

Aus dem Institut für  
Mikrobiologie und Hygiene,  
Universitätsklinikum Charité,  
Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung LPS-inhibierender  
Effekte von Lipoproteinen und  
Lipopolysaccharid Bindendem Protein  
(LBP) in murinem Serum**

Zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von Jan Holger Knierim aus Rendsburg

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Roland Felix

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R.R. Schumann  
2. Prof. Dr. A.J. Ulmer  
3. Priv.-Doz. Dr. Dr. med. TH. Hartung

eingereicht: 22.12.1999

Datum der Promotion: 16.10.2000

## **Charakterisierung LPS-inhibierender Effekte von Lipoproteinen und Lipopolysaccharid Bindendem Protein (LBP) in murinem Serum**

LPS wird von Gram-negativen Bakterien freigesetzt und führt mit Hilfe von LBP zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten und Makrophagen. Diese von LPS ausgelöste Kaskade, ist entscheidend an der Entstehung der Sepsis beteiligt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die LPS-induzierte Stimulation von Makrophagen durch murines Serum gehemmt werden kann. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit im Mausmodell verdeutlicht werden, welche Rolle Lipoproteine und LBP bei dem protektiven Serumeffekt spielen. Von den in Mauseren verschiedener Mausstämmen bestimmten Parametern korrelierte der Phospholipidgehalt relativ gut mit dem inhibitorischen Serumeffekt. Eine Depletion von Lipoproteinen aus den Seren führte zu einer starken Reduktion des inhibitorischen Serumpotentials, während die Verwendung von LBP-defizienten Seren keinen Einfluß auf den Serumhemmeffekt hatte.

Lipoproteine sehr geringer, geringer und hoher Dichte verursachten in Gegenwart von LBP eine deutliche Reduktion der LPS-Effekte, die gut mit ihrem Phospholipidgehalt korrelierte. In Abwesenheit von Serum und LBP konnten Lipoproteine LPS-Effekte auch bei hohen Phospholipidkonzentrationen kaum noch inhibieren. In nativen murinen Lipoproteinen hoher Dichte und lipoproteindefizientem Serum ließ sich LBP nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß native Lipoproteine sehr geringer, geringer und hoher Dichten als Akzeptoren für LPS dienen können. Ihr inhibitorisches Potential korreliert am besten mit ihrem Phospholipidgehalt. Der Transport von LPS in diese Lipoproteine wird durch LBP katalysiert, was den protektiven Effekt hoher LBP-Konzentrationen erklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß LBP nicht der einzige Bestandteil von murinem Serum ist, der LPS in Lipoproteine transferiert. Vermutlich ist bei den, in dieser Arbeit verwendeten Serumkonzentrationen der PLTP-Gehalt ausreichend, diesen LPS-Transfer in Abwesenheit von LBP zu vollziehen.

Bei der Interaktion zwischen Lipoproteinen und LPS handelt es sich um einen physiologischen Weg des Organismus, um auf bakterielle Endotoxine zu reagieren und so der Sepsis entgegenzuwirken. Mit genaueren Kenntnissen über diese Interaktion, bei der Lipidtransferproteine wie LBP und PLTP eine entscheidende Rolle spielen, können eventuell in Zukunft Methoden gefunden werden, diese physiologischen Vorgänge des Körpers zu unterstützen, um so eine Sepsis zu therapieren.

Lipopolysaccharid Bindendes Protein, LBP, Lipopolysaccharid, LPS, Lipoproteine, Sepsis, Mäuse, Serum

## **Charakterisation of LPS-inhibiting effects of lipoproteins and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in murine serum**

LPS released by gram-negative bacteria is bound by LBP and initiates the release of proinflammatory cytokines in macrophages and monocytes. These cytokines are thought to play a central role in the pathophysiology of sepsis.

In these studies I was able to show an inhibitory effect of murine serum on the LPS-induced stimulation of macrophages. Furthermore the role of lipoproteins and LBP in this protective effect of serum was investigated.

The inhibitory effect of serum from different mouse strains was best correlated to its phospholipid content. Depletion of serum from lipoproteins strongly reduced its LPS-inhibitory potential while depletion of serum from LBP had no effect.

Murine VLDL, LDL and HDL were found to be potent inhibitors of LPS-effects in presence of LBP. In absence of LBP the inhibitory effect was much weaker. LBP could be detected in murine HDL and murine lipoproteindeficient serum.

My data shows that HDL, LDL and VLDL can act as acceptors of LPS. Their inhibitory potential is best correlated to their phospholipid content.

LBP catalyses transport of LPS into lipoproteins. This could be an explanation for its protective effect in high doses.

Furthermore it could be shown that LBP is not the only serum component that transfers LPS into Lipoproteins. Possibly the used serum contained enough PLTP to perform this transfer in absence of LBP.

The interaction between Lipoproteins and LPS is a physiological way of the organism to react on endotoxines and inhibit the development of sepsis. PLTP and LBP play major roles in this interaction. Understanding the pathways of LPS-detoxification may help to support the organism's physiological answer and establish new methods to treat sepsis.

Lipopolysaccharid binding Protein, LBP, Lipopolysaccharid, LPS, lipoproteins, mice, serum, sepsis

Ellen und Charlotte

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1 EINLEITUNG

- 1.1 Infektion, Sepsis und Systemisches Inflammationssyndrom (SIRS)
  - 1.1.1 Bedeutung bakterieller Infektionskrankheiten
  - 1.1.2 Definition von Bakteriämie, Systemischem Inflammationssyndrom (SIRS) und Sepsis
  - 1.1.3 Erreger der Sepsis
  - 1.1.4 Die durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis und die Rolle der Monozyten und Makrophagen
- 1.2 Die Akut-Phase-Reaktion (APR)
- 1.3 Das Lipopolysaccharid (LPS)
- 1.4 Das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP)
  - 1.4.1 LBP ist ein Akut-Phase-Protein
  - 1.4.2 LBP moduliert LPS-Effekte
  - 1.4.3 LBP transferiert LPS in Lipoproteine hoher Dichte (HDL), Detoxifizierung von LPS
  - 1.4.4 Andere Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu LBP und deren Funktion
- 1.5 Die zellulären LPS-Rezeptoren CD14, Toll-like Rezeptor 2/4 (TLR2/4) und CD11/CD18
  - 1.5.1 Die verschiedenen CD14-Varianten
  - 1.5.2 Der Toll-like Rezeptor (TLR) 2/4
  - 1.5.3 CD11/CD18
- 1.6 LPS-induzierte Stimulation von CD14-positiven und -negativen Zellen
  - 1.6.1 Die LPS-induzierte, LBP-abhängige Stimulation von CD14-positiven Zellen
  - 1.6.2 Lösliches CD14 dient der LPS-vermittelten Stimulation von Zellen ohne membranständiges CD14
- 1.7 Serum kann die Wirkung von LPS auf CD14 positive Zellen hemmen
  - 1.7.1 Cationic antimicrobial proteins (CAP)
  - 1.7.2 Lipopolysaccharid Bindendes Protein (LBP)
  - 1.7.3 Transferrin, Gc-globin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin
  - 1.7.4 Lipoproteine und Lipidtransferproteine
- 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

- 2.1 Material
- 2.2 Methoden
  - 2.2.1 Zellkultur
    - 2.2.1.1 Zelllinien
    - 2.2.1.2 Kulturbedingungen
    - 2.2.1.3 Zellstimulation
  - 2.2.2 Toxizitätstests
    - 2.2.2.1 Trypanblau-Färbung
    - 2.2.2.2 Proteinbestimmung der lysierten Zellen
    - 2.2.2.3 LDH-Bestimmung im Zellüberstand
  - 2.2.3 Blutentnahme und Serumpräparation
  - 2.2.4 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)
    - 2.2.4.1 ELISA zur Messung von murinem TNF- $\alpha$
    - 2.2.4.2 ELISA zur Messung murinen LBPs
  - 2.2.5 Isolierung von Lipoproteinen aus Mausseren
    - 2.2.5.1 Sequentielle Flotationsdichtezentrifugation
    - 2.2.5.2 Sterilfiltration
    - 2.2.5.3 Dialyse der isolierten Lipoproteine
    - 2.2.5.4 Kontrolle der Reinheit der isolierten Lipoproteine
  - 2.2.6 Kommerziell erworbene komplette Assays („Kits“)
    - 2.2.6.1 Cholesterinmessung
    - 2.2.6.2 Phospholipidmessung
    - 2.2.6.3 Laktatdehydrogenase-Messung
  - 2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford
  - 2.2.8 Endotoxinmessung
  - 2.2.9 Nachweis von LBP in den Lipoproteinen
    - 2.2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
    - 2.2.9.2 Transfer des elektrophoretisch aufgetrennten LBP auf Membranen
    - 2.2.9.3 Immunodetektion von LBP (Western Blot)
  - 2.2.10 LBP-Depletion aus NMRI-Serum
  - 2.2.11 Statistik

### 3 ERGEBNISSE

- 3.1 Ausschluß toxischer Effekte von Mausseren auf RAW 264.7 Zellen
  - 3.1.1 Zählung der Trypanblau-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>
  - 3.1.2 Ermittlung der Anzahl der adhärenenten Zellen nach Exposition mit Mausserum
  - 3.1.3 Messung der Laktatdehydrogenase im Zellüberstand
- 3.2 Wirkung von Mausserum auf LPS-stimulierte RAW 264.7 Zellen
- 3.3 Arbeiten mit Serum von LBP-defizienten (LBP<sup>-/-</sup>) Mäusen und LBP-depletiertem Serum
  - 3.3.1 Inhibition der LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese von RAW 246.7 Zellen durch Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in Gegenwart von rekombinantem LBP
  - 3.3.2 Inhibition der LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Synthese von RAW 246.7 Zellen durch LBP-depletiertes Serum im Vergleich zu Kontrollserum
  - 3.3.3 Inhibition der LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese von RAW 246.7 Zellen durch Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in der Abwesenheit von LBP
- 3.4 Arbeiten mit Lipoproteinen
  - 3.4.1 Ergebnisse der Lipoproteinisolierung
  - 3.4.2 Nachweis von LBP in lipoproteindefizientem Serum und Lipoproteinen
  - 3.4.3 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von murinen Lipoproteinen und rekombinantem LBP
  - 3.4.4 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von rekombinantem LBP und lipoproteindefizientem Serum im Vergleich zu Normalserum
  - 3.4.5 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von murinen Lipoproteinen und Abwesenheit von rekombinantem LBP

## **4 DISKUSSION**

- 4.1 Ausschluß toxischer Effekte von Mausseren
- 4.2 Serum hemmt LPS-Effekte
- 4.3 Lipoproteine als Akzeptor des Lipopolysaccharides (LPS)
- 4.4 Geschwindigkeit der Inaktivierung durch Lipoproteine
- 4.5 Nachweis von LBP in Lipoproteinen
- 4.6 Der protektive Effekt von LBP
- 4.7 Verhalten von Lipoproteinen und LBP im Serum

## **5. LITERATUR**

## **6. ANHANG**

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

## Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akut-Phase-Reaktion
ATTC	American Type Culture Collection
BALB/c	Mausstamm
BPI	„bacterial/permeability increasing protein“, Synonym CAP57
C	Celsius
C3H	Mausstamm
C57 black	Mausstamm
CAP	„cationic antimicrobial protein“
CD	„cluster of differentiation“
CETP	„cholesterol ester transfer protein“
CHO	„chinese hamster ovary cells“
CRP	C-reaktives Protein
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.	Escherichia
ECL	„enhanced chemoluminescence“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
et al.	et alii
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GPI	Glycerophosphatidylinositol
h	Stunde
HDL	„high density lipoprotein“, Lipoproteine hoher Dichte
IL	Interleukin
KDO	Keto-desoxy-oktonat
l	Liter
LAL	Limulus Amöben Lysat
LBP	Lipopolysaccharid Bindendes Protein
LBP <sup>-/-</sup>	Gentechnisch homozygot ausgeschaltetes LBP; LBP „knockout“
LBP <sup>+/-</sup>	Gentechnisch heterozygot ausgeschaltetes LBP
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	„low density lipoproteins“, Lipoproteine geringer Dichte

Lp (a)	Lipoprotein (a)
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	Mol
mCD 14	membrangebundenes CD14
Min	Minute
NF	Nukleärer Faktor
NMRI	Mausstamm
OPD	o-Phenylenediamin Dihydrochlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PLTP	„phospholipid transfer protein“
rHDL	Rekonstituiertes HDL
R-LPS	„rough-LPS“
SAA	Serum-Amyloid A
sCD 14	lösliches CD14
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemisches Inflammationssyndrom
S-LPS	„smooth LPS“
spp.	Spezies
129 SVJ	Mausstamm
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	„toll like receptor“
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TRIS	Tris-hydroxy-ethyl-aminoethan
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
VLDL	„very low density lipoproteins“, Lipoproteine sehr geringer Dichte
w/v	Gewicht pro Volumen

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Infektion, Sepsis und Systemisches Inflammationssyndrom (SIRS)**

#### **1.1.1 Bedeutung bakterieller Infektionskrankheiten**

Am Anfang des 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche Substanzen mit antimikrobieller Wirkung entdeckt. Zu ihnen gehören u.a. das Penicillin (1928 Erstbeschreibung durch Fleming), die Sulfonamide (1932 durch Domagk) und das Streptomycin (1943 durch Walksman) (Hoel & Williams 1997). Heute stehen weit mehr Antibiotika mit teilweise deutlich breiterem Wirkungsspektrum und hoher Effizienz zur Verfügung. Trotzdem stellen bestimmte, durch Bakterienkontakt ausgelöste Reaktionsabläufe des Organismus, auch heute noch eine ernsthafte Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. Zu ihnen gehören die durch bakterielle Toxine ausgelöste Sepsis und der septische Schock mit einer Inzidenz von 1-2 % in Westeuropa und den USA (Kieft et al., 1993, Sands et al., 1997). Das Krankheitsbild des septischen Schocks hat eine Letalität von 40-70 % (Cohen & Glauser 1991). In Nordamerika sterben jährlich 150 000 Menschen an den Folgen einer Sepsis (Stone 1994;Parrillo 1993). Eine Therapie dieser gefürchteten Komplikationen von bakteriellen Infektionen ist schwierig, da sie durch körpereigene Mediatoren unterhalten werden. Versuche mit Antikörpern gegen Lipopolysaccharid (s.u.), Gram-negative Bakterien und pro-inflammatorische Zytokine haben bisher nicht den gewünschten Erfolg gebracht (Natanson et al., 1994; Sepsis therapy still shocking).

#### **1.1.2 Definition von Bakteriämie, Systemischem Inflammationssyndrom (SIRS) und Sepsis**

Prinzipiell kann bei Infektionen und den damit verbundenen Komplikationen zwischen der lokalen Infektion, der Bakteriämie, der Sepsis und dem „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) unterschieden werden. Bei der lokalen Infektion bleibt das Geschehen im Wirtsorganismus auf ein bestimmtes Gewebe oder Organsystem, häufig die Eintrittspforte des Erregers, beschränkt. Ein typisches Beispiel hierfür wäre der Abszeß. Geraten die Erreger nun kurzzeitig in die Blutbahn, ohne eine Allgemeinreaktion des

Körpers oder eine Bakterienabsiedlung in herdfernem Gewebe auszulösen, spricht man von Bakteriämie.

Sepsis wird seit einer Konsensuskonferenz 1991 definiert als eine Inflammation infektiöser Genese, bei der mindestens zwei der folgenden Symptome auftreten: a) Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; b) Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ; c) Tachypnoe  $> 20/\text{min}$  oder Hypoventilation ( $\text{PaCO}_2 < 32\text{ mm Hg}$ ); d) Leukozytenzahl  $> 12000/\text{mm}^3$  oder  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Neutrophile (Bone et al., 1992). Als systemisches Inflammationssyndrom (SIRS) wird die gleiche Wirtsreaktion bei nicht-infektiöser Ätiologie definiert. Treten bei der Sepsis außerdem Organdysfunktionen auf, wird von einer „schweren Sepsis“ gesprochen. Ein Septischer Schock liegt vor bei zusätzlicher Hypotonie (systolisch  $< 90\text{ mm Hg}$ , oder  $40\text{ mm Hg}$  niedriger als der Ausgangswert) trotz Flüssigkeitszufuhr in Verbindung mit Perfusionstörungen (Cohen & Glauser 1991).

### 1.1.3 Erreger der Sepsis

Eine Sepsis kann durch Bakterien, Viren und Pilze ausgelöst werden. Unter den in Blutkulturen nachgewiesenen Erregern dominieren in Mitteleuropa die Bakterien. Dabei nehmen Gram-negative und Gram-positive Erreger etwa gleiche Teile ein. Etwa 10 % der bakteriämischen Episoden sind polymikrobiell und *Candida spp.* finden sich in etwa 3 % der Fälle. Die häufigsten Erreger sind *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, koagulase-negative Staphylokokken, Enterokokken, Klebsiellen und *Pseudomonas spp.* (Brun-Buisson et al. 1995; Geerdes et al., 1992).

Die Bakterien setzen eine Vielzahl an Toxinen frei. Man unterscheidet Exotoxine von Endotoxinen. Während erstere von Erregern aktiv sezerniert werden sind Endotoxine Zellwandbestandteile die besonders nach Destruktion der Bakterien frei werden und durch Immunstimulation und Zytokinfreisetzung zu Sepsis und Septischem Schock führen.

Zu den Endotoxinen gehört das Peptidoglykan und die Lipoteichonsäure aus der Gram-positiven Zellwand (Kesser et al., 1991; Kengatharan et al., 1998), sowie das Endotoxin oder Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Hauptbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien ist, und als auslösendes Agens der Gram-negativen Sepsis identifiziert wurde (Rietschel et al., 1994). Bei anderen Arten von Erregern wie z.B. Spirochäten sind ähnliche Faktoren isoliert worden (Randolf et al., 1995).

#### **1.1.4 Die durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Sepsis und die Rolle der Monozyten und Makrophagen**

Lipopolysaccharid (LPS) löst schon in kleinsten Konzentrationen die Synthese und Ausschüttung hoher Konzentrationen sogenannter pro-inflammatorischer Zytokine in Abwehrzellen aus. Im Vordergrund stehen bei dieser Reaktion die Gewebsmakrophagen, die für die systemischen Zytokinspiegel bedeutendste Zellart (Nathan 1987; Schumann et al., 1994).

Die von Makrophagen und deren Vorläuferzellen, den Monozyten, bei Stimulation mit Lipopolysacchariden synthetisierten Stoffe sind vielfältig. Die Liste reicht von kleinsten Sauerstoffradikalen bis hin zu Makromolekülen (Nathan 1987). Für den Inflamationsprozeß von besonderer Bedeutung sind die Zytokine IL-1b, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Diese Substanzen aktivieren eine Vielzahl anderer Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Lymphozyten und Hepatozyten. Endothelzellen ermöglichen auf diesen Stimulus hin die Adhäsion und Diapedese von Granulozyten und leiten so die inflammatorische Reaktion ein (Casale & Carolan 1999). Die Lymphozytenaktivierung führt zur Verstärkung der spezifischen Abwehr und die Hepatozyten produzieren spezielle, für die Abwehr relevante, sogenannte Akut-Phase-Proteine (Green et al., 1998; Bauman & Gauldie, 1994) (siehe auch Abschnitt 1.2.). Die nun anlaufende Reaktionskaskade kann einerseits für die Erregerabwehr nützlich sein, sie kann aber andererseits auch überschießen und so zur Sepsis und zum Septischen Schock führen (Okusawa et al., 1988; Michie et al., 1988; Parrillo 1993).

#### **1.2 Die Akut-Phase-Reaktion (APR)**

Infektionen, Traumata, Neoplasien oder auch chemische Noxen führen zu einem Reaktionskomplex des Körpers, der die Abwehr verbessern soll und Akut-Phase-Reaktion genannt wird (Kushner 1982). Zu diesem Reaktionskomplex gehören unter anderem Fieber, Leukozytose mit Linksverschiebung, Thrombozytose, Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände und der Anstieg spezieller Serumproteine, die für die Abwehr von Bedeutung sind (Bauman & Gauldie, 1994).

Diese Proteine werden Akut-Phase-Proteine (APP) genannt. Per definitionem spricht man von einem Akut-Phase-Protein, wenn sich seine Serumkonzentration in der Akut-Phase-Reaktion um mindestens 25 % ändert (Kushner & Mackiewicz 1987). Steigt die

Konzentration des Proteins, spricht man von einem positiven APP, sinkt sie hingegen, handelt es sich um ein sogenanntes negatives APP. Die Produktion von APP wird durch Zytokine induziert. Besonders die u.a. von Monozyten und Makrophagen produzierten Interleukine IL-1 und IL-6 sind starke Induktoren der Synthese von APP (Ramadori et al., 1985; Castell et al., 1990). Die positiven APPs lassen sich aufgrund ihres Stimulierungsmusters durch die obigen Zytokine in zwei Klassen einteilen: Klasse 1 APPs werden durch IL-6 stimuliert, IL-1 wirkt hier synergistisch. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem das C-reaktive Protein (CRP), Komplementkomponente C3, Serum-Amyloid A (SAA) und das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP). Die Bildung der Klasse 2 APP wird ebenfalls durch IL-6 stimuliert, IL-1 hat hier aber keinen oder aber einen hemmenden Effekt. Zu dieser Gruppe gehören z.B. humanes Haptoglobin und Fibrinogen (Bauman & Gauldie, 1994).

Auch anhand ihrer Funktion lassen sich die Akut-Phase-Proteine unterscheiden. Man differenziert drei Hauptkategorien:

- A: Der Abwehr dienende APP: Hierzu zählt man z.B. CRP. Es bindet Phosphorylcholin und andere Membranbestandteile von Bakterien und dient damit unter anderem der Opsonierung und Aktivierung des Komplementsystems (Volanakis & Kaplan 1971).
- B: Proteinaseinhibitor: Sie verhindert die Destruktion von Gewebe durch die in der Entzündung vom Organismus und Bakterium produzierten Serin-Proteinasen. Als Beispiel sei hier  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin genannt (Kalsheker 1996).
- C: Transportproteine: Transportproteine wie z.B. Transferrin spielen einerseits eine entscheidende Rolle beim Schutz des Körpers vor Sauerstoffmetaboliten und dienen andererseits dem Abtransport von Abbauprodukten zerstörter Zellen (Halliwell & Gutteridge 1990).

