

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Durchflusszytometrische Untersuchungen zur
Interaktion einer GFP-Fusionsvariante des
Lipopolysaccharid-bindenden Proteins
(LBP-GFP) mit der humanen Zelllinie
HEK293-TLR4/MD-2**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Yvonne Siebken
Matrikelnummer: 2000092
Hamburg-Bergedorf
Am 25. Juni 2013

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)
PD Dr. Andra Schromm (Forschungszentrum Borstel)

Diese Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im
Forschungszentrum Borstel
Forschungsgruppe Immunbiophysik

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt PD Dr. Andra Schromm für die Einstellung am Forschungszentrum Borstel für die Zeit meines Praxissemesters und der Bachelorarbeit. Die ständige Bereitschaft, mir bei Fragen und Problemen zu helfen, gaben mir die Sicherheit und den Mut mich von einem behüteten Studenten zu einem selbstverantwortlichen wissenschaftlichen Mitarbeiter zu entwickeln. Diese Entwicklung war wahrscheinlich die Wichtigste während des gesamten Studiums. Vielen Dank für die Bereitschaft mich zu prüfen und auszubilden, für das Lehren des wissenschaftlichen Arbeitens und das Integrieren in die Arbeitsgruppe.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls meinem Betreuer und Gutachter an der HAW Hamburg Prof. Dr. Jörg Andrä, der mich mit gutem Rat bei der Anfertigung der Bachelorarbeit unterstützt hat.

Meiner größten Stütze im Labor, Irina von Cube, danke ich aufrichtig für die hervorragende Betreuung und die Einweisung in die molekularbiologischen Methoden, für das Pflegen meiner Zellen, für das Lehren der besonderen „Kniffe“ und die schönste Büronachbarschaft, die auch an einem schlechten Tag immer für ein Lächeln sorgte.

Des Weiteren danke ich den gesamten Mitarbeitern der Forschungsgruppen der Immunbiophysik und der Biophysik für das Aufnehmen in die Gemeinschaft und die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft. Hierbei möchte ich besonders Sabrina Groth, Nina Halbrock, Christine Hamman, Michaela Ramhold, die ebenfalls die Zellkultur und Zellernnte für mich übernommen hat, Sabine Dabelstein und Franziska Kopp hervorheben, die mir gerade in den ersten Wochen jede erdenkliche Frage beantwortet haben und nie gezögert haben, mir zu helfen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Lutz Hamann, Charité Berlin, für die Bereitstellung des Expressionsplasmids und bei Mona Shokouhi, Forschungszentrum Borstel, für die Bereitstellung des Fusionsproteins.

Meiner besten Freundin Jasmin danke ich für die mentale Stütze, nicht nur während des Studiums, aber vor allem während der Anfertigung meiner Bachelorarbeit. Mit ihrer Unterstützung konnte ich jeden Tag mit einer positiven Einstellung beginnen.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich immer bedingungslos unterstützt haben, unabhängig davon, welche Entscheidung ich in meinem Leben getroffen habe. Ich konnte mich in meinem eigenen Tempo frei entfalten und spürte zu keiner Zeit Erwartungsdruck. Danke für den uneingeschränkten Rückhalt, der es mir ermöglicht, meine Ziele bestmöglich und bodenständig zu verfolgen.

INHALT

DANKSAGUNG	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG.....	10
1.1 ZIELSETZUNG.....	10
1.2 DAS IMMUNSYSTEM.....	11
1.3 DIE ANGEBORENE IMMUNANTWORT.....	12
1.4 LIPOPOLYSACCHARID	13
1.5 LIPOPOLYSACCHARID-BINDENDEN PROTEIN.....	15
1.6 LPS-LBP Interaktion.....	16
1.7 LBP-GFP _{His}	18
2. MATERIAL	19
2.1 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN.....	19
2.2 PUFFER.....	21
2.3 VERWENDETE GERÄTE.....	21
2.4 VERBRAUCHSMATERIAL	22
3. METHODEN	23
3.1 ZELLKULTUR UND ZELLERNTEN	23
3.2 ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON TLR4-REZEPTOREN	24
3.3 BINDUNG VON LBP-GFP _{His} AN DIE ZELLMEMBRAN	24
3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	25
3.5 INTEGRITÄTSPRÜFUNG DER ZELLMEMBRAN MIT	26
PROPIDIUMIODID	26
4. ERGEBNISSE	27
4.1 FÄRBUNG DER TLR4-REZEPTOREN AN HEK293-TLR4/MD-2.....	27
ZELLEN.....	27
4.2 BINDUNG VON LBP-GFP _{His} AN HEK293-TLR4/MD-2 ZELLEN	29
4.3 PRÜFUNG DER MEMBRANINTEGRITÄT MIT PROPIDIUMIODID	33
4.4 FLUORESCENZAUSLÖSCHUNG VON EXTRAZELLULÄREM GFP DURCH TRYPANBLAU.....	38

