliche Ansammlung basischer Aminosäuren darstellt und die Region innerhalb des LBP, die die höchste Amphipathie aufweist. Dieser Bereich liegt N-terminal und durch Struktur-Funktions-Analysen konnte die N-terminale Region des LBP als LPS-Interaktionsbereich charakterisiert werden. Die Interaktion mit CD14 verläuft hingegen im C-terminalen Bereich [78, 79].

In der Aufklärung der räumlichen Struktur der Proteine spielen die Röntgenstrukturanalysen des BPI eine große Rolle, da aufgrund der hohen Übereinstimmung zwischen den Sequenzen eine ähnliche Form auch für die anderen Proteine angenommen wird.

Wie in Abbildung 5 erkennbar zeigt das BPI eine bumerangähnliche Form mit zwei Domänen, die N- und C-terminal liegen und sich strukturell sehr ähneln, aber in ihrer Sequenz unterscheiden. Sie sind aus einer kurzen  $\alpha$ -Helix, einem  $\beta$ -Faltblatt und einer längeren  $\alpha$ -Helix aufgebaut und werden als „tonnenförmig“ beschrieben [80]. Die Verbindung zwischen beiden Domänen wird durch eine Prolin-reiche 21 Aminosäuren lange Sequenz hergestellt, die ein  $\beta$ -Faltblatt bildet. Diese Form der Faltung ist bisher in keinem anderen Protein beschrieben worden.

Der für die LPS-Bindung wichtige N-terminale Bereich ist kationisch und durch Deletion verschiedener Einheiten konnte gezeigt werden, dass die Bereiche der Aminosäuren 17 bis 45 (kurze Helix), 82 bis 108 und 142 bis 169 (längere Helix) für die LPS-Bindung essentiell sind. Um die Interaktion zwischen LBP und LPS genauer zu untersuchen, wurden LBP-Formen hergestellt, bei denen jeweils einzelne Aminosäuren innerhalb des N-terminalen Bereiches ausgetauscht wurden. Besonders groß war die Auswirkung des Austausches der Aminosäuren Arginin und Lysin an den Positionen 94/95 durch Glutaminsäure. Die als E94/95 bezeichnete Mutante verlor vollständig die Fähigkeit, LPS-Monomere zu binden und sie zu Monozyten zu transportieren. In der Folge war keinerlei zellstimulatorische Aktivität dieser Mutante zu beobachten [81]. So konnte der Bereich der Aminosäuren 94/95 als essentiell für die Bindung von LPS-Monomeren und die resultierende Zellstimulation charakterisiert werden.

Allerdings war die Bindung von LPS-Aggregaten an CD14, die keine zellstimulatorische Wirkung hat, durch den Aminosäureaustausch nicht beeinträchtigt, was auf das Vorliegen weiterer Bindungsstellen mit anderen Funktionen hinweist.



Das C-terminale Ende ist im Wesentlichen neutral und zeigt eine eingeschränkte LPS-neutralisierende Wirkung.

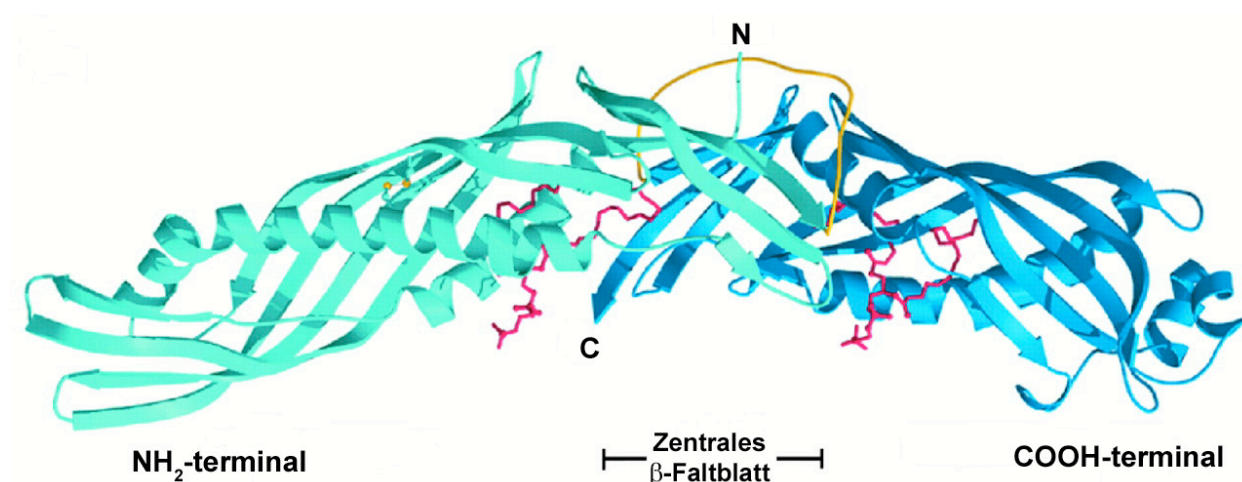


Abb. 5 **Dreidimensionale Struktur des BPI**

Deutlich kann man die bumerangähnliche Form des BPI erkennen. Die  $\text{NH}_2$ -terminale Domäne wird als der LPS-Interaktionsbereich bezeichnet, der C-terminalen Domäne werden unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben. Im Falle des BPI wurde sowohl über eine LPS-neutralisierende Wirkung [82, 83] als auch über die Förderung der Phagozytose durch Neutrophile [84] berichtet. Für das LBP scheint die Funktion der C-terminalen Domäne in der Interaktion mit CD14 zu liegen [78]. In rot dargestellt sind zwei gebundene Phosphatidylcholin-Moleküle, die jeweils zwischen den terminalen Domänen und dem verbindenden  $\beta$ -Faltblatt liegen [80].

Die in Abbildung 5 dargestellten Phosphatidyl-Moleküle werden in zwei apolaren Bindungstaschen gebunden, die an der konkaven Seite des Bumerangs und jeweils zwischen der „Tonnenform“ der C- bzw. N-terminalen Domäne und dem zentralen  $\beta$ -Faltblatt liegen. Die Interaktion verläuft hauptsächlich über die Acylketten der Phosphatidylcholine [80]. Das das LPS und das Phosphatidylcholin strukturelle Gemeinsamkeiten zeigen, darunter negativ geladene Phosphatgruppen und Acylketten, könnten diese Bindungstaschen auch an der LPS-Interaktion beteiligt sein.

Bisher ist BPI das einzige Protein der Familie, dessen dreidimensionale Struktur kristallographisch aufgeklärt wurde. Allerdings gibt es bekanntermaßen eine große Übereinstimmung in den Sequenzen von BPI und LBP. In den Bereichen, in denen sich die apolaren Bindungsta-

schen befinden, ist diese Übereinstimmung besonders hoch [85], weshalb postuliert wurde, dass die Bindungstaschen auch innerhalb des LBP-Moleküls existieren und dort in der Lage sind neben LPS auch Phospholipide zu binden.

Das Bindungsverhalten von LBP gegenüber Phospholipiden wurde in einer vorliegenden Dissertation untersucht [86]. In dieser konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass es zu einer Bindung von LBP an Phosphatidyl-Inositol und Phosphatidyl-Ethanolamin kommt. Weitere Versuche, für die rekombinant hergestelltes LBP in Wildtyp-Form und diverse Mutanten verwendet wurden, führten allerdings nicht zu überzeugenden Ergebnissen. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Bindungsverhalten gegenüber Phospholipiden weiter untersucht, wofür das 3-sn-Phosphatidylethanolamin aus *E. coli* verwendet wurde. Dieses zeigt wie in Abbildung 6 dargestellt ebenfalls eine Acylkette, mit der es in den Phospholipidbindungstaschen gebunden werden könnte.

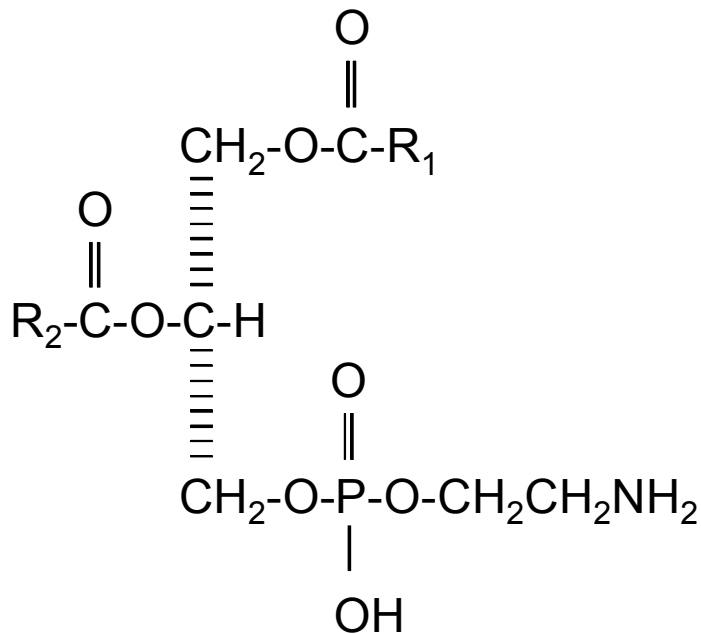


Abb. 6 **Chemische Struktur des Phosphatidylethanolamins**

Dargestellt ist die Strukturformel des Phosphatidylethanolamins aus *E. coli*, das für Bindungsversuche verwendet wurde. Es verfügt wie die Lipopeptide ebenfalls über eine Acylkette, die eine wichtige Rolle in der Interaktion mit LBP spielen könnte.

## 1.5 Polymorphismen und ihre Auswirkungen

### 1.5.1 Genetische Variabilität

Immer wieder sieht sich die Medizin mit interindividuellen Unterschieden konfrontiert, die sich in unterschiedlichen Krankheitsempfänglichkeiten und -verläufen widerspiegeln. Auf der Suche nach so genannten Wirtsfaktoren, die diese Unterschiede erklären, sind in letzter Zeit genetische Variationen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Im Bereich des Immunsystems sind dies vor allem Mutationen und Polymorphismen, die einzelne Moleküle betreffen.

Bei den so genannten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) kommt es zum Austausch eines einzelnen Nukleotids. Cytosin beispielsweise ist anfällig gegenüber Methylierung, wodurch in der Folge Thymin entsteht. Deshalb ist der Austausch von Cytosin zu Thymin der am häufigsten auftretende SNP. Insgesamt sind 90 % aller Mutationen solche Punktmutationen. Um die möglichen Auswirkungen von Punktmutationen zu verstehen,

sind einige genetische Grundkenntnisse erforderlich, die im Folgenden in Anlehnung an Harrisons Innere Medizin Bd. 1 kurz dargestellt werden [87].

Bekanntermaßen besteht die DNA aus vier Basen (Cytosin = C, Thymin = T, Adenin = A, Guanin = G), die zu 64 Basentripletts, den so genannten Codons kombiniert werden. Drei Codons sind Stoppcodons, die restlichen 61 codieren für die 20 proteinogenen Aminosäuren. Daraus wird schnell ersichtlich, dass mehrere Tripletts für dieselbe Aminosäure codieren müssen. Die für dieselbe Aminosäure codierenden Tripletts unterscheiden sich oft nur in einer Base. Häufig handelt es sich dabei um die letzte Base, während die ersten beiden identisch sind.

Für Punktmutationen heißt dies, dass ein Austausch einer einzelnen Base ohne jegliche Auswirkung bleiben kann, wenn das dadurch entstehende Triplet für dieselbe Aminosäure wie das ursprüngliche codiert. Zum Beispiel codiert das Triplet CCT für die Aminosäure Prolin. Wird an der letzten Position des Triplets Thymin durch eine der drei anderen Basen ausgetauscht, resultiert eine Veränderung des Codons. Allerdings codieren auch die Tripletts CCC, CCA und CCG für Prolin, die Aminosäuresequenz bleibt unverändert. Wird allerdings das mittlere Cytosin durch Thymin ausgetauscht, wird an der entsprechenden Stelle statt Prolin die Aminosäure Leucin eingebaut. Welche Auswirkungen das hat, hängt von dem jeweiligen Protein und der Art des Aminosäureaustausches ab. Entsteht eine Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften, kann die Funktion des Proteins gar nicht oder wenig verändert sein. Es ist aber auch möglich, dass die chemische Struktur des Proteins so empfindlich gestört ist, dass es instabil wird und zerfällt. Befindet sich die Mutation in einem für die Funktion wichtigen Areal, z. B. in Bindungsbereichen, kann die Funktion erheblich eingeschränkt sein (*loss-of-function*-Mutation). Zum Teil führt dies bereits embryonal zum Tod (letale Mutation) oder aber zu erheblichen Veränderungen im Organismus. Punktmutationen können aber auch zu einer verbesserten Funktion führen (*gain-of-function*-Mutation).

Bei allen möglichen Auswirkungen muss zwischen Individuen unterschieden werden, die auf beiden Allelen die Information für das veränderte Protein tragen und solchen, die sowohl die Information für das mutierte als auch die für das ursprüngliche Protein besitzen. Erstere bezeichnet man als homozygot, letztere als heterozygot. Die „normale“ Form des Proteins wird als Wildtyp bezeichnet. Die Verteilung der Allele innerhalb einer Population wird mithilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes dargestellt. Dabei geht man von einer idealen Population aus, die eine große Anzahl an Individuen beinhaltet, die sich untereinander ohne Einschränkungen fortpflanzen. Außerdem dürfen weder Mutationen noch Selektion oder Migration stattfinden. Sind diese

Bedingungen erfüllt, kann man aus einer gegebenen Allelfrequenz die Häufigkeit des Genotyps berechnen und umgekehrt.

Bei einer Studienpopulation mit bekannter Allel- und Genotypfrequenz muss überprüft werden, ob sich diese im so genannten Hardy-Weinberg-Equilibrium befindet, um die Repräsentativität der untersuchten Population nachzuweisen.

### ***1.5.2 SNP und Infektionen***

Oft führen Punktmutationen nicht zu offensichtlichen phänotypischen Unterschieden, sondern zu diskreten Veränderungen, die sich nur in dem Bereich niederschlagen, in dem das veränderte Protein eine wichtige Funktion erfüllt.

So konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte TLR-4-Polymorphismen sowohl eine reduzierte Immunantwort auf LPS als auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Malaria zur Folge haben [88, 89]. Auch für andere TLR konnten Polymorphismen identifiziert werden, die eine Auswirkung auf den Verlauf von Infektionskrankheiten haben [90]. Für LBP wurde beispielsweise ein Polymorphismus im Promotorbereich gefunden, der das erhöhte Risiko einer Bakteriämie zur Folge hat [91]. Von mehreren anderen bekannten Polymorphismen wurden zwei für diese Arbeit untersucht, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### **SNP rs2232613 c998t -> Pro333Leu**

Beim ersten SNP handelt es sich um den SNP rs2232613, der durch einen Austausch von Cytosin zu Thymin an der Stelle 998 zu einer veränderten Nukleotidsequenz führt. Dieser Austausch resultiert in der Veränderung der Aminosäuresequenz an der Stelle 333, wo statt eines Prolins die Aminosäure Leucin in das Protein eingebaut wird.

Das erste Mal wurde dieser Polymorphismus in der DNA von Kindern identifiziert, bei denen mit den in der Routinediagnostik verwendeten Methoden kein LBP detektierbar war. In Vorarbeiten konnte anschließend gezeigt werden, dass der Polymorphismus das Bindungsverhalten des LBP gegenüber LPS und Lipopeptiden beeinträchtigt und dass auch die durch diese Liganden ausgelöste Immunantwort deutlich verringert ist (Dissertation Jana Kristin Eckert, 2009).

### **SNP rs2232618 t1341c -> Phe436Leu**

Beim zweiten Polymorphismus rs2232618 kommt es an der Stelle 1341 zu einem Austausch von Thymin zu Cytosin, woraufhin an der Stelle 436 der Aminosäuresequenz statt Phenylalanin Leucin entsteht.

Ursprünglich wurde dieser Polymorphismus als c1306t (Pro436Leu) beschrieben [92]. Laut neuerer Sequenzdaten befindet sich an der Stelle 436 allerdings Phenylalanin. Für diese Aminosäure kodiert der Bereich 1341 bis 1343 der Nukleotidsequenz. Für die Position 1341 wird ein C -> T-Austausch beschrieben, der bewirkt, dass statt der Aminosäure Leucin Phenylalanin in das Protein eingebaut wird. Die T-Variante (TTC), die zur Veränderung der Aminosäuresequenz führt, ist in der europäischen Bevölkerung die häufiger vorkommende und auch die für Vorarbeiten verwendeten rekombinant hergestellten LBP-wt-Formen weisen diese Form auf. Aufgrund dieser Daten wird in der vorliegenden Arbeit die LBP-Form mit Phenylalanin an der Stelle 436 als Wildtyp bezeichnet und von einem Austausch in der Basenfolge der DNA von Thymin zu Cytosin gesprochen.

Die Auswirkung dieses Polymorphismus wurde bisher funktionell noch nicht untersucht.

## **1.6 Bakterielle Meningitis**

Eine auch heute noch gefürchtete Erkrankung ist die Meningitis. Dabei handelt es sich um eine Entzündung der Meningen (weiche Hirnhäute), die durch unterschiedliche Erreger (sowohl Viren als auch Bakterien) hervorgerufen werden kann und unterschiedliche Verläufe zeigt. Hier wird der Schwerpunkt auf die bakterielle Meningitis gelegt, bei der die Meningen, der Subarachnoidalraum und der angrenzende Kortex von der entzündlichen Reaktion betroffen sein können. Basierend auf dem Kapitel „Akute bakterielle Meningitis“ aus Harrisons Innere Medizin 2 werden an dieser Stelle kurz die Grundlagen der Erkrankung dargestellt [93].

Mit einer Inzidenz von 2,5 Erkrankungen auf 100 000 Einwohner stellt die bakterielle Meningitis eine der häufigsten eitrigen intrakraniellen Infektionen dar. Das Erregerspektrum unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Alter der Erkrankten: Während bei Neugeborenen *E.coli* und *B-Streptokokken* ( $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken der Gruppe B; *S. agalacticae*) dominieren, wird der größte Teil der Meningitiden bei Kindern und Erwachsenen durch *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen. Bei Kindern spielt auch die Meningitis durch *Hae-*

*mophilus influenzae* weiterhin eine Rolle, wobei der Anteil durch die Schutzimpfung stark zurückgegangen ist.

Insgesamt dominiert *S. pneumoniae* als Erreger einer bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen über 20 Jahren, *N. meningitidis* löst fast 60 % der bakteriellen Meningitiden im Alter zwischen 2 und 20 Jahren aus. Aufgrund dieser Verteilung wird der Fokus auf diesen beiden Erregern liegen.

Die meisten Meningitis-Erreger werden durch Tröpfcheninfektion übertragen. Anschließend erfolgt eine hämatogene Ausbreitung und die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, wonach die Erreger sich im Subarachnoidalraum weitgehend ungestört vermehren können, da hier aufgrund der Immunprivilegiertheit des ZNS verhältnismäßig wenig Immunglobuline, Antikörper und Komplementfaktoren vorhanden sind. Die akute bakterielle Meningitis führt schnell zu einem lebensbedrohlichen Zustand – bei Meningitiden durch *N. meningitidis* liegt die Letalität bei 3-7 %, für *S. pneumoniae* bei 20 %. Außerdem kommt es bei etwa 25 % der Erkrankten nach überlebter Meningitis-Erkrankung zu bleibenden Schädigungen, die sich in unterschiedlich stark ausgeprägter Minderung der intellektuellen Fähigkeiten, Gedächtnisstörungen, epileptischen Anfällen, Hörverlust oder Gangstörungen äußern können.

Bei Besiedelung des Liquorraums wird durch Astrozyten und Mikroglia eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die großen Anteil an der schädigenden Wirkung bei Meningitits hat und im Einzelnen folgendermaßen abläuft: Nach der Besiedelung des Nasopharyngealraums erfolgt eine Ausbreitung in den Intravasalraum, von wo aus die Bakterien den intraventrikulären Plexus chorioideus erreichen. Durch Lyse der Bakterien wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die zur Bildung eines eitrigen Exsudats im Subarachnoidalraum führt. Pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 und Chemokine führen zur Anlockung weiterer Leukozyten und zur gesteigerten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Der resultierende Einstrom von Zellen und Proteinen in das bereits eitrige Exsudat behindert den Liquorfluss, was in der Entstehung eines obstruktiven Hydrozephalus resultiert. Zudem führen die Zytokine zur Freisetzung von weiteren Mediatoren und reaktiven Metaboliten, die zytotoxisch wirken. Im Laufe der Erkrankung geht die Fähigkeit zur zerebrovaskulären Autoregulation verloren, außerdem kann es durch eine begleitende Vaskulitis zu Gefäßverengungen kommen.

In der Summe führen diese Vorgänge zu einem gleichzeitig interstitiellen, vasogenen und zytotoxischen Ödem. Das Ödem kann für sich genommen oder in Verbindung mit thrombotischen

Komplikationen oder einer Herniation zu Ischämie, Infarzierung und damit bleibenden Schäden führen.

In der Vergangenheit wurde versucht, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären.

Dabei ist bekannt, dass Astrozyten TNF- $\alpha$  freisetzen, wenn sie mit LPS [94] oder Pneumokokken-Zellwandbestandteilen [95] stimuliert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch zerebrale Endothelzellen in Antwort auf Stimulation mit Zellwänden von Pneumokokken TNF- $\alpha$  sezernieren und die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*) heraufregulieren, was als möglicher Faktor für die Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke diskutiert wird [96].

Auch das LBP scheint im Zusammenhang mit der Immunreaktion im zentralen Nervensystem (ZNS) beteiligt zu sein. So bindet es an das Glykangerüst der Pneumokokkenzellwand und ist in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) von Meningitis-Patienten deutlich erhöht [97]. LBP-Knock-out-Mäuse zeigen einen verringerten Leukozyteneinstrom in die CSF, was mit einem verringerten Hirnödem, verringertem intrakraniellen Druck und reduziertem neuronalen Schaden einhergeht [97].

Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt es nahe, dass LBP eine Rolle bei der Aktivierung von Immunvorgängen während der Meningitis spielen könnte. Diese Aktivierung scheint aber durch die ausgelöste Immunreaktion einen negativen Effekt zu haben.

### **1.7 Herleitung der Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit**

Da LBP in der Immunantwort auf bakterielle Stimuli eine große Rolle spielt, ist ein genaueres Verständnis seiner dosisabhängigen Wirkung wichtig, um pathologische Wirkungen von Bakterien zu verstehen. Genetische Variationen bieten einerseits die Möglichkeit, anhand resultierender Funktionsausfälle auf die normale Funktion des Proteins zu schließen, andererseits bieten sie auch eine mögliche Erklärung für die großen interindividuellen Unterschiede in Hinsicht auf Krankheitsanfälligkeit und -verlauf.

Anhand einer Fall-Kontroll-Studie wurde bereits der Einfluss verschiedener LBP-Polymorphismen auf den Verlauf der Sepsis untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der SNP Cys98Gly und männliches Geschlecht mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Sepsis



korreliert ist. Außerdem scheinen sich dieser SNP und das Vorliegen von Leucin an der Stelle 436 negativ auf den Verlauf der Sepsis auszuwirken [92].

In funktionellen Untersuchungen des Polymorphismus c998t zeigte sich eine verminderte Bindung gegenüber LPS und Lipopeptiden im Vergleich zu Wildtyp-LBP. Zunächst wird deshalb untersucht, ob auch der Polymorphismus t1341c zu einem veränderten Bindungsverhalten gegenüber bakteriellen Liganden führt.

Aufgrund der postulierten Phospholipidbindungstaschen werden anschließend Bindungsversuche mit einem Phospholipid durchgeführt, wobei Seren von freiwilligen Probanden bekannten Genotyps und rekombinant hergestelltes LBP in allen drei Formen (wt, c998t, t1341c) verwendet werden.