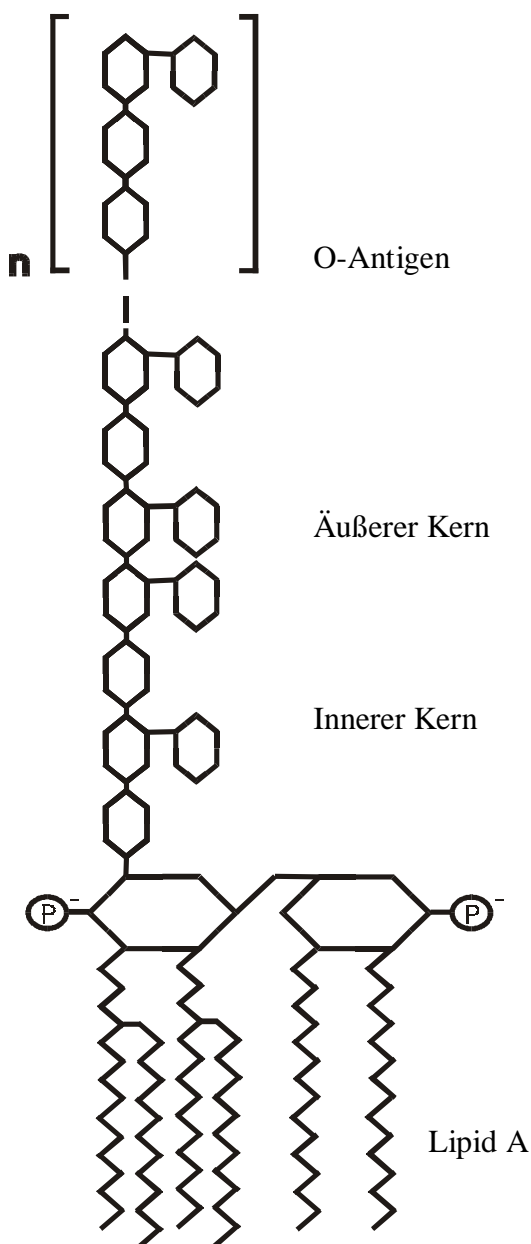
Auch das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP) ist ein Akut-Phase-Protein (Schumann et al., 1996). Seine Funktion wird im Abschnitt 1.4 genauer erläutert.

### **1.3 Das Lipopolysaccharid (LPS)**

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien. Es weist bei verschiedenen Bakterienspezies das gleiche Aufbauprinzip auf. So besteht das klassische LPS immer aus einem O-Antigen, einem Kernpolysaccharid und dem Lipid A (Raetz 1990; Rietschel et al., 1994).

Bei dem außen liegenden O-Antigen handelt es sich um ein Polymer aus sich

wiederholenden Oligosacchariden. Es besitzt antigenen Charakter und ist bei jeder Bakterienspezies unterschiedlich. Deshalb dient es der Differenzierung verschiedener Serotypen, was z.B. bei der epidemiologischen Untersuchung von Salmonellen-Infektionen genutzt wird (Popoff et al., 1998). Das O-Antigen kann auch vollständig fehlen. Diese LPS-Art wird „rough-LPS“ (R-LPS) genannt. Im Gegensatz dazu spricht man bei Anwesenheit eines O-Antigens von „smooth LPS“ (S-LPS) (Raetz 1990).



**Abbildung 1: Schematische Struktur des Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin).** LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Es besteht aus einem nach außen ragenden Zuckeranteil, der bei den verschiedenen Bakterienspezies stark variiert oder gänzlich fehlen kann und einem Lipidanteil, dem Lipid A, welches der Verankerung des Lipopolysaccharids in der Bakterienmembran dient. Der Polysaccharidanteil besteht aus dem inneren und dem äußeren Kern, sowie dem O-Antigen. Die Variabilität der Zuckerstrukturen nimmt vom inneren Kern zum O-Antigen zu. Lipid A ist für die meisten pathophysiologischen Eigenschaften des LPS verantwortlich. Sowohl die beiden Phosphatgruppen, als auch die Anzahl, Länge und Verzweigung der Lipidketten sind wichtig für die Aktivität des Lipid A Moleküls.

Das Kernpolysaccharid liegt proximal des O-Antigens und wird in einen äußeren und einen inneren Kern unterteilt. Das Kernpolysaccharid des LPS ist, im Gegensatz zum O-Antigen, bei vielen Gram-negativen Bakterien gleichartig aufgebaut. Im inneren Kern des Kernpolysaccharides befindet sich immer Keto-desoxy-oktonat (KDO). Es ist für die Funktion der äußeren Zellmembran unerlässlich und sein Verlust ist mit dem Leben Gram-negativer Bakterien nicht vereinbar (Raetz 1990).

Das Lipid A ist der kovalent gebundene Lipidanteil des LPS und dient als sein Membrananker. Es ist ein amphiphiles Molekül. Die hydrophile Kopfgruppe besteht aus zwei  $\beta$ -1-6-glykosidisch verknüpften N-acetyl-Glucosamin-Molekülen, die zusätzlich mindestens zwei Phosphatreste und gegebenenfalls weitere polare Gruppen enthalten. Der hydrophobe Teil des Lipid A besteht aus vier-Hydroxy-Fettsäureketten. Typisch ist die Substitution von einigen Hydroxy-Fettsäuren mit weiteren, normalerweise nicht hydroxylierten Fettsäureketten (Raetz 1990). Mittlerweile ist von vielen verschiedenen Laboratorien gezeigt worden, daß Lipid A für die meisten pathophysiologischen Wirkungen des LPS verantwortlich ist (Loppnow et al., 1986; Rietschel et al., 1994). Es dient der Interaktion zwischen LPS und dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP) und der Interaktion mit Lipoproteinen sowie der Aktivierung des Komplementsystems (Schumann et al., 1994; Freudenberg et al., 1980; Ihara et al., 1982).

Wenn Gram-negative Bakterien sich vermehren oder sterben wird LPS und somit Lipid A freigesetzt (Freudenberg et al., 1991). Dieses stimuliert nun mit Hilfe bestimmter Serumfaktoren (s.u.) unter anderem Granulozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen zur Produktion von Mediatoren, welche die typischen Endotoxineffekte wie Akut-Phase-Reaktion, Blutdruckabfall und sogar Verbrauchs-koagulopathie und Schock induzieren (Pugin et al., 1993; Haziot et al., 1993; Dentener et al., 1993; Nathan 1987; Parrillo 1993).

## 1.4 Das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP)

### 1.4.1 LBP ist ein Akut-Phase-Protein

Das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP) ist ein lösliches Protein von 58 kD Größe, das von Hepatozyten synthetisiert und konstitutiv ins Blut abgegeben wird (Tobias et al., 1986; Schumann et al., 1990; Tobias & Ulevitch 1993). Die Serumkonzentration im gesunden Menschen beträgt 18 µg/ml und steigt im Septischen Schock auf bis zu 40-60 µg/ml an (Gallay et al., 1994a). Die LBP-Produktion läßt sich durch IL-6 induzieren und dieser Effekt wird durch IL-1 verstärkt. Es handelt sich also um ein Akut-Phase-Protein der Klasse 1 (Schumann et al., 1996; Grube et al., 1994).

### 1.4.2 LBP moduliert LPS-Effekte

LBP besitzt eine starke Bindungsaffinität zu LPS (Tobias & Ulevitch 1993). Eine Funktion von niedrig konzentriertem LBP ist, LPS an seinen zellulären Rezeptor zu transportieren und so die Wirkung von LPS zu verstärken (Hailman et al., 1994). Bei einer gegebenen Menge LPS kann niedrig dosiertes LBP die Zytokinausschüttung von Monozyten um den Faktor 100 bis 1000 verstärken. In Gegenwart von LBP sind LPS-Mengen von 1 ng/ml ausreichend, um die Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine IL-1b, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Makrophagen auszulösen (Schumann et al., 1990). Im Mausmodell ließen sich des weiteren LPS-Effekte wie Zytokinanstieg und Letalität durch anti-LBP-Antiseren vermindern (Gallay et al., 1994b). In LBP-defizienten (LBP<sup>-/-</sup>) Mäusen konnte gezeigt werden, daß LBP für die Induktion einer Entzündungsreaktion durch LPS in Mäusen benötigt wird und daß die LBP<sup>-/-</sup> Mäuse bei LPS Applikation deutlich höhere Überlebensraten zeigten als Kontrolltiere (Jack et al., 1997; Wurfel et al., 1997). Zum anderen wiesen die LBP<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Letalität nach einer Salmonellen-Infektion auf (Jack et al., 1997).

Eine protektive Funktion von LBP wurde ebenfalls durch die Applikation hoher Konzentrationen von LBP in einem Sepsis-Mausmodell erzielt (Lamping et al., 1998): Sowohl eine durch LPS als auch durch intakte Bakterien ausgelöste Sepsis konnte durch die Gabe von LBP unterdrückt werden. Hohe Konzentrationen von LBP scheinen daher, wie auch durch *in vitro*-Experimente bestätigt wurde, LPS-Effekte zu hemmen (s.u.).

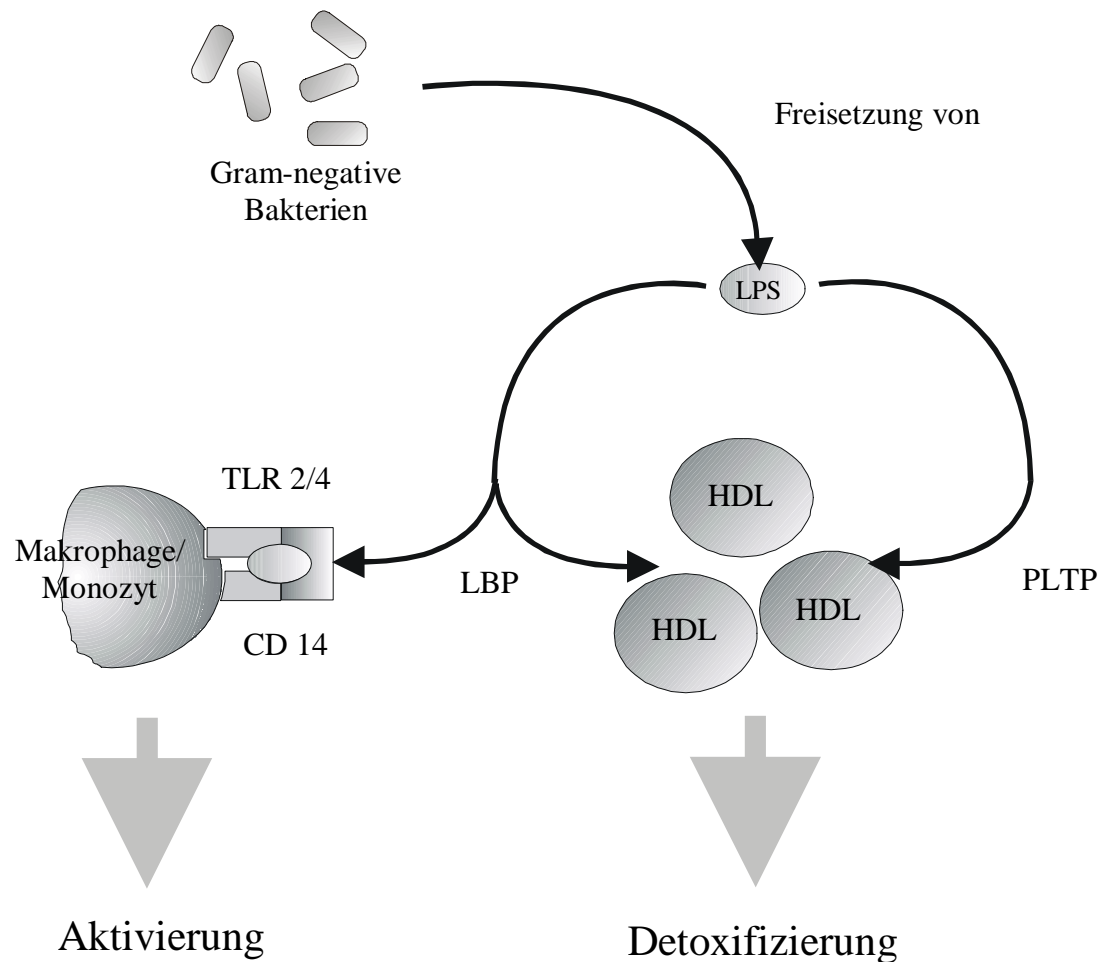
### **1.4.3 LBP transferiert LPS in Lipoproteine hoher Dichte (HDL), Detoxifizierung von LPS**

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß Lipoproteine hoher Dichte (HDL) LPS binden und inaktivieren können. Dieser Vorgang scheint in zwei Schritten abzulaufen und die Gegenwart von Serum zu benötigen (Ulevitch et al., 1979). Versuche mit rekonstituiertem HDL (rHDL) zeigten, daß der dabei entscheidende Serumfaktor möglicherweise das LBP ist (siehe Abb. 2). Einerseits transferiert LBP das LPS direkt ins rHDL, andererseits scheint es auch eine 2-Schritt-Reaktion zu geben, bei der LPS zuerst zu sCD14 transportiert wird und dann von rHDL internalisiert wird. (Wurfel et al., 1994). Tatsächlich scheint die 2-Schritt-Reaktion deutlich bevorzugt abzulaufen, so konnte die Neutralisation von LPS durch HDL bei Addition von sCD14 mehr als 30-fach verstärkt werden (Wurfel & Wright 1997; Yu et al., 1997). Dafür, daß LBP LPS auch in natives HDL transportiert, spricht, daß LBP in humanem Plasma mit dem Apoprotein-A-I assoziiert vorliegt (Wurfel et al., 1994). Dieses Apoprotein kommt ausschließlich in HDL vor (Camejo et al., 1970). Es ist derzeit nicht klar, ob die Fähigkeit von LBP, LPS in HDL zu transferieren für die Schutzfunktion der hohen LBP-Konzentrationen verantwortlich ist (s.u.).

### **1.4.4 Andere Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu LBP und deren Funktion**

LBP weist Sequenzübereinstimmungen auf DNA- und Proteinebene mit verschiedenen anderen Lipidtransferproteinen auf. Die höchste Ähnlichkeit gegenüber LBP besitzt mit 58 % auf DNA- und 44 % auf Proteinebene das „bacterial permeability increasing protein“ (BPI, CAP 57), (Gray et al., 1989). Seine Funktion wird in Abschnitt 1.7.11 genauer erläutert. Zu dem „cholesteryl ester transfer protein“ (CETP) hat LBP eine Sequenzübereinstimmung von 23 % auf Proteinebene (Drayna et al., 1987). Dieses Protein erleichtert den Abbau von HDL-Cholesterin und reduziert den Inhalt von HDL. Außerdem spielt es eine zentrale Rolle beim Rücktransport von Cholesterin in die Leber (Tall 1995). Die Sequenzübereinstimmung auf Proteinebene zwischen LBP und dem „phospholipid transfer protein“ (PLTP) beträgt 25 % (Day et al., 1994). PLTP dient dem Transport von Phospholipiden zwischen den verschiedenen Lipoproteinen und wurde auf der Oberfläche von humanem HDL gefunden (Albers et al., 1984; Tall et al., 1983). PLTP transportiert wie LBP das bakterielle Lipopolysaccharid in rekonstituiertes HDL und sorgt so für seine

Inaktivierung, besitzt aber keine Transportfunktion zu den zellulären LPS-Rezeptoren (Hailman et al., 1996).



**Abbildung 2: Eine weitere Funktion von LBP und PLTP.** Lipopolysaccharid wird von Gram-negativen Bakterien freigesetzt. Es wird an LBP gebunden und von ihm entweder an die zellulären Rezeptoren transportiert, was zum Beispiel zur Zytokinausschüttung führen kann, oder aber in das HDL transportiert. Die Internalisierung von LPS in Lipoproteinpartikel überführt dieses in eine inaktive Form. PLTP kann LPS ebenfalls in HDL-Partikel transportieren. Ein Transport zu den zellulären Rezeptoren und eine damit verbundene Stimulation ist nicht möglich.

## **1.5 Die zellulären LPS-Rezeptoren CD14, Toll-like Rezeptor 2/4 (TLR2/4) und CD11/CD18**

### **1.5.1 Die verschiedenen CD14-Varianten**

CD14 ist neben LBP ein weiteres Molekül mit entscheidender Bedeutung für die LPS-vermittelte Stimulation von Zellen (Maliszewski et al. 1985; Goyert et al., 1988). Man unterscheidet membrangebundenes CD14 (mCD14) und lösliches CD14 (sCD14). Das membrangebundene CD14, ein 53 kD Glykoprotein, ist auf den Zellen der myeloischen Reihe, besonders auf Makrophagen und Monozyten zu finden (Wright et al., 1990; Ulevitch 1993). Es ist mit einem Glycerophosphatidylinositol (GPI) - Anker in der Membran fixiert, besitzt somit keine transmembranäre Domäne und kann also nicht der Signaltransduktion dienen (Haziot et al., 1988).

Das lösliche CD14 ist in einer Konzentration von 2-6 µg/ml im Blut nachweisbar (Frey et al., 1992). Es wird entweder durch Abspaltung von seinem Lipidanker von der Zelloberfläche abgegeben („shedding“) oder aber als lösliches Protein sezerniert (Bazil & Strominger 1991; Durieux et al., 1994). Diese unterschiedlichen Ursprungsorte erklären die verschiedenen Molekulargewichte der Varianten des löslichen CD14 (48-, 53-, 55 kD). CD14 besitzt eine LPS-Bindungsstelle und kann vermutlich Komplexe mit LPS und LBP ausbilden (Wright et al., 1990). Anti-CD14 Antikörper können die LBP-vermittelte LPS-abhängige Stimulierung von Monozyten und Makrophagen blockieren (Wright et al., 1990). Außerdem konnte gezeigt werden, daß CD14-defiziente Mäuse sehr resistent gegenüber LPS und Infektionen mit Gram-negativen Bakterien sind (Haziot et al., 1996). CD14 scheint des weiteren neben LPS auch die Vermittlung anderer bakterieller Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykan zu vermitteln. Es wurde der Begriff „pattern recognition“ Rezeptor vorgeschlagen (Pugin et al., 1994).

### **1.5.2 Der Toll-like Rezeptor (TLR) 2/4**

Lange wurde nach dem signalübertragenden Element des LPS-Rezeptors gesucht. Kürzlich wurden schließlich verschiedene Hinweise darauf gefunden, daß Mitglieder der Toll-like-Rezeptor-Familie für LPS-vermittelte Signaltransduktion eine Rolle spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß Überexpression des Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2) nicht LPS-

responsive Zellen dazu bringt, auf LPS-abhängige Stimulation mit NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu reagieren. Außerdem läßt sich diese LPS-Stimulation durch LBP und Transfektion mit mCD14 verstärken (Yang et al., 1998).

Für die These, daß Toll-like-Rezeptoren für LPS-Erkennung wichtig sind, spricht auch, daß bei zwei Mausstämmen, die nur stark abgeschwächt auf LPS reagieren können (C3H/HeJ und C57BL10/ScCr-Mäuse), ein Gendefekt in einem der Toll-like Rezeptoren (TLR-4) identifiziert werden konnte (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

Neure Ergebnisse zeigen, daß TLR-2 und TLR-4 auch die Signaltransduktion von LPS gegenüber CD14-negativen Zellen vermitteln (Zhang et al., 1999) und daß TLR-2 auch andere bakterielle Liganden binden und deren Signaltransduktion vermitteln kann (Schwandner et al., 1999).

### **1.5.3 CD11/CD18**

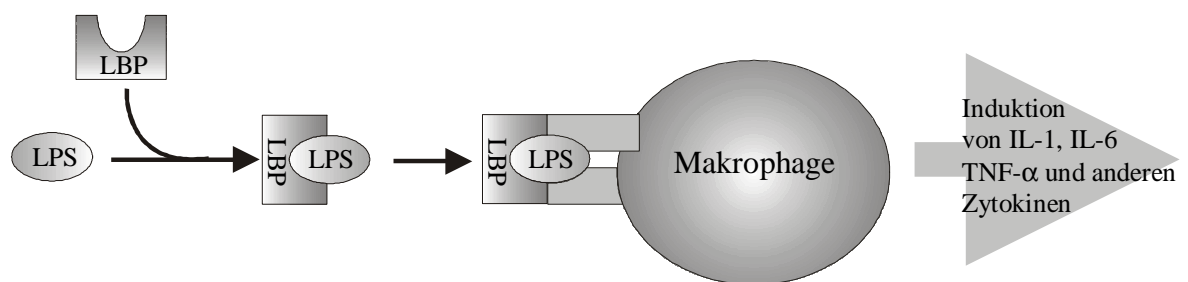
CD 11 und CD 18 sind Mitglieder der Leukozyten Integrin Familie. Mit CD 11c oder CD 18 transfizierte Chinese hamster ovary (CHO-) Fibroblasten konnten auf LPS-Stimulation hin mit einer Induktion des NF- $\kappa$ B Signalweges reagieren (Ingalls & Golenbock 1995). Dieser Effekt scheint auch bei mutiertem CD 11 / CD 18, das nicht mehr über einen transmembranären Anteil verfügt, nachweisbar zu sein (Ingalls et al., 1998). Dies führt zu der Hypothese, daß CD 14 und CD 11/ CD 18 den gleichen transmembranären Signalüberträger verwenden, der höchstwahrscheinlich TLR-2 bzw. TLR-4 ist.

## **1.6 LPS-induzierte Stimulation von CD14-positiven und -negativen Zellen**

### **1.6.1 Die LPS-induzierte, LBP-abhängige Stimulation von CD14-positiven Zellen**

Wenn LPS aus der bakteriellen Zellwand in ein wässriges Milieu freigesetzt wird, bildet es Multimere (Mizellen) aus, die nicht immunstimulierend sind (Seydel et al., 1993; Takayama et al., 1994). LBP bindet die Lipid A-Untereinheit von LPS, monomerisiert LPS-Multimere und transportiert sie an CD14-positive Zellen wie z.B. Monozyten und Makrophagen (Lamping et al., 1996; Tobias et al., 1989). Ist kein LBP anwesend, so werden 100-bis 1000-mal höhere LPS-Spiegel benötigt, um Zellen *in vitro* zu stimulieren

(Schumann et al., 1990). Der LBP-LPS-Komplex bindet wahrscheinlich an seine zellulären Rezeptoren, CD14 und TLR, wobei ein oder zwei LPS-Moleküle pro CD14 Molekül gebunden werden (Hailman et al., 1994). Wird die Bindung durch CD14-Antikörper blockiert, läßt sich die LPS-induzierte, LBP-abhängige Stimulation von Monozyten und neutrophilen Granulozyten inhibieren (Zarewych et al., 1996). CD14-defiziente-Mäuse zeigen eine deutlich höhere LPS-Toleranz und niedrigere systemische Zytokinspiegel nach LPS Gabe (Haziot et al., 1996). Die Aktivierung von Mitgliedern der TLR-Familie führt zur Signalübertragung ins Zellinnere wie durch einige Arbeiten gezeigt wurde (Yang et al., 1998, Schwandner et al., 1999). Über verschiedene Signaltransduktionswege wird die Zelle dann u.a. zur Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 und IL-8 stimuliert (Dentener et al., 1993). Abb. 3 faßt die Stimulation von CD14-positiven Zellen durch LPS systematisch zusammen.