4.5 EINFLUSS DER INKUBATIONSTEMPERATUR AUF DEN QUENCHING EFFEKT	41
5. DISKUSSION	44
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	50
7. AUSBLICK.....	51
8. ANHANG	52
I. AK-Färbung von TLR4-Rezeptoren.....	52
II. Bindung von LBP-GFPHis an die Zellmembran.....	53
III. Prüfung der Membranintegrität mit Propidiumiodid	55
IV. Fluoreszenzextinguierung von extrazellulärem GFP	55
V. Literaturverzeichnis.....	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die chemische LPS Struktur.....	14
Abbildung 2: Modell der Struktur des LBP-bindenden Proteins	16
Abbildung 3: <i>Dot Plot</i> -Analyse der TLR4-Färbung und Fluoreszenzauslöschung durch Trypanblau an HEK293-TLR4/MD-2 #33.....	28
Abbildung 4: <i>Dot Plot</i> -Analyse der LBP-GFP _{His} -Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #33	29
Abbildung 5: <i>Dot Plot</i> -Darstellungen zur Separation von LBP-GFP _{His} -gebundenen Zellen aus unterschiedlichen Populationen	31
Abbildung 6: <i>Dot Plot</i> -Quadranten-Analyse einer Bindung von LBP-GFP _{His} an die Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2 #33	31
Abbildung 7: Analyse der LBP-GFP _{His} -Bindung an HEK293-TLR4/MD-2	32
Abbildung 8: <i>Dot Plot</i> -Analyse einer Propidiumiodid-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 #33 zur Prüfung der Membranintegrität.....	34
Abbildung 9: <i>Dot Plot</i> -Analyse einer Propidiumiodid-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 #33 zur Prüfung der Membranintegrität: Vergleich des Einflusses von Trypsin- und Accutasebehandlung	35
Abbildung 10: <i>Dot Plot</i> -Darstellung einer Propidiumiodid-Färbung nach LBP-GFP _{His} -Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #33	37
Abbildung 11: <i>Dot Plot</i> -Analyse einer Fluoreszenzauslöschung von extrazellulär gebundenem LBP-GFP _{His} an HEK293-TLR4/MD-2 #33	39
Abbildung 12: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die LBP-GFP _{His} -Bindung und den Trypanblau Quenching-Effekt	41
Abbildung 13: Vergleich der <i>Dot-Plots</i> bei Variation der Inkubationstemperatur	43
Abbildung 14: Übersicht über die <i>Dot Plot</i> -Analysen der LBP-GFP _{His} -Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen #15 und #33 aus unabhängig durchgeführten Experimenten	54
Abbildung 15: Vergleich der <i>Dot Plot</i> -Darstellung zweier Klone von HEK293-TLR4/MD-2 auf Bildung von Populationen.....	54
Abbildung 16: Vergleich der Effekte der Zellablösung auf Accutase und Trypsin von #15 mit #33.....	55
Abbildung 17: <i>Dot Plot</i> -Darstellung einer Propidiumiodid-Färbung nach LBP-GFP _{His} -Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #15	55
Abbildung 18: <i>Dot Plot</i> -Analyse einer Fluoreszenzauslöschung von extrazellulär gebundenem LBP-GFP _{His} an HEK293-TLR4/MD-2 #15	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammenfassung der <i>Dot Plot</i> -Analysen mehrerer Versuche zur PI-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 Zellen	36
Tabelle 2: Übersicht über die Effektivität des Trypanblau-Quenchings	40
Tabelle 3: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von der Zellzahl	52
Tabelle 4: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von der Tb-Konzentration bei unterschiedlichen Zellzahlen.....	52
Tabelle 5: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von dem Tb-Volumen.....	52
Tabelle 6: Einfluss der Applikationsreihenfolge von Tb-Lösung und Puffer auf die Fluoreszenzauslöschung.....	53
Tabelle 7: Übersicht der Auswertung der LBP-GFP _{His} -Bindungsversuche an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen aus unabhängigen Experimenten	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
APP	Akute-Phase-Protein
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
BPI	<i>Bactericidal/Permeability Increasing Protein</i>
BSA	Albumin Fraktion V (aus Rinderserum)
c	Stoffmengenkonzentration
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CETP	<i>Cholesterol Ester Transfer Protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced chemical luminescence</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötale Kälberserum)
FPP	Fluorescence protease protection
FSC	<i>Forward scatter</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	Glutamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G 418	<i>Geneticin</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEK293	<i>Human embryonic kidney 293</i>
His	Histidin
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
kDa	kilo Dalton
KCl	Kaliumchlorid
Kdo	Ketodesoxyoctonsäure
KF	Kulturflasche
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LO	Links oben
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
LU	Links unten
Lys	Lysin