Weiter zeigen Vorergebnisse, dass der LBP c998t-SNP in verschiedenen Zellsystemen nach Stimulation mit unterschiedlichen bakteriellen Liganden zu einer verringerten TNF- $\alpha$ -Antwort führt. Mit Zellstimulationsversuchen wird der Frage nachgegangen, ob das auch bei dem Polymorphismus t1341c der Fall ist.

Schließlich werden beide Polymorphismen im Hinblick auf das Krankheitsbild der Meningitis untersucht. Es ist bekannt, dass LBP auch im Liquor vorhanden ist, allerdings in sehr viel geringeren Konzentrationen als im Serum. Aufgrund dieses Umstandes und der Rolle des LBP in der frühen Immunantwort erscheint es möglich, dass ein Funktionsverlust aufgrund von Polymorphismen sich auf die Anfälligkeit gegenüber Meningitis auswirkt. Da bei Infektionen im zentralen Nervensystem die körpereigene Abwehr anscheinend großen Anteil an der schädigenden Wirkung hat, erscheint gerade hier die Erforschung der immunregulatorischen Funktion des LBP interessant.

Zu diesem Zweck werden DNA-Proben von Kindern, die an Neisserien-Meningitis erkrankt sind, auf beide LBP-Polymorphismen untersucht. Die Polymorphismusverteilung innerhalb eines gesunden Kontrollkollektivs wird mit der innerhalb des Patientkollektivs verglichen, um erste Aussagen über mögliche Auswirkungen auf die Anfälligkeit gegenüber Meningitis in Korrelation zum Genotyp zu treffen.

## 2 Materialien und Geräte

### 2.1 Chemikalien

Die standardmäßig verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, B. Braun Melsungen AG und Fluka Chemie bezogen.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen erfolgte die Desinfektion mit vergälltem Ethanol.

<i>Aqua B. Braun</i>	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</i>
<i>Bovines Serum Albumin Fraktion V</i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Dulbecco's PBS, Without Ca &amp; Mg</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>Fetal Calve's Serum (FCS)</i>	<i>Biochrom AG Culture of the Cell, Berlin, Deutschland</i>
<i>Hepes</i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>KCl</i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>NaCl</i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz</i>

## 2.2 Geräte

<i>Mikroliterspritze</i>	<i>Hamilton, Bonaduz, Schweiz</i>
<i>Reusable Autoclavable Vacu-Pette/96™</i>	<i>Scienceware, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<i>Vortexer REAX 2000</i>	<i>Heidolph, Kelheim, Deutschland</i>
<i>Zentrifuge GS-15R Centrifuge</i>	<i>Spinco Division, Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien</i>
<i>Centrifuge 5415 C</i>	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
<i>Sicherheitswerkbank HSP 12</i>	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland</i>
<i>Photometer Spectra Fluor Plus</i>	<i>Tecan, Crailsheim, Deutschland</i>
<i>LightCycler inkl. Software Version 3.5</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland</i>
<i>LightCycler® Centrifuge Adapters 1 909 312</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland</i>
<i>SevenEasy pH-Meter</i>	<i>Mettler Toledo InLab®, Gießen, Deutschland</i>
<i>Ultraschallwasserbad</i>	<i>Unitra Unima, Olsztyn, Polen</i>

## 2.3 Verbrauchsmaterial

<i>Blue Max 50 ml Polypropylene Conical Tube Ref 352070</i>	<i>Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>15 ml High Clarity Polypropylene Conical Tube Ref 352096</i>	<i>Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Einwegpipettenspitzen 100-1000 µl 0,5-10 µl und 10-200 µl</i>	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland</i>

<i>Pipettenspitzen Filtertips (0,5-10 µl)</i>	<i>Neolab, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Zellkulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup> 90076, Lot 20080153</i>	<i>TPP®, Trasadingen, Schweiz</i>
<i>Zellkulturplatten</i>	<i>TPP®, Trasadingen, Schweiz</i>
<i>CELLine 350</i>	<i>Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland</i>
<i>Mikrotiterplatte</i>	<i>Greiner, Frickenhausen, Deutschland</i>
<i>Multi-Adapter für S-Monovetten</i>	<i>Sarstedt Aktiengesellschaft &amp; Co., Nürnbrecht, Deutschland</i>
<i>S-Monovetten®</i>	<i>Sarstedt Aktiengesellschaft &amp; Co., Nürnbrecht, Deutschland</i>
<i>Vacutainer® Brand Blood Collection Sets</i>	<i>Becton Dickinson Vacutainer Systems, Heidel- berg, Deutschland</i>
<i>LightyCycler® Capillaries 04 929 292 001</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland</i>
<i>MultiGuard Barrier Tips Pipettenspitzen DNase / RNase frei</i>	<i>Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, Utah</i>

## 2.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien

### Allgemein benötigte Lösungen und Reagenzien

<i>PBS pH 7,4</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Öster- reich</i>
<i>10 x PBS</i>	<i>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> mit destilliertem Wasser auf 2 l auffüllen pH 7,4</i>
<i>Bovines Serumalbumin (BSA)</i>	<i>New England BioLabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland</i>

## Materialien und Geräte

---

<i>FCS</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>LPS von E. coli 0111:B4</i>	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<i>LPS von Salmonella minnesota Re 595</i>	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<i>Pam<sub>2</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub> x 3 TFA</i>	<i>EMC Microcollection, Schwalbach/Taunus, Deutschland</i>
<i>Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub></i>	<i>EMC Microcollection, Schwalbach/Taunus, Deutschland</i>
<i>3-sn-Phosphatidylethanolamin-Lösung 60647-10MG</i>	<i>Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<b>Puffer</b>	
<i>Carbonatpuffer, pH 8,2</i>	<i>4,2 NaHCO<sub>3</sub> mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen pH 8,2 einstellen</i>
<i>Carbonatpuffer, pH 9,5</i>	<i>4,2 g NaHCO<sub>3</sub> 1,78 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen pH 9,5 einstellen</i>
<i>100 mM Sodium Phosphate, pH 6,0</i>	<i>0,54 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,04 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit destilliertem Wasser auf 250 ml auffüllen pH 6,0 einstellen</i>
<i>HEPES-Puffer</i>	<i>11,92 g HEPES 8,77 g NaCl mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen pH 7,4 einstellen</i>
<i>Inkubationspuffer für TNF- und IL-6-ELISA</i>	<i>2,5 % FCS in Waschpuffer</i>
<i>Inkubationspuffer für hLBP-ELISA</i>	<i>Hepes-Puffer mit 1% BSA</i>
<i>Blockierpuffer für hLBP-ELISA</i>	<i>10 % Milchpulver in PBS / Tween 20</i>
<i>Waschpuffer für ELISA</i>	<i>100 ml 10 x PBS mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen 0,5 ml Tween 20</i>

*Wasch- und Inkubationspuffer für Bindungsassays*     *1 mg/ml BSA in Hepes-Puffer*

*Blockierungspuffer für Bindungsassays*             *10 mg/ml BSA in Hepes-Puffer*

## 2.5 DNA-Extraktion und PCR

### Allgemein

*DNA-Away*     *Roth, MBP, Karlsruhe, Deutschland*

*dNTP-Set*     *Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und  
DNA Diagnostika mbH, Berlin, Deutschland*

*Gentherm 10 x Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>*                     *Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und  
DNA Diagnostika mbH, Berlin, Deutschland*

*Gentherm 50 mM MgCl<sub>2</sub>*                                     *Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und  
DNA Diagnostika mbH, Berlin, Deutschland*

*Taq-Polymerase*     *Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und  
DNA Diagnostika mbH, Berlin, Deutschland*

*QIAamp DNA Blood Mini Kit*                             *Qiagen, Hilden, Deutschland*

### Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden bezogen über TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH  
Berlin, Deutschland.

*LBP t1341c rev fin*     *Nr: 936658  
3' – gAg CCC TgT TTT CCA AgT CC*

*LBP t1341c for fin*     *Nr: 936657  
5' – TTT gCT TTT CCC AAg CgT T*

*LBP t1341c sensor*     *Nr: 936659  
5' – CTA TTA CAT CCT TAA CAC CCT CTA  
C – FL<sup>1</sup>*

<i>LBPt1341c anchor</i>	Nr: 936660 5' – LC640 <sup>2</sup> – CCA AgT TCA ATg gTA AgA ATC ACT gTg g – PH <sup>3</sup>
<i>LBP c998t R</i>	Nr: 816669 5' – CAC AAA ggC ATC TAT CTC CAT ATA
<i>LBP c998t F</i>	Nr: 816668 5' – CAA CTT CCA gCT TTA TCT gAC TC
<i>LBP c998t Anchor</i>	Nr: 816670 5' – CCC AgT Tag CC -- FL <sup>1</sup>
<i>LBPc998t Sensor</i>	Nr: 854530 5' – LC640 <sup>2</sup> -ggC TCT ACC CCA ACA TgA A – PH <sup>3</sup>

## 2.6 Zellkultur

<i>RAW 246.7</i>	<i>DSMZ, Braunschweig, Deutschland</i>
<i>HEK 293</i>	<i>DSMZ, Braunschweig, Deutschland</i>
<i>RPMI-Medium 1640 Without Glutamine (RAW 246.7)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH</i>
<i>DMEM (HEK 293)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>Kulturmedium</i>	<i>RPMI oder DMEM 10 % FCS 1 % Natriumpyruvat 200 mM L-Glutamin Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)</i>
<i>Hygromycin B</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>

---

<sup>1</sup> Fluorescein-markiert

<sup>2</sup> LightCycler Red 640-markiert

<sup>3</sup> phosphoryliert

<i>Stimulationsmedium</i>	<i>Kulturmedium ohne FCS</i>
<i>Natriumpyruvat</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>L-Glutamin</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
<i>Trypsin / EDTA</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>

## 2.7 ELISA und Bindungsassays

### Antikörper und Standards

<i>Monoklonaler anti-mouse TNF-<math>\alpha</math>-Antikörper Stock 0,5 mg/ml</i>	<i>Cat-Nr: 551225 BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Monoklonaler anti-mouse TNF-<math>\alpha</math>-Antikörper (biotinyliert) Stock 0,5 mg/ml</i>	<i>Cat-Nr: 554415 BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Rekombinantes murines TNF-<math>\alpha</math> Stock 10 <math>\mu</math>g/ml</i>	<i>Cat-Nr: 410-MT BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Monoklonaler anti-mouse IL-6-Antikörper Stock 0,5 mg/ml</i>	<i>Cat-Nr: 554400 BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Monoklonaler anti-mouse IL-6-Antikörper (bi- otinyliert) Stock 0,5 mg/ml</i>	<i>Cat-Nr: 554402 BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Rekombinantes murines IL-6 Stock 100 <math>\mu</math>g/ml</i>	<i>Cat-Nr: C-21616-SS Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland</i>
<i>Monoklonaler muriner anti-hLBP-Antikörper, lyophilisiert (biG412)</i>	<i>Cat-Nr: 023-3c.2 Biometric, Company for Biomedical Technolo- gies Inc., Greifswald, Deutschland</i>



<i>Monoklonaler muriner anti-hLBP-Antikörper (biG48)</i>	<i>Cat-Nr: 23-2c.2 Biometric, Company for Biomedical Technologies Inc., Greifswald, Deutschland</i>
<i>Rekombinantes humanes LBP Stock 250 µg/ml</i>	<i>Cat-Nr: 014-1.2 (ALEXIS 201-131-C010) Biometric, Company for Biomedical Technologies Inc., Greifswald, Deutschland</i>

### **Farbreaktion**

<i>Biotin</i>	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<i>Streptavidin-HRP-Peroxidase-Konjugat (POD)</i>	<i>Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland</i>
<i>SeramunBlau® slow</i>	<i>Art-Nr: S-004-TMB Seramun Diagnostica GmbH, Wolzig, Deutschland</i>
<i>Stopplösung</i>	<i>1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>

### **2.8 Verwendete Software**

<i>LightCycler Software Version 3.5</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland</i>
<i>Magellan Version 3</i>	<i>Tecan, Crailsheim, Deutschland</i>
<i>GraphPad Prism Version 4.0</i>	<i>Graph Pad Software, Inc, USA</i>
<i>Microsoft® Office (inklusive Word, Excel, Photoshop)</i>	<i>Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland</i>
<i>Adobe Photoshop CS Version 8.0</i>	<i>Adobe Systems GmbH, München, Deutschland</i>
<i>SPSS Statistics</i>	<i>SPSS Inc., Chicago, Illinois</i>
<i>Swiss Pdb Viewer Deep View</i>	<i><a href="http://www.expasy.org/spdbv/">http://www.expasy.org/spdbv/</a></i>
<i>Fisher-Exakt-Test im Internet</i>	<i><a href="http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm">http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm</a></i>

## 3 Methoden

### 3.1 Genotypisierung

#### 3.1.1 Darstellung der Kollektive

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Kollektive auf zwei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des LBP untersucht. Dabei handelte es sich um die Mutationen c998t und t1341c.

Das erste Kollektiv bestand aus 465 gesunden Blutspendern an der Charité und 227 gesunden Individuen, die in die DNA-Extraktion und Untersuchung auf verschiedene Polymorphismen eingewilligt hatten. Bei den Blutspendern wurde DNA aus dem Blut gewonnen, bei den anderen Probanden wurden Wangenabstriche durchgeführt, aus denen mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen DNA gewonnen wurde. Die insgesamt 692 Personen dienten als Kontrollkollektiv, um Aussagen über die Verteilung von Polymorphismen in einer gesunden Bevölkerung zu erhalten.

Des Weiteren wurde DNA von 31 Kindern untersucht, die innerhalb des Jahres 2008 mit einer durch *Neisseria meningitides* hervorgerufenen Meningitis diagnostiziert worden waren. Die DNA wurde gemeinsam mit klinischer Information vom Nationalen Referenzzentrum für *Neisseria meningitides* in Würzburg zur Verfügung gestellt.

Alle Untersuchungen wurden von der zuständigen Ethikkommission bewilligt. Ziel war es, die Verteilung der beiden Polymorphismen in der gesunden deutschen Bevölkerung und bei Kindern mit Meningitis zu ermitteln und zu vergleichen.

#### 3.1.2 PCR Light Cycler Technik

Die Untersuchung auf die Polymorphismen erfolgte mit Hilfe der LightCycler *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Die PCR dient im Allgemeinen der Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Zunächst erfolgt durch Erhitzen die Denaturierung, nach der DNA und Primer als Einzelstränge vorliegen. Anschließend lagern sich die Primer komplementär an die Einzelstränge an und die DNA-Polymerase elongiert die Sequenz zwischen den Primern.

Die LightCycler-Technik kombiniert die herkömmliche PCR mit der Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) und ermöglicht so eine Quantifizierung des DNA-Produkts

während eines Zyklus, also in Echtzeit. Dafür werden Oligonukleotide (FRET-Sonden) verwendet, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen (Donor und Akzeptor) markiert sind und während der PCR an die Zielsequenz binden. Die erste Sonde (LBP-Anker-Sonde, Donor-Fluorochrom) ist mit Fluoreszein markiert, welches durch eine Lichtquelle angeregt wird und einen Teil seiner Energie an das Akzeptor-Fluorochrom der zweiten Sonde (LBP-Sensor-Sonde) abgibt. Bei dem Akzeptor-Fluorochrom handelt es sich um den Fluoreszenzfarbstoff Red640, der durch den Energietransfer angeregt wird. Das emittierte Licht wird vom LightCycler-Gerät gemessen und kann zur Quantifizierung benutzt werden.

Anschließend wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da die Sonden mit einer charakteristischen temperaturabhängigen Stabilität an die DNA binden, kann man durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur den Schmelzpunkt der Sonden bestimmen, also die Temperatur, bei der die Sonden sich von der DNA lösen und das Fluoreszenzsignal abbricht.

Durch eine Veränderung der DNA, wie sie bei einer Punktmutation auftritt, verändert sich dieser Schmelzpunkt. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Schmelzkurven sind charakteristisch für unterschiedliche Genotypen und können deshalb verwendet werden, um Wildtyp-Allelträger von heterozygoten und homozygoten Mutationsträgern zu unterscheiden. Zur Veranschaulichung stellt die Abbildung 7 exemplarisch einen möglichen Verlauf solcher Schmelzkurven dar.

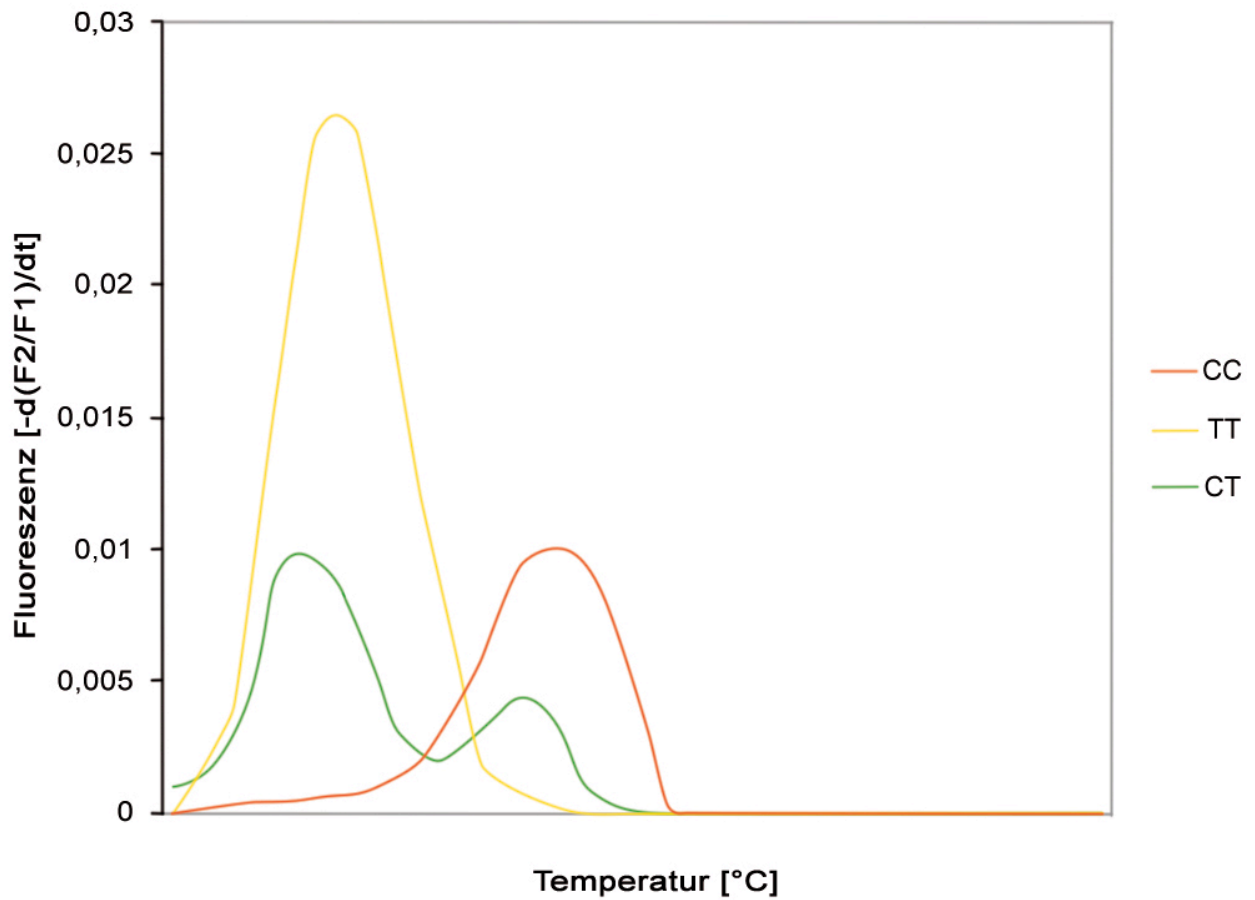


Abb. 7 **Beispiel für PCR LightCycler Schmelzkurven**

Dargestellt sind drei unterschiedliche Schmelzkurven, die das Vorliegen unterschiedlicher Genotypen zeigen. Die rote Linie repräsentiert dabei den Wildtyp, die gelbe Linie den Genotyp mit einer homozygoten Ausprägung der Mutation und die grüne, zweigipflige Linie zeigt einen möglichen Verlauf bei Vorliegen von Heterozygotie. Die Höhe der Schmelzkurven und die jeweiligen Schmelzpunkte unterscheiden sich abhängig vom untersuchten Polymorphismus.

Im Folgenden werden die Ansätze der Reagenzien und die LightCycler-Protokolle für beide Polymorphismen gesondert dargestellt.

## Methoden

---

### RT-PCR-Ansatz für LBP c998t

---

Bestandteile	Menge für 1 Probe in $\mu\text{l}$
PCR-fähiges Wasser	6,8
Buffer 10x	2
MgCl <sub>2</sub>	0,8
BSA	3
dNTP	1
Primer 1 for	1
Primer 2 rev	1
Sensor	1
Anchor	1
Polymerase	0,4
<b>Volumen pro well</b>	<b>18</b>
Template DNA pro well	2
<b>Gesamtvolumen pro well</b>	<b>20</b>

---

## Methoden

### Protokoll

#### **Denaturierung**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: -**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	04:00	20.00

#### **Amplifikation**

**Zyklen: 50**

**Analysemodus: Quantifizierung**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	00:05	20.00
52	einzel	00:20	20.00
72	-	00:15	20.00

#### **Schmelzkurve**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: Schmelzkurve**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	00:02	20.00
40	-	00:30	20.00
95	kontinuierlich	-	0.20

#### **Kühlung**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: -**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
40	-	00:30	20.00

## Methoden

---

### RT-PCR-Ansatz für LBP t1341c

---

Bestandteile	Menge für 1 Probe in $\mu\text{l}$
PCR-fähiges Wasser	5,5
Buffer 10x	2
MgCl <sub>2</sub>	2
BSA	3
dNTP	1
Primer 1 for	1
Primer 2 rev	1
Sensor	1
Anchor	1
Polymerase	0,5
<b>Volumen pro well</b>	<b>18</b>
Template DNA pro well	2
<b>Gesamtvolumen pro well</b>	<b>20</b>

---

## Methoden

### Protokoll

#### **Denaturierung**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: -**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	04:00	20.00

#### **Amplifikation**

**Zyklen: 40**

**Analysemodus: Quantifizierung**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	00:00	20.00
56	einzel	00:10	20.00
72	-	00:08	20.00

#### **Schmelzkurve**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: Schmelzkurve**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
95	-	00:10	20.00
40	-	00:30	20.00
80	kontinuierlich	-	0.10

#### **Kühlung**

**Zyklen: 1**

**Analysemodus: -**

<b>Zieltemperatur (°C)</b>	<b>Akquisitionseinstellung</b>	<b>Zeit (mm:ss)</b>	<b>Temperatur-Transitionsrate (°C/s)</b>
40	-	00:30	20.00



### 3.2 Serumentnahme

Es wurden gesunde freiwillige Probanden auf die LBP-Polymorphismen untersucht. Personen unterschiedlichen Genotyps wurden geschlechts- und altersspezifisch gematcht und zur Blutentnahme einbestellt. Durch vorangehende Befragung wurde sichergestellt, dass keine chronische oder akute Erkrankung vorlag und keine immunwirksamen Medikamente eingenommen wurden. Den Probanden wurde mit dem Vacutainer System Blut entnommen. Nach 20 Minuten Lagerung bei 4° C war das Blut vollständig geronnen und die Röhrchen wurden 10 min bei 1200 rpm und 4° C zentrifugiert. Dadurch wurde der zelluläre vom flüssigen Anteil des Blutes getrennt, der sich nach dem Zentrifugieren im Überstand befand. Dieser Überstand (Serum) wurde mit einer Pasteurpipette in ein Falconröhrchen überführt. Jeweils 100 µl Serum wurden in Eppendorf-Cups pipettiert, welche anschließend bei -20° C bis zur Verwendung eingefroren wurden.