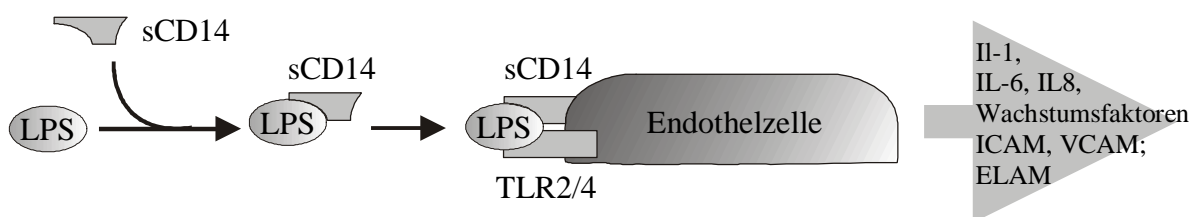


**Abbildung 3: LPS-abhängige, LBP-vermittelte Stimulation von CD14-positiven Zellen.** Das von Gram-negativen Bakterien freigesetzte Lipopolysaccharid (LPS) wird von dem LPS Bindenden Protein (LBP) gebunden und zum LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus CD14 und dem Toll-like Rezeptor 2/4 transportiert. Die Bindung von LPS bewirkt die Ausschüttung verschiedener Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6.

### 1.6.2 Lösliches CD14 dient der LPS-vermittelten Stimulation von Zellen ohne membranständiges CD14

Zu den Zellen ohne membranständiges CD14 gehören Endothelzellen, glatte Muskelzellen und andere. Sie lassen sich durch LPS zur Synthese von IL-1b, IL-6 und IL-8 anregen (Loppnow & Libby 1989; Loppnow & Libby 1990; Schonbeck et al., 1995). Außerdem werden bei LPS-induzierter Stimulation vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert (Yu et

al., 1986). Für diese durch LPS induzierten Reaktionen scheint sCD14 eine entscheidende Rolle zu spielen. So bedürfen Endothelzellen und andere CD14-negative Zellen der Anwesenheit von sCD14, um auf die im Organismus vorkommenden Konzentrationen von LPS reagieren zu können (Schumann et al., 1996; Frey et al., 1992). Mitglieder der TLR-Familie dienen hier ebenfalls als Signalüberträger (Zhang et al., 1999).



**Abbildung 4: LPS-abhängige Stimulation CD14-negativer Zellen.** CD14-negative Zellen werden von LPS zur Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt. Diese LPS-abhängige Stimulation wird durch lösliches CD14 (sCD14) verstärkt. Auch hierbei dient der Toll-like Rezeptor 2 bzw. 4 (TLR2/4) der Signalübermittlung ins Zellinnere.

### 1.7 Serum kann die Wirkung von LPS auf CD14-positive Zellen hemmen

Obwohl in den meisten experimentellen Systemen Serum die LPS-Wirkung verstärkt, wurde unter bestimmten Bedingungen gezeigt, daß ansteigende Serumkonzentrationen LPS-Wirkungen hemmen können. So kann LPS nach Vorinkubation mit Serum/Plasma kein Fieber oder Tod im Tierexperiment verursachen (Rall & Kelly 1957; Skarnes et al., 1958; Ulevitch & Johnston 1978). Die Zytokinantwort von Makrophagen und Monozyten auf eine LPS-Stimulation hin läßt sich durch Serumbgabe sowohl im murinen, als auch im humanen System verringern (Lamping et al., 1998; Flegel et al., 1989). Serum vermag außerdem, den Limulustest zu inhibieren, indem es vermutlich die Konzentration an freiem LPS verringert (Johnson et al., 1977; Warren et al., 1985; Berger et al., 1990). Das Serum enthält also einen oder mehrere Faktoren, die die LPS-Wirkungen wie z.B. eine überschießende Zytokinantwort von Monozyten und Makrophagen hemmen.

Es gibt eine Vielzahl von Serum-Proteinen, für die eine Bindungsaffinität zu LPS bekannt

ist. Bei einigen von ihnen ist eine inhibitorische biologische Aktivität gezeigt worden, während andere Bindungen keine biologische Relevanz, im Sinne einer Inhibition, zu haben scheinen. Im folgenden seien einige der potentiellen Inhibitoren aufgeführt.

### **1.7.1 Cationic antimicrobial proteins (CAP)**

Neutrophile Granulozyten enthalten einige Peptide und Proteine mit antimikrobieller Aktivität. Zu ihnen gehören die „cationic antimicrobial proteins“ (CAP), von denen besonders zwei Proteine mit LPS neutralisierender Aktivität bekannt sind. Es handelt sich um das „bacterial permeability-increasing protein“ (BPI, CAP57) und das „cationic antimicrobial protein 18 kD“ (CAP18).

BPI weist eine hohe Sequenzübereinstimmung mit LBP auf (Gray et al., 1989; Elsbach & Weiss 1993). Es kommt im Serum nur in geringen Konzentrationen vor, wirkt einerseits direkt antibakteriell und ist andererseits in der Lage die LPS-induzierte, LBP-vermittelte Stimulation von Monozyten und Makrophagen zu inhibieren (Dentener et al., 1993; Corradin et al., 1994). Für rekombinantes BPI, das nur aus der N-terminalen Hälfte des Proteins besteht, ist in verschiedenen Sepsismodellen ein schützender Effekt nachgewiesen worden (Elsbach & Weiss 1993; Kelly et al., 1993; Kohn et al., 1993; Vandermeer et al., 1994). Obwohl BPI eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, wird es momentan in Studien als Therapeutikum besonders für die Meningokokkensepsis, bei der es zu sehr hohen LPS-Spiegeln kommt, erprobt (Giroir et al., 1997).

Das „cationic antimicrobial protein 18“ (CAP18) kommt in einer Konzentration von 1,18 µg/ml im humanen Plasma vor (Sorensen et al., 1997). *In vitro* hemmt CAP18 die LPS-induzierte Stimulation von Makrophagen und inhibiert den Limulus-Test. Außerdem konnte im Mausversuch ein schützender Effekt vor LPS-Intoxikation nachgewiesen werden (Larrick et al., 1994).

### **1.7.2 Lipopolysaccharid Bindendes Protein (LBP)**

LBP besitzt, neben der oben erwähnten LPS-verstärkenden Wirkung, in hohen Dosen auch eine inhibierende Wirkung auf die LPS-abhängige Stimulation von CD14-positiven Zellen. Diese tritt bei Konzentrationen von 10 µg/ml an der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und murinen Peritonealmakrophagen auf (Lamping et al., 1998; Amura et al., 1997).

Außerdem konnte ein protektiver Effekt von hochdosiertem LBP im murinen Sepsismodell gezeigt werden, wobei sich auch verminderte systemische Zytokinspiegel fanden (Lamping et al., 1998). Ob diese protektiven Effekte von LBP durch seine Eigenschaft, LPS in HDL zu transferieren, begründet ist, ist nicht geklärt.

### **1.7.3 Transferrin, Gc-globin, $\alpha$ 2-Makroglobulin**

Für Transferrin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin und Gc-globin konnte eine gewisse Bindungsaffinität zu LPS nachgewiesen werden (Berger & Beger 1987). Allerdings gelang es den Untersuchern nicht, eine Korrelation zwischen LPS inhibitorischer Serumaktivität und der Serumkonzentration von Transferrin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin aufzuzeigen (Berger et al., 1990).

### **1.7.4 Lipoproteine und Lipidtransferproteine**

In Abschnitt 1.4.3 wurde schon darauf eingegangen, daß humane Lipoproteine hoher Dichte (HDL) LPS internalisieren und so inaktivieren können. Dies gilt auch für humane Lipoproteine geringer Dichte (LDL), Lipoprotein (a) (Lp(a)) und Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL) (Netea et al., 1998a; Parker et al., 1995). Die Internalisierung von LPS durch Lipoproteine steigert die LPS-Clearance und reduziert die Bindung von LPS an die Zelle, was letztendlich die Zytokinausschüttung von Abwehrzellen reduziert (Read et al., 1995; Munford et al., 1981). Allerdings unterliegen die Hemmeffekte von Lipoproteinen einer ausgesprochen langsamen Zeitkinetik, was lange Vorinkubationen von LPS mit Lipoproteinen nötig macht, und zu der Annahme geführt hat, daß eine Stimulation von Abwehrzellen einer Inaktivierung durch Lipoproteine zuvor kommt (Netea et al., 1998b).

Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem inhibitorischen Potential der verschiedenen Lipoproteine und deren Phospholipidgehalt (Parker et al., 1995). Deshalb wird vermutet, daß sich der Lipid A-Anteil des LPS in die an der Oberfläche der Lipoproteine befindlichen Phospholipide einlagert und so inaktiviert wird. Der Begriff „leaflet insertion model“ wurde für diesen Mechanismus vorgeschlagen (Parker et al., 1995).

Zusätzlich zu den *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, daß Lipoproteine Tiere vor dem Endotoxintod schützen können. Mäuse können Applikationen letaler LPS-Dosen überleben, wenn LPS mit humanem HDL vorinkubiert wurde (Ulevitch et al., 1979). Auch

für humanes LDL, VLDL und Chylomikronen konnte dieser Effekt gezeigt werden (Harris et al., 1990). Ein weiteres Indiz für die protektiven Effekte von Lipoproteinen *in vivo* sind die Versuche mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen und transgenen Mäusen die das humane Apoprotein-A-I exprimieren. Beide Tierarten haben deutlich gesteigerte Lipoproteinkonzentrationen im Serum und sind weit resistenter gegenüber intraperitonealen LPS-Injektionen als Kontrolltiere (Netea et al., 1996; Levine et al., 1993). Es sind mittlerweile auch erstmals Versuche mit Lipoproteinen am Menschen durchgeführt worden: Freiwilligen wurde entweder rekonstituiertes HDL (rHDL) oder ein Placebo per infusionem appliziert. Kurz darauf erhielten beide Gruppen eine intravenöse LPS-Injektion (4 ng/kg). Die Probanden mit vorheriger rHDL Infusion zeigten deutlich weniger klinische Zeichen einer LPS-Intoxikation. Es ließ sich außerdem zeigen, daß bei den Probanden mit Placebo-Infusion höhere Zytokinspiegel im Blut nachweisbar sind (Pajkrt et al., 1996).

In Abschnitt 1.4.3 ist auf die Fähigkeit von LBP eingegangen worden, Lipopolysaccharid in rekonstituiertes HDL zu transferieren. Auch wurde dort beschrieben, daß es Indizien dafür gibt, daß dieser Effekt auch für natives humanes HDL zutrifft. Ähnliche Fähigkeiten werden für PLTP in Abschnitt 1.4.4 beschrieben, welches auch in humanem HDL vorkommt. Ob LBP auch den Transfer von LPS in Lipoproteine anderer Dichten ermöglichen kann, was für einen Einfluß dies auf den Hemmeffekt von Lipoproteinen hat, und ob LBP in nativen Lipoproteinen detektiert werden kann, ist bisher nicht beschrieben.

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Lipopolysaccharid (LPS) wird von Gram-negativen Bakterien aus der äußeren Zellwand in die Umgebung abgegeben. Bei der Infektion des Wirtes reagiert es mit dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP) und wird zu CD14-positiven Zellen, wie Monozyten und Makrophagen transportiert, wo es die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine auslöst. Eine überschießende Freisetzung dieser Zytokine scheint entscheidend an Entstehung von Sepsis und SIRS beteiligt zu sein. LPS kann des Weiteren durch LBP zu den Apolipoprotein-A-I enthaltenden Lipoproteinen des Wirts transportiert werden, was zu einer Internalisierung und Inaktivierung von LPS führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fähigkeit von Serum, LPS-Effekte zu hemmen, untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte dabei dem im Serum vorkommenden LBP, sowie den Lipoproteinen gewidmet werden. Hierzu sollen verschiedene Mausseren verwendet und ihre Wirkung auf die LPS-induzierte Stimulation von RAW 264.7 Zellen, einer murinen Makrophagenzelllinie, in Abhängigkeit von rekombinantem murinem LBP untersucht werden. Mit Hilfe von Seren der LBP<sup>-/-</sup> Maus, sowie LBP-depletiertem Serum und rekombinantem murinem LBP sollte die Rolle des Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (LBP) bei dem Serum-Hemmeffekt beleuchtet werden. Außerdem sollte durch Isolation von murinen Lipoproteinen und die Herstellung von lipoproteindefizientem Serum die Bedeutung von Lipoproteinen für die Hemmwirkung von Serum untersucht werden. Diese Versuche, sowie die Verwendung von murinen Lipoproteinen und rekombinantem murinem LBP sollten schließlich eine mögliche Wechselwirkungen zwischen LBP und Lipoproteinen bei der Detoxifizierung von LPS aufzeigen.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### Chemikalien:

Acid Blue Stain Concentrate	Helena Laboratories, Gateshead, UK
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %ige Lösung, Vernetzungsgrad 39:1	Amresco, SOLON, Ohio, USA
Aether zur Narkose	ASID, Böblingen
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagenz	BIO-RAD, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Hyperfilm ECLTM	Amersham Buchler, Braunschweig
Limulus Amöben Lysat	Charles River Endosafe, Charleston, USA
LPS-Standard	Charles River Endosafe, Charleston, USA
Magermilchpulver	DIFCO, Detroit, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin	Roth, Karlsruhe
Natrium-Azid	Merk, Darmstadt
o-Phenylenediamin Dihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Pentachrome LAL	Pentapharm AG
Protein-G-Säule „High Trap“	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Proteinstandard	Sigma, Deisenhofen
Reagenz ECLTM	Amersham Buchler, Braunschweig
Streptavidin-Peroxidase labeled	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
TWEEN 20	Serva, Heidelberg
Universal Lysepuffer	Boehringer Mannheim, Mannheim
Wasser zur Injektion (LPS frei)	Braun, Melsungen

**Zellkulturmaterialien:**

Steriles Einwegmaterial	NUNC, Wiesbaden Falcon, Heidelberg Eppendorf, Hamburg
Antibiotic Antimycotic Solution	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
fetales Kälberserum	GibcoBRL, Karlsruhe
Glutamax I	GibcoBRL, Karlsruhe
LPS von <i>E. coli</i> O111: B4	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium	PAA, Cölbe
Trypsin	PAA, Cölbe

**Zelllinie:**

RAW 264.7 ATTC TIB 71 (Raschke et al., 1978).

**Mausseren:**

BALB/c-, C57black- und 129 SVJSerum	RCC Biotechnology & Breeding, Füllinsdorf, Schweiz
C3H-Serum	EPO, Berlin Buch
NMRI-Serum	Charles River, Sulzfeld oder selbst entnommen von Mäusen der Firma Zierzucht Schönewalde
LBP-defizientes (LBP <sup>-/-</sup> ) Serum	Selbst entnommen von LBP-defizienten (LBP <sup>-/-</sup> ) Mäusen, die in unserem Labor gezüchtet wurden. Die Mäuse wurden generiert und dankenswerter Weise zur

Verfügung gestellt von C. Schütt und R. Jack, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald (Jack et al., 1997).

**Reagentien für ELISA und Westernblot:**

Anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörper	Pharmingen, Hamburg
Anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörper biotinyliert	Pharmingen, Hamburg
Anti-mLBP-Antiserum (Kaninchen)	In unserem Labor hergestellt (Lamping et al., 1998)
Anti-mLBP-Antiserum biotinyliert	In unserem Labor hergestellt (Lamping et al., 1998)
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon P Membran	Millipore, Eschwege
mTNF- $\alpha$ Standard	R&D Systems, Wiesbaden/Nordenstadt
rekombinantes murines LBP	Hergestellt im Labor von Dr. Schumann mithilfe des Baculovirus Systems (Lamping et al., 1998)

**Dichtezentrifugation:**

20 ml Spritzen	Braun, Melsungen
Kollodiumhülsen	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter, 0,2 $\mu$ m	Schleicher & Schuell, Dassel
Thick walled Polyallomer Tubes	Beckmann, München

**Kommerziell erworbene komplette Assays („Kits“):**

Cholesterinassay	Sigma, Deisenhofen
Phospholipidassay	Wako Chemikals, Neuss
Laktatdehydrogenaseassay	Boehringer Mannheim, Mannheim

**Geräte:**

Avanti <sup>TM</sup> 30 Zentrifuge	Beckmann, München
Filmentwickler: Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
GS-6 Zentrifuge	Beckmann, München
L8-70M Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Mikrotiterplattenreader SPECTRA-Fluor-Plus	Tecan, Crailsheim
Mini Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Spektrometer UV-160A	Shimadzu, Duisburg

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Zelllinien**

Alle Versuche wurden mit RAW 246.7 Zellen durchgeführt. Es handelt sich um eine murine Makrophagenzelllinie (Raschke et al., 1978).

#### **2.2.1.2 Kulturbedingungen**

Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die adhärente Zelllinie RAW 246.7 wurde in 1640 RPMI Medium unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamax und Antibiotic Antimycotic Solution bei einer Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> und 37°C gehalten.

Konfluente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 2,5 %igem Trypsin von der Kulturflasche gelöst. Nach Ablösung wurde die Wirkung des Trypsins mit FKS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1000 UpM und Raumtemperatur 10 Minuten abzentrifugiert (GS-6 Zentrifuge). Die so gewonnenen Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und in einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter in 96-Loch-Platten ausgesät.

#### **2.2.1.3 Zellstimulation**

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. LPS, LBP, Serum und die Lipoproteine wurden in RPMI 1640 Medium verdünnt. Die Zellen wurden nun mit LPS von *E.coli* O111:B4 und rekombinantem murinen LBP stimuliert und diese Stimulation mit Serum und/oder Lipoproteinen inhibiert. Nach vier Stunden wurden die Überstände abgenommen und bei -80°C eingefroren, um sie später im murinen TNF- $\alpha$  ELISA zu messen (siehe 2.2.4.1).

### **2.2.2 Toxizitätstests**

Um zu überprüfen, ob die RAW 246.7 Zellen durch die Behandlung mit Mausseren Schaden nehmen, wurden verschiedene Toxizitätstests durchgeführt.

#### **2.2.2.1 Trypanblau-Färbung**

Die Zellen wurden mit der höchsten verwendeten Serumkonzentration für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium fast vollständig abgenommen und das verbliebene Medium mit Trypanblau 1:1 verdünnt. Abgestorbene Zellen lassen sich mit dieser Methode anfärben, während vitale Zellen farblos bleiben. Die Zahl der blau gefärbten Zellen wurden mittels Zählkammer und Mikroskop bestimmt.

#### **2.2.2.2 Proteinbestimmung der lysierten Zellen**

Die Zellen wurden mit der höchsten verwendeten Serumkonzentration für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie drei mal mit PBS gewaschen und danach mit „Universal-Lysepuffer“ lysiert. Das Zellysate wurde abgenommen und seine Proteinmenge nach unten beschriebenen Verfahren ermittelt (siehe 2.2.7). Die Proteinmenge im Lysat korreliert mit der Anzahl der adhären Zellen.

#### **2.2.2.3 LDH-Bestimmung im Zellüberstand**

Die Zellen wurden mit den maximal verwendeten Serumkonzentrationen für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) Konzentration in den Zellüberständen mit Hilfe eines kommerziellen Kits ermittelt (siehe 2.2.6.3). Da LDH in allen Zellen vorkommt und nur bei Schädigung der Zellen abgegeben wird, stellt sie einen guten Marker für eine eventuelle Zellschädigungen dar.

### **2.2.3 Blutentnahme und Serumpräparation**

Die Mäuse wurden in Äther narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte unter möglichst sauberen Bedingungen mit Pasteur-Pipetten aus dem Retroorbital Plexus. Das gewonnene Blut wurde in Aliquots abgefüllt und bis zur vollständigen Gerinnung (ca. 30 Minuten) bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde es 15 min bei 3000 UpM mit der Avanti™30 Zentrifuge zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Serum wurde vorsichtig abpipettiert. Um sicher zu gehen, daß sich keine restlichen Zellen im Serum befinden, wurde die Prozedur ein zweites Mal wiederholt.

### **2.2.4 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

#### **2.2.4.1 ELISA zur Messung von murinem TNF- $\alpha$**

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit 50  $\mu$ l pro Vertiefung einer 3  $\mu$ g/ml Lösung des monoklonalen anti-mTNF- $\alpha$ -Antikörpers in 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,0 bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurden die freien Proteinbindungsstellen mit 10 % FKS in PBS, 0,05 % TWEEN blockiert. Nach erneutem Waschen wurden je 100  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe von murinem TNF- $\alpha$  und die zu bestimmenden TNF- $\alpha$ -haltigen Zellüberstände, verdünnt in PBS mit 10% FKS und 0,05 % TWEEN, auf die Platte gegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungsreihe hatte einen Maximalwert von 4 ng/ml und eine Nachweisgrenze von 63 pg/ml. Nach dreimaligem Waschen wurde der zweite, biotinylierte, monoklonale anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml, ebenfalls verdünnt in PBS mit 10 % FKS und 0,05 % TWEEN eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, die Platte sechsmal gewaschen und der sekundäre Antikörper mit je 100  $\mu$ l pro Vertiefung Streptavidin-Peroxidase-Konjugat der Konzentration 1  $\mu$ g/ml (verdünnt in 10% FKS, 0,05 % TWEEN in PBS) detektiert. Als Substrat wurde ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD) verwendet. Die Farbreaktion wurde nach ca. 20 Minuten mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet. Anschließend wurde die optische Dichte bei 490 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen.

### 2.2.4.2 ELISA zur Messung murinen LBPs

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit 50 µl pro Vertiefung einer 5 µg/ml Lösung des Anti-LBP-Antiserums (Kaninchen) verdünnt in 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen und Blockieren der freien Bindungsstellen mit 10 % FKS in PBS mit 0,05 % TWEEN wurden jeweils 100 µl einer Verdünnungsreihe des rekombinanten LBP und die zu bestimmenden LBP-haltigen Proben, verdünnt in PBS mit 10 % FKS und 0,05 % TWEEN, zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungsreihe hatte einen Maximalwert von 25 ng/ml und eine Nachweisgrenze von 0,39 ng/ml. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl des biotinylierten Anti-LBP-Antiserums in einer Konzentration von 5 µg/ml eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, die Platte dreimal gewaschen und dieser sekundäre Antikörper mit je 100 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1 µg/ml) detektiert. Auch hier diente ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD) als Substrat. Abstoppen und Messung der optischen Dichte erfolgten wie beim TNF-α ELISA.