mCD14	membrangebundenes CD14
MD-2	<i>Myeloid differentiation factor 2</i>
MHC-I-Komplex	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MQ-Wasser	Doppelt deionisiertes Wasser aus Reinstwasser Anlage
MW	Molekulargewicht
MyD	<i>myeloid differentiation primary-response protein</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P	Penicillin
PI	Propidiumiodid
PLTP	<i>Phospholipid Transfer Protein</i>
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RO	Rechts oben
RT	Raumtemperatur
RU	Rechts unten
S	Streptomycin
sCD14	<i>soluble</i> (löslich) CD14
SSC	<i>Side scatter</i>
Tb	Trypanblau
TLR4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>transforming-growth-factor-β-activated kinase</i>
w	Massenanteil
z.B.	zum Beispiel
β	Massenkonzentration
# 33	Klon Nr. 33

1. EINLEITUNG

1.1 ZIELSETZUNG

Die Beteiligung des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP), als Akute-Phase-Protein im Serum, bei der Initiierung einer Immunantwort konnte bereits umfassend belegt werden. LBP bindet Lipopolysaccharid (LPS) und transportiert dieses zu einem zellgebundenen Rezeptorkomplex, welcher eine Kaskade von Reaktionen einleitet, die als Resultat die Ausschüttung von Zytokinen hervorruft. Des Weiteren ist die Existenz von membranassoziertem LBP (mLBP) nachgewiesen (Roes, 2006). Die Orientierung dieses Proteins an bzw. in der Membran ist jedoch bislang noch nicht näher charakterisiert (Müller, 2003). Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an rekonstituierten Lipid-Membranen legen nahe, dass unterschiedliche Konformationen des LBP an Membranen vorliegen können (Roes, 2006). Die Untersuchung der Lokalisation von mLBP ist essentiell für das Verständnis seiner Funktion, besonders im Zusammenhang mit der Interaktion mit LPS. Für LBP wurden verschiedene Domänen beschrieben, die jeweils eine unterschiedliche Funktion besitzen. Der LPS-bindende Bereich wurde an der N-terminalen Domäne des Moleküls identifiziert (Theofan, 1994). Daher kann die Orientierung von LBP, beispielsweise als Transmembranprotein, direkte Auswirkungen auf seine immunologische Funktion haben.

Eine Möglichkeit die Orientierung membranassoziierter Proteine zu analysieren, stellt der *fluorescence protease protection assay* (FPP-Assay) dar. Grundlage dieses Assays ist die proteolytische Verdaubarkeit einer GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsvariante des zu analysierenden Proteins. Diese Protease-induzierte Fluoreszenzauslöschung findet ausschließlich an extrazellulärem GFP statt (Lorenz, 2006; Lorenz, 2008). In vorangegangenen Forschungsarbeiten wurde am Forschungszentrum Borstel eine LBP-GFP-Fusionsvariante hergestellt. Erste Versuche zur Etablierung des FPP für die Untersuchung der Orientierung von mLBP konnten zeigen, dass Trypanblau-Quenching eine effektivere Fluoreszenzauslöschung hervorruft, als der Fluoreszenzverdau mittels Trypsin (Shokouhi, 2013).