Zwei Seren von homozygoten Individuen wurden von Kollaborationspartnern bereitgestellt. Michael Kabesch von der LMU München stellte das Serum einer für den SNP c998t homozygoten Frau zur Verfügung und aus den Helios-Kliniken Buch wurde das Serum einer Frau geliefert, die homozygot für den SNP t1341c ist.

### 3.3 Gewinnung rekombinanter Proteine

Alle verwendeten LBP-Varianten wurden hergestellt und bereitgestellt von Jana Kristin Eckert. Grundlage bildete das von Nicolas W. Schröder zur Verfügung gestellte LBP-Sequenz enthaltende Plasmid pCEP4-LBP-wt. Dieses diente als Quelle für die DNA-Sequenz, die im Weiteren zur Mutagenese eingesetzt wurde und als Quelle für den Vektor pCEP4. Das Insert dieses Vektors wurde zur Herstellung der LBP-Variante c998t in den Vektor pUC19 umkloniert.

Die Mutagenese erfolgte mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach Anleitung des Herstellers. Auch die Variante LBP t1341c wurde auf diese Art hergestellt.

Die Transformation erfolgte anschließend in *E. coli*, die Expression der Proteine in HEK293-Zellen. Zur Transfektion der Zellen wurde FuGene 6 Transfection Reagent verwendet. Eine ausführliche Darstellung der Methoden findet sich in der Dissertation von Jana Kristin Eckert [98].

Die Expression kann auf unterschiedliche Arten erfolgen: In normaler Zellkultur werden die Zellen etwa alle drei Tage geteilt und mit neuem Medium versorgt, das alte Medium wird abgesaugt. Expressieren diese Zellen das rekombinante Protein, sezernieren sie es in den Tagen zwischen den Passagen ins Nährmedium. Dieses wird nun bei jeder Passage abgenommen und in 50 ml-Röhrchen bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Die zweite Methode ist das CELLline CL-350-System. Dieses besteht aus speziellen Zellkulturflaschen, die zwei durch eine semipermeable Membran voneinander getrennte Kompartimente aufweisen. Im „inneren“ Raum befinden sich die Zellen in Medium ohne FCS, der „äußere“ Raum ist mit Kulturmedium mit FCS gefüllt. Durch die semipermeable Membran können alle wichtigen Nährstoffe in das innere Kompartiment diffundieren, das sezernierte Protein wird aufgrund seiner Molekülgröße aber in diesem zurückgehalten. Dadurch werden die rekombinanten Proteine in diesem System in einem kleineren Volumen aufkonzentriert und die Ausbeute ist insgesamt größer. Hier wird das Medium einmal wöchentlich aus dem inneren Kompartiment entnommen und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Die LBP-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt.

### **3.4 ELISA**

#### ***3.4.1 Allgemein***

Die Durchführung des ELISAs wird hier exemplarisch erklärt.

Zunächst wird eine Immunoplatte mit dem ersten (*capture*) Antikörper beschichtet. Dafür werden 50 µl einer Lösung aus Antikörper in Beschichtungspuffer in jede Vertiefung der 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Antikörperlösung verbleibt mindestens 12 Stunden und maximal eine Woche auf der Platte (Aufbewahrung bei 4 °C). In dieser Zeit bindet der erste Antikörper an die Plattenoberfläche.

Anschließend ist es notwendig, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dies erfolgt durch einstündige Inkubation mit 100 µl eines Blockierpuffers in jeder Vertiefung. Zwischen allen Schritten des ELISAs wird die Platte mehrmals mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Substanzen zu entfernen und anschließend kräftig ausgeklopft.

Als nächstes erfolgt das Auftragen der Proben und Standards. Die Inkubationszeit beträgt ein bis zwei Stunden. Während dieser Zeit bindet das Antigen, das sich in den Proben und Standards befindet an den ersten Antikörper, der nun immobilisiert auf der Platte vorliegt.

Nach erneutem Waschen wird der zweite Antikörper aufgetragen (50 µl pro Vertiefung) und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper ist mit Biotin markiert und bindet an das Antigen, gegen das er gerichtet ist. An das Biotin bindet das anschließend aufgetragene und mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin (Inkubationszeit 1 Stunde).

Nach erneutem Waschen erfolgt das Auftragen des TMB-Substrats und es kommt zu einer Farb-reaktion zwischen dem Substrat und der Peroxidase. Die Lichtreaktion erfolgt lichtgeschützt und wird durch Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt, wenn der höchste Wert der Standardreihe dunkelblau und der niedrigste Wert im Vergleich zum Nullwert leicht bläulich ist. Durch das Abstoppen erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb. Nun ist das Gerät Spectra Fluor Plus in der Lage, die Absorption bei 450 nm zu messen (Optische Dichte = OD), wobei das Maß an Absorption mit der Antigenkonzentration korreliert.

Für die Standardreihe sind die Antigenkonzentrationen bekannt, da eine definierte Ausgangsmenge seriell verdünnt wird. Durch Zuordnung dieser bekannten Konzentrationen zu den jeweiligen OD-Werten wird durch die Software Tecan Magellan 3 eine Standardkurve erstellt. Anhand derer kann bei den Proben jede OD in eine Konzentration übertragen werden.

### ***3.4.2 Biotinylierung von Antikörpern***

Da keine bereits biotinylierten Antikörper gegen humanes LBP für ELISA erhältlich waren, wurde der monoklonale Antikörper im Labor biotinyliert.

Dazu musste der Antikörper zunächst gelöst und dialysiert werden, damit die Antikörperlösung keine störenden aminohaltigen Gruppen (z.B. Tris, Glycin, Azid) enthält. Dazu wurde die Lösung auf eine semipermeable Membran gegeben und mindestens 4 Stunden bei 4°C gegen PBS, pH 7,4 dialysiert.

Das Biotin wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) mit einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst und in 100-fachem Überschuss zu der Antikörperlösung gegeben. Nach mindestens 12-stündiger Inkubation der Lösungen bei 4°C konnte der Antikörper verwendet und aufbewahrt werden.

### ***3.4.3 Spezifische ELISA-Protokolle***

## Methoden

Arbeitsschritt	<b>m TNF-alpha</b>	<b>m IL-6</b>	<b>h LBP</b>
<b>1. AK</b>	<i>1:100 in 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0</i>	<i>1:250 in NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2</i>	<i>1:500 in Carbonatpuffer, pH 8,2</i>
<b>Proben / Standard</b>	<i>Standard: 10.000-6,25 pg/ml Proben: unverdünnt</i>	<i>Standard: 2000-31,25 pg/ml Proben: 1:2 verdünnt</i>	<i>Standard: 250-3,9 pg/ml Serum: 1:200 verdünnt</i>
<b>2. AK</b>	<i>1:1000 in Probenpuffer</i>	<i>1:500 in Probenpuffer</i>	<i>1:2000 in Hepes/1% BSA</i>

### 3.5 LBP-Bindungsassays

Das Funktionsprinzip eines Bindungsassays entspricht dem des ELISA. Ziel ist es herauszufinden, ob eine Substanz, in diesem Falle LBP, an eine andere bindet.

Dafür werden Immunosorb-Platten statt mit einem ersten Antikörper nun mit der zu testenden Substanz beschichtet. Dabei handelt es sich im Falle des LBP-Bindungsassays um verschiedene bakterielle Liganden, welche in einer Konzentration von 30 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 8,2 gelöst werden.

Für die Versuche dieser Arbeit wurden LPS 0111:B4, diacyliertes und triacyliertes Lipopeptid und 3-sn-Phosphatidylethanolamin verwendet.

LPS und die Lipopeptide wurden lyophilisiert geliefert. Zur Lösung in destilliertem Wasser erfolgte die Homogenisierung durch Vortexen und die Verwendung des Ultraschallwasserbads. 3-sn-Phosphatidylethanolamin lag in Chloroform gelöst vor und wurde direkt in Carbonatpuffer gelöst. Auch diese Lösung wurde mit Ultraschall homogenisiert.

Von den Lösungen wurden je 50 µl in jede Vertiefung pipettiert, dabei wurde eine Reihe als Negativkontrolle freigelassen, um unspezifische Bindung von LBP an die Platte ausschließen zu können.

Nach sechsständiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit destilliertem Wasser gründlich gespült und über Nacht getrocknet. Sie konnten bis zur weiteren Verwendung längere Zeit aufbewahrt werden.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte im Falle der Bindungsassays mit HEPES/10 mg/ml BSA. Während der Inkubation (30 Minuten) wurden die Platten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurden die Proben in absteigenden Konzentrationen (1:2 Verdünnung) aufgetragen. Bei Versuchen mit Seren war die höchste Konzentration 25 %, diese wurde auch in die Vertiefungen pipettiert, die nicht beschichtet waren.

Vorversuche zeigten, dass die Bindungsassays mit rekombinantem LBP unter Verwendung von Zellkulturüberständen weniger unspezifische Bindung zeigen als bei Versuchen mit aufgereinigtem LBP. Deshalb wurden die Überstände aus der Zellkultur direkt und ohne vorangehende Aufreinigung verwendet. Sie wurden sowohl unverdünnt als auch in unterschiedlichen Verdünnungsschritten aufgetragen. Auch hier wurden die höchsten Konzentrationen sowohl in beschichtete als auch als Negativkontrolle in unbeschichtete Vertiefungen pipettiert.

Die spezifischen Verdünnungen ergaben sich aus den unterschiedlichen Konzentrationen in den jeweiligen Überständen. Sie wurden so gewählt, dass mit möglichst wenigen Verdünnungsschritten eine gleiche Proteinkonzentration der einzelnen Varianten erreicht wurde, die dann in identischen Schritten seriell weiter verdünnt wurde. So konnte eine Vergleichbarkeit der Werte gewährleistet werden.

Während der zweistündigen Inkubationszeit wurden die Platten wieder geschüttelt. Eine mögliche Interaktion zwischen der Testsubstanz und dem sich in den Proben befindenden LBP sollte in dieser Zeit stattfinden.

Nach gründlichem Waschen mit HEPES/1 mg/ml BSA wurde der biotinylierte Antikörper gegen humanes LBP aufgetragen (2 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur). Die Farbreaktion erfolgte analog zum ELISA mit Streptavidin-Peroxidase und TMB-Substrat. Nach Abstoppen der Reaktion mittels  $\text{H}_2\text{SO}_4$  schloss sich die Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm an. Diese wurde mit dem Gerät SpectraFluorPlus unter Benutzung des Programms Magellan durchgeführt. Die Höhe der OD korreliert mit der Menge LBP, das an die Testsubstanz gebunden ist. Damit kann die OD als Maß für das Bindungsverhalten zwischen LBP und den jeweiligen Substanzen benutzt werden.

### 3.6 Zellkultur

Die Expression des rekombinanten LBP erfolgte in HEK293-Zellen, bei denen es sich um menschliche embryonale Nierenzellen handelt. Da die Expression von Jana K. Eckert durchgeführt wurde und für Versuche im Rahmen dieser Dissertation Zellüberstände zur Verfügung gestellt wurden, wird darauf hier nicht näher eingegangen.

Für die Stimulationsversuche in dieser Arbeit wurde die Zelllinie RAW 264.7, eine murine monozytäre Makrophagenzelllinie verwendet. Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank.

RAW 264.7-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit FCS kultiviert. Sie wurden im Brutschrank bei 37° C und unter 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in Zellkulturflaschen gehalten und alle 2 bis 3 Tage verdünnt und in neues Medium aufgenommen. Vor jedem weiteren Versuchsschritt wurden die Zellen unter dem Binokular untersucht, um sicherzustellen, dass keine Kontamination vorlag und die Zellen vital waren.

Um Zellen für Versuche zu verwenden, muss ihre Zellzahl bestimmt werden. Dies erfolgt mit einer Neubauer-Zählkammer, indem die Zellen in einzelnen Quadranten gezählt und gemittelt werden. Die Anzahl pro Quadrant entspricht dabei der Anzahl Zellen  $\times 10^4$  in 1 ml Zellsuspension.

Einen Tag vor der Stimulation wurden die Zellen auf 24-Mikrotiterplatten mit  $1 \times 10^5$  Zellen/well in Medium ohne FCS oder in 96-Mikrotiterplatten mit  $4 \times 10^4$  Zellen/well ausgesät und adhärirten über Nacht. Am nächsten Tag konnte das alte Medium abgenommen und durch neues Medium ersetzt werden, welches Stimulationszusatz unter An- und Abwesenheit von Serum enthielt. Bei dem zugegebenen Serum handelte es sich um die Seren der Probanden unterschiedlichen Genotyps, so dass dies einer Zugabe von wt-LBP, LBP t1341c (hetero- und homozygot) oder LBP c988t (heterozygot) entsprach.

Es wurden Versuche mit Serumkonzentrationen zwischen 1 und 5 % durchgeführt. Bei jedem Versuch wurde eine Negativkontrolle ohne Serum mitgeführt.

Stimuliert wurde mit LPS 0111:B4 und LPS Re595 in verschiedenen Konzentrationen. Auch hier wurde für jedes einzelne Serum eine Negativkontrolle mitgeführt, die keinen Stimulationszusatz enthielt.

Die Zellen wurden 2, 4, 12 oder 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen in den Überständen mittels ELISA gemessen.

Alle Messungen erfolgten in Doppelwerten.

### **3.7 Erstellung dreidimensionaler Computermodelle für LBP**

Auf der Grundlage der Sequenz von BPI erfolgte die Erstellung dreidimensionaler Modelle für das LBP. Dafür wurde das Programm Swiss-PDB Viewer Deep View 4.0 verwendet, das auf der Grundlage einer Aminosäuresequenz in der Lage ist, die wahrscheinliche Molekülgestalt zu ermitteln [99].

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Verteilung der LBP-Polymorphismen in einer gesunden Kontrollpopulation

Das Kontrollkollektiv bestand aus 465 gesunden Blutspendern und 227 gesunden Individuen, die in eine genetische Analyse eingewilligt hatten. Eine genaue Darstellung dieser Kohorte findet sich in der Veröffentlichung „*A Functional Toll-Like Receptor 8 Variant Is Associated with HIV Disease Restriction*“ [100].

Insgesamt wurde die DNA von 692 Individuen auf die beiden LBP-Polymorphismen untersucht. Proben, die auch nach wiederholter PCR nicht eindeutig einem Genotyp zuzuordnen waren, wurden als „nicht bestimmbar“ gewertet. Dadurch reduziert sich die Anzahl auf 645, wovon 473 Männer und 172 Frauen waren.

#### 4.1.1 Verteilung des LBP-Polymorphismus c998t

Wie im Kapitel 3.1.2 dargestellt konnte aus dem Verlauf der Schmelzkurven auf das Vorliegen der Genotypen geschlossen werden. Dabei lag der Schmelzpunkt im Falle des Polymorphismus c998t für das Wildtyp-Allel lag bei 59°C. Bei Vorliegen der Mutation verringerte er sich auf 52°C und heterozygote Proben wiesen eine zweigipflige Schmelzkurve auf. Insgesamt fanden sich 547 Personen, die den Wildtyp aufwiesen und 98 Personen, die heterozygot für den LBP-SNP c998t waren. Homozygote Individuen wurden nicht gefunden. In der Tabelle 2 sind die Häufigkeiten unterschiedlicher Genotypen dargestellt.

Tab. 2 Verteilung des SNP c998t im Kollektiv der gesunden freiwilligen Spender

	<b>Gesamt</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
<b>Anzahl</b>	645	547	98	0
<b>Anteil in %</b>	100	84,8	15,2	0



Die Verteilung des Polymorphismus wurde auch in Abhängigkeit vom Geschlecht untersucht, was in Tabelle 3 dargestellt ist. Mit einer Häufigkeit von 15,4 % in der Gruppe der männlichen und 14,5 % in der Gruppe der weiblichen Personen wurde kein geschlechtsabhängiger Unterschied in der Verteilung des Polymorphismus festgestellt. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test.

**Tab. 3 Verteilung des SNP c998t in Abhängigkeit vom Geschlecht im Kollektiv der gesunden freiwilligen Spender**

		Männlich	Weiblich
<b>Gesamt</b>	Anzahl	473	172
	Anteil an Gesamtkollektiv	73,3 %	26,7 %
<b>CC</b>	Anzahl	400	147
	Anteil innerhalb von Geschlecht	84,6 %	85,5 %
<b>CT</b>	Anzahl	73	25
	Anteil innerhalb von Geschlecht	15,4 %	14,5 %
<b>TT</b>	Anzahl	0	0
	Anteil innerhalb von Geschlecht	0	0

#### **4.1.2 Verteilung des LBP-Polymorphismus t1341c**

Der Schmelzpunkt des Wildtyp-Allels lag im Falle dieses Polymorphismus bei 57,04° C, für das mutierte Allel bei 63,46° C. Auch hier konnten heterozygote Individuen aufgrund der zweigipfligen Schmelzkurve identifiziert werden.

Es wurden insgesamt 530 Wildtyp-Personen, 107 heterozygote Proben und 8 homozygote Individuen gefunden (Häufigkeiten und Prozentangaben s. Tab. 4).

Tab. 4 Verteilung des SNP t1341c im Kollektiv der gesunden freiwilligen Spender

	Gesamt	TT	CT	CC
<b>Anzahl</b>	645	530	107	8
<b>Anteil in %</b>	100	82,2	16,6	1,2

Auch dieser Polymorphismus wurde auf geschlechtsabhängige Unterschiede untersucht. Wie aus Tab. 5 ersichtlich liegt zwar die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps mit 15,9 % bei den Männern leicht unter der Häufigkeit von 18,4 %, die bei den Frauen gefunden wurde. Auch Homozygotie scheint bei Frauen geringfügig häufiger vorzukommen als bei Männern. Doch nach statistischer Analyse mit dem Chi-Quadrat-Test sind diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

Tab. 5 Verteilung des SNP t1341c in Abhängigkeit vom Geschlecht im Kollektiv der gesunden freiwilligen Spender

		Männlich	Weiblich
<b>Gesamt</b>	Anzahl	473	172
	Anteil an Gesamtkollektiv	73,3 %	26,7 %
<b>TT</b>	Anzahl	393	137
	Anteil innerhalb von Geschlecht	83,1 %	79,7 %
<b>CT</b>	Anzahl	76	31
	Anteil innerhalb von Geschlecht	16,1 %	18 %
<b>CC</b>	Anzahl	4	4
	Anteil innerhalb von Geschlecht	0,85 %	2,3 %

Nach der Analyse der Häufigkeiten verschiedener Genotypen erfolgte die Berechnung der Allelfrequenz für beide Polymorphismen (Tab. 6).

Tab 6 **Allelfrequenzen**

	Allelfrequenz t1341c	Allelfrequenz c998t
Wildtyp-Allel	0,904651	0,924031
Mutiertes Allel	0,095349	0,075969
Gesamt	1	1

Die Allelfrequenzen liegen für beide Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Equilibrium ( $p + q = 1$  und  $p^2 + 2 \times pq + q^2 = 1$ , wobei  $p$  die Allelfrequenz des Wildtyp-Allels und  $q$  die Allelfrequenz des mutierten Allels darstellt).

## 4.2 Dreidimensionale LBP-Modelle

Mit dem Programm Swiss Deep View wurde basierend auf der Sequenz des BPI ein Modell für das Wildtyp-LBP erstellt. Je nach Fragestellung kann man unterschiedliche Darstellungsmethoden wählen. Zum Beispiel kann das Programm das Gerüst aus C-Atomen mit oder ohne Seitenketten anzeigen oder man kann gezielt bestimmte Strukturen (beispielsweise alle H-Atome) oder auch nur einzelne Abschnitte des Proteins farblich kennzeichnen.

Besonders interessant ist in diesem Falle die Möglichkeit, eine dreidimensionale Darstellung zu wählen. Dabei werden die Sekundär- und Tertiärstruktur des LBP dargestellt. Auch hier kann man gezielt einzelnen Strukturen bestimmte Farben zuweisen und interessante Abschnitte gesondert hervorheben.

Deutlich sieht man in Abbildung 8 Perspektive die bumerangähnliche Form des LBP.

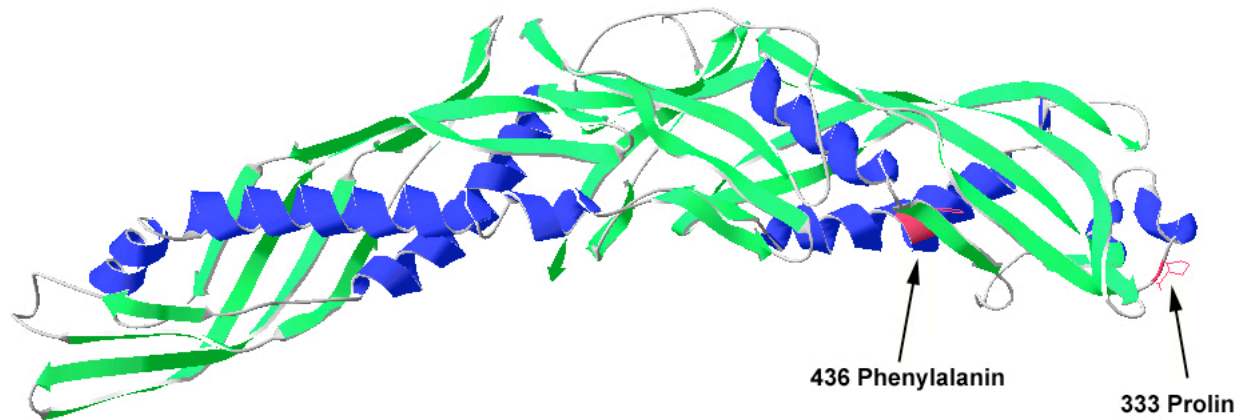


Abb. 8 **Ribbon-Darstellung des Wildtyp-LBP**

Die dreidimensionale Struktur des LBP ist schematisch dargestellt. Die  $\alpha$ -Helices sind blau und die  $\beta$ -Faltblätter grün gefärbt. Rot hervorgehoben sind die Positionen 333 und 436 der Aminosäuresequenz, deren Mutationen im Fokus dieser Arbeit standen.

Von besonderem Interesse sind natürlich die Bereiche der Aminosäuresequenz, in denen es beim Vorliegen eines der beschriebenen Polymorphismen zu einem Aminosäureaustausch kommt. Zur besseren Ansicht dieser Stellen wurde das Protein für die nächste Abbildung (Abb. 9) um etwa  $90^\circ$  nach hinten gedreht.