### 2.2.5 Isolierung von Lipoproteinen aus Mausseren

#### 2.2.5.1 Sequentielle Flotationsdichtezentrifugation

Die Isolation wurde mit einigen Abänderungen nach einer Methode zur Isolierung von Lipoproteinen aus humanem Serum durchgeführt (Schumaker & Puppione 1986). Es wurden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Eine Natrium-Bromid-Lösung der Dichte 1,369 g/ml und eine Natrium-Chlorid-Lösung der Dichte 1,006 g/ml. Die Dichten wurden pyknometrisch eingestellt und nach der Herstellung wurden die Stammlösungen mit Hilfe eines Sterilfilters filtriert und danach mit 0,02 % Natrium-Azid versetzt. Für die Lipoproteingewinnung wurde frisch entnommenes Mausserum von NMRI Mäusen verwendet, das entweder wie oben beschrieben selbst entnommen oder bei Charles River bestellt wurde. Das Serum wurde gepoolt und mit 0,02 % Azid versetzt. 6 ml des Serums wurden gleichmäßig auf zwei Polyallomerröhrchen verteilt und jeweils mit 0,5 ml der NaCl-Lösung vorsichtig überschichtet. Die Röhrchen wurden mit einem SW50.1 Rotor bei 20°C und 40000 UpM zentrifugiert. Nach 22 Stunden wurden 0,5 ml des Überstandes vorsichtig abpipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 4°C gelagert. Der

Überstand enthielt Lipoproteine der Dichte  $<1,006$  g/ml. Von der direkt darunter befindlichen Flüssigkeit wurden weitere 800  $\mu$ l abpipettiert und verworfen. Sie enthielten kaum Proteine oder Lipide. Der restliche Inhalt der Röhren wurde resuspendiert und gepoolt. Die Dichte wurde mit Hilfe der NaBr-Lösung und destilliertem, endotoxinfreiem und mit Natrium-Azid versetzten Wassers auf eine Dichte von 1,063 g/ml und ein Volumen von 7 ml eingestellt. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf zwei neue Röhren verteilt und wieder für 22 Stunden bei 20°C und 40000 UpM mit dem SW50.1 Rotor zentrifugiert.

Der nun sichtbare Überstand enthielt Lipoproteine der Dichte 1,006-1,063 g/ml. Er wurde in 0,5 ml vorsichtig abpipettiert und ebenfalls bei 4°C gelagert. Von der direkt darunter befindlichen Flüssigkeit wurden weitere 800  $\mu$ l abpipettiert und verworfen. Der im Röhren verbliebene Rest des Serums wurde erneut resuspendiert, gepoolt und mit Hilfe der NaBr-Stammlösung und des destillierten Wassers auf eine Dichte von 1,21 g/ml und ein Volumen von 7 ml eingestellt. Die Lösung wurde wieder gleichmäßig auf zwei neue Röhren verteilt und mit dem SW50.1 Rotor bei 20°C und 40000 UpM zentrifugiert. Nach 29 Stunden wurde die Zentrifuge gestoppt und der sichtbare Überstand in 0,5 ml abpipettiert. Er enthielt Lipoproteine der Dichte 1,063-1,21 g/ml. Die Zwischenschicht wurde wieder in 800 $\mu$ l abpipettiert. Der Unterstand enthält lipoproteindefizientes Serum. Er wurde resuspendiert und wie der Überstand bei 4°C gelagert. Die so isolierten Lipoproteine wurden nun wie unten beschrieben dialysiert und dann auf die Zellen gegeben bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Arbeit an der Zellkultur bei -80°C gelagert.

### **2.2.5.2 Sterilfiltration**

Die Sterilfiltration wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Die unsterilen Lösungen wurden mit einer 20 ml Spritze aufgezogen. Danach wurde der Sterilfilter auf die Spritze gesetzt und die Lösung in sterile Röhren gespritzt. Die Röhren wurden verschlossen und bei 4°C gelagert.

### **2.2.5.3 Dialyse der isolierten Lipoproteine**

Kollodiumhülsen wurden eine Stunde in destilliertes, LPS-freies Wasser eingelegt. Danach

wurden die Hülsen mit je 900 µl der isolierten Lipoproteine oder des lipoproteindefizienten Serums gefüllt. Der Inhalt von je 4 Hülsen wurde bei 4°C gegen 500 ml PBS dialysiert. Die Dialyse erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde zwei Stunden dialysiert, dann wurde das PBS gegen frisches ausgetauscht und die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

### **2.2.5.4 Kontrolle der Reinheit der isolierten Lipoproteine**

Um die Qualität der Lipoproteine zu überprüfen, wurden sie in der Abteilung Klinische Chemie der Charité einer nativen Gel-Elektrophorese unterzogen. Dabei wurde jede Probe auf zwei Gele aufgetragen. Das erste Gel wurde einer Lipidfärbung unterzogen. Das zweite Gel wurde getrocknet und dann in unserem Labor einer Comassie-Blau-Proteinfärbung unterzogen. Dabei wurde es für 4 Minuten in die 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnte Färbelösung (Acid Blue Stain Concentrate) gelegt und auf einer Schüttel-Plattform (Mini Rocking Platform) geschwenkt. Danach wurde es 20 Minuten ebenfalls auf der Plattform mit 5 %iger Essigsäure entfärbt. Die isolierten Lipoproteine und die Seren wurden alle im Limulus Amöben Lysat Assay („LAL-Test“) auf ihre Endotoxinkonzentration hin überprüft (Beschreibung s. u.). Hierbei wurden für Stimulationen in Gegenwart von LBP maximal 200 pg/ml und ohne Gegenwart von LBP maximal 700 pg/ml LPS toleriert.

### **2.2.6 Kommerziell erworbene komplette Assays („Kits“)**

#### **2.2.6.1 Cholesterinmessung**

Die Cholesterinmessungen von Lipoproteinen und Seren wurde mit einem Cholesterolassay der Firma Sigma, Deisenhofen, nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.6.2 Phospholipidmessung**

Die Phospholipidkonzentrationen wurden ebenfalls mit einem kommerziellen Kit gemessen. Es handelt sich um einen Kit der Firma Wako Chemicals, Neuss.

### **2.2.6.3 Laktatdehydrogenase-Messung**

Die Laktatdehydrogenase wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits der Firma Boehringer Mannheim bestimmt. Als Standard dienten die von der Labormedizin der Charité, Berlin verwendeten Standard-Seren.

### **2.2.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Die Serum- und Lipoproteine sowie Zellüberstände wurden in destilliertem Wasser 1:2, 1:20 und 1:200 vorverdünnt. Außerdem wurde mit dem Proteinstandard eine Standardreihe der Konzentration 10; 5; 2,5; 1,25 und 0 µg/ml vorbereitet. Das Bradford-Reagenz wurde vor der Messung 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt. Von den Standards und Proben wurden je 20 µl auf einen Milliliter verdünntes Bradford-Reagenz gegeben. Die dabei entstehende Farbänderungen wurde im Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch rechnerischen Vergleich der optischen Dichte der Proben mit der Eichkurve.

### **2.2.8 Endotoxinmessung**

Die Endotoxinmessung wurde mittels des Limulus Amöben Lysat Assays (LAL) durchgeführt (Pearson 1979). Eine Standardreihe wurde mit Hilfe des LPS Standards und destillierten Wassers hergestellt. Sie enthält die Konzentrationen 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1 und 1,56 pg/ml. Die Proben wurden 1:10 verdünnt. Nach Hitzeinaktivierung der Standards und Proben bei 70°C für 15 Minuten wurden je 50 µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte gegeben. Auf die Standards und Proben wurden je 50 µl Limulus Amöbe Lysat pipettiert. Das Lysat-LPS-Gemisch wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde Pentachrome LAL als Substrat 1:4 in Tris-Puffer verdünnt und je 100 µl pro Vertiefung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 100 µl 40 %iger Essigsäure pro Vertiefung abgestoppt. Die Farbreaktion wurde nun im Mikrotiterplattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und die entsprechenden Konzentrationen errechnet.

## **2.2.9 Nachweis von LBP in den Lipoproteinen**

### **2.2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zunächst wurde ein 10 %iges Polyacrylamidtrenngel in die Gelkammer gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser entfernt und es wurde mit einem 5 %igem Polyacrylamidsammelgel überschichtet. Die zu analysierenden Lipoproteine wurden in Probenpuffer (50 mM TRIS HCl, pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) SDS; 50 mM DTT; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden in einer vertikalen Gel-Kammer mit Laufpuffer (25 mM TRIS HCl, pH 6,8; 180 mM Glycin; 0,1 % w/v SDS) bei 20-30 mA ca. 2-3 Stunden aufgetrennt.

### **2.2.9.2 Transfer des elektrophoretisch aufgetrennten LBP auf Membranen**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem Semi-Dry-Blot-Verfahren auf Immobilon P Membranen übertragen. Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf eine zuvor mit Methanol und Aqua bidestillata gespülte Immobilon P Membran gelegt. Das Gel und die Membran wurden dann zwischen zwei in Transferpuffer (25 mM TRIS; pH 8,5; 200 mM Glycin; 20 % Methanol) getränkte Gel Blotting Papier-Schichten so in die Blot-Apparatur eingespannt, daß die Membran der Anode zugewandt war. Der Proteintransfer erfolgte 1,5 Stunden bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche.

### **2.2.9.3 Immunodetektion von LBP (Western Blot)**

Zur Absättigung der freien Proteinbindungsstellen auf den Immobilon P Membranen wurden die Membranen nach dem Transfer für 60 Minuten in 5 % Magermilchpuffer in PBS das 0,05 % TWEEN enthielt geschüttelt und anschließend je zweimal 10 Minuten mit PBS, 0,05 % TWEEN gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit biotinyliertem polyklonalem anti-LBP-Antiserum, 1:3000 verdünnt in Verdünnungspuffer (3 % Magermilchpulver in PBS, 0,05 % TWEEN), für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann erneut gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit

Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, verdünnt 1:4000 in Verdünnungspuffer, inkubiert. Das Nachweisverfahren mittels Chemolumineszenz (ECL) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.10 LBP-Depletion aus NMRI-Serum**

1 ml NMRI Serum wurde über Nacht bei 4°C mit 350 µg Anti-LBP Antiserum inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung bei 800 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach vorherigem Spülen einer Protein-G-Säule mit PBS wurde der Überstand mit einer 1 ml Spritze langsam durch eine Protein-G-Säule gedrückt und das Eluat aufgefangen. Das Eluat wurde aliquotiert und eingefroren, bevor es auf die Zellen gegeben wurde. Als Kontrolle für die Zellstimulation diente ein NMRI Serum, das ebenfalls eluiert, nicht aber mit dem Antiserum inkubiert wurde. Vor der Stimulation wurden die Proteinkonzentrationen beider Seren gemessen und angeglichen. Der LBP-ELISA ergab für das depletierte Serum eine LBP Konzentration von 6,3 ng/ml und für das Kontrollserum eine Konzentration von 1,3 µg/ml.

### **2.2.11 Statistik**

Die Zellstimulationen wurden in drei Versuchen durchgeführt jeder Wert wurde einmal im TNF- $\alpha$  ELISA gemessen. Signifikanzen wurden im Wilcoxon-Test ermittelt. In den Abbildungen zu Zellstimulationsversuchen handelt es sich um Mittelwerte, die Fehlerbalken drücken Standardabweichungen aus. Zu allen dargestellten Ergebnissen gibt es weitere Ergebnisse mit ebenfalls drei Versuchen, die eine ähnliche Tendenz zeigen und in dieser Arbeit nicht abgebildet sind.

Messungen von Protein-, Cholesterol-, Phospholipid- und Endotoxinkonzentrationen sind Dreifachmessungen. Angleichungen von Seren und Lipoproteinen erfolgten anhand der Mittelwerte.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Ausschluß toxischer Effekte von Mausseren auf RAW 264.7 Zellen**

Da im Folgenden inhibitorische Aktivitäten von Mausseren und deren Bestandteile untersucht werden, mußte zuerst geklärt werden, ob Mausserum zytotoxisch auf die verwendete Zelllinie wirkt. Um dies auszuschließen, wurden verschiedene Zytotoxizitätstests durchgeführt. Hierbei wurde Serum von NMRI-Mäusen speziell mit hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) verglichen, welches zu den empfohlenen Bestandteilen des Kulturmediums der Zellen gehört und sich deshalb besonders gut als Kontrolle eignet.

##### **3.1.1 Zählung der Trypanblau-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup>**

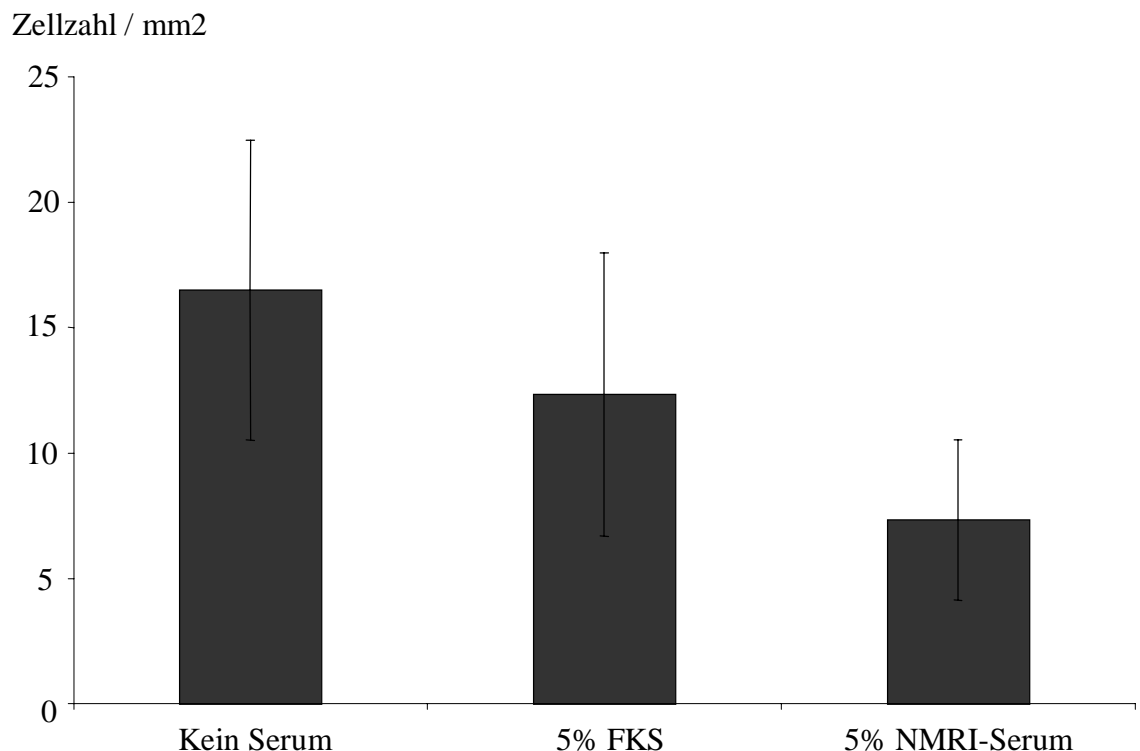
RAW 264.7 Zellen wurden mit Medium und 5 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS) oder 5 % NMRI-Serum 4 Stunden inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt (Abb. 5). Die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen ist in Abwesenheit von Serum signifikant höher als in Gegenwart von 5 % FKS ( $p=0,045$ ) und 5 % NMRI-Serum ( $p<0,0001$ ). Bei den Zellen, die in NMRI-Serum inkubiert wurden finden sich signifikant weniger Trypanblau-positive Zellen als bei denen, die in FKS inkubiert wurden ( $p=0,01$ ). Diese Ergebnisse zeigen, daß sich bei Inkubation mit NMRI-Serum die wenigsten abgestorbenen Zellen finden. RAW 264.7 Zellen lassen sich folglich in Mausserum sehr gut kultivieren.

##### **3.1.2 Ermittlung der Anzahl der adhärennten Zellen nach Exposition mit Mausserum**

In diesem Experiment wurden RAW 264.7 Zellen in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP vier Stunden inkubiert oder es wurden zusätzlich 5 % fetalem Kälberserum (FKS) bzw. 5 % NMRI-Serum zugegeben. Nach dem Waschen wurden sie lysiert und der Proteingehalt im Lysat bestimmt. Der Proteingehalt des Lysates korrelierte dabei mit der

Anzahl der adhärenenten und somit vitalen Zellen.

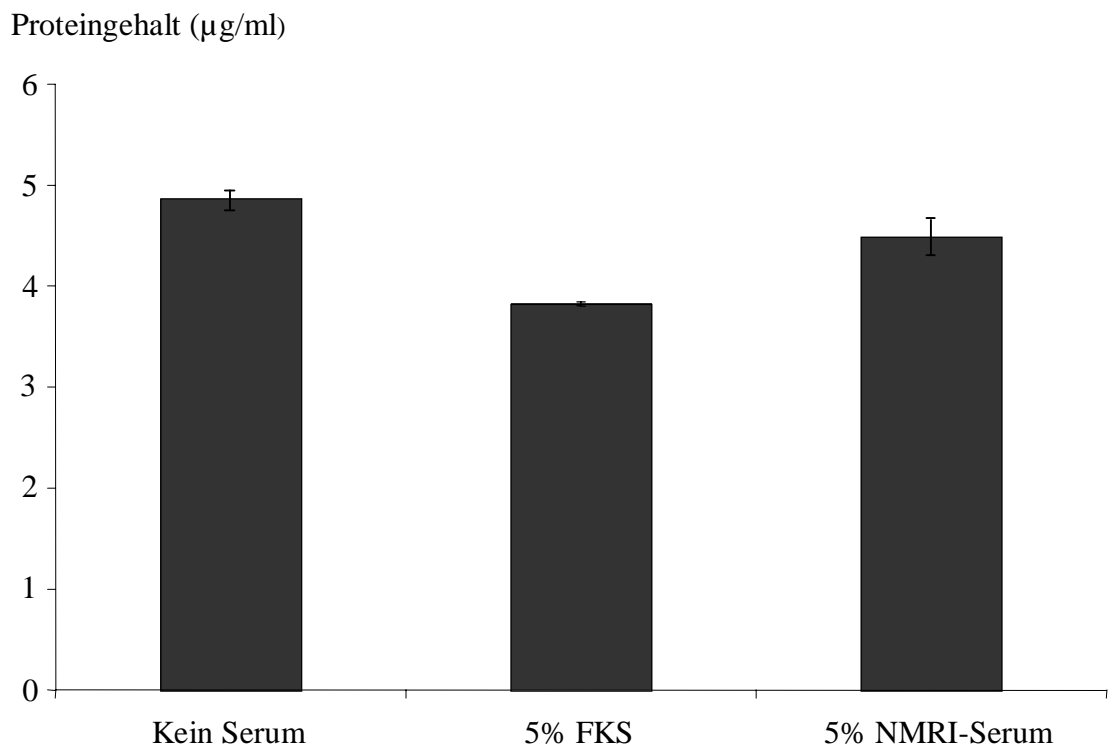
Abb. 6 zeigt, daß der Proteingehalt des Lysates in Abwesenheit von Serum mit 4,8655 µg/ml am höchsten ist. Nach Inkubation in Gegenwart von NMRI-Serum ist er um 0,38015 ng/ml niedriger und nach Inkubation in FKS ist er mit 3,82165 µg/ml am niedrigsten. Die Zahl der adhärenenten Zellen nach Inkubation mit NMRI-Serum entspricht also in etwa der, nach Inkubation mit Medium und kann damit keinesfalls als toxisch bezeichnet werden.



**Abbildung 5: Zählung Trypanblau-positiver Zellen.** RAW 264.7 Zellen wurden entweder nur mit 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP inkubiert, oder es wurden zusätzlich 5 % FKS bzw. 5 % NMRI-Serum hinzugegeben. Nach 4 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit Trypanblau inkubiert. Die Zahl der sich anfärbenden Zellen ist hier dargestellt. Die Ergebnisse wurden jeweils in 12 Versuchen ermittelt. Die abgebildeten Balken entsprechen den Mittelwerten, die Fehlerbalken der Standardabweichung. Die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen ist in Abwesenheit von Serum signifikant höher als in Gegenwart von 5 % FKS ( $p=0,045$ ) und 5 % NMRI-Serum ( $p<0,0001$ ).

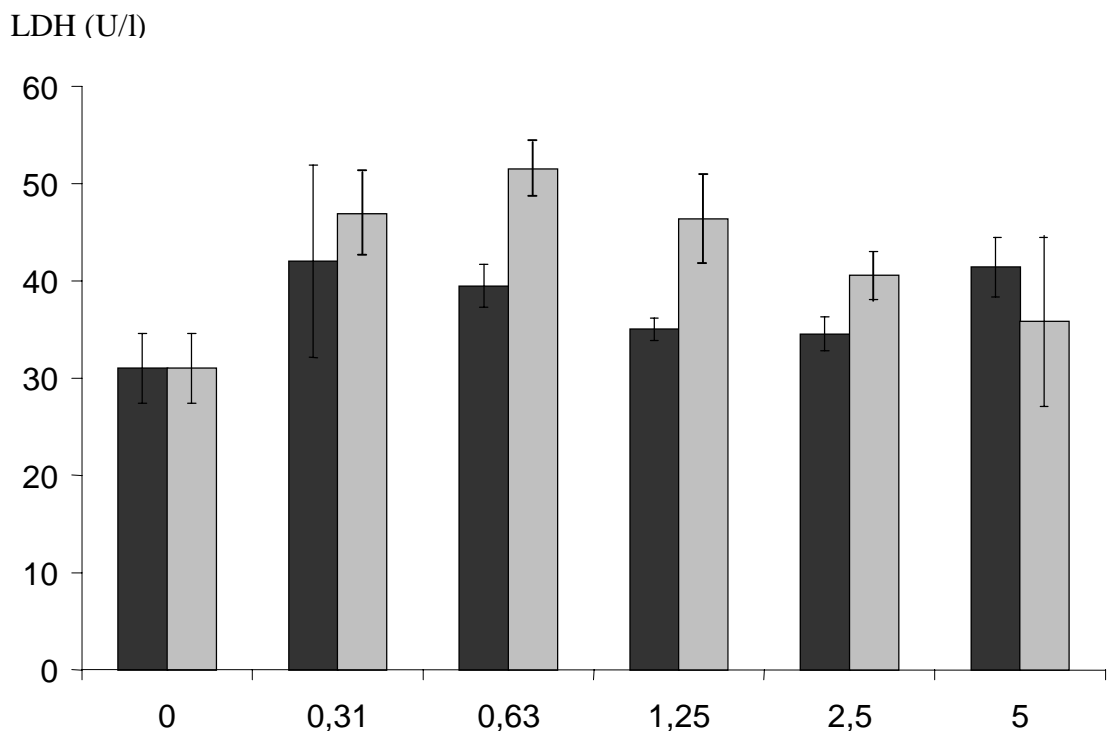
### 3.1.3 Messung der Laktatdehydrogenase im Zellüberstand

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, das bei Schädigung von Zellen extrazellulär freigesetzt wird und deshalb auch im Serum vorkommt. Zuerst wurde der LDH-Gehalt des FKS und des NMRI-Serums bestimmt. Danach wurden RAW 264.7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von einerseits FKS und andererseits NMRI-Serum in Anwesenheit von 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP inkubiert. Nach 4 Stunden wurde die LDH-Konzentration im Zellüberstand bestimmt. Die Zugabe von 0,31 % Serum (FKS und NMRI-Serum) führte zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Konzentration im Überstand ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 6: Quantifizierung der adhärenen Zellen.** RAW 264.7 Zellen wurden entweder nur mit 0,5 ng/ml LPS und 1µg/ml LPB inkubiert, oder es wurden zusätzlich 5 % FKS bzw. 5 % NMRI-Serum hinzugegeben. Nach vier Stunden wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Danach wurde die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt. Die Ergebnisse wurden in jeweils 2 Versuchen ermittelt.