In dieser Arbeit sollte ein Trypanblau-Quenching-Assay zur Untersuchung der Interaktion einer GFP-Fusionvariante des LBP mit der humanen Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 eingesetzt werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen sollten die Bindung des

Fusionsproteins an die Zytoplasmamembran bestätigen. Des Weiteren sollte durch Fluoreszenzauslöschung eine Aussage über die Lokalisation der GFP-tragenden Domäne des LBP-GFP-Proteins getroffen werden. Die Interaktionen von Proteinen mit der Membran, sowie membranabhängige Aufnahmeprozesse wie die Phagozytose, sind in der Regel temperaturabhängig. Diese Abhängigkeit sollte in dieser Arbeit ebenfalls für das LBP-GFP-Fusionsprotein überprüft werden.

1.2 DAS IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem höherer Lebewesen hat die Funktion den Organismus gegen in den Körper eingedrungene Mikroorganismen und fremde Substanzen, sowie fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen, zu schützen. Es besteht aus mechanischen und physiologischen Barrieren, wie Haut, Darm oder Atemwege, zellulären Bestandteilen und bestimmten Proteinen, die als Boten- oder Abwehrstoffe wirken.

Als Reaktion auf eingedrungene Pathogene wird im Körper eine Immunantwort ausgelöst, deren Mechanismus davon abhängig ist, ob es sich um ein bereits bekanntes oder unbekanntes Pathogen handelt. Die meisten Pathogene besitzen spezielle „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ („*pathogen associated molecular patterns*“, PAMPs), wie z.B. Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, bakterielle DNS oder auch doppelsträngige RNA. Anhand dieser konservierten Struktur motive werden Pathogene vom Wirt erkannt und anschließend eliminiert.

Das angeborene Immunsystem hat die Funktion in den Organismus eingedrungene Pathogene zu identifizieren und als Reaktion darauf eine Immunantwort auszulösen. Darauf folgt die Beseitigung der Pathogene durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose, oder antimikrobielle Effektoren. Des Weiteren instruiert es das adaptive Immunsystem und begrenzt eine Infektion, bis dieses greift.

Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind professionelle Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, welche durch die Blutbahn zu den befallenen Geweben migrieren, um dort proteolytische Enzyme zu sezernieren, Erreger durch Phagozytose aufzunehmen und abzutöten. Die Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) erkennen virusinfizierte oder transformierte Zellen dadurch, dass diese eine verringerte Expression des, auf ihren Oberflächen vorkommenden, Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I-Komplex) aufweisen. Das humorale Komplementsystem ist ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems, welches aus mehr als 30 Serum-

proteinen besteht und an der Kontrolle von Entzündungsreaktionen und der Lyse von Antikörper-markierten Zellen beteiligt ist. Die dendritischen Zellen gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Sie nehmen durch Pinozytose Antigene in der Peripherie auf und wandern nach dieser Aktivierung in die Lymphknoten, wo sie die Antigene auf ihren Zelloberflächen präsentieren.

Wichtige Zellen des erworbenen oder auch adaptiven Immunsystems sind die B-Lymphozyten. Sie tragen an ihren Zelloberflächen Antigenrezeptoren. Pathogene Antigene stimulieren diese Zellen durch die Bindung mit deren B-Zell-Rezeptoren. Daraufhin differenzieren die B-Zellen zu Plasmazellen, welche große Mengen von spezifischen Antikörpern synthetisieren und sezernieren. Die gebildeten Antikörper führen dann in dem betroffenen Gewebe eine Immunreaktion aus. Die B-Zell-Aktivierung wird zusätzlich von T-Lymphozyten, in Form von T-Helfer-Zellen unterstützt. Besonders wichtig für das adaptive Immunsystem ist die Differenzierung zu Gedächtniszellen. Diese stellen einen Informationsspeicher für die Bildung von Antikörpern dar. Bei einer erneuten Infektion, mit einem bereits bekannten Pathogen, wandeln sich die Gedächtniszellen sehr viel schneller zu Plasmazellen um, sodass es zu einer schnelleren Antikörperproduktion bei einem Zweitkontakt kommt. Das adaptive Immunsystem ist zum effektiven Schutz vor Pathogenen notwendig. Es greift, wenn Erreger die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems überwunden haben, ihnen entgehen konnten oder einen Infektionsherd gebildet haben. Es beseitigt eingedrungene Pathogene und führt zu einer schützenden Immunität. Diese kann auf bereits bekannte eingedrungene Mikroorganismen mit gesteigerter Effizienz reagieren. Dadurch kann eine erneute Infektion wesentlich schneller bekämpft werden (Schütt & Bröker, 2011; Male, 2005; Janeway, 1997).