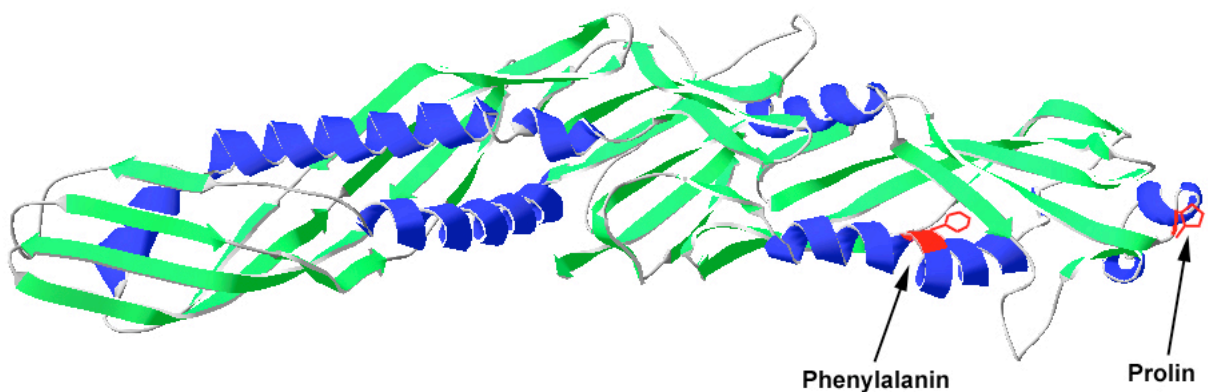
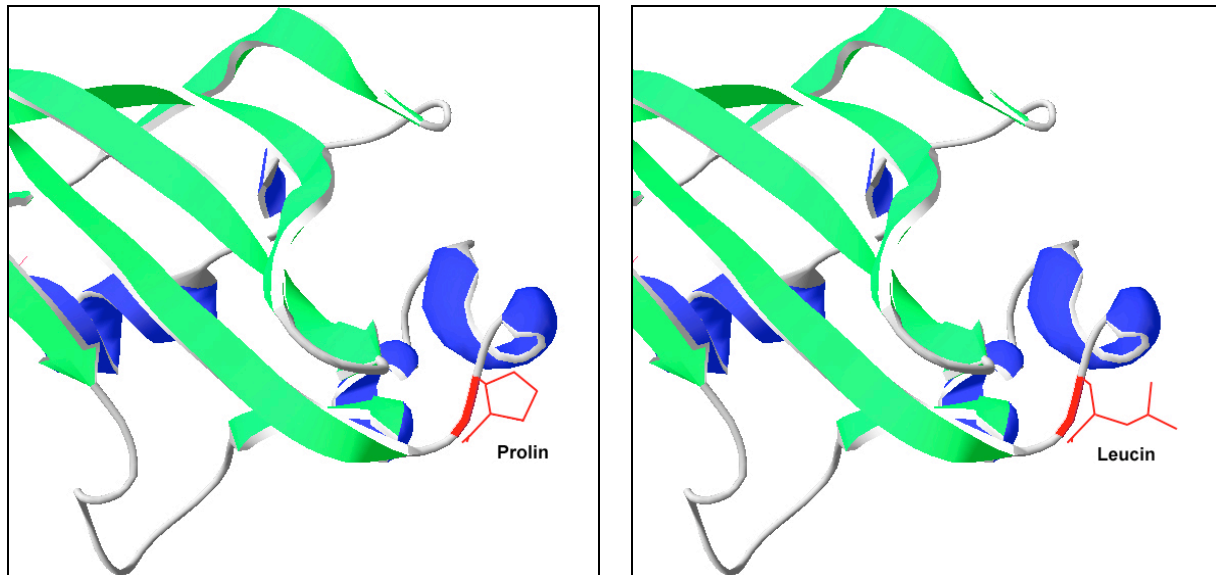


Abb. 9 **Ribbon-Darstellung des Wildtyp-LBP**

Schematische Darstellung des LBP mit Fokus auf die Aminosäurebereiche 333 und 436. An diesen Positionen befinden sich beim Wildtyp-LBP Prolin (333) und Phenylalanin (436).

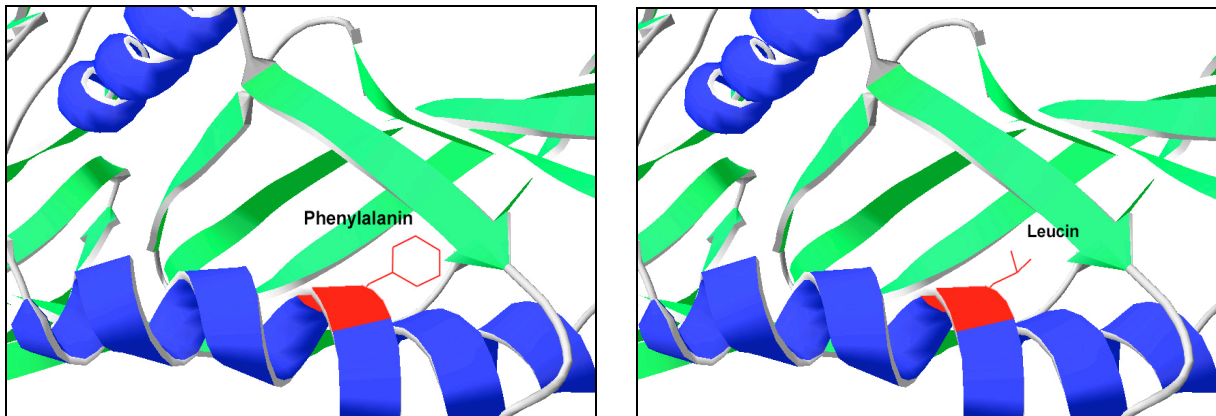
Als weitere interessante Funktion bietet das Programm die Möglichkeit, einzelne Aminosäuren in der Sequenz auszutauschen. So ist es möglich, bestimmte Mutationen zu imitieren und die Auswirkungen im dreidimensionalen Modell zu beobachten.

Im Folgenden sind die beiden Polymorphismen einzeln und jeweils im Vergleich zu der Wildtyp-Form dargestellt. Abbildung 10 illustriert die Mutation an der Stelle 333 der Aminosäuresequenz, während die Abbildung 11 auf den Bereich 436 fokussiert ist.



**Abb. 10 Darstellung der Mutation Pro333Leu**

Schematische Darstellung des Bereichs innerhalb des LBP, der um die Aminosäure an der Position 333 liegt. Bei der Wildtyp-Form des LBP befindet sich an dieser Stelle Prolin (links), welches bei Vorliegen des Polymorphismus c998t durch Leucin ausgetauscht wird (rechts).



**Abb. 11 Darstellung der Mutation Phe436Leu**

Hier ist der Bereich um die Aminosäure an der Position 436 dargestellt, bei der es sich im Falle des Wildtyp-LBP um Phenylalanin handelt (links). Durch den Polymorphismus t1341c kommt es zu einem Austausch durch Leucin (rechts).

Die computergestützte Analyse zeigt zunächst, in welchem Bereich des Proteins sich die Mutation auswirkt. So liegen die betroffenen Aminosäuren nicht weit voneinander entfernt. Der Austausch von Prolin zu Leucin an der Position 333 befindet sich im C-terminalen Bereich, der als CD14-Interaktionsbereich gilt. Die Veränderung an der Position 436 scheint sich zwischen diesem Bereich und dem zentralen  $\beta$ -Faltblatt zu befinden. In dieser Region wurde beim BPI auch eines der erwähnten Phosphatidylcholine mit aufgereinigt [80]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Phosphatidylcholinen und LPS wird auch für diesen Bereich eine mögliche Interaktion mit LPS vermutet.

Nach der rein strukturellen Analyse wird in den folgenden Versuchen untersucht, ob im Rahmen von *in-vitro*-Experimenten Auswirkungen der dargestellten Veränderungen zu beobachten sind.

### 4.3 Rekombinante Proteine und Seren

Es wurden Versuche mit Seren von Probanden durchgeführt, deren Genotyp bekannt war.

Nach der Serumentnahme wurde vor der weiteren Verwendung der Seren für Versuche die LBP-Konzentration bestimmt, um starke Schwankungen, die Ergebnisse verfälschen könnten, auszugleichen.

Wie Abbildung 12 zeigt weisen die meisten Probanden LBP-Konzentrationen, wie in der Literatur für Gesunde beschrieben, zwischen 5 und 20  $\mu\text{g/ml}$  auf.

Mit einem kommerziellen Assay war bei Kindern, die homozygot für den SNP c998t waren, kein LBP detektierbar. Im für diese Arbeit verwendeten ELISA zeigten die Probanden, die homozygot für den c998t-SNP sind, aber normale LBP-Serumkonzentrationen. Dies beweist die Eignung des hier verwendeten Testverfahrens. Auch der homozygote Proband mit dem t1341c-SNP zeigt eine normale LBP-Konzentration.

Die zwei Probanden mit den höchsten LBP-Werten (in der Abbildung 12 mit \* gekennzeichnet) waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme leicht erkältet, was sich in den erhöhten LBP-Spiegeln von 34 und 47  $\mu\text{g/ml}$  äußert, die eine leichte Akutphasereaktion anzeigen. Das Serum dieser zwei Probanden wurde daraufhin nicht für Versuche verwendet.

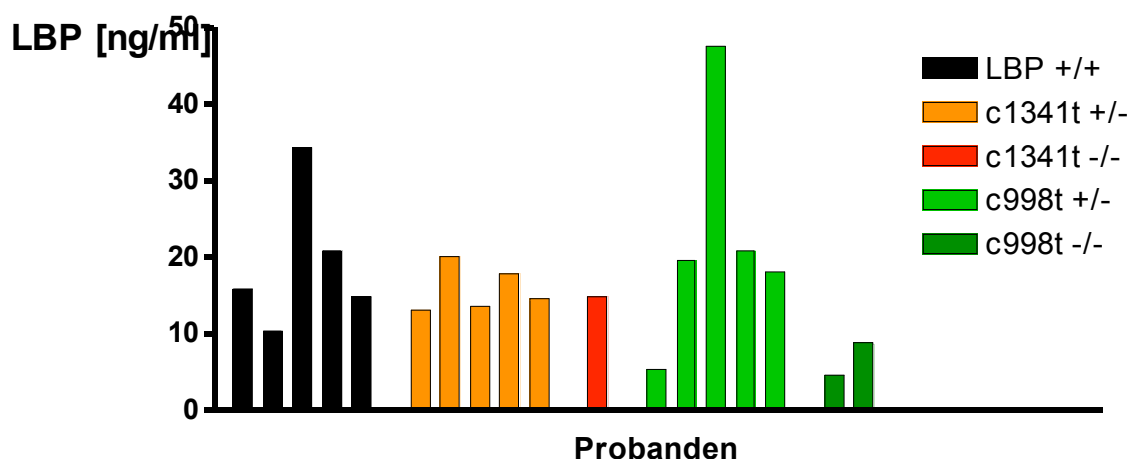


Abb. 12 **LBP-Konzentration in Seren von gesunden Probanden**

Dargestellt sind die LBP-Serumspiegel von Probanden, die den Wildtyp aufweisen (schwarz), von Probanden mit heterozygotem Genotyp für den Polymorphismus t1341c (orange) und c998t (hellgrün) und von homozygoten Probanden für den SNP t1341c (rot) und c998t (dunkelgrün).

Neben den Versuchen mit Seren erfolgten ähnliche Experimente mit rekombinant hergestellten LBP-Varianten. Auch bei diesen wurde die Proteinausbeute mittels human-LBP-ELISA bestimmt. Die Expressierung erfolgte in HEK293-Zellen, die entweder in normaler Zellkultur oder im CELLline-System kultiviert wurden. Detailliertere Darstellungen dazu finden sich in der Dissertation von Jana K. Eckert [98].

Für die Wildtyp-Variante konnten hohe Konzentrationen schon im Zellüberstand der normalen Zellkultur erreicht werden. Die Ausbeute bei den beiden Varianten c998t und t1341c war wesentlich geringer. Deshalb wurde bei den beiden LBP-Mutationen das CELLline-System verwendet, wobei die Konzentrationen auch hier im Vergleich zum Wildtyp-LBP niedriger waren, wie Tabelle 7 zeigt.

Tab. 7 **Konzentrationen von rekombinant hergestellten LBP-Varianten**

LBP-Variante	LBP-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	
	CELLline	Zellkultur
<b>LBP wt</b>		8,5
<b>c998t</b>	0,406	0,027
<b>t1341c</b>	0,021	0,009

#### 4.4 Bindungsassays

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob die strukturellen Veränderungen an den Positionen 333 und 436 sich auf die Bindungskapazität gegenüber bakteriellen Liganden auswirken, mit denen das LBP erwiesenermaßen interagiert.

Um das festzustellen, wurden Bindungsassays mit unterschiedlichen bakteriellen Liganden durchgeführt. Dabei wurden die jeweiligen Bindungspartner auf eine ELISA-Platte aufgetragen und anschließend mit LBP-enthaltendem Serum oder rekombinant hergestelltem LBP inkubiert.



Durch das Auftragen eines gegen LBP gerichteten Antikörpers und eine anschließende Farbreaktion kann aus der resultierenden Optischen Dichte (OD) auf das Ausmaß der Bindung vom LBP an die aufgetragenen Liganden geschlossen werden.

Es wurden dabei Seren von Probanden unterschiedlichen Genotyps und die rekombinant hergestellten LBP-Varianten verwendet. Die Ergebnisse wurden daraufhin analysiert, ob es Unterschiede zwischen den einzelnen LBP-Varianten gibt. Alle Versuche erfolgten in Doppelwertbestimmung und wurden mindestens dreimal wiederholt.

Das Bindungsverhalten gegenüber LPS 0111:B4 und diacyliertem Lipopeptid wurde für die Mutante c998t bereits gut untersucht ([98]). In den folgenden Versuchen wurde deshalb auf die Verwendung von Serum, das die Mutation c998t in heterozygoter oder homozygoter Ausprägung aufweist, verzichtet. Stattdessen wurden Seren von Probanden verwendet, die entweder den Wildtyp aufwiesen oder heterozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Diese Seren wurden mit einer maximalen Konzentration von 25 % aufgetragen und anschließend 1:2 verdünnt. Die minimale Konzentration betrug 0,78 %.

Von jedem Genotyp wurden mehrere Seren verwendet, wobei die durchschnittliche LBP-Konzentration 17 ng/ml für die Wildtyp-Seren und 15,8 ng/ml für die Seren heterozygoter Probanden betrug. Die Werte für die unterschiedlichen Seren wurden gemittelt und werden mit Standardfehler dargestellt.

Die Signifikanz eventueller Unterschiede wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Die p-Werte finden sich in tabellarischer Form jeweils unter den Abbildungen. Signifikante Werte sind fett gedruckt.

Da LPS als Hauptligand für das LBP gilt und großen Anteil an der Pathogenität Gram-negativer Bakterien hat, wurde als Erstes das Bindungsverhalten der Mutanten gegenüber LPS untersucht. Dafür wurde LPS 0111:B4 aus *E. coli* verwendet. Bei diesem LPS handelt es sich um ein S-LPS.

OD [450 nm]

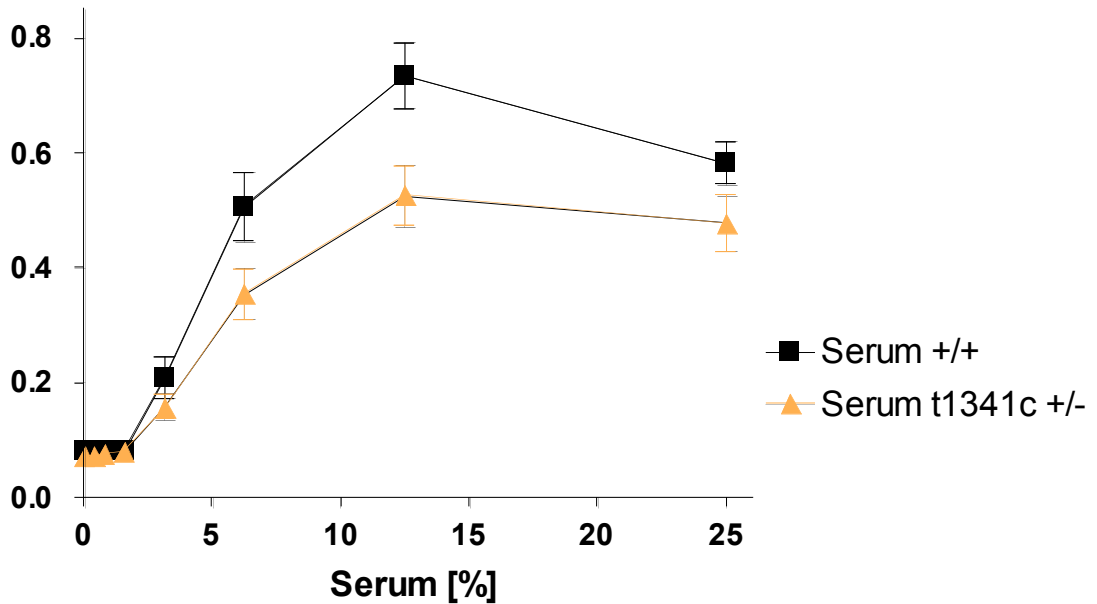


Abb. 13 Bindungsassay mit LPS 0111:B4

Beschichtet wurde mit 30 µg/ml LPS in Carbonatpuffer, pH 8,2. Aufgetragen wurden Seren, die das Wildtyp-LBP enthalten (schwarz) und solche mit einem heterozygoten Genotyp für den SNP t1341c (orange). Seren von heterozygoten Probanden weisen eine signifikant verringerte Bindungskapazität gegenüber LPS 0111:B4 auf.

Tab. 8 Berechnete p-Werte

Serumkonzentration in %	p-Wert für Vergleich zwischen Wildtyp- und t1341c-Serum
0,39	0,107662166
0,78	0,223944671
1,58	0,863148636
3,13	0,238306543
6,25	<b>0,047664144</b>
12,5	<b>0,010124306</b>
25	0,094991258

Deutlich ist in Abbildung 13 zu erkennen, dass es zu einer Bindung zwischen Serum und dem LPS 0111:B4 kommt. Die Bindung nimmt zunächst mit steigender Serumkonzentration zu, um dann bei 12,5 % eine Sättigung zu erreichen und in der höchsten Konzentration von 25 % wieder abzufallen.

Vergleicht man das Ausmaß der Bindung, führt die Verwendung von Serum, das die Wildtyp-Form des LBP enthält, zu einer stärkeren Reaktion. Zwar ist auch bei den Seren von Probanden, die heterozygot für den t1341c-SNP sind, eine Bindung an LPS zu beobachten. Diese fällt jedoch in allen Konzentrationen schwächer aus, wobei der Unterschied bei den Konzentrationen 6,25 und 12,5 % signifikant ist.

Anschließend wurden weitere Liganden untersucht, die charakteristisch für Gram-positive Bakterien sind. Im Rahmen von Experimenten werden dafür die synthetischen Lipopeptide Pam<sub>2</sub>Cys und Pam<sub>3</sub>Cys verwendet.

Zunächst zeigt die Abbildung 14, dass auch die Bindung an triacyliertes Lipopeptid mit steigenden Serumkonzentrationen zunimmt. Dabei ist die Stärke der Bindung insgesamt geringer und der Abfall in hohen Konzentrationen ist schwächer ausgeprägt als bei den Bindungsassays mit LPS. Doch auch gegenüber triacyliertem Lipopeptid ist die Bindung von LBP signifikant verringert, wenn die Mutation t1341c vorliegt.

## OD [450 nm]

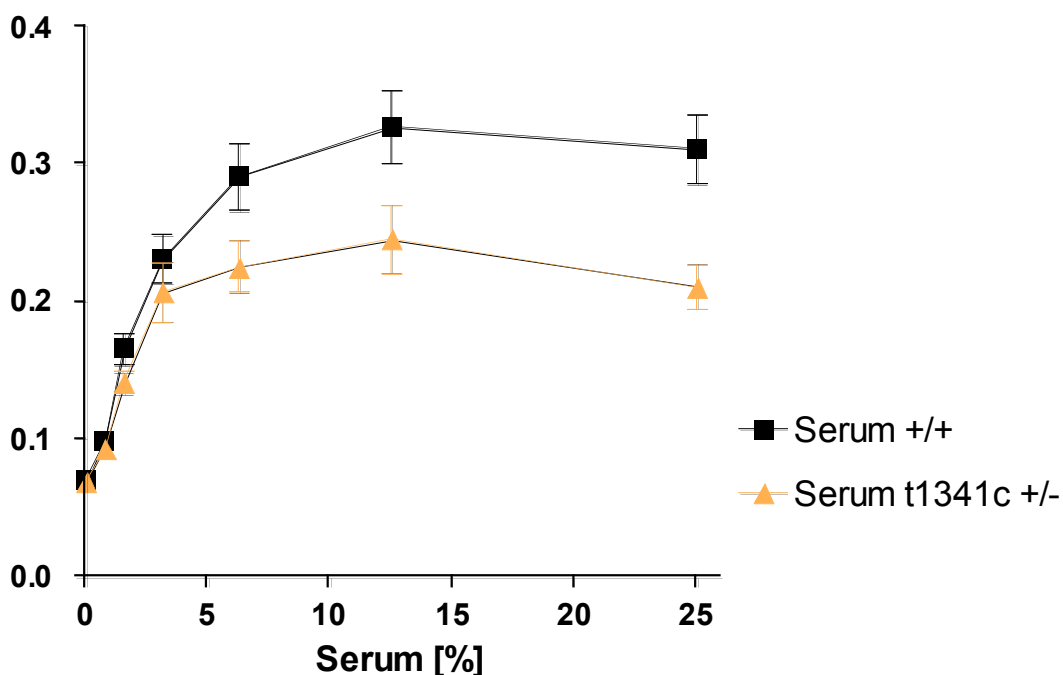


Abb. 14 Bindungsassay mit triacyliertem Lipopeptid

Beschichtet wurde mit Pam<sub>3</sub>Cys 30 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 8,2. Aufgetragen wurden Seren, die das Wildtyp-LBP enthalten (schwarz) und solche mit einem heterozygoten Genotyp für den SNP t1341c (orange). Auch hier ist die Bindungskapazität bei Verwendung von Seren heterozygoter Probanden signifikant verringert.

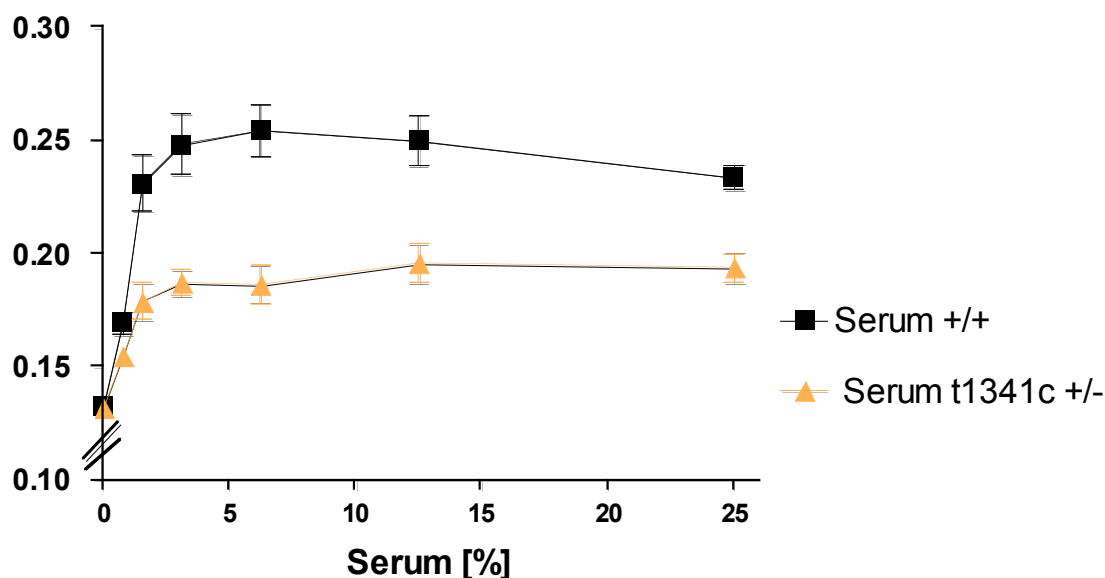
Tab. 9 Berechnete p-Werte

Serumkonzentration in %	p-Wert für Vergleich zwischen Wildtyp- und t1341c-Serum
0,78	0,278606383
1,58	0,092293442
3,13	0,390532291
6,25	<b>0,047270032</b>
12,5	<b>0,034301988</b>
25	<b>0,002907759</b>

Die Abbildung 15 zeigt schließlich die Bindung von im Serum enthaltenem LBP gegenüber diacyliertem Lipopeptid. Das Gesamtausmaß der Bindung ist vergleichbar mit dem gegenüber triacyliertem Lipopeptid. Bei hohen Konzentrationen kommt es allerdings lediglich zu einer Abflachung der Kurve und nicht zu einem Abfall.

In diesem Versuch ist die erkennbare Abschwächung der Bindung bei heterozygotem Genotyp in allen Konzentrationen höchst signifikant.

## OD [450 nm]



## Abb. 15 Bindungsassay mit diacyliertem Lipopeptid

Beschichtung aus Pam<sub>2</sub>Cys 30 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 8,2. Auch hier Verwendung von Serum von Wildtyp-Probanden und heterozygoten Trägern der Mutation t1341c, wobei die Bindungskapazität bei Vorliegen von Heterozygotie deutlich verringert ist.