Steigende Serumkonzentrationen führten zu keinem weiteren, signifikanten Anstieg der LDH-Ausschüttung der Zellen ( $p= 0,392$ ) (Abb. 7). Die Zugabe von Serum führt also zu einem Anstieg der LDH-Konzentration. Dieser Anstieg ist aber nicht dosisabhängig, sondern steigt selbst bei sechzehnfacher Konzentration nicht weiter an. Wichtig ist auch, daß kein signifikanter Unterschied zwischen FKS und NMRI-Serum besteht.



**Abbildung 7: LDH-Messung im Zellüberstand nach Inkubation mit NMRI-Serum oder FKS.** RAW 264.7 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen NMRI-Serum oder FKS in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP vier Stunden inkubiert. Danach wurde die Laktatdehydrogenase-Konzentration im Überstand mit einem kommerziellen Kit bestimmt. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Serum wurden in sechs Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse in Anwesenheit von Serum entsprechen jeweils drei Versuchen. Die Zugabe von 0,31 % Serum führt zu einem signifikanten Anstieg der LDH ( $p < 0,0001$ ). Steigende Serumkonzentrationen führen zu keinem weiteren, signifikanten Anstieg der LDH im Zellüberstand ( $p= 0,392$ ).

### **3.2 Wirkung von Mausserum auf LPS-stimulierte RAW 264.7 Zellen**

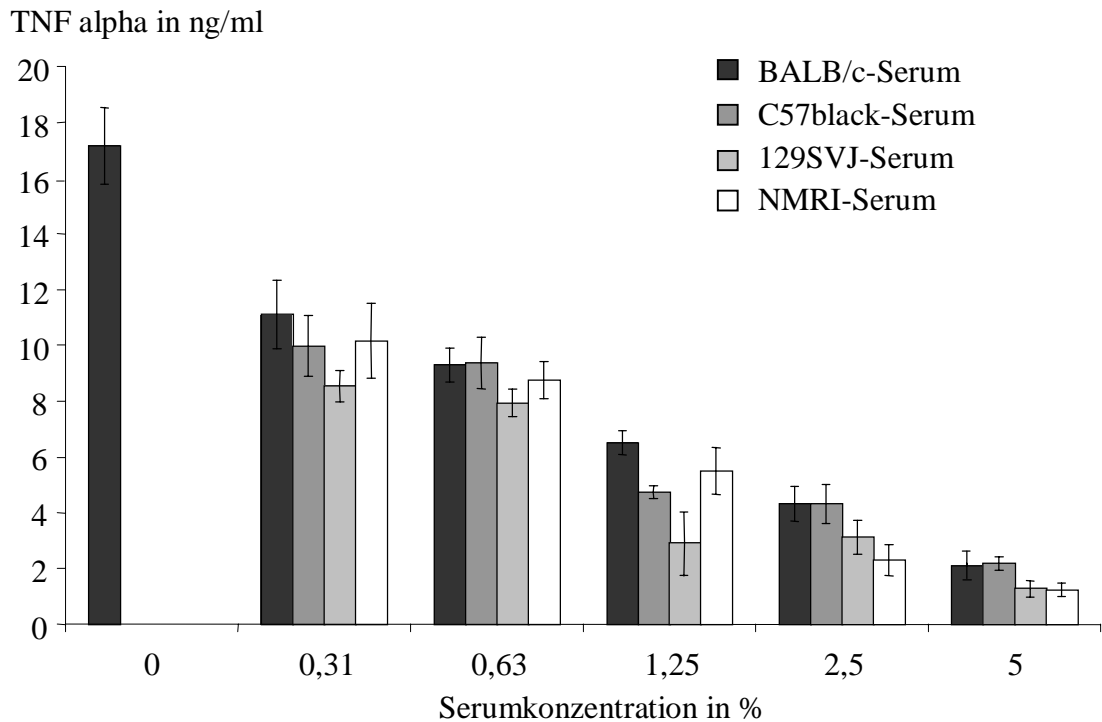
RAW 264.7 Zellen wurden mit 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP stimuliert. Seren der Mausstämme BALB/c, C57black, 129 SVJ und NMRI wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Nach 4-stündiger Inkubation wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen (Abb. 8). Die TNF- $\alpha$ -Produktion der Zellen ist in Abwesenheit von Serum am stärksten. Sie beträgt 17,15 ng/ml im Mittel. Bei Zugabe von 0,31 % murinem Serum kommt es zu einer signifikanten Reduktion dieses Ausgangswertes ( $p= 0,002$ ) auf einen Mittelwert von 9,95 ng/ml. Diese Reduktion unterscheidet sich nicht signifikant bei Vergleich der verschiedenen Mausseren ( $p= 0,123$ ). Bei Zugabe von 5 % Serum ist die TNF- $\alpha$ -Produktion durchschnittlich auf 1,7 ng/ml gesenkt. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied im inhibitorischen Potential der Seren der vier verschiedenen Maustypen zu ermitteln ( $p= 0,082$ ). Bei Erhöhung der Serumkonzentration ergibt sich eine klar dosisabhängige Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese. Zwischen den verschiedenen Mausseren konnte bezüglich ihres inhibitorischen Potentials kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### **3.3 Arbeiten mit Serum von LBP-defizienten (LBP<sup>-/-</sup>) Mäusen und LBP-depletiertem Serum**

#### **3.3.1 Inhibition der LPS induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese von RAW 246.7 Zellen durch Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in Gegenwart von rekombinantem LBP**

LBP<sup>-/-</sup> Mäusen, von denen uns ein Pärchen von C. Schütt und R. Jack, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt wurde und die in unserem Labor gezüchtet worden sind, wurde Blut aus dem Retroorbitalplexus entnommen. Daraus wurde Serum gewonnen, in welchem im LBP-ELISA die LBP-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. RAW 246.7 Zellen wurden mit 0,5 ng/ml LPS in Gegenwart von 1 µg/ml rekombinantem LBP stimuliert und Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in Konzentrationen von 0,31 bis 5% wurde hinzugefügt. Nach 4 Stunden wurde TNF- $\alpha$  in den Zellüberständen mittels ELISA detektiert. 0,31 % Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen reduzierte die LPS-induzierte, LBP-abhängige TNF- $\alpha$ -Produktion der RAW 264.7 Zellen auf 52 %.

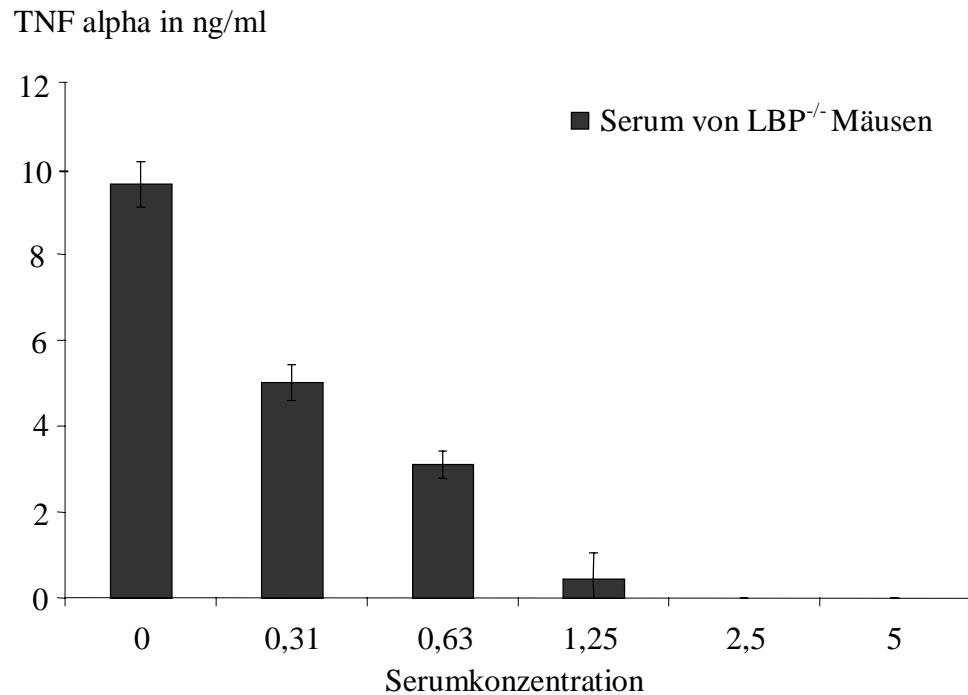
Bei Serumkonzentrationen von 2,5 % ist TNF- $\alpha$  im Zellüberstand nicht mehr nachweisbar (Abb.9).



**Abbildung 8: Einfluß verschiedener Mausseren auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion.** RAW 264.7 Zellen wurden mit 0 bis 5 % Serum der angegebenen Mausstämmen in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1  $\mu$ g/ml LBP für 4 Stunden inkubiert. TNF- $\alpha$  wurde im Überstand mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Serum wurden in zwölf Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Serumkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen. Die Reduktion der TNF- $\alpha$ -Produktion bei 0,31% Serum ist signifikant ( $p=0,002$ ). Die verschiedenen Seren unterschieden sich weder bei 0,31% noch bei 5% Serumkonzentration signifikant voneinander ( $p=0,123$ ), ( $p=0,82$ ).

Mausstamm	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipide (mg/dl)	LBP ( $\mu$ g/ml)
BALB/c	111,1	248,6	5,8
C57black	65,5	272,5	2,6
129 SVJ	135	270,9	3,4
NMRI	55	217,6	6,1

**Tabelle 1:** Messung der Cholesterin-, Phospholipid- und LBP-Konzentration der in Abb. 8 verwendeten Seren. Es handelt sich um Mittelwerte aus mindestens dreifacher Messung

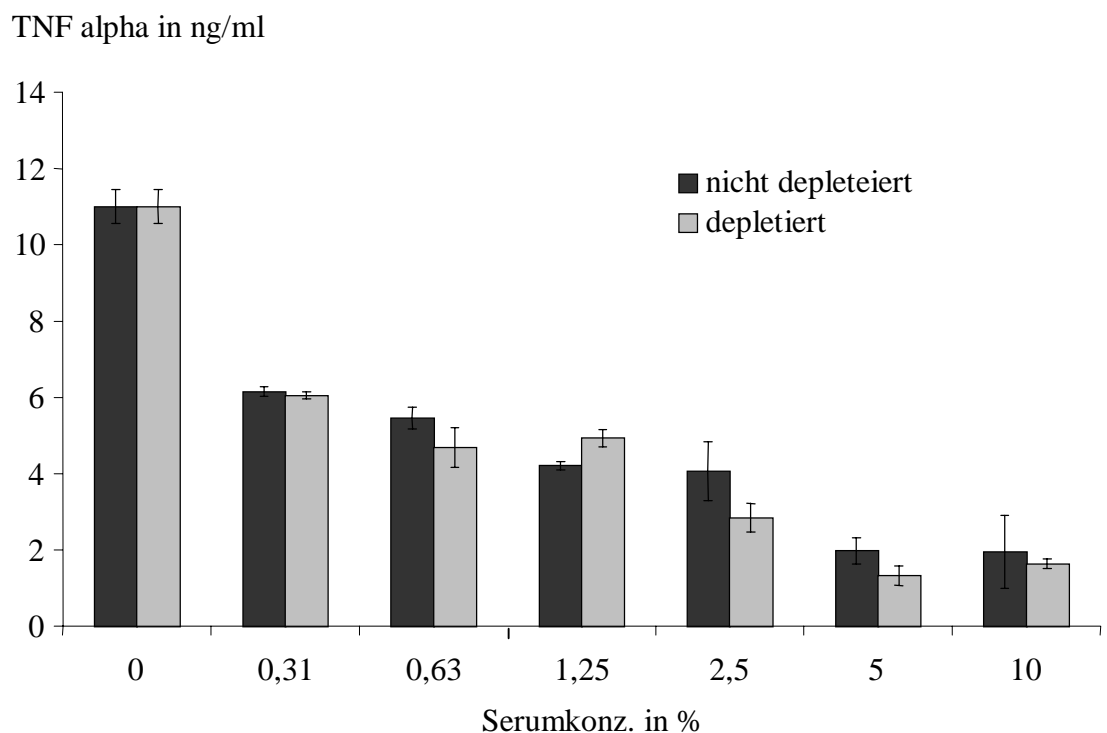


**Abbildung 9: Einfluß von Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Synthese in Gegenwart von LBP.** RAW 264.7 Zellen wurden mit 0 bis 5 % Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1  $\mu$ g/ml LBP für 4 Stunden inkubiert. TNF- $\alpha$  im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Serumkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen.

### 3.3.2 Inhibition der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese von RAW 246.7 Zellen durch LBP-depletiertes Serum im Vergleich zu Kontrollserum

Serum von NMRI-Mäusen wurde durch Immunodepletion mit anti-LBP Antiserum von LBP teildepletiert. In dem so erhaltenen Serum ließen sich 6,3 ng/ml LBP detektieren (SD +/- 0,26). Das verwendete NMRI-Kontrollserum enthielt 1,265  $\mu$ g/ml LBP (SD +/- 0,012). RAW 264.7 Zellen wurden mit 0,5 ng/ml LPS in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml LBP stimuliert. Es wurden steigende Konzentrationen von LBP-depletiertem und nicht depletiertem Serum hinzugefügt. Nach einer vierstündigen Inkubation wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen (Abb. 10). Die Zugabe von 0,31 % Serum senkte die TNF- $\alpha$ -Synthese auf 55,4 %. Diese Reduktion ließ sich durch Zugabe höherer Serumkonzentrationen noch verstärken. So wurden bei Zugabe von 10 % Serum, unabhängig davon, ob es sich um LBP-depletiertes oder nicht depletiertes Serum handelt,

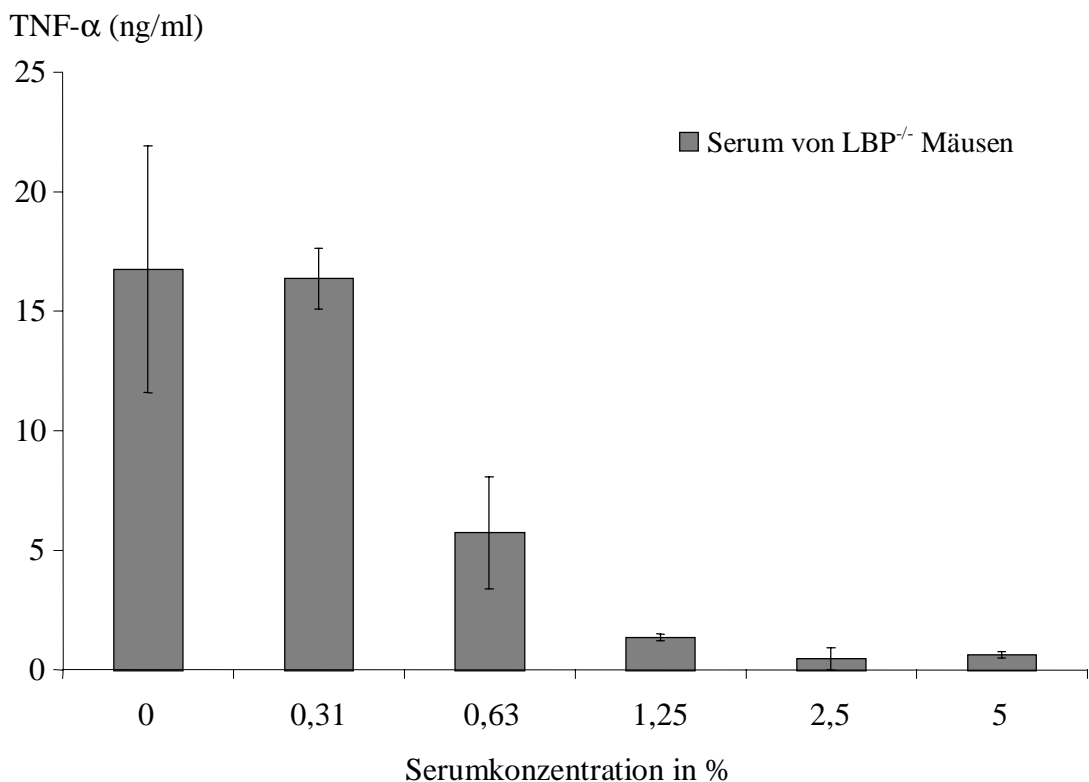
nur noch 16 % der ursprünglichen TNF- $\alpha$  Menge produziert. Beide Seren, das LBP-depletierte und das nicht depletierte NMRI-Serum, hemmten die TNF- $\alpha$ -Produktion der RAW 264.7 Zellen bei gleichen Konzentrationen in etwa gleichem Ausmaß. Während bei Verwendung des nicht depletierten Serums die LBP-Konzentration mit der Serumkonzentration anstieg, bleibt sie bei Verwendung des LBP-depletierten Serums nahezu konstant. Trotzdem zeigen beide Seren den gleichen Hemmeffekt hinsichtlich der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese der Zellen.



**Abbildung 10: Vergleich von LBP-depletiertem und Normalserum bezüglich des Einflusses auf die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung.** RAW 264.7 Zellen wurden mit 0 bis 10 % LBP-depletiertem und Kontrollserum in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1  $\mu$ g/ml LBP für 4 Stunden inkubiert. TNF- $\alpha$  im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Serum wurden in fünf Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse für nicht depletiertes Serum in verschiedenen Konzentrationen entsprechen jeweils zwei Versuchen, die für depletiertes Serum drei Versuchen.

### 3.3.3 Inhibition der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Synthese von RAW 246.7 Zellen durch Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen in der Abwesenheit von LBP

RAW 246.7 Zellen wurden mit 6 ng/ml LPS in Abwesenheit von LBP stimuliert. Ansteigende Konzentrationen von Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen wurden zugegeben. Nach vier Stunden wurde TNF- $\alpha$  in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. In Abwesenheit von Serum stellten die RAW 264.7 Zellen, nach Stimulation mit 6 ng/ml LPS, 16,75 ng/ml TNF- $\alpha$  her. Bei Zugabe von 0,31 % LBP<sup>-/-</sup> Serum ergab sich noch keine Reduktion. Bei Serumkonzentrationen von 1,25 % aber zeigte sich eine deutliche Reduktion der TNF- $\alpha$ -Synthese auf 8 %. (Abb 11). Der Serumhemmeffekt ließ sich also auch in Abwesenheit von LBP beobachten.



**Abbildung 11: Wirkung von Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen auf LPS-Effekte in Abwesenheit von LBP.** RAW 264.7 Zellen wurden mit 6 ng/ml LPS und Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration des Zellüberstandes mittels ELISA gemessen (n=3).

### 3.4 Arbeiten mit Lipoproteinen

#### 3.4.1 Ergebnisse der Lipoproteinisolierung

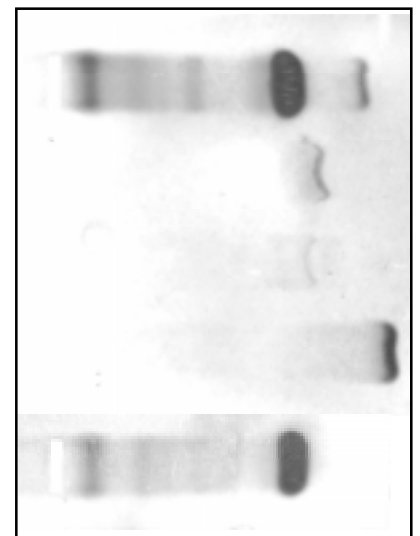
Um murine Lipoproteine aus NMRI-Serum zu isolieren, wurden Flotationsdichtezentrifugationen durchgeführt, die für die Isolierung humaner Lipoproteine etabliert worden sind (Schumaker & Puppione 1986). Dabei wurden verschiedene Dichten adjustiert, die den typischen Dichten der humanen Lipoproteine entsprechen. Diese sind 1,063-1,21 g/ml für humanes HDL, 1,006-1,063 g/ml für humanes LDL und <1,006 g/ml für humanes VLDL. Nach der Isolation wurden die Lipoproteine und das verbliebene lipoproteindefiziente Serum einer nativen Gel-Elektrophorese unterzogen. Jede Charge wurde dabei auf zwei Gele aufgetragen, von denen das eine einer Proteinfärbung, das andere einer Lipidfärbung unterzogen wurde (Abb. 12).

A) Lipidfärbung:



NMRI-Serum  
 $d < 1,006 \text{ g/ml}$   
 $d = 1,006-1,063 \text{ g/ml}$   
 $d = 1,063-1,21 \text{ g/ml}$   
 lipoproteindefizientes  
 NMRI-Serum

B) Proteinfärbung

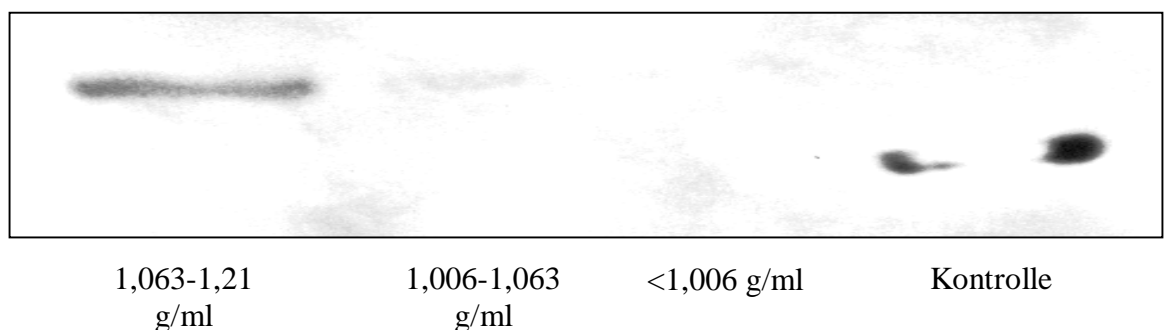


**Abbildung 12: Native Gelelektrophorese muriner Lipoproteine.** Durch sequentielle Flotationsdichtezentrifugation aus NMRI-Serum isolierte Lipoproteine verschiedener Dichten und NMRI-Serum, sowie lipoproteindefizientes Serum wurden einer nativen Gelelektrophorese unterzogen. Die Gele wurden dann mit einer Lipid- (A) sowie einer Proteinfärbung (B) gefärbt.