1.3 DIE ANGEBORENE IMMUNANTWORT

Die angeborene Immunantwort hat die Aufgabe eine direkte antimikrobielle Antwort einzuleiten, sowie phagozytierende Zellen und Effektor-Moleküle zum Infektionsherd zu rekrutieren. Es erfordert daher das direkte Auslösen eines Effektor-Mechanismus durch den Erreger.

Ein in den Körper eingedrungenes Pathogen muss dafür zuerst durch das angeborene Immunsystem identifiziert werden. Die Struktur der dabei beteiligten Proteine ist im Genom festgelegt. Auf den Oberflächen von Makrophagen und neutrophilen Granulo-

zyten werden Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) exprimiert. Diese Rezeptoren erkennen PAMPs von Mikroorganismen und durch deren Bindung werden unterschiedliche Abwehrmechanismen initiiert. Dazu gehören die Phagozytose des Erregers und die Aktivierung der Zelle, die den PRR exprimiert. Die Zelle reagiert auf die Aktivierung mit der Transkription von Genen, die zur Expression und Sekretion von Zytokinen, wie TNF- α , Interleukin(IL)-1, IL-6 und IL-8, und Enzymen mit stark lokaler Wirkung, wie Phospholipase und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, führt. Die sezernierten Zytokine bewirken ein Ansteigen der Körpertemperatur, welches eine zerstörende Wirkung auf viele Mikroorganismen hat. Des Weiteren verursachen sie eine Entzündungsreaktion, welche die Oberflächeneigenschaften und die Permeabilität der Blutgefäße verändert. Die Mediatoren induzieren ebenfalls die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APP) in der Leber. Akute-Phase-Proteine haben die Aufgabe die Entzündung zu lokalisieren, eine Ausbreitung zu verhindern und das Immunsystem zu unterstützen, z.B. indem sie verstärkt das Komplementsystem aktivieren. Dieses wirkt, indem es die Oberfläche von Pathogenen opsonisiert, um so den Phagozyten die Erkennung und den Verdau zu erleichtern. Des Weiteren können die beteiligten Proteine zerstörende Poren in der Zellmembran von Bakterien bilden, die die Membranintegrität stören und zur Lyse der Bakterien führen (Schütt & Bröker, 2011; Male, 2005; Janeway, 1997).

1.4 LIPOPOLYSACCHARID

Lipopolysaccharide (LPS) sind chemische Verbindungen, die aus Zucker- und Lipideinheiten bestehen (Glycolipide). In Bezug auf das Immunsystem hat die Zellwand gram-negativer Bakterien eine besondere Bedeutung. In ihrer äußeren Zellmembran sind Lipopolysaccharide integral verankert, welche bei der Zellteilung oder der Abtötung von Bakterien freigesetzt werden können (Rietschel, 1994). Diese Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Gram-negativen Bakterien durch das Immunsystem. So löst LPS Immunreaktionen, unter anderem die Freisetzung von Zytokinen, die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems und die Phagozytose, aus und stellt dabei einen wichtigen Mediator in der Pathogenese Gram-negativer Sepsis dar (Morrison, 1987; Reyes, 2002; Gutsmann, 2001). Strukturell kann LPS in zwei Bereiche, einen hydrophilen und einen