## Tab. 10 Berechnete p-Werte

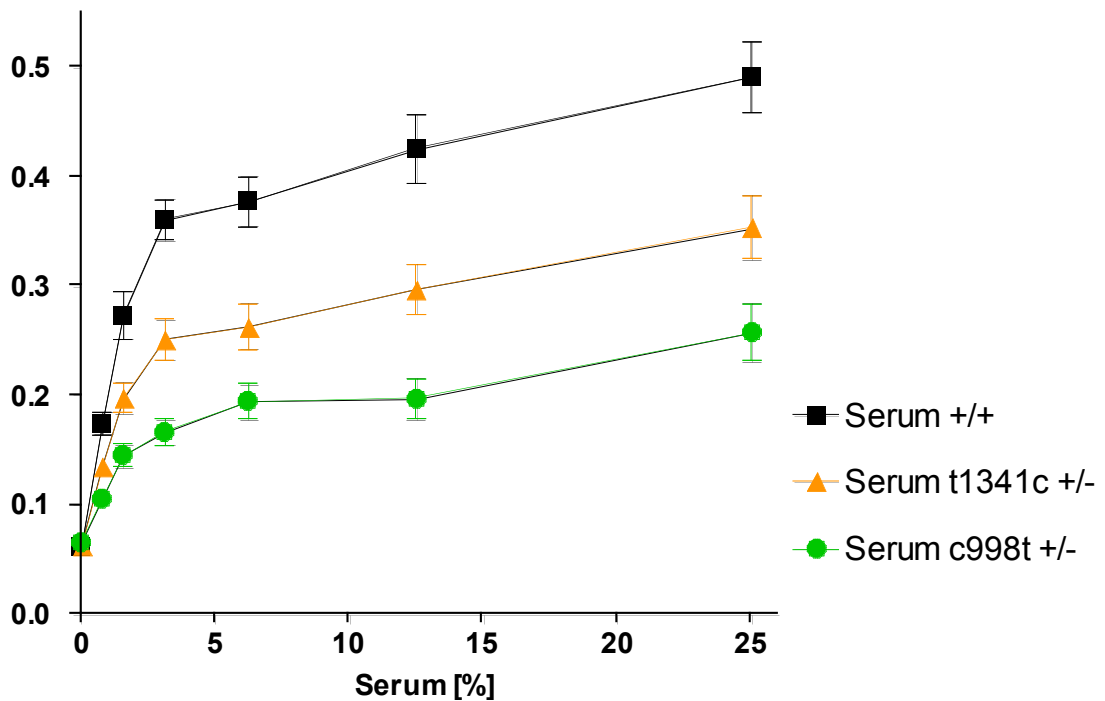
Serumkonzentration in %	p-Wert für Vergleich zwischen Wildtyp- und t1341c-Serum
0,78	0,025841671
1,58	0,001864753
3,13	0,000338333
6,25	8,04869E-05
12,5	0,000967942
25	9,45209E-05

Zusammengefasst scheint das Vorliegen von mutiertem LBP im Serum das Bindungsverhalten gegenüber allen drei bakteriellen Liganden zu beeinträchtigen. Das Ausmaß dieser Beeinträchtigung unterscheidet sich in Abhängigkeit von dem verwendeten Liganden und ist bei diacyliertem Lipopeptid am stärksten signifikant.

Auch Phospholipide spielen als Bestandteile der Zellmembran von Bakterien eine Rolle und vermitteln einen Teil der pathogenen Wirkung. Deshalb wurden Versuche zum Bindungsverhalten auch mit 3-sn-Phosphatidylethanolamin durchgeführt.

Für diese Versuche wurden sowohl Seren als auch rekombinant hergestellte Proteine verwendet. Zunächst erfolgten die Bindungsassays mit Seren von Probanden, die den Wildtyp aufwiesen oder heterozygot für einen der beiden LBP-Polymorphismen waren. Dabei betragen die durchschnittlichen LBP-Konzentrationen der Wildtyp-Seren 16,6 ng/ml und in Seren heterozygoter Probanden 16 ng/ml für den t1341c-SNP bzw. 15,8 ng/ml für den c998t-SNP.

**OD [450 nm]**



**Abb. 16 Bindungsassay mit 3-sn-Phosphatidylethanolamin**

Beschichtung mit 3-sn-Phosphatidylethanolam gelöst in Carbonatpuffer, pH 8,2. Konzentration 30 µg/ml. Aufgetragen wurden Seren unterschiedlichen Genotyps, wobei +/+ den Wildtyp-Genotyp repräsentiert. Die orange Linie entspricht dem Vorliegen des Polymorphismus t1341c in heterozygoter Ausprägung, die grüne Linie entspricht dem homozygot mutierten Genotyp. Die Bindungskapazität ist bei Vorliegen des mutierten LBP deutlich verringert.

## Ergebnisse

Tab. 11 **Berechnete p-Werte**

Serumkonzentration in %	p-Wert für Vergleich zwischen	
	Wildtyp – t1341c	Wildtyp – c998t
0,78	<b>0,003916429</b>	<b>2,8265E-07</b>
1,58	<b>0,005941595</b>	<b>4,13415E-06</b>
3,13	<b>0,000144249</b>	<b>2,15521E-11</b>
6,25	<b>0,000665202</b>	<b>6,18923E-08</b>
12,5	<b>0,001615929</b>	<b>9,33584E-08</b>
25	<b>0,002676139</b>	<b>1,10021E-06</b>

Abbildung 16 zeigt, dass mit steigenden Serumkonzentrationen die Bindung zwischen den LBP-Formen und dem Phospholipid zunimmt. Auch bei hohen Serumkonzentrationen kommt es weder zu einer Sättigung noch zu einem Abfall der Bindungskurven. Allerdings sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen erkennbar. Das Bindungsvermögen der t1341c-Variante ist bereits statistisch signifikant eingeschränkt. Dieser Effekt ist bei der c998t-Variante noch deutlich größer.

Die folgenden Abbildungen zeigen ähnliche Versuche mit rekombinant hergestelltem Protein aller drei Genotypen.

Zunächst erfolgte die Etablierung des Assays.

Dafür wurde in einem ersten Schritt rekombinant hergestelltes Protein der Wildtyp-Form in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Da Vorversuche gezeigt haben, dass die Ergebnisse mit unaufgereinigtem Zellkulturüberstand sauberer sind als bei Verwendung von aufgereinigtem Protein, wurde für die Bindungsassays der Überstand verwendet.

## OD [450 nm]

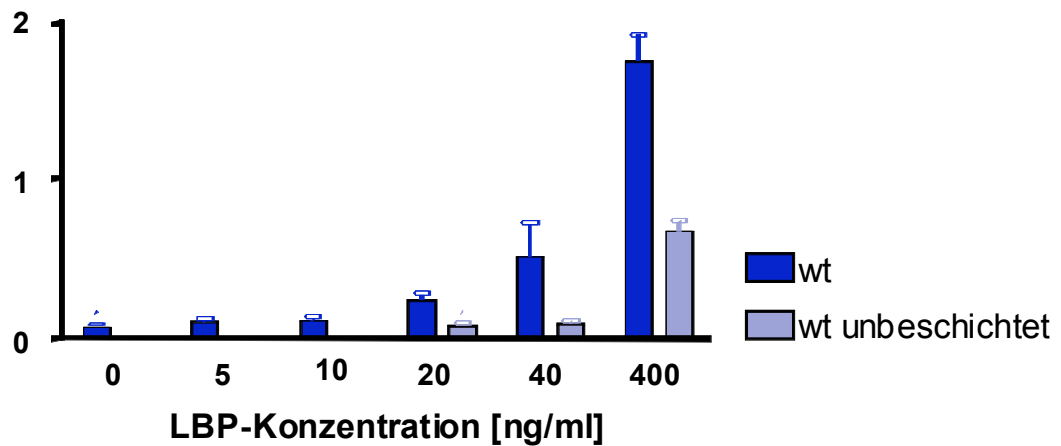


Abb. 17 **Bindungsassay mit rekombinatem Wildtyp-LBP**

Beschichtung mit 3-sn-Phosphatidylethanolam gelöst in Carbonatpuffer, pH 8,2. Konzentration 30  $\mu\text{g/ml}$ . Dargestellt ist die Bindung von rekombinatem Wildtyp-LBP an 3-sn-Phosphatidylethanolamin, die deutlich zu erkennen ist.

Zunächst wurde mit geringen Konzentrationen untersucht, ob überhaupt eine Bindung an das Phospholipid stattfindet. Zur Kontrolle wurde jede Konzentration auch in unbeschichtete Vertiefungen aufgetragen. Dadurch kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unspezifische Bindung an die Platte ausgeschlossen werden.

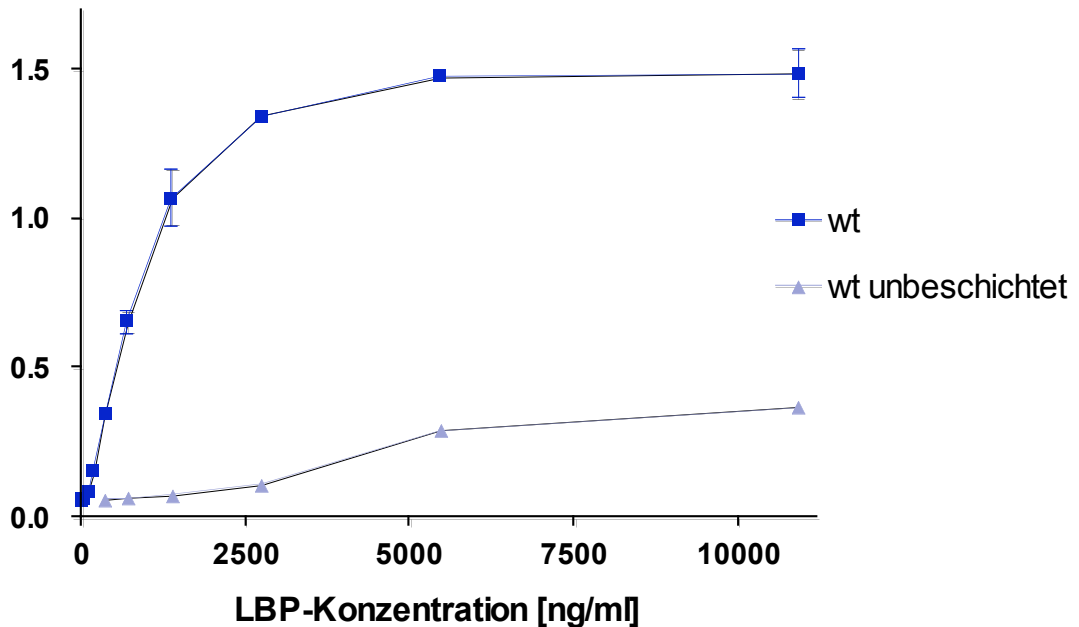
In Abbildung 17 kann man erkennen, dass es zu einer Reaktion kommt, deren Stärke mit zunehmender Konzentration des LBP zunimmt. Ab einer Konzentration von 20 ng/ml ist auch eine unspezifische Reaktion in unbeschichteten Vertiefungen zu beobachten, diese liegt aber deutlich unter den Werten, die in beschichteten Vertiefungen erreicht werden. Daraus kann man schließen, dass es zu einer Bindung zwischen dem aufgetragenen LBP und dem 3-sn-Phosphatidylethanolamin kommt. Diese ist ab einer LBP-Konzentration von 20 ng/ml für weitere Versuche ausreichend.

Um unspezifische Platten-Protein-Interaktion sicher ausschließen zu können, wurde das rekombinante Protein in weiteren Vorversuchen in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt. Auf der Immunosorbplatte war dann jeweils eine Reihe nicht mit Phosphatidylethanolamin beschichtet worden und jede Konzentration wurde sowohl in eine beschichtete und eine unbeschichtete Vertiefung pipettiert. Deutlich sieht man auch hier, dass es zwar zu einer unspezifischen Bindung



des Proteins an die Platte kommt, dass diese aber in hohem Maße durch die Bindung des Proteins in beschichteten Vertiefungen übertroffen wird (Abb. 18).

**OD [450 nm]**



**Abb. 18 Bindungsassay mit hohen Konzentrationen wt-LBP**

Beschichtung mit 3-sn-Phosphatidylethanolamin 30 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 8,2. Inkubation mit rekombinantem LBP in der Wildtyp-Form. Deutlich erkennbar kommt es zu einer Bindung zwischen LBP und PE.

Abschließend kann man also sagen, dass die beobachtete Bindung des LBP an das Phosphatidylethanolamin nicht auf unspezifische Interaktion mit den verwendeten Platten zurückzuführen ist.

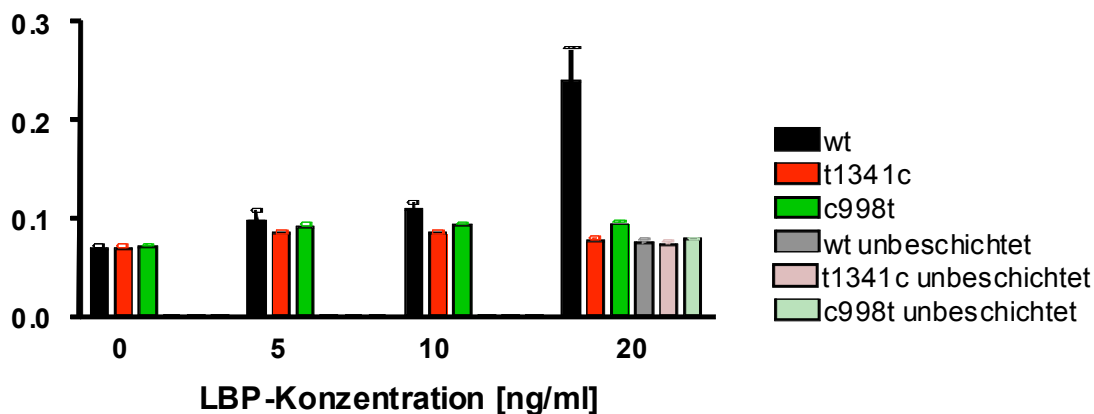
Um die Auswirkungen der Polymorphismen auf die Bindungsfähigkeit von LBP an Phosphatidylethanolamin zu untersuchen, wurden ähnliche Versuche nun auch mit dem rekombinant hergestellten Protein der anderen Genotypen durchgeführt. Da die Proteinausbeute hier sehr viel geringer war, musste jedoch mit geringeren Konzentrationen gearbeitet werden.

Die rekombinanten Proteine lagen im Zellkulturüberstand in unterschiedlichen Konzentrationen vor und wurden sowohl unverdünnt als auch in unterschiedlichen Verdünnungsschritten eingesetzt. Da die Ausgangskonzentrationen für die einzelnen LBP-Formen sehr unterschiedlich waren, mussten diese zunächst angeglichen werden. Der Angleich erfolgte über eine möglichst ge-

## Ergebnisse

ringe Zahl von Verdünnungsschritten. Daraus ergab sich eine Höchstkonzentration, die für alle drei Variationen erreicht werden konnte. Von dieser ausgehend wurde weiter in identischen Schritten verdünnt.

**OD [450 nm]**



**Abb. 19 Bindungsassay mit 3-sn-Phosphatidylethanolamin**

Beschichtung mit 3-sn-Phosphatidylethanolam gelöst in Carbonatpuffer, pH 8,2. Konzentration 30  $\mu\text{g/ml}$  und Inkubation mit rekombinatem LBP. Dabei handelte es sich um wt-LBP (schwarz) und mutiertes LBP der Polymorphismen t1341c (rot) und c998t (grün).

**Tab. 12 Berechnete p-Werte**

LBP-Konzentration in ng/ml	p-Wert für Vergleich zwischen	
	Wildtyp – t1341c	Wildtyp – c998t
0	0,98184816	0,574135935
5	0,295637843	0,542095329
10	0,092509035	0,162624955
20	<b>0,039300388</b>	<b>0,048574163</b>

In Abbildung 19 ist eine Bindung des wt-LBP bei einer LBP-Konzentration von 20 ng/ml erkennbar. Dies bestätigt die in Abb. 17 dargestellten Vorversuche. Im Gegensatz zur Wildtyp-Form des LBP sind die mutierten LBP-Formen anscheinend nicht in der Lage, an Phosphatidylethanolamin zu binden. Die Reaktion, die in allen Konzentrationen etwa das gleiche Ausmaß zeigt, übersteigt nicht die unspezifische Bindung, die in der höchsten Konzentration auch in nicht mit Phosphatidylethanolamin beschichteten Vertiefungen zu beobachten ist.

---

Damit ist gezeigt, dass sowohl bei Vorliegen der Mutation c998t als auch bei der Variante t1341c keine Bindung an Phosphatidylethanolamin stattfindet.

Die dargestellten Versuche zeigen, dass sich durch die Polymorphismen die Bindung sowohl gegenüber allen untersuchten bakteriellen Liganden als auch gegenüber Phospholipiden (repräsentiert durch PE) abschwächt. Als nächstes muss nun untersucht werden, inwieweit sich das in einer veränderten Immunreaktion auf Bakterien oder ihre Bestandteile widerspiegelt.

### **4.5 Stimulation der murinen Makrophagen-Zelllinie**

Um zu klären, wie die Reaktion des Immunsystems auf Bakterien in Anwesenheit unterschiedlicher LBP-Formen ausfällt, wurden Stimulationsversuche mit einer murinen Mausmakrophagen-Zelllinie durchgeführt.

Die Stimulation erfolgte mit LPS 0111:B4, LPS Re 595 und diacyliertem und triacyliertem Lipopeptid in unterschiedlichen Konzentrationen. Dadurch wird eine Immunreaktion der Zellen ausgelöst, die sich durch die Bestimmung von pro-inflammatorischen Zytokinen quantifizieren lässt. Dazu wurde die TNF- $\alpha$ - und IL-6-Konzentration in den Überständen nach 2, 4, 12 und 24 Stunden mittels ELISA bestimmt.

Für die Auslösung der inflammatorischen Reaktion ist die Anwesenheit von LBP erforderlich. Dieses wurde in Form von Seren zugesetzt. Diese Seren stammten wie bei den Bindungsassays bereits dargestellt von Probanden unterschiedlichen Genotyps. So war es möglich, die Stärke der inflammatorischen Reaktion in Abhängigkeit vom Genotyp zu analysieren und zu vergleichen. Für die im Folgenden dargestellten Versuche wurden ausschließlich Seren von Probanden verglichen, die entweder den Wildtyp oder den Polymorphismus t1341c in hetero- oder homozygoter Form aufwiesen, da ähnliche Versuche für den Polymorphismus c998t bereits von Jana K. Eckert durchgeführt wurden. In diesen zeigte sich bei Vorliegen des Polymorphismus c998t eine deutlich abgeschwächte Zytokinantwort auf unterschiedliche bakterielle Liganden, weshalb nun untersucht werden sollte, ob ein ähnlicher Effekt auch durch den Polymorphismus t1341c auftritt.

## Ergebnisse

---

Die folgenden Diagramme stellen jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mehreren nacheinander durchgeführten Experimenten dar (mindestens zwei, in der Regel drei). Im Falle signifikanter Unterschiede finden sich die p-Werte für die einzelnen Stimulationsversuche in tabellarischer Form den jeweiligen Abbildungen zugeordnet. Sie wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Signifikante Werte sind fett gedruckt.

Zunächst wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS 0111:B4 unter Anwesenheit von 1 % Serum stimuliert.

Nach 4, 12 und 24 Stunden erfolgte die Messung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ .

Um eine unspezifische Vorstimulation der Zellen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (in der Abbildung 20 schwarz dargestellt). Diese zeigt deutlich, dass es ohne Zugabe von LPS 0111:B4 kaum zu einer Produktion von TNF- $\alpha$  kommt. Wird LPS ohne Serum zugegeben, steigt die TNF- $\alpha$ -Produktion erst nach 24 Stunden leicht an. Die erreichten Werte sind niedrig und unterstreichen damit die wichtige Rolle, die dem Serum und damit dem LBP in der Auslösung der Immunantwort zukommt. Durch die Zugabe von Serum erfolgte eine Steigerung der ausgelösten TNF- $\alpha$ -Sekretion. Bereits nach vier Stunden ist eine starke Immunreaktion zu beobachten, welche sich mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich verstärkt.

Im weiteren Verlauf scheinen bei Seren, die mutiertes LBP (SNP t1341c in heterozygoter oder homozygoter Ausprägung) enthalten, leicht höhere TNF- $\alpha$ -Werte erreicht zu werden als bei Verwendung von Wildtyp-LBP. Die Unterschiede sind allerdings sehr gering und deutlich erst nach 24 Stunden zu beobachten. Nach dieser Zeit steigt die TNF- $\alpha$ -Konzentration auch an, wenn kein Serum zugegeben wurde, was auf eine unspezifische Stimulation zurückzuführen ist.

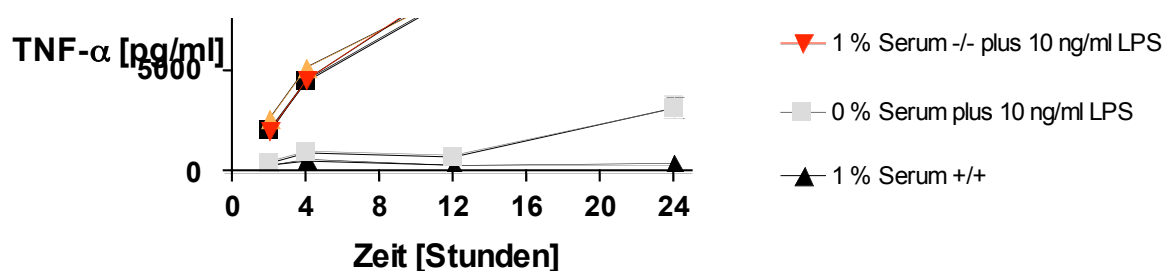


Abb. 20 **TNF- $\alpha$  nach Stimulation von RAW 264.7 mit S-LPS**

Verwendet wurden jeweils fünf Seren von Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/-) Probanden und ein Serum von einem homozygoten Probanden. Bei den Mutationsträgern handelte es sich um Probanden, die hetero- oder homozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Stimuliert wurde mit 10 ng/ml LPS 0111:B4. Die Werte sind jeweils gemittelt und mit Standardfehler dargestellt.

Anschließend folgt der Vergleich zwischen Seren unterschiedlichen Genotyps.

Tab. 13 **Berechnete p-Werte**

Zeit in Stunden	p-Wert für Vergleich zwischen	
	Wildtyp – t1341c heterozygot	Wildtyp – t1341c homozygot
2	0,050956651	0,754038358
4	0,158389707	0,927575242
12	0,72863488	0,290802294
24	<b>0,015768367</b>	<b>0,010539138</b>

Da nur ein Proband homozygot für den t1341c-Polymorphismus war, stand nur eine begrenzte Menge Serum zur Verfügung. Deshalb wurden die folgenden Experimente zunächst ausschließlich mit Seren von Wildtyp- und heterozygoten Probanden durchgeführt, um im Falle wegweisender Ergebnisse gegebenenfalls später gezielte Versuche auch mit homozygotem Serum anzuschließen.

Im nächsten Versuchsaufbau wurde zunächst die Reaktion vier Stunden nach Stimulation mit 1, 10 und 100 ng/ml unterschiedlicher LPS-Arten (R-LPS und S-LPS) gemessen. Dies erfolgte in diesem Fall über die Bestimmung eines weiteren pro-inflammatorischen Zytokins (IL-6).

Bei Stimulation mit LPS 0111:B4 unter Anwesenheit von 2 % Serum ist deutlich zu erkennen, dass es ohne Zugabe von Serum zu keiner nennenswerten IL-6-Produktion kommt.

Insgesamt werden für IL-6 geringere Werte erreicht als für TNF- $\alpha$ . Trotzdem ist eine Immunreaktion bei Stimulation mit 10 und 100 ng/ml LPS deutlich zu erkennen (Abb. 21).