Das NMRI-Serum führte zu einer breiten Bande in der Lipidfärbung und zu einer Vielzahl von Banden in der Proteinfärbung. Die isolierten Lipoproteine zeigten diskrete Banden in der Lipidfärbung, welche deutlich voneinander zu differenzieren sind. In der Proteinfärbung zeigten sie ausschließlich an dieser Position wieder Banden. Das lipoproteindefiziente Serum zeigte keine Banden in der Lipidfärbung. In der Proteinfärbung sah man ein dem NMRI-Serum entsprechendes Bandenmuster.

### 3.4.2 Nachweis von LBP in lipoproteindefizientem Serum und Lipoproteinen

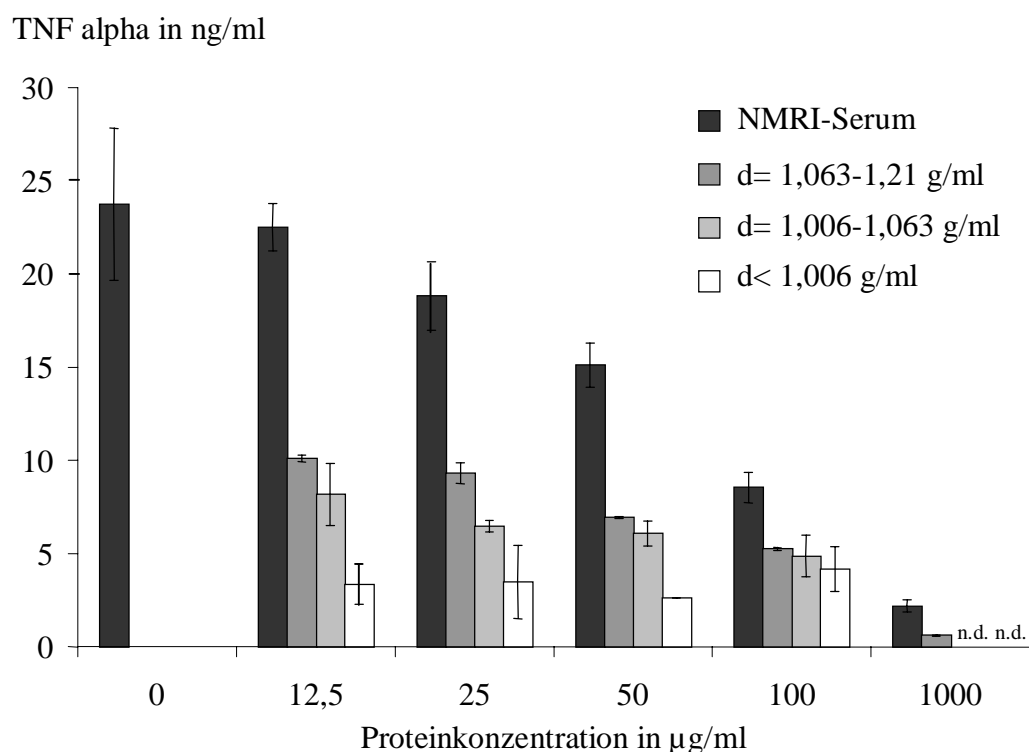
Mit Hilfe des ELISA wurde der LBP-Gehalt des lipoproteindefizienten Serums mit 3,7  $\mu\text{g/ml}$  bestimmt. In den Lipoproteinen ließ sich mit dieser Methode kein LBP nachweisen. Deshalb wurde versucht, LBP in den Lipoproteinen mittels Western-Blot zu detektieren (Abb. 13). Eine deutliche Bande zeigte sich nur bei den Lipoproteinen der Dichte 1,063-1,21 g/ml nicht aber bei Lipoproteinen der Dichten 1,006-1,063 g/ml und  $<1,006$  g/ml. Als Positivkontrolle diente rekombinantes murines LBP.



**Abbildung 13: LBP-Western-Blot der murinen Lipoproteine verschiedener Dichten.** Murine Lipoproteine wurden mittels sequentieller Flotationsdichtezentrifugation isoliert. LBP wurde in den Lipoproteinen mit einem polyklonalen Antiserum detektiert.

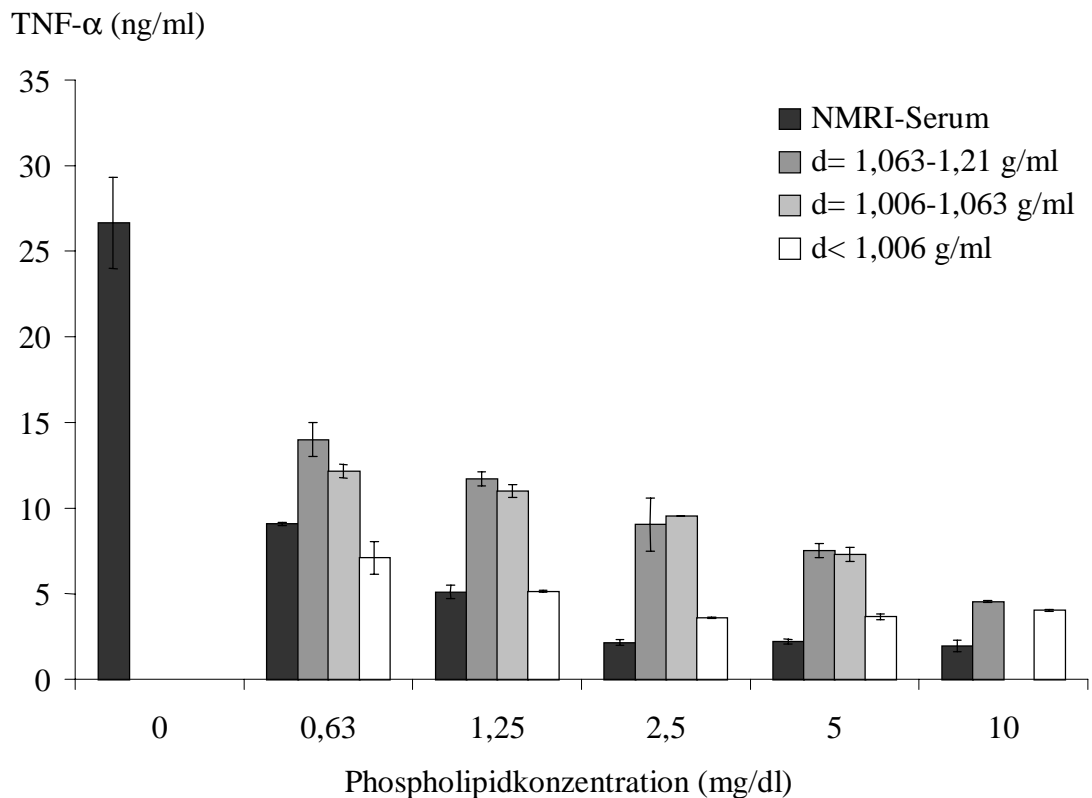
### 3.4.3 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von murinen Lipoproteinen und rekombinantem LBP

RAW 264.7 Zellen wurden mit 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP in Anwesenheit aufsteigender Lipoproteinkonzentrationen stimuliert. Nach vier Stunden wurde in den Zellüberständen die TNF- $\alpha$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Bevor die Lipoproteinfraktionen den Zellen zugesetzt wurden, wurden sie dialysiert, ihre Endotoxinkontamination bestimmt und ihre Cholesterol-, Protein- und Phospholipidkonzentrationen ermittelt.



**Abbildung 14: Einfluß von Lipoproteinen auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion.** RAW 264.7 Zellen wurden mit NMRI-Serum und Lipoproteinen der Dichten 1,063-1,21 g/ml; 1,006-1,063 g/ml und <1,006 g/ml in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1 µg/ml LBP für 4 Stunden inkubiert. TNF- $\alpha$  im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Lipoproteine und das Serum wurden anhand der Proteinkonzentration angeglichen. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Lipoproteinen wurden in zwölf Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Proteinkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen. N.d. = nicht durchgeführt.

Für den Zellversuch wurden die Lipoproteine nach der Cholesterol-, der Protein- oder der Phospholipidkonzentration angeglichen. Der Vergleich der Hemmwirkung von Serum und Lipoproteinen bei angeglichener Proteinkonzentration zeigte eine dosisabhängige Hemmung der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Produktion (Abb. 14). Abb. 15 zeigt Ergebnisse eines Versuches, bei dem die Phospholipidkonzentrationen zur Quantifizierung der Lipoproteine verwendet wurden.

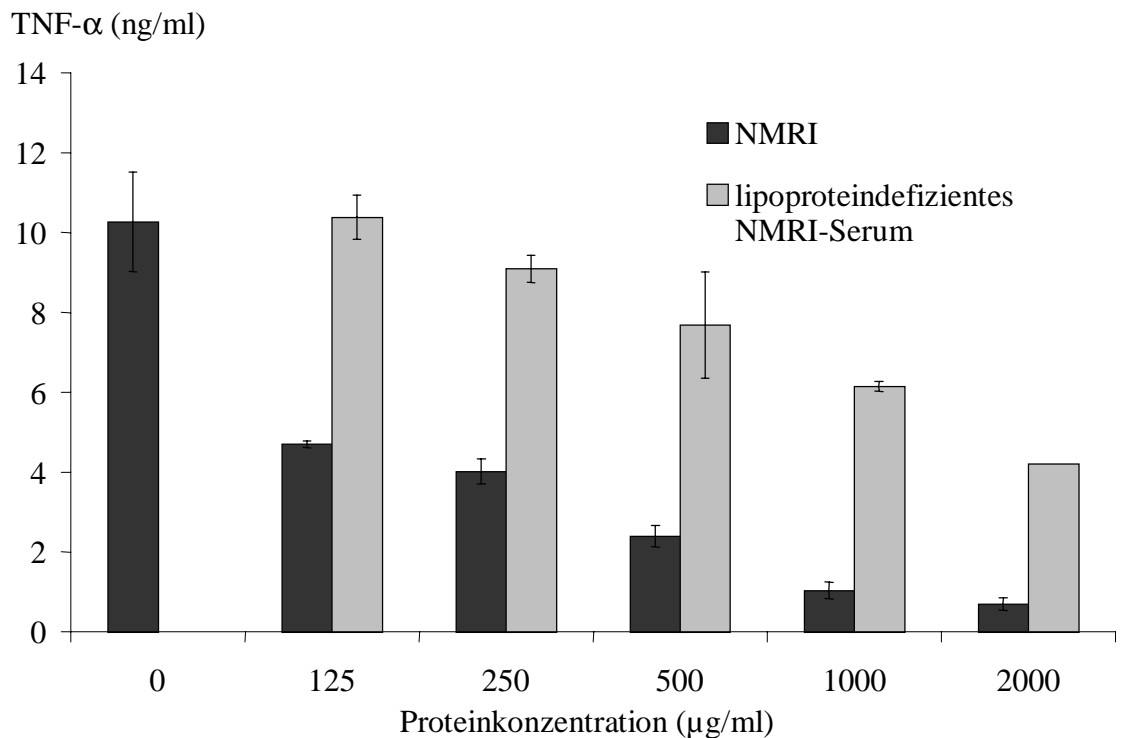


**Abbildung 15: Einfluß von Lipoproteinen auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Synthese.** RAW 264.7 Zellen wurden mit NMRI-Serum und Lipoproteinen der Dichten 1,063-1,21 g/ml; 1,006-1,063 g/ml und <1,006 g/ml in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1  $\mu$ g/ml LBP für 4 Stunden inkubiert. TNF- $\alpha$  im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Lipoproteine und das Serum wurden anhand der Phospholipidkonzentration angeglichen. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Lipoproteinen wurden in zwölf Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Phospholipidkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen. Die Reduktion der TNF- $\alpha$ -Synthese bei 0,63 mg/dl ist im Vergleich zur Abwesenheit von Lipoproteinen oder Serum signifikant ( $p < 0,0001$ ). N.d.= nicht durchgeführt.

Isolierte Lipoproteine zeigen, wenn sie nach der Proteinkonzentration angeglichen werden, eine im Vergleich zu Normalserum verstärkte LPS-hemmende Aktivität: NMRI-Serum verursachte bei einer Proteinkonzentration von 12,5 µg/ml noch keine deutliche Reduktion der TNF-α-Produktion, während die Lipoproteine der verschiedenen Dichten die TNF-α-Produktion im Mittel schon auf 30 % reduzierten. Die stärkste Hemmung ließ sich mit murinen Lipoproteinen der Dichte 1,006 erreichen. Bei einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml war die Reduktion der TNF-α-Sekretion auch durch NMRI-Serum deutlich. Es wurden nur noch 36 % der anfänglichen TNF-α-Menge im Überstand gefunden (Abb. 14). Bei einer Phospholipidkonzentration von 0,63 mg/dl ließ sich sowohl bei Verwendung von NMRI-Serum, als auch bei Verwendung von Lipoproteinen eine signifikante Reduktion der TNF-α-Produktion erkennen ( $p < 0,0001$ ). Dabei war die Reduktion im NMRI-Serum und in den Lipoproteinen der Dichte  $< 1,006$  g/ml mit 34 % und 27 % deutlicher als in denen der Dichten 1,063-1,21 g/ml (53%) und 1,006-1,063 g/ml (46%). Dieser Trend läßt sich bei allen Phospholipidkonzentrationen reproduzieren (Abb. 15).

#### **3.4.4 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von rekombinanten LBP und lipoproteindefizientem Serum im Vergleich zu Normalserum.**

Das durch die Ultrazentrifugation gewonnene lipoproteindefiziente Serum wurde nach Dialyse auf seine Fähigkeit hin, LPS-Effekte zu inhibieren, untersucht. Dazu wurden RAW 264.7 Zellen mit 0,5 ng/ml LPS in Gegenwart von 1µg/ml LBP stimuliert. Das lipoproteindefiziente Serum wurde in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und seine inhibitorische Aktivität mit der von NMRI-Serum verglichen (Abb. 16). Die Proteinkonzentrationen der beiden Seren wurden vorher angeglichen. Das lipoproteindefiziente Serum zeigte eine deutlich abgeschwächte inhibitorische Aktivität: Bei einer Proteinkonzentration von 125 µg/ml reduzierte das NMRI-Serum die TNF-α-Sekretion auf 46 %, während das lipoproteindefiziente Serum hier noch keine Reduktion der TNF-α-Konzentration im Zellüberstand verursachte. Bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml reduzierte das NMRI-Serum die TNF-α-Sekretion auf 7 %, während das lipoproteindefiziente Serum sie lediglich auf 41 % reduzierte. Bei dieser Proteinkonzentration befinden sich immer noch 0,15 mg/dl Cholesterin und 0,384 mg/dl Phospholipide im zugegebenen lipoproteindefizienten Serum.



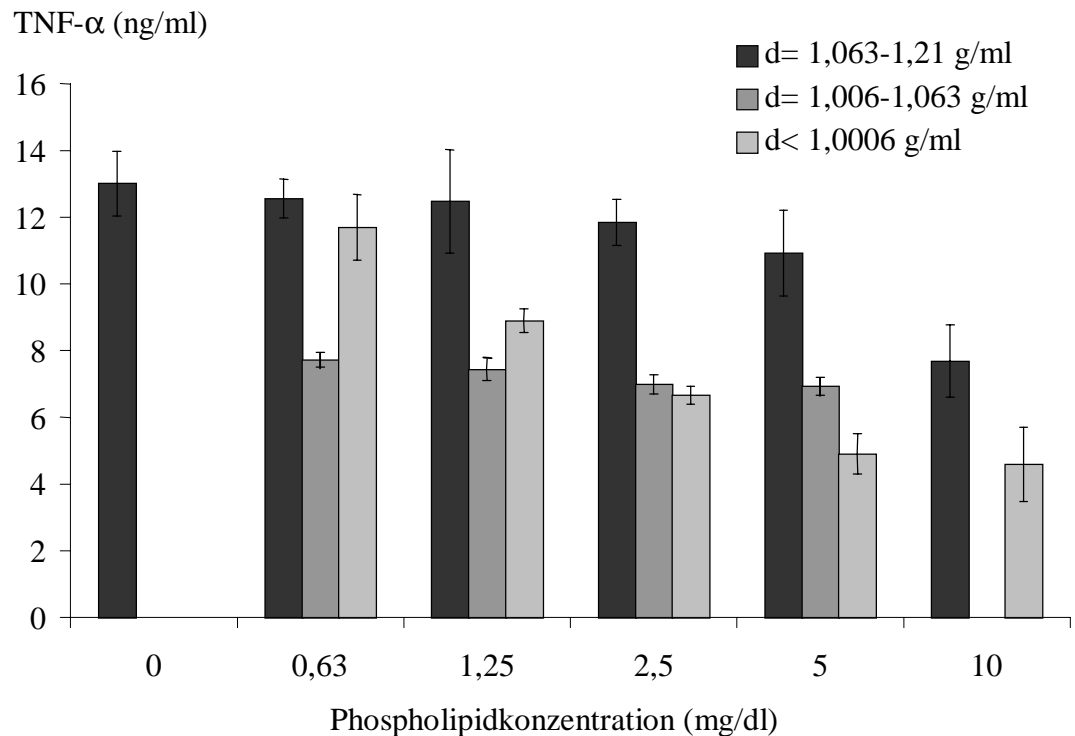
**Abbildung 16: Vergleich zwischen lipoproteindefizientem Serum und Normalserum bezüglich der Inhibition von LPS-Effekten.** RAW 264.7 Zellen wurden mit lipoproteindefizientem oder NMRI-Serum in Gegenwart von 0,5 ng/ml LPS und 1µg/ml LBP vier Stunden inkubiert. Die Seren wurden anhand ihrer Proteinkonzentration angeglichen. Danach wurde der TNF- $\alpha$ -Gehalt des Zellüberstandes mittels ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Serum wurden in sechs Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse für die verschiedenen Serumkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen.

### 3.4.5 Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit LPS in Gegenwart von murinen Lipoproteinen und Abwesenheit von rekombinantem LBP

Um zu untersuchen, ob sich eine LPS-induzierte Stimulation von RAW 264.7 Zellen auch in Abwesenheit von rekombinantem LBP durch Lipoproteine inhibieren läßt, wurden die Zellen mit 6 ng/ml LPS in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von Lipoproteinen inkubiert (Abb 17). Bei einer Phospholipidkonzentration von 0,63 mg/dl zeigten nur die Lipoproteine der Dichte 1,006-1,063 eine klare Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Überstand auf 59 %. Bei einer Phospholipidkonzentration von 5 mg/dl war die Reduktion

bei Lipoproteinen der Dichten 1,006-1,063 und <1,006 g/ml hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Bei einer Phospholipidkonzentration von 10 mg/dl reduzierten die Lipoproteine der Dichte 1,063-1,21 g/ml die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung der RAW 264.7 Zellen auf 59 %.

Der inhibierende Effekt der Lipoproteine fällt in Abwesenheit von rekombinatem LBP insgesamt schwächer aus als in den unter 4.3.3 beschriebenen Versuchen. So ließ sich mit Lipoproteinen der Dichten 1,006-1,063 g/ml und <1,006 g/ml bei einer Phospholipidkonzentration von 5 mg/dl in diesem Versuchsaufbau eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung auf im Mittel nur 45 % erreichen. Lipoproteine der gleichen Dichten reduzierten die TNF- $\alpha$ -Produktion bei gleichen Phospholipidkonzentrationen in Anwesenheit von LBP aber auf im Mittel 21 % (s. Abb. 12).



**Abbildung 17: Einfluß von Lipoproteinen auf die LPS induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion in Abwesenheit von LBP.** Lipoproteine wurden mittels sequentieller Flotationsdichtezentrifugation gewonnen. RAW 264.7 Zellen wurden mit den gewonnenen Lipoproteinen der verschiedenen Dichten (d) in Gegenwart von 6 ng/ml LPS und Abwesenheit von LBP vier Stunden inkubiert. Danach wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse in Abwesenheit von Lipoproteinen wurden in 9 Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Phospholipidkonzentrationen entsprechen jeweils drei Versuchen. Die Reduktion der TNF- $\alpha$ -Produktion bei 5 mg/dl Phospholipidkonzentration und den Lipoproteinen der Dichten 1,006-1,063 und <1,006 g/ml ist hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). N.d.= nicht durchgeführt.

## 4 DISKUSSION

Das Lipopolysaccharid (LPS), Hauptbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, aktiviert mit Hilfe des Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (LBP) die Makrophagen des Wirtsorganismus (Tobias et al., 1986; Schumann et al., 1990). Diese reagieren mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  (Dentener et al., 1993). Wenn zu hohe Konzentrationen dieser Zytokine den Wirtsorganismus überschwemmen, kann es zur Sepsis und zum septischen Schock kommen (Nathan 1987; Parrillo 1993). Serum vermag diese LPS-induzierte Stimulation von Makrophagen und Monozyten zu inhibieren (Lamping et al., 1998; Flegel et al., 1989). Lipoproteine können LPS-Effekte *in vitro* und *in vivo* hemmen (s. Abschnitt 1.7.4.2). Sie dienen als Akzeptoren des LPS, internalisieren dieses und führen so zur Inaktivierung. Von LBP ist bekannt, daß es den Transport von LPS in rekonstituiertes HDL erleichtert (Wurfel et al., 1994). Ob Lipoproteine der für den Serumhemmeffekt entscheidende Faktor sind und welche Funktion dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein dabei zukommt, wurde im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht. Bessere Kenntnisse über das Zusammenspiel von Lipoproteinen und Lipidtransferproteinen bei der LPS-Inaktivierung sind wichtig, da sie eventuell als Ansatz für eine neuartige Therapie der durch Gram-negative Bakterien verursachten Sepsis dienen könnten.