Im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Genotypen scheint es eine geringfügig geringere IL-6-Produktion bei Verwendung von Seren heterozygoter Individuen zu geben. Dieser Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant und bei Verwendung einer 5 %-igen Serumlösung nicht mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

### IL-6 [pg/ml]

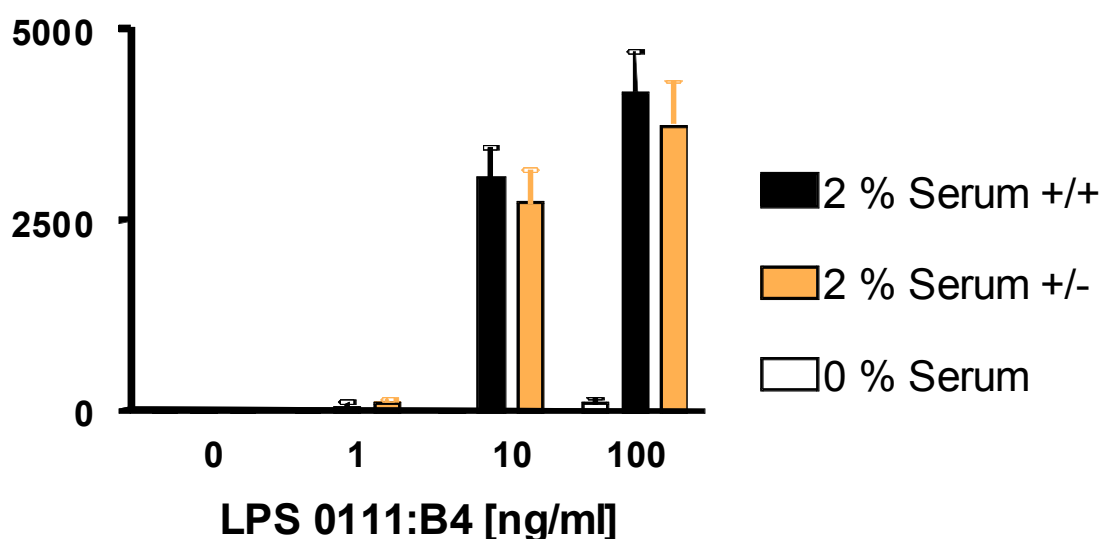


Abb. 21 IL-6 vier Stunden nach Stimulation von RAW 264.7 mit S-LPS

Verwendet wurden jeweils fünf Seren von Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/-) Probanden. Bei den Mutationsträgern handelte es sich um Probanden, die hetero- oder homozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Versuchen, die in identischer Form nacheinander durchgeführt wurden.

Analog zu den vorherigen Versuchen erfolgte die Stimulation mit LPS Re 595 unter Anwesenheit von 2 und 5 % Serum.

## Ergebnisse

Unter Anwesenheit von 2 % Serum wurde mit 10 und 100 ng/ml LPS Re 595 stimuliert. Die Zellen zeigen keinerlei IL-6-Produktion, wenn kein LPS zugesetzt wurde, was im Sinne einer Vorstimulation zu interpretieren wäre. Ohne Zugabe von Serum kommt es in keiner Konzentration zu einer messbaren Reaktion. Aber auch unter Anwesenheit von Serum kommt es erst bei der höchsten LPS-Konzentration zu einer starken IL-6-Produktion. Dabei ist allerdings zwischen den einzelnen Genotypen kein Unterschied erkennbar (Abb. 22).

### IL-6 [pg/ml]

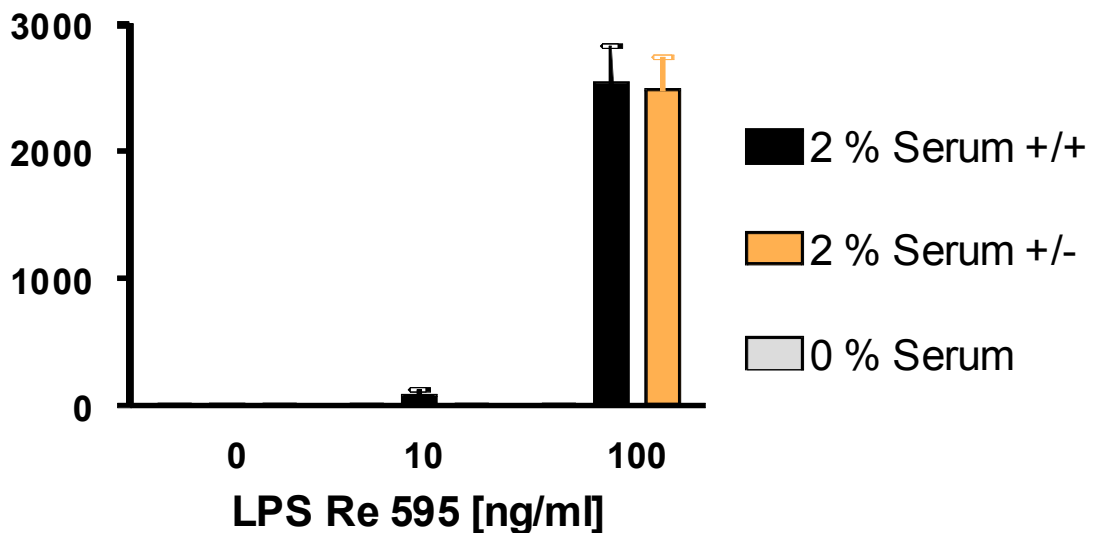
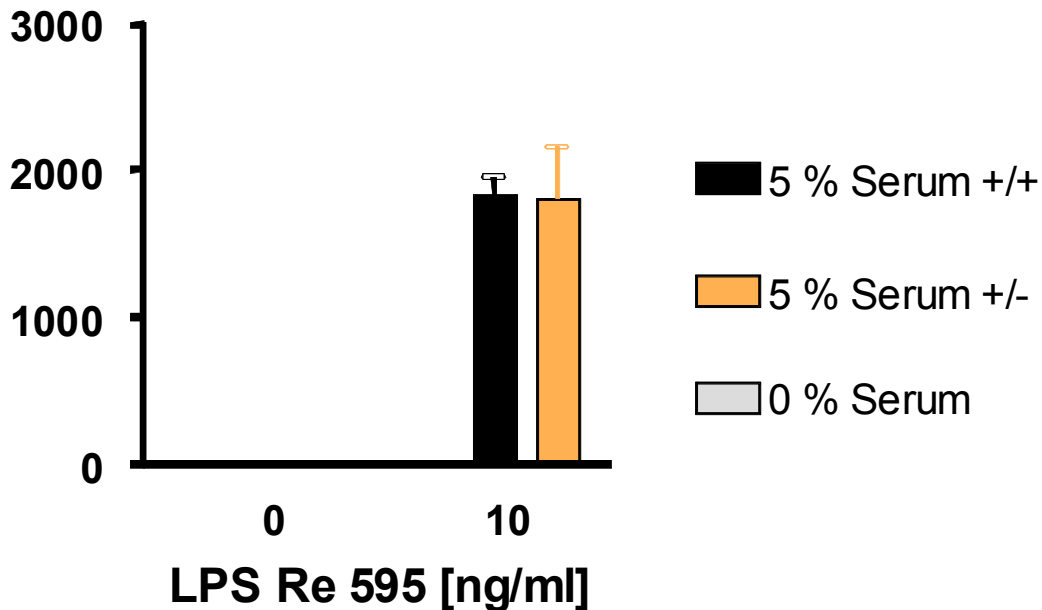


Abb. 22 **IL-6 vier Stunden nach Stimulation von RAW 264.7 mit R-LPS**

Verwendet wurden jeweils fünf Seren von +/+ und +/- Probanden. Bei den Mutationsträgern handelte es sich um Probanden, die hetero- oder homozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Versuchen, die in identischer Form nacheinander durchgeführt wurden.

Unter Verwendung von 5 % Serum erfolgte die Stimulation lediglich mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Auch hier löst weder die Zugabe von reinem Serum ohne LPS noch die Stimulation mit LPS unter Abwesenheit von Serum eine Reaktion aus.

Die IL-6-Produktion, die durch 100 ng/ml LPS Re 595 unter Anwesenheit von 5 % Serum ausgelöst wird, ist insgesamt schwächer als bei Verwendung von niedriger konzentriertem Serum. Aber auch hier ist kein Unterschied zwischen den Seren unterschiedlichen Genotyps zu beobachten (Abb. 23).

**IL-6 [pg/ml]**

**Abb. 23 IL-6 vier Stunden nach Stimulation von RAW 264.7 mit R-LPS**

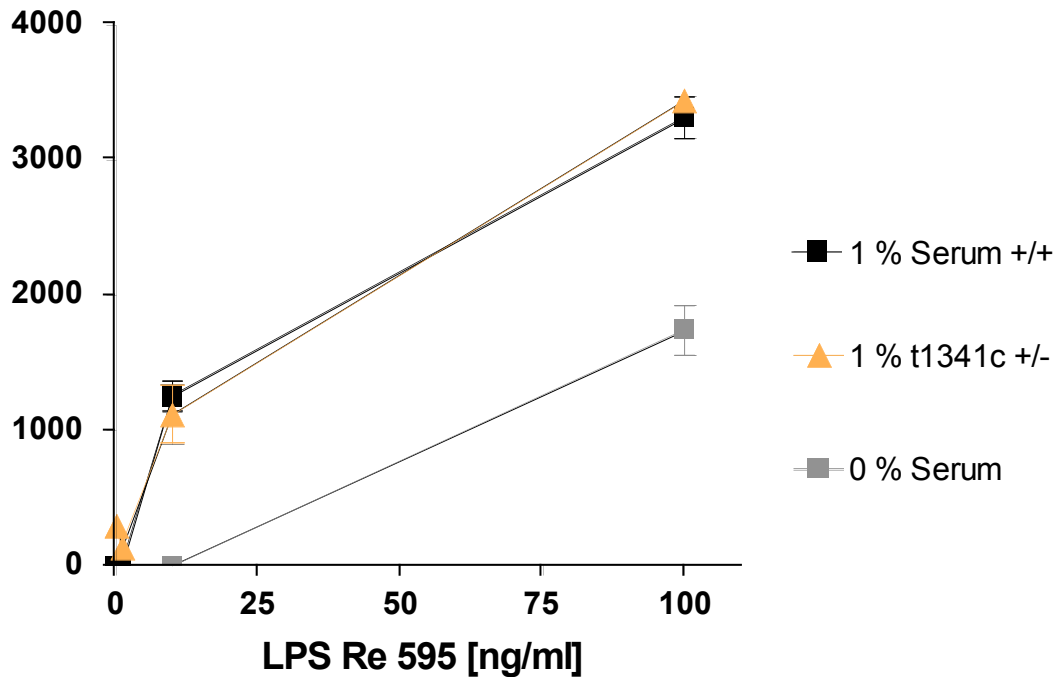
Verwendet wurden jeweils fünf Seren von +/+ und +/- Probanden. Bei den Mutationsträgern handelte es sich um Probanden, die hetero- oder homozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Versuchen, die in identischer Form nacheinander durchgeführt wurden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass alle Ergebnisse den verstärkenden Effekt zeigen, den die Zugabe von Serum auf die Zytokinantwort hat. Diese Verstärkung scheint aber unabhängig vom Vorliegen des Polymorphismus t1341c bei allen verwendeten Seren gleich stark ausgeprägt zu sein.

Abschließend wurde nochmals die TNF- $\alpha$ -Produktion in Reaktion auf verschiedene LPS-Formen untersucht. Dabei lag der Fokus auf den Werten nach 4 Stunden, da die Sekretion von TNF- $\alpha$  in der Regel sehr schnell erfolgt.

Zunächst wurde mit LPS Re 595 in den Konzentrationen 1, 10 und 100 ng/ml stimuliert und so die Reaktion auf ein R-LPS getestet. Wie bei den vorherigen Versuchen kommt es zu einer starken TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, die mit steigender LPS-Konzentration zunimmt und unter Abwesenheit von Serum wesentlich schwächer ausfällt. Allerdings ist kein Unterschied zwischen Wildtyp-Serum und heterozygotem Serum zu erkennen (Abb. 24).



**TNF- $\alpha$  [pg/ml]**

**Abb. 24 TNF- $\alpha$  vier Stunden nach Stimulation von RAW 264.7 mit R-LPS**

Verwendet wurden jeweils fünf Seren von +/+ und +/- Probanden. Bei den Mutationsträgern handelte es sich um Probanden, die hetero- oder homozygot für den Polymorphismus t1341c waren. Die Werte nach 4 h sind jeweils gemittelt und mit Standardfehler dargestellt.

Um auch die Reaktion auf ein S-LPS zu untersuchen, erfolgte anschließend die Stimulation mit LPS 0111:B4 in identischen Konzentrationen. Dabei führt die Stimulation ohne Zugabe von Serum zu keiner messbaren Reaktion.

Die Zugabe von Serum resultiert wie bereits bekannt in einer Verstärkung der TNF- $\alpha$ -Produktion. Dabei wurde in diesem Versuchsaufbau auch nochmals Serum von Probanden verwendet, die heterozygot für den Polymorphismus c998t waren. Insgesamt werden sehr viel höhere Werte erreicht als bei Stimulation mit LPS Re 595. Die Konzentration ist dabei bei Stimulation mit niedrigen LPS-Konzentrationen unabhängig vom verwendeten Serum nahezu identisch. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml sind allerdings Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten (Abb. 25).

## Ergebnisse

Vergleicht man Serum von Wildtyp-Probanden mit Serum von Probanden, die den Polymorphismus c998t oder t1341c aufweisen, fällt bei Vorliegen der Mutationen eine verringerte TNF- $\alpha$ -Produktion auf. Bereits das Vorliegen des Polymorphismus t1341c in heterozygoter führt zu einer Abschwächung, die allerdings nicht statistisch signifikant ist. Deutlicher und statistisch signifikant ist die Auswirkung bei Vorliegen des Polymorphismus c998t in heterozygoter Ausprägung. Am stärksten ist allerdings der Effekt bei Homozygotie für den Polymorphismus t1341c. Da Serum von Probanden, die homozygot für den LBP-SNP c998t waren, nicht in ausreichender Menge vorhanden war und die Ergebnisse dazu bereits in der Dissertation von Jana K. Eckert dargestellt sind [98], wurde auf die Verwendung hier verzichtet.

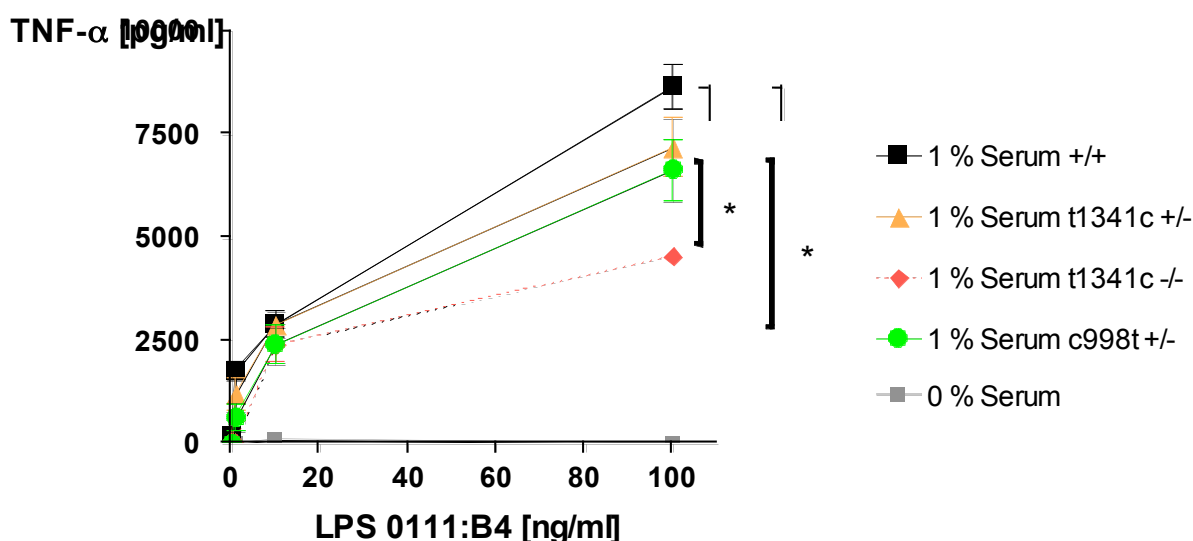


Abb. 25 TNF- $\alpha$  vier Stunden nach Stimulation von RAW 264.7 mit S-LPS

Verwendet wurden jeweils fünf Seren von +/+ und t1341c +/- Probanden, vier Seren von c998t +/- Probanden und ein Serum von einem homozygoten Probanden (t1341c -/-). Die Werte nach 4 h sind jeweils gemittelt und mit Standardfehler dargestellt.

Tab. 14 Berechnete p-Werte

LPS-Konzentration in ng/ml	p-Wert für Vergleich zwischen		
	Wildtyp – t1341c hetero- zygot	Wildtyp – t1341c homo- zygot	Wildtyp – c998t heterozy- got
0	0,056156131	0,224903586	<b>0,003276916</b>
1	0,244463403	<b>0,010290675</b>	<b>0,011248391</b>
10	0,995850297	0,504655626	0,461248081
100	0,115306066	<b>0,008253507</b>	<b>0,038568343</b>

---

In weiteren Versuchen wurde mit Lipopeptiden (diacyliert und triacyliert) stimuliert. Diese zeigten allerdings nicht so klare Ergebnisse wie die Stimulation mit verschiedenen LPS-Formen. Aus diesem Grund wurden diese Ergebnisse hier nicht dargestellt. Zusammengefasst waren hier keinerlei Genotyp-abhängigen Unterschiede zwischen den einzelnen Seren in der Lipopeptid-induzierten Zytokininduktion zu beobachten.

Insgesamt konnte also in Stimulationsversuchen in Zellkultur kein nennenswerter Funktionsverlust der Mutante t1341c gezeigt werden. Hingegen scheint die c998t Mutante die Immunantwort stark zu beeinflussen (siehe [98, 101])

### **4.6 Verteilung der LBP-Polymorphismen im Kollektiv der Meningitis-Patienten**

Da in Zellkulturversuchen die Beeinflussung der Immunreaktion durch die beiden LBP-Mutanten stark unterschiedlich war, sollte noch die Frage geklärt werden, ob Träger dieser Mutationen sich im Krankheitsverlauf unterschiedlich verhalten. Um in dieser Frage erste Anhaltspunkte zu erlangen, wurden Patientendaten analysiert, wobei der Fokus auf dem Krankheitsbild der Meningitis lag. Obwohl wir hier zunächst nur eine kleine Fallzahl untersuchen konnten, entschieden wir uns für dieses Krankheitsbild, da hier die inflammatorische Wirtsreaktion von großer Wichtigkeit ist, und es zudem zu dramatischen auch lethalen klinischen Verläufen kommt. Zu diesem Zweck wurden vom Nationalen Referenzzentrum für *Neisseria meningitidis* zunächst 31 DNA-Proben zur Verfügung gestellt. Diese Studie wird fortgesetzt, konnte aber im zeitlichen Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht mehr abgeschlossen werden. Die DNA-Proben stammen von Kindern im Alter zwischen zwei Wochen und 10 Jahren, die im Zeitraum von Januar bis November 2008 an einer Meningokokken-Meningitis erkrankten. Das Patientenkollektiv besteht aus 19 Jungen und 12 Mädchen. Zunächst erfolgte die Untersuchung auf die Polymorphismen c998t und t1341c mittels LightCycler PCR.

**4.6.1 Verteilung des LBP-Polymorphismus c998t**

Die Untersuchung auf den LBP-Polymorphismus c998t ergab 3 Kinder, die heterozygot für den SNP sind im Vergleich zu 28 Kindern, die die Wildtyp-Form aufweisen. Homozygote Individuen wurden nicht gefunden (Tab. 15)

**Tab. 15 Verteilung des SNP c998t im Patientenkollektiv**

	Gesamt	CC	CT	TT
Anzahl	31	28	3	0
Anteil in %	100	80,6	16,1	

Die Aufteilung nach Geschlecht ergibt unter den Mädchen ausschließlich den Wildtyp, während die Häufigkeit für Heterozygotie bei Jungen 15,8 % beträgt (Tab. 16). Allerdings ergab die Untersuchung der Geschlechterverteilung aufgrund der niedrigen Fallzahl keinen signifikanten Unterschied.

**Tab. 16 Verteilung des SNP c998t in Abhängigkeit vom Geschlecht (Patientenkollektiv)**

		Männlich	Weiblich
Gesamt	Anzahl	19	12
	Anteil an Gesamtkollektiv	61,3 %	38,7 %
CC	Anzahl	16	12
	Anteil innerhalb von Geschlecht	84,2 %	100 %
CT	Anzahl	3	0
	Anteil innerhalb von Geschlecht	15,8 %	0
TT	Anzahl	0	0
	Anteil innerhalb von Geschlecht	0	0

**4.6.2 Verteilung des LBP-Polymorphismus t1341c**

Für eine Erläuterung der Schmelzpunkte und –kurven siehe Kap. 4.1.1 (Verteilung in einer gesunden Kontrollpopulation).

Die Analyse ergab, dass 25 Kinder die Wildtyp-Form des LBP exprimieren und 5 Kinder heterozygot für den Polymorphismus t1341c sind. Ein Kind weist einen homozygoten Genotyp auf (Tab. 17).

**Tab. 17 Verteilung des SNP t1341c im Patientenkollektiv**

	Gesamt	TT	CT	CC
Anzahl	31	25	5	1
Anteil in %	100	80,6	16,1	3,2

Auch für diesen Polymorphismus erfolgte eine geschlechtsabhängige Darstellung der Häufigkeiten und der Verteilung (Tab. 18). Trotz sich stark unterscheidender Häufigkeiten zwischen Jungen und Mädchen sind diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Tab. 18 Verteilung des SNP t1341c in Abhängigkeit vom Geschlecht (Patientenkollektiv)

		Männlich	Weiblich
Gesamt	Anzahl	19	12
	Anteil an Gesamtkollektiv	61,3 %	38,7 %
TT	Anzahl	17	8
	Anteil innerhalb von Geschlecht	89,5 %	66,7 %
CT	Anzahl	2	3
	Anteil innerhalb von Geschlecht	10,5 %	25 %
CC	Anzahl	0	1
	Anteil innerhalb von Geschlecht	0	8,3 %

#### ***4.6.3 Vergleich der Polymorphismusverteilung zwischen gesundem Kontrollkollektiv und Kindern mit Meningitis***

Eine zentrale Frage ist, ob die Polymorphismen in einem Patientenkollektiv im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv eine andere Verteilung aufweisen. Um eine zuverlässige statistische Auswertung durchzuführen, ist die Fallzahl im Patientenkollektiv allerdings zu gering. Trotzdem wurde sowohl die Verteilung der Polymorphismen insgesamt als auch im Hinblick auf das Geschlecht statistisch untersucht, um eventuelle Tendenzen festzustellen. Die entsprechenden Berechnungen wurden aufgrund der geringen Fallzahl mit dem Fisher-Exakt-Test durchgeführt. Alle berechneten p-Werte sind im Anhang ausführlich dargestellt. Weder in der Gesamthäufigkeit noch im Hinblick auf die in den Tabellen 19 und 20 dargestellten Allelfrequenz gibt es dabei für einen der Polymorphismen einen signifikanten Unterschied.

Tab 19 Allelfrequenz c998t

	Kontrollen	Patienten
Wildtyp-Allel	0,924031	0,951613
Mutiertes Allel	0,0875969	0,048387
Gesamt	1	1

Tab 20 Allelfrequenz t1341c

	Kontrollen	Patienten
Wildtyp-Allel	0,904651	0,887097
Mutiertes Allel	0,095349	0,112903
Gesamt	1	1

Auch im Patientenkollektiv befinden sich beide Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Equilibrium.

### Geschlechtsabhängige Analyse für den SNP c998t

Beim Vergleich der SNP-Häufigkeit innerhalb der Männer und innerhalb der Frauen gibt es keinen Unterschied zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Für den Vergleich der Polymorphismus-Häufigkeit in Abhängigkeit vom Geschlecht innerhalb der Patientengruppe ist keine statistische Auswertung möglich. Unter den Mädchen kommen keine heterozygoten Patienten vor, weshalb der Unterschied bei dreifacher Fallzahl bereits signifikant wäre. Aber da die normale Häufigkeit des SNP 15 % beträgt und es sich nur um 12 Mädchen handelt, kann das zur Bewertung nicht herangezogen werden.

### **Geschlechtsabhängige Analyse für den SNP t1341c**

Zunächst erfolgte auch für den Polymorphismus t1341c der Vergleich beider Kollektive in Abhängigkeit vom Geschlecht.

Im Vergleich männlicher Individuen scheint es auch für den Polymorphismus t1341c keine Unterschiede zu geben. Nimmt man allerdings eine hypothetische Vergrößerung der Fallzahl um den Faktor 10 bei gleich bleibender Verteilung an („power-Analyse“), wird der Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv mit einem p-Wert von 0,04 statistisch signifikant.

Größer ist dieser Effekt im Vergleich der weiblichen Individuen zu beobachten.

So scheint das mutierte Allel (ht+mut gegenüber wt) bei Mädchen des Patientenkollektivs häufiger aufzutreten. Nimmt man eine sechsfache Fallzahl bei gleich bleibender Verteilung an, ist der Unterschied mit einem  $p=0,03$  bereits signifikant, bei zehnfacher Fallzahl und gleich bleibender Verteilung wäre  $p=0,014$ . Anschließend erfolgte eine Untersuchung auf geschlechtsabhängige Unterschiede innerhalb des Patientenkollektivs. Dabei fällt auf, dass der Anteil an Mädchen an heterozygoten und mutierten Individuen höher ist, obwohl ihr Anteil an der Gesamtzahl des Kollektivs geringer ist.

Untersucht man die Häufigkeit heterozygoter Individuen, wird bei vierfacher Anzahl der Unterschied zwischen Jungen und Mädchen leicht signifikant ( $p=0,023$ ). Die Präsenz des (mutierten) C-Allels ist bei dieser hypothetischen Fallzahl bereits deutlich statistisch signifikant häufiger bei Mädchen anzutreffen ( $p=0,0046$ ).

Natürlich kann dies nicht als statistischer Beweis, aber sehr wohl als erster Hinweis auf eine mögliche Tendenz gewertet werden.



## 5 Diskussion

### 5.1 Funktionsanalyse des LBP

LBP spielt eine wichtige Rolle in der Auslösung der Immunantwort gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Seine Wirkung beruht vor allem auf der Bindung und dem Transport von spezifischen bakteriellen Liganden. Einige der bisher identifizierten Bindungspartner von LBP sind das LPS und diverse Lipopeptide.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Polymorphismen von LBP auf ihre funktionellen Auswirkungen hin untersucht. Dazu wurde zunächst das Bindungsverhalten der t1341c-Mutante gegenüber den typischen Liganden des LBP untersucht, bei denen es sich um Lipopeptide (repräsentativ für Gram-positive Bakterien) und LPS als das klassische immunstimulierende Prinzip Gram-negativer Bakterien handelt. Anschließend wurden identische Versuche auch mit Phosphatidylethanolamin durchgeführt, wobei beide untersuchten Polymorphismen berücksichtigt wurden. Im Anschluss erfolgten Experimente, in denen die Immunaktivierung unter Einfluss der unterschiedlichen LBP-Formen untersucht wurde. Um die Ergebnisse der Experimente erklären zu können, ist die Kenntnis der genauen Lokalisation der Polymorphismen innerhalb von LBP und die Funktion der entsprechenden Bereiche nötig. Dazu wurden zunächst dreidimensionale Modelle erstellt, aus denen man die Lokalisation der Mutationen entnehmen kann.

Der Polymorphismus c998t führt zu einem Aminosäureaustausch im Protein an der Position 333, die sich im C-terminalen Bereich des Proteins befindet. Der Polymorphismus t1341c liegt nach der dreidimensionalen Darstellung und nach Erkenntnissen zu strukturellen Übereinstimmungen zwischen dem BPI und dem LBP innerhalb des zentralen  $\beta$ -Faltblatts in der Nähe des Übergangs zum COOH-terminalen Bereich [85]. In diesem Bereich liegt eine der Phospholipidbindungstaschen des BPI, deren Existenz auch für das LBP vermutet wird [76]. Es stellt sich die Frage, inwieweit der Austausch einer Aminosäure an dieser Stelle die Funktion des Proteins verändert und welche Rolle die postulierten Phospholipidbindungstaschen dabei spielen.

Die Bewertung der experimentellen Daten wird auf den ersten Blick dadurch kompliziert, dass LBP zum Teil entgegengesetzte Funktionen beinhaltet: Auf der einen Seite dient es der Aktivierung des Immunsystems, auf der anderen Seite führt es zu einer Hemmung der Zytokinantwort und schützt damit gewissermaßen vor einer überschießenden und für den Körper schädlichen Immunreaktion.

Wie diese Mechanismen reguliert werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings gibt es erste Anhaltspunkte dafür, dass die gegensätzlichen Reaktionen von unterschiedlichen Bereichen des Proteins vermittelt werden. So wurde in Versuchen mit löslichem LBP zunächst der NH<sub>2</sub>-terminale Bereich als essentiell für die Bindung von LPS-Monomeren identifiziert, wobei die Bindung von LPS-Aggregaten durch Mutationen in diesem Bereich unbeeinflusst bleibt [102].

Mittlerweile konnte allerdings gezeigt werden, dass das LBP nicht nur im Serum, sondern auch in Membranen der immunkompetenten Zellen vorliegt. Dabei scheint die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne nach außen gerichtet zu sein, während die zwei Phospholipidbindungstaschen den transmembranären Bereich markieren und die Verbindung zu der Phospholipid-Doppelschicht herstellen [103]. Die primäre Interaktion mit der Zellmembran läuft allerdings ebenfalls über den NH<sub>2</sub>-terminalen Bereich ab, indem die positiv geladenen Aminosäuren mit den negativ geladenen Zellmembranbestandteilen interagieren. Die Phospholipidbindungstaschen verankern somit das LBP mit der Phospholipid-Doppelschicht.

Im Zusammenhang mit membranständigem LBP konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieses vor allem für die Zellstimulation verantwortlich ist, während in löslicher Form vorliegendes LBP zu dem neutralisierenden Effekt beiträgt [104]. Zur Aktivierung über membranständiges LBP sollen besonders LPS-Aggregate wichtig sein. Das bedeutet, dass lösliches LBP über andere Bindungsstellen für LPS-Aggregate verfügen muss als membranständiges LBP, bei dem die Interaktion über die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne abläuft. Dies ist neben der Verankerung in der Zellmembran eine weitere mögliche Funktion der postulierten Phospholipidbindungstaschen. Sie könnten für die Bildung von LPS-LBP-Komplexen sorgen, wenn das LBP in löslicher Form vorliegt und auch andere Liganden binden. So verfügen alle in dieser Arbeit untersuchten Liganden über Acylketten. Diese können so in die Bindungstaschen eingebettet werden, dass der hydrophobe Rest der Liganden durch das umgebende Protein abgeschirmt wäre. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, wie die Phospholipidbindungstaschen dem Transport von lipidhaltigen Strukturen in wässriger Umgebung dienen [76].

In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass es nach Formung von LPS-LBP-Komplexen nicht zu einer Integrierung in Membranen kam, also auch nicht zu einer Zellaktivierung [103]. Das kann bedeuten, dass die Komplexbildung mit der Bindung von LPS in den Bindungstaschen einhergeht, die dann nicht mehr für die Interaktion mit den Zellmembranen zur Verfügung stehen.

Zudem existiert über Serum-Lipoproteine vermutlich ein weiterer Mechanismus, welcher der Inaktivierung des LPS dient. Das LBP könnte LPS zu diesen transportieren oder aber über die

Phospholipidbindungstaschen gebunden an Lipoproteine im Serum vorliegen und anschließend LPS-Aggregate binden.

Über die erwähnten Mechanismen könnten die Phospholipidbindungstaschen also durch Bindungs- und Transportmechanismen zur Inaktivierung von LPS beitragen, aber durch die Verankerung des LBP in die Zellmembran von Immunzellen auch eine Rolle in der Immunaktivierung spielen.

## 5.2 Auswirkungen der Polymorphismen *in vitro*

Vorarbeiten zur Mutation c998t zeigen einen Funktionsverlust sowohl im Hinblick auf die Bindung von Liganden als auch auf die ausgelöste Immunreaktion [98].

Allerdings gilt für die LPS-Bindung der NH<sub>2</sub>-terminale Bereich als entscheidend [80]. Eine Veränderung am entgegen gesetzten Ende des Proteins, wie sie durch den Polymorphismus c998t entsteht, kann also nur über indirekte Mechanismen das Bindungsverhalten gegenüber den Liganden verändern.

Eine mögliche Erklärung ist hierbei eine erhöhte Anfälligkeit der c998t Variante gegenüber Proteasen, die durch die Mutation hervorgerufen wird. Ein erster Hinweis auf diesen Umstand waren Schwierigkeiten, die beim Nachweis des mutierten LBP durch den Routineassay auftraten. In Western Blots konnten schließlich zwei Fragmente gefunden werden, die in ihrer Gesamtheit die Größe des Holo-LBP ergeben. Daraus wurde geschlossen, dass das mutierte LBP aufgrund der strukturellen Veränderung in zwei Fragmente zerfällt, die nicht mehr funktionsfähig sind [98]. Damit ist weniger vollständiges Protein vorhanden und seine Wirkung ist abgeschwächt.

Die Mutation t1341c wurde bisher noch nicht ausführlich mittels rekombinanter Expression untersucht. In den durchgeführten Bindungsversuchen zeigte sich zunächst ein Funktionsverlust gegenüber allen klassischen Liganden. In Versuchen mit Phosphatidylethanolamin wurde anschließend nachgewiesen, dass LBP dieses bindet, wobei diese Interaktion entsprechend der oben dargestellten Vermutung wahrscheinlich über die Phospholipidbindungstaschen stattfindet. Die Bindung von Phosphatidylethanolamin wird durch beide Mutationen eingeschränkt. Dieser Effekt ist für die Mutante c998t ausgeprägter, was sich durch den erwähnten Zerfall in zwei funktionslose Fragmente erklären lässt.

Für den Polymorphismus t1341c ist ein solcher Zerfall nicht wahrscheinlich. Daher muss der Funktionsverlust durch andere Mechanismen hervorgerufen werden. Da sich durch die Veränderung einer Aminosäure die Struktur von Bindungsstrukturen deutlich ändern kann, führt die Mutation t1341c an dieser Stelle möglicherweise zu einer geringeren Affinität gegenüber den bakteriellen Liganden. Dies würde sich in einer Abschwächung der Bindungsstärke widerspiegeln, wie sie in den Versuchen zu beobachten war.

Allerdings zeigte sich im Rahmen von Zellstimulationsversuchen unter Verwendung von t1341c-mutiertem LBP keine ausgeprägte Veränderung der ausgelösten Immunreaktion. Es kann also sein, dass die Bindung über die Phospholipidbindungstaschen für die zellstimulatorische Funktion keine Rolle spielt.

Möglicherweise sind die Phospholipidbindungstaschen chemisch in der Lage, die Liganden zu binden, was sich unter den künstlichen und vor allem zellfreien Bedingungen eines Bindungsassays in einer Bindungsreaktion widerspiegelt. Unter biologischen Bedingungen findet eine solche Bindung eventuell gar nicht statt und die Bindungstaschen dienen einer anderen Funktion. Es kann auch sein, dass die Veränderung einer der Bindungstaschen den generellen Einbau des Proteins in die Membran und damit die Funktion unbeeinträchtigt lässt, da die primäre Interaktion mit der Zellmembran über die NH<sub>2</sub>-terminale Domäne abläuft.

Eine weitere Überlegung stellt die sich in Abhängigkeit von der Dosis verändernde Funktion des LBP dar. So steht die in Abb. 24 sichtbare Verringerung der Immunreaktion im Widerspruch zu den Ergebnissen, die in Abb. 19 dargestellt sind und die eine stärkere TNF- $\alpha$ -Reaktion bei der Verwendung von t1341c-Seren zeigen. Dabei fällt auf, dass unterschiedlich hohe Konzentrationen von LPS verwendet wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Polymorphismus c1341t bei geringer bakterieller Exposition zu einer Verstärkung der Immunaktivierung führt, bei sehr hohen LPS-Konzentrationen aber den hemmenden Effekt des LBP verstärkt.

Allerdings werden entsprechend den Bindungsversuchen auch Lipopeptide und Phospholipide gebunden, für die ein solcher neutralisierender Effekt bis heute nicht beschrieben wurde.

Natürlich wäre grundsätzlich eine gegensätzliche Funktion der Bindungstaschen denkbar. In diesem Falle wären sie beim LPS an der Neutralisierung beteiligt, während sie bei den anderen Liganden für die Immunaktivierung zuständig wären. Eine Mutation, die sich in abnehmender Bindung äußert, müsste sich dann aber auch in einer verringerten Immunreaktion widerspiegeln, was in Versuchen mit Lipopeptiden nicht der Fall war.

Eine Erklärung liegt in der komplexen Funktion eines Proteins. So ist es unwahrscheinlich, dass entgegengesetzte Proteinfunktionen zeitlich und räumlich völlig unabhängig voneinander statt-

finden. Das heißt, dass es über membranständiges LBP zu einer Zellaktivierung kommt, welche in niedrigen Konzentrationen überwiegt. Trotzdem liegt auch in diesem Falle lösliches LBP im Serum vor, über das permanent eine bestimmte Menge Pathogen neutralisiert wird. In höheren LBP-Konzentrationen nimmt dieser Anteil zu und die neutralisierende Wirkung wird im Falle des LPS durch eine verringerte Zytokinausschüttung sichtbar.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass über die Phospholipidbindungstaschen Ähnliches auch für Lipopeptide und Phospholipide abläuft. Dies würde in normalen Konzentrationen analog zum LPS in geringem Maße und deshalb unbemerkt stattfinden. Der fehlende neutralisierende Effekt gegenüber Lipopeptiden auch in hohen Dosen lässt sich eventuell durch eine geringere Affinität der Bindungstaschen gegenüber diesen Liganden erklären.

In nächsten Schritten müsste deshalb untersucht werden, ob sich die Affinität des LBP zu LPS im Vergleich zu den anderen Liganden unterscheidet. Dies kann über Kompetitionsassays erfolgen, in denen man LPS und Lipopeptide gegeneinander titriert und mit LBP inkubiert.

Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Untersuchung auf Affinitätsunterschiede von Lipopeptiden und Phospholipiden gegenüber membranständigem im Vergleich zu löslichem LBP. So wäre eine höhere Affinität zu membranständigem LBP, das die Zellaktivierung hervorruft, ebenfalls eine denkbare Erklärung für den fehlenden neutralisierenden Effekt.

Anschließend müsste geklärt werden, ob durch die vorliegende Mutation t1341c die Neutralisierung des LPS gestört ist. Dafür müsste mit hohen Dosen LPS unter Anwesenheit von hoch dosiertem LBP stimuliert werden.

Ein letzter Punkt im Zusammenhang mit den Zellstimulationsversuchen betrifft die verwendeten R- und S-LPS-Formen. Ein geringer Unterschied in der Zytokinantwort war ausschließlich bei Verwendung von S-LPS zu beobachten. Das ist ein Hinweis darauf, dass der unterschiedliche Aufbau der LPS-Formen eventuell die Funktion des LBP beeinflusst.

Zunächst liegt der einzige Unterschied in dem Fehlen von Oligosaccharidketten beim R-LPS. Dieses besitzt *per se* eine geringere stimulatorische Aktivität als S-LPS. Möglicherweise kann das dadurch erklärt werden, dass weniger Zuckerketten mit Acylketten zur Interaktion mit den kationischen Aminosäuren des NH<sub>2</sub>-Terminus vorhanden sind, was zu einer insgesamt schwächeren Reaktion führt. Untersucht man beispielsweise reines Lipid A, welches auch das Kernpolysaccharid nicht mehr enthält, so scheint es zu einer Aggregatbildung zu kommen, wodurch nur verkürzte polare Strukturen exponiert werden. Die apolaren Lipidreste des Lipid A befinden sich abgeschirmt vom wässrigen Milieu im Inneren der Aggregate. An die exponierten Phosphat-

gruppen des N-Glucosamin-Gerüsts kann das LBP anscheinend binden, allerdings ist die Bindung im Vergleich zur Bindung an ganzem LPS um etwa 50 % reduziert [86, 103].

Die Zuckerketten scheinen also für die Bindungsfähigkeit des LBP von entscheidender Bedeutung zu sein. Aufgrund der höheren Anzahl an Zuckerketten sollte das S-LPS vom LBP besser gebunden werden. Das wird durch die im Vergleich zum R-LPS höhere stimulatorische Aktivität unterstützt. Da dies auch für die Bindung in den Phospholipidbindungstaschen gelten müsste, wäre eine Abschwächung der neutralisierenden Wirkung in Folge der Mutation t1341c zu erwarten. Diese müsste für das S-LPS stärker ausfallen und würde sich bei normalen LBP-Konzentrationen nicht oder in einer Verstärkung der Aktivierung auswirken.

Der stärkere Funktionsverlust im Hinblick auf die Neutralisierung würde sich erst in höheren LBP-Konzentrationen zeigen, die weit über den in den vorliegenden Versuchen verwendeten liegen. Allerdings ist zu beobachten, dass es bei Stimulation mit S-LPS unter Verwendung von mutiertem LBP zu einer Verringerung der Immunreaktion kommt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Bereich der Phospholipidbindungstaschen auch eine Funktion in der Zellaktivierung hat. Diese scheint abhängig zu sein vom Maß der Acylierung, da ein Effekt nur bei der in hohem Maße acylierten Form des S-LPS zu beobachten ist. Möglicherweise spielt dabei auch MD-2 eine Rolle. Dieses verfügt ebenfalls eine kationische und hydrophobe Bindungsstelle, die sensibel gegenüber dem Acylierungsmuster des Lipid A ist [105]. Im Falle des MD-2 scheint die Aktivierung über LPS-Monomere abzulaufen – die aber für die Funktion des membranständigen LBP eine geringere Rolle spielen.

So könnte über die Phospholipidbindungstaschen ein dritter Mechanismus existieren, der die Stimulation auch über LPS-Monomere ermöglicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen insgesamt im Einklang mit anderen neuen Untersuchungsergebnissen. So konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Dimerisierung der TLR-4-Komplexe in hohem Maße von der Anwesenheit von LBP und membranständigem CD14 abhängig ist. Allerdings scheint lösliches CD14 eine entgegen gesetzte Funktion zu haben und die Signalübertragung und damit Immunaktivierung findet auch bei fehlender Dimerisierung der Rezeptorkomplexe statt [67]. Dies ist ein Hinweis auf unterschiedliche Funktionen innerhalb der LBP-LPS-Interaktion und sich unterscheidende Signalwege. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass mit dem sog. *high mobility group box 1 protein* (HMGB-1) ein alternativer Weg entdeckt wurde, der dem Transport von LPS zu CD14 dient [106]. Dieser wird durch die Anwesenheit von LBP gehemmt, was eine gewisse Konkurrenz zwischen LBP und HMGB-1 in der LPS-Bindung impliziert. Über HMGB-1 kann also ein Mechanismus existieren, der bei einem Funktionsverlust des

LBP sicherstellt, dass trotzdem eine Immunreaktion ausgelöst werden kann. Auch dies ist eine mögliche Erklärung für die fehlende Eindeutigkeit der beobachteten Effekte.

Die Rolle der Phospholipidbindung wird durch weitere Ergebnisse unterstrichen. So stellte sich heraus, dass oxidierte Phospholipide an LBP und CD14 binden und die Signalübertragung über TLR-2 und TLR-4 hemmen [107]. Sie dienen damit anscheinend dem Schutz vor einer sehr ausgeprägten Immunreaktion, da sie kompetitiv die Interaktion von LPS mit seinen Bindungspartnern hemmen. Allerdings wurden auch hier Hinweise auf alternative Wege der Zellaktivierung gefunden. So wird vor allem die Immunreaktion auf Lipopeptide gehemmt, während zwar die Bindung von LPS, aber nicht die ausgelöste Zytokinantwort unterbunden wird. Diese scheint also durch weitere Signalwege ausgelöst zu werden, in denen möglicherweise das membranständige MD-2 eine Rolle spielt.

Fasst man die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit und die vorliegenden weiteren Untersuchungen zusammen, so wird einerseits die entscheidende Rolle des LBP in der primären Immunantwort deutlich. Andererseits ist erkennbar, dass es über zahlreiche andere Signalwege weitere Möglichkeiten der Immunaktivierung und –hemmung gibt, die eine eindeutige Zuordnung von beobachteten Effekten erschweren.

### **5.3 Populationsuntersuchungen zu den Polymorphismen**

Nachdem die Polymorphismen zunächst rein funktionell beleuchtet wurden, ist die nächste Frage natürlich die Auswirkung auf Krankheiten im authentischen biologischen Rahmen.

Dazu diene die statistische Analyse der Patientengruppe, die sich aus an Meningitis erkrankten Kindern zusammensetzte.

In einer prospektiven Studie wurde bereits ein Risiko-Haplotyp des LBP-Gens identifiziert, der für schwere Sepsis prädisponiert [108]. Die Bedeutung des LBP für den Verlauf von bakteriellen Infektionen wird auch dadurch unterstrichen, dass die Höhe der Serumspiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert und LBP damit als geeigneter Biomarker für die Identifikation von Patienten mit schwerer Sepsis und voraussichtlich schlechtem Verlauf gilt [109]. Gleiches gilt auch für Infektionen bei Kindern [110], was verdeutlicht, dass die Untersuchung der LBP-Polymorphismen einem sinnvollen klinischen Zweck dient. Für den SNP c998t ist in Vorergebnissen innerhalb der Arbeitsgruppe ein Zusammenhang mit dem Verlauf besonders Gramnegativer Sepsis erkennbar (noch unveröffentlicht). Im hier untersuchten, allerdings sehr kleinen,

Kollektiv der Meningitis-Patienten konnten allerdings keinerlei Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass der Polymorphismus sich auf die Anfälligkeit auswirkt. Für den LBP t1341c-SNP gibt es in der Gesamtverteilung ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Allerdings gibt es im Vergleich der Jungen und Mädchen eine Auffälligkeit, die aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch zu bewerten ist, aber durchaus als Tendenz dargestellt werden kann.

So ist die Anzahl der Jungen deutlich höher als die der Mädchen, was existierende Daten bestätigt, nach denen Jungen besonders im frühen Kindesalter häufiger an Meningitis erkranken als Mädchen. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass bei weiblichen Individuen eine allgemein stärkere humorale und Zell-vermittelte Immunantwort gefunden wird [111]. So weisen Frauen beispielsweise eine niedrigere Mortalität gegenüber Sepsis auf [112]. Diese Effekte werden auf den Einfluss von Sexualhormonen zurückgeführt: während Testosteron zu einer Downregulation von TLR-4 führt [113], resultieren höhere Östrogenspiegel sowohl in einem Anstieg der LBP-Konzentration als auch in einer stärkeren Expression von TLR-4 und CD14 [111].

Da die protektiven Effekte des Östrogens anscheinend also LBP-abhängig vermittelt werden, könnten die Mädchen im Patientenkollektiv im Falle einer LBP-Mutation diesen geschlechtsabhängigen Vorteil verlieren. Natürlich ist eine Bewertung der Häufigkeiten aufgrund der geringen Fallzahl problematisch. Allerdings fällt auf, dass die Mädchen 60 % der heterozygoten und 100 % der homozygoten Individuen stellen, obwohl der Anteil der Jungen am Gesamtkollektiv deutlich größer ist.