### 4.1 Ausschluß toxischer Effekte von Mausseren

Es ist bekannt, daß Mausserum das Wachstum und die Differenzierung einiger Zelllinien beeinflussen und zytotoxische Faktoren enthalten kann (Gundersen et al., 1981; Paul 1973; Bennett et al., 1988). Um auszuschließen, daß die beobachteten Hemmeffekte von Seren durch solche Effekte verursacht wurden, wurden verschiedene Toxizitätstests durchgeführt. Dabei wurde ein typisches Mausserum, das NMRI-Serum mit fetalem Kälberserum (FKS) verglichen. FKS ist empfohlener Bestandteil des Kulturmediums der Zellen und deshalb als Kontrolle gut geeignet (Raschke et al., 1978). Bei Färbung der Zellen mit Trypanblau konnte gezeigt werden, daß sich die meisten toten Zellen nach Inkubation in Medium ohne Zugabe von Serum befinden. Ursache hierfür ist vermutlich die durch Serumentzug eingeleitete Apoptose der RAW 264.7 Zellen (Chin et al., 1999). Nach Zugabe von NMRI-Serum konnten die wenigsten Trypanblau-positiven Zellen gezählt werden (Abb.5). NMRI-Serum ist dem FKS vermutlich wegen seiner Autologie als Kulturbestandteil

überlegen. Um auszuschließen, daß abgestorbene Zellen abgelöst wurden, wurde eine Proteinbestimmung des Zellysats der adhärenen Zellen durchgeführt (Abb. 6). Die ermittelte Proteinmenge muß mit der Zahl der adhärenen Zellen korrelieren. Hier zeigte sich, daß bei Inkubation mit NMRI-Serum tatsächlich 8 % weniger adhärenente Zellen vorhanden sind als bei alleiniger Inkubation in Serum. Diese 8 % sind aber zu wenig, um eine Reduktion der Trypanblau-positiven Zellen um 66 % zu erklären. In weiteren Versuchen wurde die Laktatdehydrogenase im Zellüberstand gemessen, und es zeigte sich bei Zugabe von Seren eine signifikante Erhöhung der LDH-Konzentration im Überstand. Dieser Anstieg ist aber nicht dosisabhängig, sondern steigt selbst bei sechzehnfacher Konzentration nicht weiter an. Außerdem findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen FKS und NMRI-Serum. Aufgrund der vorliegenden Daten scheint klar, daß Mausseren in keiner der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration toxische Effekte gegenüber RAW 264.7 Zellen aufweisen.

#### **4.2 Serum hemmt LPS-Effekte**

Es ist schon länger bekannt, daß eine Vorinkubation von LPS in Serum die fieberhafte Reaktionen und Letalität in Versuchstieren verringern kann (Rall & Kelly 1957; Skarnes et al., 1958; Ulevitch & Johnston 1978). Außerdem ist beschrieben worden, daß humanes Serum LPS-Effekte *in vitro* inhibiert (Berger et al., 1990; Warren et al., 1985). Kürzlich wurde im Labor von Dr. Schumann entdeckt, daß murines Serum gegenüber RAW 264.7 Zellen eine Reduktion der LPS-induzierten Zytokinausschüttung in Gegenwart von LBP bewirkt (Lamping et al., 1998). In dieser Arbeit wurde nun der Hemmeffekt verschiedener Mausseren untersucht und verglichen. Die Hemmung der TNF- $\alpha$ -Synthese ist dosisabhängig und sehr deutlich ausgeprägt (Abb. 8). Zwischen verschiedenen Mausstämmen konnte kein Unterschied bezüglich des inhibitorischen Potentials ihrer Seren gefunden werden. Der dreimal höhere Cholesterinwert des 129 SVJ-Serums im Vergleich zum NMRI-Serum hat folglich keinen Einfluß auf das inhibitorische Potential. Auch die deutlichen unterschiedlichen LBP-Konzentrationen der verschiedenen Seren scheinen keine Rolle zu spielen. Der Phospholipidgehalt der Seren ist allerdings sehr ähnlich (Tabelle 1). Phospholipide kämen also nach diesen Ergebnissen als für den Hemmeffekt ursächlicher Bestandteil des Serums in Frage. Wichtig ist anzumerken, daß zwischen murinem und humanem System teilweise deutliche Konzentrationsunterschiede bezüglich einiger für diese Arbeit wichtiger Parameter bestehen. So liegt die normale LBP-

Konzentration in Mausserum im  $\mu\text{g/ml}$  Bereich (Lamping et al., 1998). Das deckt sich auch mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten (Tabelle 1). Sie steigt in der Akut-Phase auf ca. das Fünffache an. Bei menschlichem Serum liegt die Normalkonzentration bei  $18 \mu\text{g/ml}$  und steigt im Septischen Schock auf bis zu  $40\text{-}60 \mu\text{g/ml}$  an (Gallay et al., 1994a). Auch bei Lipiden und Lipoproteinen bestehen deutliche Unterschiede. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) etwa 30 % der Gesamtlipoproteine ausmachen ist bei der Maus die HDL-Fraktion mit nahezu 80 % deutlich größer. Man spricht hier von einem sogenannten „HDL-Säugetier“ (Chapman 1986). Die Gesamtlipoprotein-Konzentration in humanen Serum ist aber mit  $150\text{-}250 \text{ mg/dl}$  nur etwas niedriger als die der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten murinen Seren. Trotzdem sind Mäuse sehr viel unempfindlicher gegenüber LPS als Menschen (Galanos et al., 1979; Pajkrt et al., 1996). Dies könnte daran liegen, daß sich ein größerer Anteil der Phospholipide in HDL befindet und dort Kontakt zu anderen Faktoren, wie z.B. LBP, hat, welche eine Internalisierung von LPS in die Phospholipidfraktion erleichtern.

### 4.3 Lipoproteine als Akzeptor des Lipopolysaccharides (LPS)

Es konnte gezeigt werden, daß humane Lipoproteine hoher Dichte (HDL) LPS binden und inaktivieren können (Ulevitch & Johnston 1978). Ähnliche Effekte ließen sich *in vivo* und *in vitro* auch für LDL und VLDL nachweisen (Parker et al., 1995; Harris et al., 1990). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Rolle der Lipoproteine als Akzeptoren des LPS auch im murinen *in vitro* Versuch. Die isolierten murinen Lipoproteine aller drei untersuchten Dichten hemmten die LPS-Effekte auf Makrophagen sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von LBP. Elimination der Lipoproteine aus dem Serum führte zu einer starken Reduktion des inhibitorischen Potentials des Serums (Abb. 16). Die verbleibende inhibitorische Aktivität des lipoproteindefizienten Serums bei höheren Proteinkonzentrationen läßt sich durch nicht vollständige Befreiung des Serums von Lipoproteinen hinreichend erklären. So befinden sich bei einer Proteinkonzentration von  $2000 \mu\text{g/ml}$  noch  $0,15 \text{ mg/dl}$  Cholesterin und  $0,38 \text{ mg/dl}$  Phospholipide im Serum. NMRI-Serum und Lipoproteine reduzierten die LPS induzierte TNF- $\alpha$  Produktion in Anwesenheit von LBP schon bei einer Phospholipidkonzentration von  $0,63 \text{ mg/dl}$  schon auf 27 bis 53 % (Abb. 15).

Die in dieser Arbeit für das murine System *in vitro* bestätigte Rolle der Lipoproteine als Akzeptoren des Lipopolysaccharides wird auch durch *in vivo* Ergebnisse unterstützt, die

eine hohe Resistenz gegenüber LPS-Expositionen bei Mäusen mit erhöhten Serum-Lipoprotein-Konzentrationen zeigen. Dazu gehören Studien mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen und mit Apo-A-I transgenen Mäusen (Levine et al., 1993; Netea et al., 1996). Wegen der Ähnlichkeit zwischen dem Lipid A und den in Lipoproteinen befindlichen Phospholipiden und der guten Korrelation des inhibitorischen Potentials von Lipoproteinen und ihrer Phospholipidkonzentration wurde vermutet, daß der Lipid A-Anteil des LPS in den Phospholipidanteil der Lipoproteine aufgenommen wird. Der Begriff „leaflet insertion model“ wurde für diesen Vorgang vorgeschlagen (Parker et al., 1995). Auch bei den in dieser Arbeit mit murinen Lipoproteinen durchgeführten Versuchen besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen Phospholipidkonzentration und Hemmeffekt als zwischen Protein-, Cholesterin oder LBP-Konzentration und Hemmeffekt. Allerdings sind die inhibierenden Effekte trotz angeglicher Phospholipidkonzentration bei NMRI-Serum und Lipoproteinen der Dichte <1,006 g/ml noch deutlicher ausgeprägt als bei den Lipoproteinen der Dichten 1,063-1,21 g/ml und 1,006-1,063 g/ml (Abb. 15). Auch bei Vergleich verschiedener Mausseren fand sich am ehesten ein Zusammenhang zwischen Phospholipidkonzentration und inhibitorischem Potential (Abb. 8; Tabelle 1). Diese Ergebnisse zeigen die große Bedeutung der Phospholipidkonzentration für die Fähigkeit von Serum LPS-Effekte zu inhibieren.

#### **4.4 Geschwindigkeit der Inaktivierung durch Lipoproteine**

Viele *in vitro* Untersuchungen zu LPS-inhibierenden Effekten finden nach Vorinkubation von LPS mit humanen Lipoproteinen statt (Netea et al., 1998a; Flegel et al., 1989). Erst nach 6-24 Stunden werden dann die eigentlichen Versuche z.B. Zellstimulationen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Internalisierung von LPS durch Lipoproteine einem ausgesprochen langsamen zeitlichen Ablauf unterliegt. So sind 4-8 Stunden Vorinkubation von LPS mit humanem HDL und LDL nötig, um 50 % der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Produktion von humanen Monozyten zu inhibieren (Netea et al., 1998a; Netea et al., 1998b). Dies führt zur Vermutung, daß die schnellere Stimulation der Zellen durch LPS der Inaktivierung zuvorkommt und so die Lipoproteine wirkungslos bleiben (Netea et al., 1998b). Andererseits ist es möglich die Symptome einer LPS-Gabe *in vivo* durch eine relativ kurz vorher (3,5 Stunden) stattfindende Infusion mit rHDL zu reduzieren und die Zytokinausschüttung zu minimieren (Pajkrt et al., 1996). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen im murinen System ist eine Vorinkubation nicht

nötig. Die Lipoproteine und das LPS wurden in Anwesenheit von LBP gleichzeitig auf die Makrophagenzelllinie gegeben, und in den nach vier Stunden gewonnenen Zellüberständen war eine deutliche Hemmung der LPS-Effekte durch Lipoproteine nachweisbar.

#### **4.5 Nachweis von LBP in Lipoproteinen**

Es existieren zahlreiche Indizien dafür, daß humanes LBP mit Apolipoprotein-A-I im Plasma assoziiert vorliegt (Wurfel et al., 1994). Dieses Apolipoprotein ist ein typischer Bestandteil der humanen Lipoproteine hoher Dichte (HDL) (Camejo et al., 1970). In dieser Arbeit wurde versucht, murines LBP in den isolierten Lipoproteinen nachzuweisen. Der dazu erst verwendete LBP-ELISA brachte dabei keinen Erfolg. Dies liegt eventuell an der Lokalisation des Lipopolysaccharid Bindenden Proteins in den Lipoproteinen. Es ist durchaus möglich, daß sich die für das Antiserum entscheidenden Epitope des Proteins in der Lipidfraktion der Lipoproteine befinden und ihnen somit nicht zugänglich sind. Abb.13 zeigt das Ergebnis eines Western-Blots der verschiedenen Lipoproteinfraktionen. Für die Lipoproteine der Dichte 1,063-1,21 g/ml zeigte sich ein deutlich positiver LBP-Nachweis. Bei dieser Methode sind die Epitope durch die Denaturierung und Auftrennung im Polyacrylamidgel den Antikörpern zugänglich. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes LBP verwendet. Das im Baculovirussystem exprimierte rekombinante LBP ist nicht in gleichem Ausmaß glykosyliert wie das native LBP, was die unterschiedlichen Laufeigenschaften erklärt. Die Tatsache, daß sich LBP mit dieser Methode in den Lipoproteinen der Dichte 1,063-1,21 g/ml detektieren läßt, unterstützt die Theorie einer Assoziation mit Apolipoprotein-A-I oder zumindest mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL beim Menschen haben per definitionem eine Dichte 1,063-1,21 g/ml). Allerdings ließ sich in lipoproteindefizientem Serum eine hohe Konzentration an LBP nachweisen (3,7 µg/ml). LBP liegt also in murinem Serum nicht, wie für humanes Serum beschrieben, ausschließlich in Apolipoprotein-A-I enthaltenden Lipoproteinen vor, sondern befindet sich auch in größerer Menge frei im Serum.

#### 4.6 Der protektive Effekt von LBP

Das Lipopolysaccharid Bindende Protein wirkt in niedrigen Dosen verstärkend auf die LPS Stimulation, indem es LPS zu seinen zellulären Rezeptoren transportiert (Schumann et al., 1990; Hailman et al., 1994). In hohen Dosen aber besitzt es LPS-inhibierende Effekte und schützt Mäuse vor dem Endotoxintod (Lamping et al., 1998). Eine weitere Funktion von LBP, ist der Transport von LPS in rekombinantes HDL (Wurfel et al., 1994). In den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen ist ein deutlicher Unterschied der LPS-Hemmung in Anwesenheit und Abwesenheit von LBP zu erkennen (Abb. 15; Abb. 17). Der Hemmeffekt von murinen Lipoproteinen fällt in Abwesenheit von LBP sehr viel schwächer aus als in seiner Anwesenheit. Diese Tatsache läßt vermuten, daß LBP den Transport in murine, native Lipoproteine erleichtert. Vermutlich wird die Internalisierung beschleunigt, was auch erklären würde, warum in den Versuchen mit murinen Lipoproteinen keine Vorinkubation von LPS mit Lipoproteinen benötigt wurde (s.o.). Eindrücklich zeigt der Unterschied zwischen An- und Abwesenheit von LBP bezüglich des Hemmeffektes, daß LBP auch eine Transportfunktion in Lipoproteine der Dichten 1,006-1,063 und <1,006 g/ml hat. Diese Dichten entsprechen dem humanen LDL und VLDL. Auch für das Zusammenspiel zwischen LBP und HDL ergeben sich hier neue Fakten: LBP transportiert LPS nicht nur in rekonstituiertes, sondern auch in natives HDL. LBP-Konzentrationen von 1 µg/ml sind durchaus ausreichend, um den Transport zu gewährleisten. Andere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dr. Schumann zeigen, daß der Hemmeffekt von Lipoproteinen durch höhere LBP-Konzentrationen gesteigert werden kann (Dissertation O. Singer, Berlin). Diese Ergebnisse bestätigen den LPS-Effekte hemmenden Effekt von LBP in hohen Konzentrationen und legen nahe, daß auch dieser durch einen vermehrten Transport in Lipoproteine verursacht ist (Lamping et al., 1998; Dissertation von O. Singer). Hohe LBP-Dosen können den Transport von LPS in Lipoproteine weiter beschleunigen und so vor zu hohen Konzentrationen an freiem LPS schützen. Ein synergistischer Effekt von LBP und Lipoproteinen ist somit zu vermuten.

#### 4.7 Verhalten von Lipoproteinen und LBP im Serum

LBP<sup>-/-</sup> Mäuse sind äußerst resistent gegenüber LPS-Applikationen. Sie zeigen gegenüber Kontrolltieren eine verringerte Letalität und reagieren mit niedrigeren Zytokinspiegeln (Jack et al., 1997). Die Lipidkonzentrationen im Serum dieser Mäuse sind normal, und obwohl sie über kein LBP verfügen, welches den LPS-Transfer in die Lipoproteine katalysiert, tolerieren sie extrem hohe LPS-Konzentrationen. Auf der anderen Seite schützt die Gabe von LBP in größeren Mengen normale Mäuse vor dem LPS-induzierten Schock (Lamping et al., 1998). Dies scheint ohne eine gesteigerte Lipoproteinsynthese vor sich zu gehen. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Seren ohne LBP verwendet und bezüglich ihres Hemmeffektes mit Kontrollseren verglichen (Abb. 10). Beide Arten von Seren hemmen die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion in gleichem Maße. Dies könnte an dem zu geringen experimentell induzierten Anstieg der LBP-Konzentration liegen. So besitzt nicht depletiertes NMRI-Serum nur eine LBP-Konzentration von 1,3  $\mu\text{g/ml}$ . Dies bedeutet bei einer Zugabe von 10 % Serum eine endgültige LBP-Konzentration von 1,13  $\mu\text{g/ml}$  LBP in den Versuchen mit nicht depletiertem Serum und 1,0  $\mu\text{g/ml}$  in denen mit depletiertem Serum. Andererseits zeigen diese Ergebnisse auch, daß LBP allein nicht für den LPS hemmenden Effekt des Serums verantwortlich ist, da trotz fehlendem Anstieg der LBP-Konzentration im depletierten Serum der Hemmeffekt dem des nicht depletierten entspricht. Andere Untersuchungen dieser Arbeit versuchen zu überprüfen, ob Serum von LBP<sup>-/-</sup> Mäusen LPS-Effekte in Abwesenheit von LBP hemmen kann. Es kann gezeigt werden, daß dies möglich ist (Abb. 11). Es ist zu vermuten, daß ein weiterer Serumfaktor Aufgaben des LBPs zu übernehmen vermag. Dieser Faktor transportiert LPS in die Lipoproteine, ist aber nicht in der Lage, LPS zu seinen zellulären Rezeptoren zu transportieren, da bei Verwendung von LBP<sup>-/-</sup> und LBP-depletiertem Serum deutlich höhere LPS-Spiegel zur Stimulation der Zellen notwendig sind, als bei LBP<sup>+/-</sup> bzw. nicht depletiertem Serum (Daten nicht gezeigt). Die Transportfunktion dieses Faktors kompensiert das Fehlen von LBP in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Andererseits ermöglicht er in LBP<sup>-/-</sup> Mäusen den Transport von LPS in Lipoproteine, was zu einer normalen Elimination von LPS führt (Jack et al., 1997). Scheinbar ist die Leistungsfähigkeit dieses Faktors aber nicht unbegrenzt, da ein mehr an LBP die Hemmung von LPS-Effekten deutlich verstärken kann (Dissertation O. Singer) und die Gabe von rekombinantem LBP die Letalität von LPS-exponierten Mäusen signifikant zu reduzieren vermag (Lamping et al., 1998). Am wahrscheinlichsten ist der Faktor ein anderes Lipidtransferprotein mit Sequenzübereinstimmung mit LBP. Da CETP-

Aktivität in der Maus nicht detektierbar ist, könnte das „phospholipid transfer protein“ PLTP den gesuchten Faktor darstellen (Guyard-Dangremont et al., 1998). PLTP ist in murinem Serum detektierbar und weist große Sequenzhomologie zu LBP auf (Day et al., 1994). Es transportiert LPS in rekonstituiertes HDL, nicht aber an seine zellulären Rezeptoren und hemmt so in Gegenwart von rHDL LPS-Effekte (Hailman et al., 1996). Sollte PLTP der gesuchte Faktor sein, so besitzt es zusätzlich die Fähigkeit, LPS in native Lipoproteine zu transportieren. Um zu untersuchen, ob PLTP der entscheidende Faktor für den Transport von LPS in Lipoproteine ist, sind weitere Untersuchungen z.B. mit LBP und PLTP-depletiertem Serum notwendig.

---

**ANHANG****Literatur**

- Albers et al., 1984:** Albers, J.J., Tollefson J.H., Chen C.H., Steinmetz A., 1984, Isolation and characterisation of human plasma lipid transfer proteins *Arteriosclerosis*. *4*, S.49-58.
- Amura et al., 1997:** Amura, C.R., Chen, L.C., Hirohashi, N., Lei, M.G., Morrison, D.C., 1997, Two functionally independent pathways for lipopolysaccharide-dependent activation of mouse peritoneal macrophages *J. Immunol.* *159*, S.5079-5083.
- Bauman & Gauldie, 1994:** Baumann, H. and Gauldie, J., 1994, The acute phase response *Immunol Today*. *15*, S.74-80.
- Bazil & Strominger 1991:** Bazil, V. and Strominger, J.L., 1991, Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes *J Immunol.* *147*, S.1567-1574.
- Berger & Beger 1987:** Berger, D. and Beger, H.G., 1987, Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin *Clin Chim Acta.* *163*, S.289-299.
- Bennett et al., 1988:** Bennett, J.A., Peters, J.H., Chudacoff, R. and McKneally, M.F., 1988, Endogenous production of cytotoxic factors in serum of BCG-primed mice by monophosphoryl lipid A, a detoxified form of endotoxin *J Biol Response Mod.* *7*, S.65-76.
- Berger et al., 1990:** Berger, D., Schleich, S., Seidelmann, M., and Beger, H.G., 1990, Correlation between endotoxin-neutralizing capacity of human plasma as tested by the limulus-amebocyte-lysate-test and plasma protein levels *FEBS Lett.* *277*, S.33-36.
- Bone et al., 1992:** Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J., 1992, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* *101*, S.1644-1655.
- Bradford 1976:** Bradford, M.M., 1976, A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* *72*, S.248-254.
- Brun-Buisson et al. 1995:** Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Gouin, F., Lepoutre, A., Mercier, J.C., Offenstadt, G., and Regnier, B., 1995, Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units *JAMA.* *274*, S.968-974.
- Camejo et al., 1970:** Camejo, G., Suarez, Z.M., and Munoz, C., 1970, The apo-

lipoproteins of human plasma high density lipoprotein: a study of their binding capacity and interaction with lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta*. 218, S.155-166.

**Casale & Carolan 1999:** Casale, T.B. and Carolan, E.J., 1999, Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium *Inflamm Res*. 48, S.22-27.

**Castell et al., 1990:** Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., David, M.; Fabra, R., Trullenque, R., and Heinrich, P.C., 1990, Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6 *Hepatology*. 12, S.1179-1186.

**Chapman 1986:** Chapman, M.J., 1986, Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins *Methods Enzymol*. 128, S.70-143.

**Chin et al., 1999:** Chin, B.Y., Petrache, I., Choi, A.M., and Choi, M.E., 1999, Transforming growth factor beta 1 reduces serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages *J Biol Chem*. 274, S.11362-11368.

**Cohen & Glauser 1991:** Cohen, J. and Glauser, M.P., 1991, Septic shock: treatment *Lancet*. 338, S.736-739.

**Corradin et al., 1994:** Corradin, S.B., Heumann, D., Gallay, P., Smith, J.; Muel, J., and Glauser, M.P., 1994, Bacterial/permeability-increasing protein inhibits induction of macrophage nitric oxide production by lipopolysaccharide *J Infec Dis*. 169, S.105-111.

**Day et al., 1994:** Day, J.R., Albers, J.J., Lofton-Day, C.E., Gilbert, T.L., Ching, A.F., Grant, F.J., O'Hara, P.J., Marcovina, S.M. and Adolphson, J.L., 1994, Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells *J Biol Chem*. 269, S.9388-9391.

**Dentener et al., 1993:** Dentener, M.A., Bazil, V., Von Asmuth, E.J., Ceska, M., and Buurman, W.A., 1993, Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages *J Immunol*. 150, S.2885-2891.

**Drayna et al., 1987:** Drayna, D., Jarnagin, A.S., McLean, J., Henzel, W., Kohr, W., Fiedling, C., and Lawn, R., 1987, Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA *Nature*. 327, S.632-634.