Im Zusammenhang mit geschlechtsabhängigen Unterschieden wurde kürzlich die Expressierung von Caspase-12 genauer untersucht [114]. Inflammatorische Caspasen sind Proteasen, die eine wichtige Rolle in Apoptosevorgängen und inflammatorischen Kaskaden spielen. Eine bestimmte Caspase, die Caspase-12, weist im größten Teil der menschlichen Population eine Mutation auf, die zum Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons und dem Abbruch der Synthese führt [115]. Der geringe Teil der Population, der Caspase-12 in voller Länge exprimiert, zeigt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen [116, 117]. Im Mausmodell zeigen Caspase-12-defiziente Mäuse eine Resistenz gegenüber Infektionen [101]. Yerettsian et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass diese Resistenz durch transgene Expressierung von Caspase-12 vollständig aufgehoben wird, was allerdings nur bei männlichen Mäusen zutrifft. Weibliche Mäuse weisen weiter eine Resistenz auf, die mit Caspase-12-defizienten Mäusen vergleichbar ist. Dies ist auf eine Suppression der Caspase-12-Expressierung zurückzuführen, die durch Östrogen zustande kommt. Die Expressierung von Caspase-12 wird dabei direkt vom Östrogen-Rezeptor- $\alpha$  beeinflusst und die Codierung



für das Östrogen-Responsive-Element konnte auf Intron 7 des Caspase-12-Gens lokalisiert werden.

Für LBP wurde bisher noch nicht aufgeklärt, über welche Mechanismen oder Signalwege Östrogen zu einem Anstieg der Konzentration führt. Wenn die untersuchten Polymorphismen im LBP diesen Anstieg und damit den protektiven Effekt wirklich aufheben, wäre das ein interessanter Ansatz, um die genauen Vorgänge der Beeinflussung von LBP durch Östrogen aufzuklären.

Ob der Effekt so deutlich ist, muss allerdings durch weitere Studien mit größeren Fallzahlen bestätigt werden. Die Kooperation mit dem Nationalen Referenzzentrum wird zu diesem Zweck weitergeführt und die Datenbank der Kinder mit Meningokokken-Meningitis wird in Zukunft kontinuierlich erweitert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich durch die Mutation c998t das Bindungsverhalten analog zu bekannten Vorergebnissen abschwächt. Auch für die bisher noch nicht untersuchte Mutation t1341c konnte dieser Effekt hier erstmalig gezeigt werden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass eine Interaktion zwischen Liganden und den Phospholipidbindungstaschen stattfindet.

Für die Zellaktivierung scheinen aber andere Bereiche des Proteins entscheidender zu sein, die durch die Mutation nicht beeinflusst werden. Ob sich die Mutation auf den neutralisierenden Effekt gegenüber LPS auswirkt, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden.

Auch in der Frage der klinischen Auswirkung müssen weitere Fragen geklärt werden. Nötig ist vor allem ein größeres Patientenkollektiv, in dem auch eine Analyse der einzelnen Verlaufsp Parameter sinnvoll ist. Diese müssten Krankheitsdauer, Notwendigkeit von Intensivmedizin und Verlauf bzw. Ausgang (Tod, vollständige Genesung, bleibende Schäden) beinhalten.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Liganden von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wäre auch die Analyse eines Kollektivs von nachgewiesenen Pneumokokken-Meningitis-Erkrankungen interessant. Der Vergleich zwischen Meningitis durch Gram-positive und Gram-negative Erreger könnte zusätzliche, wertvolle Aufschlüsse über die entsprechende Funktion des LBP liefern.

## 6 Zusammenfassung

LBP spielt erwiesenermaßen eine Rolle in der primären Immunantwort sowohl gegenüber Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien. In Konzentrationen, die unter physiologischen Bedingungen im Serum vorkommen, ermöglicht LBP das Erkennen geringer Mengen von LPS und anderer Liganden, was zu einer inflammatorischen Immunreaktion führt. Hohe Konzentrationen, wie sie in der Akut-Phase-Reaktion gefunden werden, hemmen allerdings die Zytokinausschüttung.

Polymorphismen sind mittlerweile als prädisponierende Faktoren für veränderte Krankheitsanfälligkeit oder individuell verschiedene Krankheitsverläufe anerkannt. Für das LBP sind verschiedene Polymorphismen beschrieben, von denen zwei für diese Arbeit funktionell und anhand klinischer Daten im Hinblick auf ihre Auswirkung untersucht werden. Dabei handelt es sich um die Einzelnukleotidpolymorphismen c998t (rs2232613) und t1341c (rs2232618) mit einer Allelfrequenz von 0,076 (c998t) bzw. 0,095 (t1341c) in einer repräsentativen Kontrollpopulation.

Vorarbeiten zeigen für den SNP c998t einen Funktionsverlust, der sich sowohl auf die Bindungsfähigkeit gegenüber bakteriellen Liganden als auch auf die Auslösung einer gegen diese gerichteten Zytokinantwort auswirkt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Polymorphismus t1341c zu untersuchen und die Erkenntnisse zum Polymorphismus c998t weiter auszubauen. Zu diesem Zweck wurden Bindungsassays und Stimulationsversuche mit der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 246.7 durchgeführt, wobei sowohl Seren von Polymorphismusträgern und Wildtyp-Kontrollen als auch rekombinant hergestelltes LBP in Wildtyp- und mutierter Form verwendet wurden. Die für Bindungsassays wie auch für die Zellstimulation verwendeten Substanzen umfassen LPS 0111:B4, LPS Re 595, Lipopeptid 2 und 3 und Phosphatidylethanolamin.

Die Analyse eines Patientenkollektivs an Meningitis erkrankter Kinder diente einer ersten präliminären Einschätzung einer möglichen klinischen Bedeutung der Polymorphismen.

In den Bindungsassays zeigte sich ein deutlicher Funktionsverlust beider Polymorphismen gegenüber allen bakteriellen Liganden. Der Funktionsverlust ist in der Regel bei Vorliegen des Polymorphismus c998t stärker ausgeprägt, aber auch für den Polymorphismus t1341c statistisch signifikant. Erstmals wurde hier auch die Bindung des LBP an Phosphatidylethanolamin nachgewiesen, welche ebenfalls bei Vorliegen beider Polymorphismen eingeschränkt ist. Die Stimulation der Mausmakrophagen zeigte bei Stimulation mit LPS leichte Unterschiede in der TNF- $\alpha$ -

und IL-6-Reaktion, die aber meist nicht statistisch signifikant waren. Lediglich 4 Stunden nach Stimulation mit LPS 0111:B4 ist die TNF- $\alpha$ -Produktion bei Vorliegen der Polymorphismen statistisch signifikant eingeschränkt. In der Analyse der Patientendaten zeigen sich Hinweise auf geschlechtsabhängige Unterschiede in der Polymorphismusverteilung, denen durch Analyse größerer Kollektive weiter nachgegangen werden muss.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.
2. Janeway Jr. CA, P. Travers, M. Walport and M.J. Shlomchik: *Immunobiology*. New York: Garland Publishing, 2001.
3. Fang C, Zhang X, Miwa T, Song WC: Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with Toll-like receptor signaling and interleukin-6 production. *Blood* 2009; 114(5): 1005-15.
4. Brilot F, Strowig T, Munz C: NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 2008; 13: 6443-54.
5. Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5(10): 987-95.
6. Kumar H, Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(4): 621-5.
7. Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(2): 169-76.
8. Schlegel HG, Fuchs, G.: *Allgemeine Mikrobiologie*, 8 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007.
9. Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ: Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev* 1974; 38(1): 87-110.
10. Scott JR, Barnett TC: Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 397-423.
11. Osborn MJ: Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem* 1969; 38: 501-38.
12. Beveridge TJ: Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem* 2001; 76(3): 111-8.
13. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M: Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256(1): 1-15.
14. Moreillon P, Majcherczyk PA: Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(9): 632-41.
15. Osborn MJ, Rosen SM, Rothfield L, Zeleznick LD, Horecker BL: Lipopolysaccharide of the Gram-Negative Cell Wall. *Science* 1964; 145: 783-9.
16. Frirdich E, Whitfield C: Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res* 2005; 11(3): 133-44.
17. Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV: Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun* 1990; 58(4): 983-91.
18. Braun V, Rehn K: Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur J Biochem* 1969; 10(3): 426-38.
19. Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, et al.: *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol* 1995; 154(6): 2866-77.
20. Schumann RR: Host cell-pathogen interface: molecular mechanisms and genetics. *Vaccine* 2004; 22 Suppl 1: S21-4.
21. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C: Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42(3): 791-8.

22. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6): 973-83.
23. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al.: Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13(7): 933-40.
24. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al.: Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169(1): 10-4.
25. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al.: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3(7): 667-72.
26. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al.: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189(11): 1777-82.
27. Bowie A, O'Neill LA: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67(4): 508-14.
28. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11(1): 115-22.
29. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S: Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000; 165(10): 5392-6.
30. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S: Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; 12(1): 113-7.
31. Horng T, Barton GM, Medzhitov R: TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 835-41.
32. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al.: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4(11): 1144-50.
33. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, et al.: TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13(8): 1015-24.
34. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ: TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412(6844): 346-51.
35. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640): 394-7.
36. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al.: IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002; 17(3): 251-63.
37. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al.: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167(10): 5887-94.
38. Takeda K, Akira S: TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16(1): 3-9.
39. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857): 732-8.
40. Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, et al.: 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* 1996; 16(7): 3490-503.
41. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ: Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164(3): 777-93.
42. Zweigner J, Schumann RR, Weber JR: The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* 2006; 8(3): 946-52.
43. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ: Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 1989; 264(18): 10867-71.

44. Rietschel ET, Brade H, Brade L, et al.: Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Prog Clin Biol Res* 1987; 231: 25-53.
45. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al.: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249(4975): 1429-31.
46. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975): 1431-3.
47. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270(18): 10482-8.
48. Hailman E, Vasselon T, Kelley M, et al.: Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Immunol* 1996; 156(11): 4384-90.
49. Jack RS, Fan X, Bernheiden M, et al.: Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 1997; 389(6652): 742-5.
50. Schroder NW, Heine H, Alexander C, et al.: Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol* 2004; 173(4): 2683-91.
51. Blairon L, Wittebole X, Laterre PF: Lipopolysaccharide-binding protein serum levels in patients with severe sepsis due to gram-positive and fungal infections. *J Infect Dis* 2003; 187(2): 287-91.
52. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al.: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180(5): 1584-9.
53. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR: High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 2001; 98(13): 3800-8.
54. Lamping N, Dettmer R, Schroder NW, et al.: LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest* 1998; 101(10): 2065-71.
55. Schroder NW, Morath S, Alexander C, et al.: Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15587-94.
56. Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS: Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2410-7.
57. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med* 1994; 180(3): 1025-35.
58. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD: Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 1996; 271(21): 12172-8.
59. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS: Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 485-93.
60. Thompson PA, Tobias PS, Viriyakosol S, Kirkland TN, Kitchens RL: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS. *J Biol Chem* 2003; 278(31): 28367-71.
61. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 1999; 162(7): 3749-52.

62. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396): 2085-8.
63. Lien E, Means TK, Heine H, et al.: Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105(4): 497-504.
64. Gangloff M, Weber AN, Gay NJ: Conserved mechanisms of signal transduction by Toll and Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005; 11(5): 294-8.
65. Kim HM, Park BS, Kim JI, et al.: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007; 130(5): 906-17.
66. Gallay P, Barras C, Tobias PS, Calandra T, Glauser MP, Heumann D: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS. *J Infect Dis* 1994; 170(5): 1319-22.
67. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M: Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol*.
68. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al.: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274(47): 33419-25.
69. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4): 443-51.
70. Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, et al.: Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163(5): 2382-6.
71. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al.: Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007; 130(6): 1071-82.
72. Kang JY, Nan X, Jin MS, et al.: Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; 31(6): 873-84.
73. Schroder NW, Opitz B, Lamping N, et al.: Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*. *J Immunol* 2000; 165(5): 2683-93.
74. Tall A: Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 235-57.
75. Hubacek JA, Buchler C, Aslanidis C, Schmitz G: 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* 1997; 236(2): 427-30.
76. Beamer LJ: Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 4): 791-4.
77. Gray PW, Corcorran AE, Eddy RL, Jr., Byers MG, Shows TB: 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* 1993; 15(1): 188-90.
78. Han J, Mathison JC, Ulevitch RJ, Tobias PS: Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem* 1994; 269(11): 8172-5.
79. Theofan G, Horwitz AH, Williams RE, et al.: An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity. *J Immunol* 1994; 152(7): 3623-9.
80. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D: Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* 1997; 276(5320): 1861-4.
81. Lamping N, Hoess A, Yu B, et al.: 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* 1996; 157(10): 4648-56.

82. Abrahamson SL, Wu HM, Williams RE, et al.: Biochemical characterization of recombinant fusions of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein. Implications in biological activity. *J Biol Chem* 1997; 272(4): 2149-55.
83. Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P: Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J Exp Med* 1991; 174(3): 649-55.
84. Iovine NM, Elsbach P, Weiss J: 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* 1997; 94(20): 10973-8.
85. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D: The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Sci* 1998; 7(4): 906-14.
86. Amberger JC: Untersuchung der Rolle der Aminosäuren L188, Y272, Y277, L278 und Y457 auf den Phospholipid- und Lipopolysaccharidtransfer des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) durch Mutagenese. Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2004.
87. Braunwald E, A.S. Fauci et al.: *Harrisons Innere Medizin* 1, 15 ed, Vol. 1. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2003.
88. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, et al.: Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(1): 177-82.
89. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A: Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002; 48(10): 1661-7.
90. Schroder NW, Schumann RR: Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(3): 156-64.
91. Chien JW, Boeckh MJ, Hansen JA, Clark JG: Lipopolysaccharide binding protein promoter variants influence the risk for Gram-negative bacteremia and mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2008; 111(4): 2462-9.
92. Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, et al.: Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29(3): 557-61.
93. Braunwald E, A.S. Fauci et al.: *Harrisons Innere Medizin* 2, 15 ed, Vol. 2. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2003.
94. Chung IY, Benveniste EN: Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* 1990; 144(8): 2999-3007.
95. Freyer D, Weih M, Weber JR, et al.: Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF-alpha in astroglial-enriched cultures. *Glia* 1996; 16(1): 1-6.
96. Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, et al.: Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999; 163(8): 4308-14.
97. Weber JR, Freyer D, Alexander C, et al.: Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* 2003; 19(2): 269-79.
98. Eckert JK: Funktionelle Analyse von Mutanten des LPS-bindenden Proteins (LBP). Humboldt-Universität zu Berlin; 2009.
99. Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2714-23.
100. Oh DY, Taube S, Hamouda O, et al.: A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis* 2008; 198(5): 701-9.
101. Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, et al.: Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 2006; 440(7087): 1064-8.



- 102.** Lamping N: Struktur-Funktions-Analyse des Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (LBP). Freie Universität; 1996.
- 103.** Gutschmann T, Haberer N, Carroll SF, Seydel U, Wiese A: Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol Chem* 2001; 382(3): 425-34.
- 104.** Roes S, Mumm F, Seydel U, Gutschmann T: Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. *J Biol Chem* 2006; 281(5): 2757-63.
- 105.** Jerala R: Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 2007; 297(5): 353-63.
- 106.** Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS: High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 2008; 180(7): 5067-74.
- 107.** Erridge C, Kennedy S, Spickett CM, Webb DJ: Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. *J Biol Chem* 2008; 283(36): 24748-59.
- 108.** Flores C, Perez-Mendez L, Maca-Meyer N, et al.: A common haplotype of the LBP gene predisposes to severe sepsis. *Crit Care Med* 2009; 37(10): 2759-66.
- 109.** Villar J, Perez-Mendez L, Espinosa E, et al.: Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe sepsis. *PLoS One* 2009; 4(8): e6818.
- 110.** Pavare J, Grope I, Kalnins I, Gardovska D: High-mobility group box-1 protein, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in children with community acquired infections and bacteraemia: a prospective study. *BMC Infect Dis*; 10: 28.
- 111.** Rettew JA, Huet YM, Marriott I: Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology* 2009; 150(8): 3877-84.
- 112.** Schröder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F: Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133(11): 1200-5.
- 113.** Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I: Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 432-7.
- 114.** Yeretsian G, Doiron K, Shao W, et al.: Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(22): 9016-20.
- 115.** Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E: Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(2): 722-6.
- 116.** Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, et al.: Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 2004; 429(6987): 75-9.
- 117.** Xue Y, Daly A, Yngvadottir B, et al.: Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am J Hum Genet* 2006; 78(4): 659-70.

## Anhang

### I. Abbildungsverzeichnis

#### Abbildungen

1 – 4	von Verfasserin erstellt <sup>1</sup>
5	Beamer, Carroll et al., 1997
6-7	von Verfasserin erstellt <sup>1</sup>
8 – 11	von Verfasserin erstellt unter Verwendung von Swiss Pdb Viewer
12 – 25	von Verfasserin erstellt Unter Verwendung von GraphPad Prism

<sup>1</sup> Für die Erstellung der Abbildungen 1-4 und 6-7 wurden die Programme Excel, Powerpoint und Photoshop verwendet.

## II. Output Fisher-Exakt-Test

Die Vergleiche zwischen den Kollektiven wurden mit dem Fisher-Exakt-Test auf der Internetseite <http://www.langsrud.com/fisher.htm> durchgeführt.

SNP c998t	SNP t1341c
<i>Vergleich der Häufigkeiten in kompletten Kollektiven</i>	
Anzahl der Heterozygoten	
TABLE = [ 28 , 547 , 3 , 98 ] Left : p-value = 0.8682297407682602 Right : p-value = 0.29328363906715954 2-Tail : p-value = 0.6049077753614924	TABLE = [ 25 , 530 , 5 , 107 ] Left : p-value = 0.5866630873613586 Right : p-value = 0.6098476363188019 2-Tail : p-value = 1
Anzahl der Homozygoten	
	TABLE = [ 25 , 530 , 1 , 8 ] Left : p-value = 0.3481090890866003 Right : p-value = 0.9397068979957021 2-Tail : p-value = 0.3481090890866003
Anwesenheit des mutierten Allels	
	TABLE = [ 25 , 530 , 6 , 115 ] Left : p-value = 0.49023558155144537 Right : p-value = 0.6888698317131274 2-Tail : p-value = 0.8111554329630271
<i>Vergleich der Häufigkeiten für männliche Individuen</i>	
Anzahl der Heterozygoten	
TABLE = [ 16 , 400 , 3 , 73 ] Left : p-value = 0.5839602177904324 Right : p-value = 0.6646940849293496 2-Tail : p-value = 1	TABLE = [ 17 , 393 , 2 , 76 ] Left : p-value = 0.8368370668460112 Right : p-value = 0.39069405351455344 2-Tail : p-value = 0.7512942406886006
Anzahl der Homozygoten	
	TABLE = [ 17 , 393 , 0 , 4 ] Left : p-value = 1 Right : p-value = 0.8450639580486742 2-Tail : p-value = 1

Anwesenheit des mutierten Allels

TABLE = [ 17 , 393 , 2 , 80 ]  
Left : p-value = 0.8550370897759141  
Right : p-value = 0.3598076470938051  
2-Tail : p-value = 0.752801317983901

**Angenommene zehnfache Fallzahl**

TABLE = [ 170 , 393 , 20 , 80 ]  
Left : p-value = 0.9879299016751452  
Right : p-value = 0.022802054280556212  
2-Tail : p-value = **0.04121467274266421**

***Vergleich der Häufigkeiten für weibliche Individuen***

Anzahl der Heterozygoten

TABLE = [ 12 , 147 , 0 , 25 ]  
Left : p-value = 1  
Right : p-value = 0.16341741700372842  
2-Tail : p-value = 0.3752907557856061

TABLE = [ 8 , 137 , 3 , 31 ]  
Left : p-value = 0.3481969878291565  
Right : p-value = 0.867066384544838  
2-Tail : p-value = 0.43959496928131897

Anzahl der Homozygoten

TABLE = [ 8 , 137 , 1 , 4 ]  
Left : p-value = 0.26927802387031763  
Right : p-value = 0.970740143471624  
2-Tail : p-value = 0.26927802387031763

Anwesenheit des mutierten Allels

TABLE = [ 8 , 137 , 4 , 35 ]  
Left : p-value = 0.23271561786815276  
Right : p-value = 0.9175535184633444  
2-Tail : p-value = 0.28454907850709105

**Angenommene sechsfache Fallzahl**

TABLE = [ 48 , 137 , 24 , 35 ]  
Left : p-value = 0.024433806300591755  
Right : p-value = 0.9888816383487672  
2-Tail : p-value = **0.03432261210105336**

**Angenommene zehnfache Fallzahl**

TABLE = [ 80 , 137 , 40 , 35 ]  
Left : p-value = 0.009340809584666019  
Right : p-value = 0.9956280378405457  
2-Tail : p-value = **0.014420799733898612**

*Vergleich der Geschlechterverteilung innerhalb des Patientenkollektivs*

Anzahl der Heterozygoten

TABLE = [ 16 , 12 , 3 , 0 ]  
Left : p-value = 0.21557285873192195  
Right : p-value = 1  
2-Tail : p-value = 0.2645161290322551

TABLE = [ 17 , 8 , 2 , 3 ]  
Left : p-value = 0.9527598837943654  
Right : p-value = 0.24523177971453997  
2-Tail : p-value = 0.32682834406972494

Anzahl der Homozygoten

TABLE = [ 17 , 8 , 0 , 1 ]  
Left : p-value = 1  
Right : p-value = 0.34615384615384404  
2-Tail : p-value = 0.34615384615384404

Anwesenheit des mutierten Allels

TABLE = [ 17 , 8 , 2 , 4 ]  
Left : p-value = 0.9783071952148695  
Right : p-value = 0.13665570617739667  
2-Tail : p-value = 0.17350576749909316

**Angenommene vierfache Fallzahl**

Anzahl der Heterozygoten

TABLE = [ 68 , 32 , 8 , 12 ]  
Left : p-value = 0.9951306397220248  
Right : p-value = 0.018367438747658348  
2-Tail : p-value = **0.022998508365264816**

Anwesenheit des mutierten Allels

TABLE = [ 64 , 32 , 8 , 16 ]  
Left : p-value = 0.9993032977097426  
Right : p-value = 0.0031790257997983025  
2-Tail : p-value = **0.004612027143905808**

### **III. Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**









## **IV. Danksagung**

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Ralf R. Schumann für das Thema, die Betreuung dieser Arbeit und die stete Unterstützung danken.

Mein Dank gilt weiterhin dem Graduiertenkolleg „Neuroinflammation“, die mich nicht nur finanziell in meiner Arbeit unterstützten, sondern auch einen wissenschaftlichen Rahmen schufen, der zur Erweiterung meiner Kenntnisse und Fähigkeiten beitrug.

Ich danke weiterhin allen Mitgliedern der AG Schumann und Moter für das immer angenehme Arbeitsklima und ein wirklich schönes Forschungsjahr.

Besonders zu erwähnen sind dabei Fränzi Creutzburg und Diana Woellner für ihre immerwährende Geduld und Hilfsbereitschaft in allen praktischen Fragen der Laborarbeit, Jana Kristin Eckert für ihre Vorarbeiten und ihre stete Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, Linn Lundvall für alle Grako- und Progress Report-Fragen, Djin-je Oh für den SPSS-Unterricht und Oliver Kumpf für die Durchsicht meiner Arbeit.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Grit Laubenstein, Mats Leubner und Daniel Hirsch für die Hilfe bei inhaltlichen, graphischen und technischen Fragen, bei der Korrektur und für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Und weil ich nicht alle namentlich aufführen kann: Danke auch an all meine anderen Freunde, die für mich da waren und sind und auf die ein oder andere Art eine wichtige Rolle in meinem Leben spielen.

Ferner danke ich meiner ganzen großen und wunderbaren Familie – schön, dass es euch gibt.