**Durieux et al., 1994:** Durieux, J.J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Calzada-Wack, J., Munker, R., Schmidt, R.E., Lupker, J., Ferrara, P., and Ziegler-Heitbrock, H.W., 1994, The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes *Eur J Immunol*. 24, S.2006-2012.

**Elsbach & Weiss 1993:** Elsbach, P., and Weiss, J., 1993, The bacterial/permeability-

increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology*. 187, S.417-429.

**Flegel et al., 1989:** Flegel, W.A., Wopl, A., Mannel, D.N., and Northoff, H., 1989, Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Immunobiology*. 57, S.2237-2245.

**Freudenberg et al., 1980:** Freudenberg, M.A., Bog-Hansen, T.C., Back, U., and Galanos, C., 1980, Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun*. 28, S.373-380.

**Freudenberg et al., 1991:** Freudenberg, M.A., Meier-Dieter, U., Staehelin, T., and Galanos, C., 1991, Analysis of LPS released from *Salmonella abortus equi* in human serum. *Microb Pathog*. 10, S.93-104.

**Frey et al., 1992:** Frey, E.A., Miller, D.S., Jahr, T.G., Sundan, A., Bazil, V., Espervik, T., Finlay, B.B., and Wright, S.D., 1992, Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 176, 1665-1571.

**Galanos et al., 1979:** Galanos, C., Freudenberg, M.A., Reutter, W., 1979, Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin *Proc Natl Acad Sci*. 76, S.5939-5943.

**Gallay et al., 1994a:** Gallay, P., Barras, C., Tobias, P.S., Calandra, T., Glauser, M.P., and Heumann, D., 1994, Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS. *J Infect Dis*. 170, S.1319-1322.

**Gallay et al., 1994b:** Gallay, P., Heumann, D., Le Roy, D., Barras, C., and Glauser, M.P., 1994, Mode of action of anti-lipopolysaccharide-binding protein antibodies for prevention of endotoxemic shock in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, S.7922-7926.

**Geerdes et al., 1992:** Geerdes, H.F., Ziegler, D., Lode, H., Hund, M., Loehr, A., Fangmann, W., and Wagner, J., 1992, Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979-1989. *Clin Infect Dis*. 15, 991-1002.

**Giroir et al., 1997:** Giroir, B.P., Quint, P.A., Barton, P., Kirsch, E.A., Kitchen, L., Goldstein, B., Nelson, B.J., Wedel, N.J., Carrol, S.F., and Scannon, P.J., 1997, Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bacterial/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis *Lancet*. 350,

**Goyert et al., 1988:** Goyert, S.M., Ferrero, E., Rettig, W.J., Yenamandra, A.K., Obata, F., and Le Beau, M.M., 1988, The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors *Science*. 239, S.497-500.

**Gray et al., 1989:** Gray, P.W., Flaggs, G., Leong, S.R., Gumina, R.J., Weiss, J., Ooi, C.E., and Elsbach, P., 1989, Cloning of the cDNA of a human neutrophil bacterial protein. Structural and functional correlations. *J Biol Chem.* 264, S.9505-9509.

**Green et al., 1998:** Green, D.M., Trial, J., and Birdsall, H.H., 1998, TNF-alpha released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes. *J Immunol.* S.2481-2489.

**Grube et al., 1994:** Grube, B.J., Cochane, C.G., Ye, R.D., Green, C.E., McPhail, M.E., Ulevitch, R.J., and Tobias, P.S., 1994, Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem.* S.8477-8482.

**Gundersen et al., 1981:** Gundersen, S., Jacobsen, J., and Funderud, S., 1981, Growth inhibitory effect of mouse serum on eukaryotic cells in a mirco assay. *Acta Pathol Microbiol Scand.* S.329-332.

**Guyard-Dangremont et al., 1998:** Guyard-Dangremont, V., Desrumaux, C., Gambert, P., Lallemand, C., and Lagrost, L., 1998, Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 120, S.517-525.

**Hailman et al., 1996:** Hailman, E., Albers, J.J., Wolfbauer, G., Tu, A.Y., and Wright, S.D., 1996, Neutralisation and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.* S.12172-12178.

**Hailman et al., 1994:** Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., and Wright, S.D., 1994, Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* S.269-277.

**Halliwell & Gutteridge 1990:** Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1990, The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280, S.1-8.

**Harris et al., 1990:** Harris, H.W., Grunfeld, C., Feingold, K.R., and Rapp, J.H., 1990, Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice *J Clin Invest.* 86, S.696-702.

**Haziot et al., 1988:** Haziot, A., Chen, S., Ferreo, E., Low, M.G., Silber, R., And Goyert, S.M., 1988, The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell mebrane by a phosphatidylinositol linkage *J Immunol.* 141, S.547-552.

**Haziot et al., 1996:** Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L. and Goyert, S.M., 1996, Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 4, S.407-414.

**Haziot et al., 1993:** Haziot, A., Rong, G.W., Silver, J. and Goyert, S.M., 1993,

---

Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol.* *151*, S.1500-1507.

**Hoel & Williams 1997:** Hoel, d. and Williams, D.N., Antibiotics: past, present, and future. Unearthing nature's magic bullets. *Postgrad Med. S.*114-2. Band 101.

**Ihara et al., 1982:** Ihara, I., Harada, Y., Ihara, S., and Kawakami, M., 1982, A new complement-dependent bactericidal factor found in nonimmune mouse sera: specific binding to polysaccharide of Ra chemotype Salmonella. *J Immunol.* *128*, S.1256-1260.

**Ingalls & Golenbock 1995:** Ingalls, R.R. and Golenbock, D.T., 1995, CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med.* *181*, S.1473-1479.

**Ingalls et al., 1998:** Ingalls, R.R., Monks, B.G., Savedra, R.J., Christ, W.J., Delude, R.L., Medvedev, A.E., Espevik, T., and Golenbock, D.T., 1998, CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J Immunol.* *161*, S.5413-5420.

**Jack et al., 1997:** Jack, R.S., Fan, X., Bernheiden, M., Rune, G., Ehlers, M., Weber, A., Kirsch, G., Mentel, R., Furll, B., Freudenberg, M., Schmitz, G., Stelter, F., and Schutt, C., 1997, Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature.* S.742-745.

**Johnson et al., 1977:** Johnson, K.J., Ward, P.A., Goralnick, S., and Osborn, M.J., 1977, Isolation from human serum of an inactivator of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol.* *88*, S.559-574.

**Kalsheker 1996:** Kalsheker, N.A., 1996, Alpha 1-antichymotrypsin. *Int J Biochem Cell Biol.* *28*, S.961-964.

Kelly et al., 1993: Kelly, C.J., Cech, A.C., Argenteanu, M., Gallagher, H., Shou, J., Minnard, E., and Daly, J.M., 1993, Role of bacterial permeability-increasing protein in the treatment of gram-negative pneumonia *Surgery.* *114*, S.140-146.

**Kengatharan et al., 1998:** Kengatharan, K.M., De Kimpe, S., Robson, C., Foster, S.J., and Thiernemann, C., 1998, Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med.* *188*, S.305-315.

**Kesser et al., 1991:** Kessler, C.M., Nussbaum, E., and Tuazon, C.U., 1991, Disseminated intravascular coagulation associated with Staphylococcus aureus septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. *J Infect Dis.* *164*, S.101-107.

**Kieft et al., 1993:** Kieft, H., Hoepelman, A.I., Zhou, W., Rozenberg-Arska, M., Struyvenberg, A. and Verhoef, J., 1993, The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. Clinical observations. *Arch Intern Med.* *153*, S.2241-2247.

**Kohn et al., 1993:** Kohn, F.R., Ammons, W.S., Horwitz, A., Grinna, L., Theofan, G.,

Weickmann, J., and Kung, A.H., 1993, Protective effect of a recombinant amino-terminal fragment of bacterial/permeability-increasing protein in experimental endotoxemia. *J Infect Dis.* *168*, S.1307-1310.

**Kushner 1982:** Kushner, I., 1982, The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* *389*, S.39-48.

**Kushner & Mackiewicz 1987:** Kushner, I. and Mackiewicz, A., 1987, Acute phase proteins as disease markers. *Dis Markers.* *5*, S.1-11.

**Lamping et al., 1998:** Lamping, N., Dettmer, R., Schroder, N.W., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R., and Schumann, R.R., 1998, LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* *101*, S.2065-2071.

**Lamping et al., 1996:** Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T.C., Kirschning, C.J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S.D., Herrmann, F., and Schumann, R.R., 1996, Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J Immunol.* S.231-240.

**Larrick et al., 1994:** Larrick, J.W., Hirata, M., Zheng, H., Zhong, J., Bolin, D., Cacaillon, J.M., Warren, H.S., and Wright, S.C., 1994, A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. *J Immunol.* *152*, S.231-240.

**Levine et al., 1993:** Levine, D.M., Parker, T.S., Donnelly, T.M., Walsh, A., and Rubin, A.L., 1993, In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* *90*, S.12040-12044.

**Loppnow et al., 1986:** Loppnow, H., Brade, L., Brade, H., Rietschel, E.T., Kusumoto, S., Shiba, T., and Flad, H.D., 1263-1267, Induction of human interleukin 1 by bacterial and synthetic lipid A. *Eur J Immunol.* *16*, S.1263-1267.

**Loppnow & Libby 1989:** Loppnow, H. and Libby, P., 1989, Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1. *Cell Immunol.* *122*, S.493-503.

**Loppnow & Libby 1990:** Loppnow, H. and Libby, P., 1990, Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest.* S.731-738.

**Maliszewski et al. 1985:** Maliszewski, C.R., Ball, E.D., Graziano, R.F., and Fanger, M.W., 1985, Isolation and characterization of My23, a myeloid cell-derived antigen reactive with the monoclonal antibody AML-2-23. *J Immunol.* *135*, S.1929-1936.

**Michie et al., 1988:** Michie, H.R., Spriggs, D.R., Manogue, K.R., Sherman, M.L., Revhaug, A., O'Dwyer, S.T., Arthur, K., Dinarello, C.A., Ceramij, A., and Wolff, S.M.,

1988, Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery*. 104, S.280-286.

**Munford et al., 1981:** Munford, R.S., Andersen, J.M. and Dietschy, J.M., 1981, Sites of tissue binding and uptake in vivo of bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complexes: studies in the rat and squirrel monkey. *J Clin Invest*. S.1503-1513.

**Natanson et al., 1994:** Natanson, C., Hoffman, W.D., Suffredini, A.F. Eichacker, P.Q., and Danner, R.L., 1994, Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med*. 120, S.771-783.

**Nathan 1987:** Nathan, C.F., 1987, Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*. 79, S.319-326.

**Netea et al., 1998a:** Netea, M.G., de Bont, N., Demacker, P.n., Kullberg, B.J., Jacobs, L.E., Verver-Jansen, T.J., Stalenhoef, A.F., and van der Meer, J.W., 1998, Lipoprotein(a) inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human mononuclear cells. *Infect Immun*. 66, S.2365-2367.

**Netea et al., 1996:** Netea, M.G., Demacker, P.N., Kullberg, B.J., Boerman, O.C., Verschuren, I., Stalenhoef, A.F., and van der Meer, J.W., 1996, Low-density lipoprotein receptor-deficient mice are protected against lethal endotoxemia and severe gram-negative infections. *J Clin Invest*. 97, S.1366-1372.

**Netea et al., 1998b:** Netea, M.G., Demacker, P.N., Kullberg, B.J., Jacobs, L.E., Verver-Jansen, T.J., Boerman, O.C., Stalenhoef, A.F., and van der Meer, J.W., 1998, Bacterial lipopolysaccharide binds and stimulates cytokine-producing cells before neutralization by endogenous lipoproteins con occur. *Cytokine*. S.766-772.

**Okusawa et al., 1988:** Okusawa, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Conolly, R.J., and Dinarello, C.A., 1988, Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*. S.1162-1172.

**Pajkrt et al., 1996:** Pajkrt, D., doran, J.E., Koster, F., Lerch, P.G., Arnet, B., van der Poll, T., ten Cate, J.W., and van Deventer, S.J., 1996, Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med*. 184, S.1601-1608.

**Parker et al., 1995:** Parker, T.S., Levine, D.M., Chang, J.C., Laxter, J., Coffin, C.C., and Rubin, A.L., 1995, Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun*. S.253-258.

**Parrillo 1993:** Parrillo, J.E., 1993, Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. S.1471-1477.

**Paul 1973:** Paul, D., 1973, Factor in acidified serum toxic for malignant cells in culture.

---

Nat New Biol. 242, S.186-188.

**Pearson 1979:** Pearson, F.C., 1979, The *Limulus* amebocyte lysate endotoxin assay: current status. *Am J Med Technol.* 45, S.704-709.

**Poltorak et al., 1998:** Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B., 1998, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science.* 282, S.2085-2088.

**Popoff et al., 1998:** Popoff, M.Y., Bockemuhl, J., and Brenner, F.W., 1998, Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White scheme. S.601-604.

**Pugin et al., 1994:** Pugin, J., Heumann, I.D., Tomasz, A., Kravchenko, V.V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J., 1994, CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1, S.509-516.

**Pugin et al., 1993:** Pugin, J., Schurer-Maly, C.C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R.J., and Tobias, P.S., 1993, Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, S.2744-2748.

**Qureshi et al., 1999:** Qureshi, S.T., Larivi, Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., and Malo, D., 1999, Endotoxin-tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (*Tlr4*). *J Exp Med.* 189,

**Randolf et al., 1995:** Randolf, J.D., Arndt, L.L., Akins, D.R., Curetty, L.L., Levi, M.E., Shen, Y., Davis, L.S. and Norgard, M.V., 1995, *Treponema pallidum* and *Borellia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol.* S.2866-2877.

**Raetz 1990:** Raetz, C.R., 1990, Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 59, S.129-170.

**Rall & Kelly 1957:** Rall, D.P., Kelley, M.G., 1957, Reduction of febrile response to bacterial polysaccharide following incubation with serum. *Am J Physiol.* S.559.

**Ramadori et al., 1985:** Ramadori, G., Sipe, J.D., Dinarello, C.A., Mizel, S.B., and Colten, H.R., 1985, Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J Exp Med.* 162, S.930-942.

**Raschke et al., 1978:** Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I., 1978, Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 15, S.261-267.

**Read et al., 1995:** Read, T.E., Grunfeld, C., Kumwenda, Z.L., Calhoun, M.C., Kane, J.P., Feingold, K.R., and Rapp, J.H., 1995, Triglyceride-rich lipoproteins prevent septic death in

rats. *J Exp Med.* 182, S.267-272.

**Rietschel et al., 1994:** Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seidel, U., and Di Padova, F., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB.* S.217-225.

**Sands et al., 1997:** Sands, K.E., Bates, D.W., Lancken, P.N., Graman, P.S., Hibberd, P.L., Kahn, K.L., Parsonnet, J., Panzer, R., Orav, E.J., and Snyderman, D.R., 1997, Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. S.234-240.

**Schonbeck et al., 1995:** Schonbeck, U., Barndt, E., Petersen, F., Flad, H.D., and Loppnow, H., 1995, IL-8 specifically binds to endothelial but not to smooth muscle cells *J Immunol.* S.2375-2383.

**Schumaker & Puppione 1986:** Schumaker, V.N. and Puppione, D.L., 1986, Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* 128, S.155-170.

**Schumann et al., 1996:** Schumann, R.R., Kirschning, C.J., Unbehauen, A., Aberle, H.P., Knope, H.P., Lamping, N., Ulevitch, R.J., and Herrmann, F., 1996, The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/§ and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* S.3490-3503.

**Schumann et al., 1990:** Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J., 1990, Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* S.1429-1431.

**Schumann et al., 1996:** Schumann, R.R., Pfeil, D., Lamping, D., Kirschning, C., Scherzinger, G., Schlag, P., Karawajew, L., and Herrmann, F., 1996, Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood.* 87, S.2805.2814.

**Schumann et al., 1994:** Schumann, R.R., Rietschel, E.T., and Loppnow, H., 1994, The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol (Berl).* S.279-297.

**Schwandner et al., 1999:** Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C.J., 1999, Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2 *J Biol Chem.* 274, S.17406-17409.

**Sepsis therapy still shocking:** 1997, Sepsis therapy still shocking *Nat Biotechnol.* 15, S.601.

**Seydel et al., 1993:** Seydel, U., Labischinski, H., Kastowsky, M., and Brandenburg, K., 1993, Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology*. S.191-211.

**Skarnes et al., 1958:** Skarnes, R.C., Rosen, F.S., Shear, M.J., and Landy, M., 1958, Inactivation of Endotoxin by a humoral component. II. Interaction of Endotoxin with Serum and Plasma. *J Exp Med*. 108, S.685-700.

**Sorensen et al., 1997:** Sorensen, O., Cowland, J.B., Askaa, J., and Borregaard, N., 1997, An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods*. S.53-59.

**Stone 1994:** Stone, R., 1994, Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science*. 264, S.365-367.

**Takayama et al., 1994:** Takayama, K., Mitchell, D.H., Din, Z.Z., Mukerjee, P., Li, C., and Coleman, D.L., 1994, Monomeric Re lipopolysaccharide form *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem*. 269, S.2241-2244.

**Tall 1995:** Tall, A., 1995, Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*. 64, S.235-257.

**Tall et al., 1983:** Tall, A.R., Forester, L.R., and Bongiovanni, G.L., 1983, Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma. *J Lipid Res*. S.277-289.

**Tobias et al., 1986:** Tobias, P.S., Soldau, K., and Ulevitch, R.J., 1986, Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med*. 164, S.777-793.

**Tobias et al., 1989:** Tobias, P.S., Soldau, K., and Ulevitch, R.J., 1989, Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem*. 264, S.10867-10871.

**Tobias & Ulevitch 1993:** Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J., 1993, Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology*. 187, S.227-232.

**Ulevitch 1993:** Ulevitch, R.J., 1993, Recognition of bacterial endotoxins by receptor-dependent mechanisms. *Adv Immunol*. S.267-289.

**Ulevitch & Johnston 1978:** Ulevitch, R.J. and Johnston, A.R., 1978, The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharide by serum. *J Clin Invest*. 62, S.1313-1324.

**Ulevitch et al., 1979:** Ulevitch, R.J., Johnston, A.R., and Weinstein, D.B., 1979, New

function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest.* 64, S.1516-1524.

**Vandermeer et al., 1994:** Vandermeer, T.J., Meconi, M.J., O'Sullivan, B.P., Larkin, V.A., Wang, H., Kradin, R.L., and Fink, M.P., 1994, Bactericidal/permeability-increasing protein ameliorates acute lung injury in porcine endotoxemia. *J Appl Physiol.* 76, S.2006-2014.

**Volanakis & Kaplan 1971:** Volanakis, J.E., and Kaplan, M.H., 1971, Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med.* 136, S.612-614.

**Warren et al., 1985:** Warren, H.S., Novitsky, T.J., Ketchum, P.A., Roslansky, P.F., Kania, S. and Silber, G.R., 1985, Neutralization of bacterial lipopolysaccharide by human plasma. *J Clin Microbiol.* 22, S.590-595.

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

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

**Wurfel et al., 1997:** Wurfel, M.M., Monks, B.C., Ingalls, R.R., Dedrick, R.L., Delude, R., Zhou, D., Lamping, N., Schumann, R.R., Thieringer, R., Fenton, M.J., Wright, S.D., and Golenbock, D., 1997, Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact. *J Exp Med.* 186, S.2051-2056.

**Wurfel & Wright 1997:** Wurfel, M.M., and Wright, S.D., 1997, Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. 158, S.3925-3934. Hrsg.: *J Immunol:*

**Yang et al., 1998:** Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., and Godowski, P.J., 1998, Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* S.284-288.

**Yu et al., 1997:** Yu, C.L., Haskard, D., Cavender, D., and Ziff, M., 1997, Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest.* 99, S.315-324.

**Yu et al., 1986:** Yu, C.L., Haskard, D., Cavender, D., and Ziff, M., 1986, Effects of bacterial lipopolysaccharide on the binding of lymphocytes to endothelial cell monolayers. *J Immunol.* 136, S.569-573.

**Zarewych et al., 1996:** Zarewych, D.M., Kindzelskii, A.L., Todd, R.F., and Petty, H.R.,

1996, LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion. *J Immunol.* 156, S.430-433.

**Zhang et al., 1999:** Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Manicinelli, R., Xu, X.P., Jin, Y., Faure, E. Mantovani, A., Rothe, M., Muzino, M. and Arditi, M., 1999, Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 274, S.7611-7614.

**Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Schumann für die Bereitstellung des interes-santen Themas, die intensive Betreuung und ständige Unterstützung. Besonders dankbar bin ich ihm außerdem für die Möglichkeit des eigenständiges Arbeitens und die Förderung meiner Famulatur in York, sowie das Ermöglichen des Besuches von wissenschaftlichen Kongressen .

Im Labor gilt mein besonderer Dank Norbert Lamping für die hervorragende Einarbeitung und seine zahllosen Anregungen zu den von mir durchgeführten Versuchen, sowie seine Einführung in die Tiefen der Macintosh und Word 5.0 Benutzung. Des weiteren danken möchte ich speziell Kathrin Michelsen, die geduldig etliche Vorversionen dieser Arbeit korrigiert und mich in die theoretischen Aspekte des Themas eingeführt hat. Vielen Dank auch an Fränzi für die Zellzählungen, Nicole für die Einführung ins Western-Blotten und Sabine für die Hilfe bei den Blutentnahmen der Mäuse. Für die Abkürzung der Wartezeiten zwischen den Versuchen danke ich Werner und Christian und für die letzten Dichtezentrifugationen danke ich Oliver.

Für die angenehme Atmosphäre möchte ich mich noch bei der gesamten Arbeitsgruppe Schumann bedanken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für Probleme, und es hat Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten.

Ich danke den Mitarbeitern des Institutes für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Direktor Prof. Dr. med E. Köttigen) der Universitätsklinik Charité, speziell Dr. Lun und Dr. Brux für ihre Hilfe bei der Kontrolle der Reinheit der isolierten Lipoproteine und ihre Anregungen zur Isolation muriner Lipoproteine.

Vielen Dank auch an das Institut für Pharmakologie der Universtitätsklinik Charité, für die Bereitstellung von NMRI-Mäusen zur Blutentnahme.

Bei C. Schütt und R. Jack aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Greifswald, möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten LBP-defizienten Mäuse bedanken.

Ich danke meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit. Und meinen beiden Süßen. Der einen für ihr Verständnis dafür, daß ich mich teilweise von meinen erzieherischen Pflichten zu Gunsten der Forschung zurückziehen mußte und der anderen dafür, daß sie die Erstere nicht allzusehr gestreßt hat.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.  
Außerdem erkläre ich, daß ich an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt habe.

Berlin den.....

.....

Jan Holger Knierim