hydrophoben, unterteilt werden. Ein hydrophiles Polysaccharid bildet dabei den äußeren Bereich. Es beinhaltet zum einen das sogenannte O-Antigen, welches sich aus bis zu 50(n) Oligosacchariden, die aus drei bis acht Monosacchariden aufgebaut sind, zusammensetzt. Dieser Teil des LPS wird zur Unterscheidung verschiedener Bakterienarten und -stämmen genutzt, da er die höchste Variabilität innerhalb des LPS aufweist. Zum anderen besteht es aus einer Kernregion, die in eine äußere und eine innere Kernregion unterteilt wird. Der äußere Kern besteht hauptsächlich aus den Sacchariden Glukose, Galaktose, Glukosamin und Galaktosamin, während der innere Kern den selten natürlich vorkommenden Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste enthält (Rietschel, 1985; Raetz, 1990). Als Lipid A wird jener hydrophobe Teil des LPS bezeichnet, der in der bakteriellen Membran verankert ist. Er besteht aus einem phosphorylierten Glucosamindisaccharid, an welches vier Fettsäuren verestert sind, von denen wiederum zwei sekundär acyliert sind. Das Lipid A bildet den biologisch aktiven Anteil des Moleküls und wirkt als Endotoxin (Rietschel, 1994). Im wässrigen Milieu, wie dem Blut, bilden sich aufgrund der amphiphilen Struktur des LPS Moleküls stabile Aggregate, aus welchen nur langsam und wenige einzelne LPS-Moleküle dissoziieren (Seydel, Koch, & Brandenburg, 1993). Als Folge einer Infektion durch bakterielles LPS entstehen krankhafte Symptome wie Fieber, lokale oder systematische Entzündungsreaktionen und bei ungünstigem Verlauf eine toxische Schockreaktion (Beutler & Rietschel; 2003).

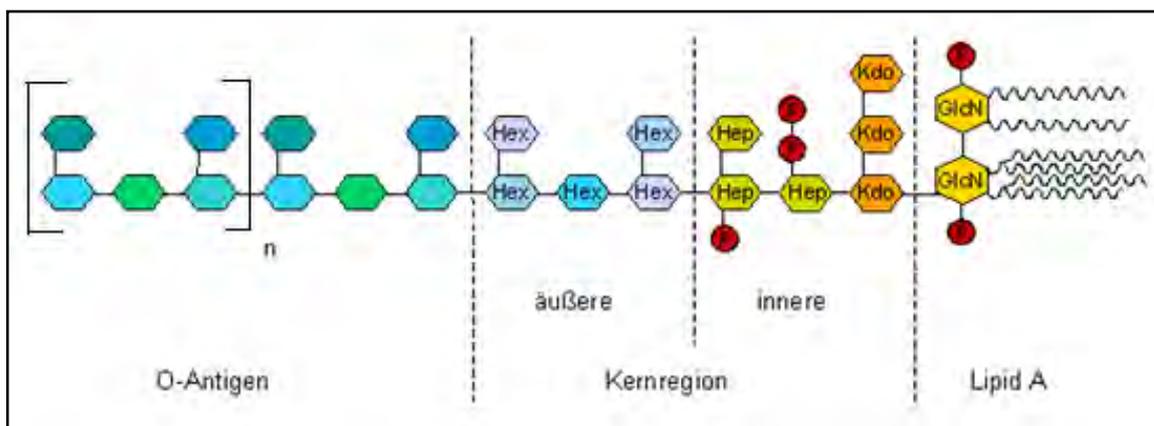


Abbildung 1: Die chemische LPS Struktur

Dargestellt sind der hydrophile Bereich, bestehend aus O-Antigen, äußerer und innerer Kernregion, und der hydrophobe Lipid A Bereich (verändert durch Alexander & Rietschel, 2001).

1.5 LIPOPOLYSACCHARID-BINDENDES PROTEIN

LBP ist ein 58-60 kDa Glykoprotein und wird als Akute-Phase-Protein hauptsächlich in der Leber synthetisiert und anschließend in den Blutkreislauf abgegeben. Die Expression von LBP ist ebenfalls in Darmepithelzellen und Lungenepithelzellen Typ II nachgewiesen (Dentener, 2000). Im gesunden Menschen hat LBP eine Serumkonzentration von 5-10 µg/mL. Diese kann, während der Akute-Phase-Reaktion, um das 10-50-fache ansteigen (Dentener, 2000). Als Lipid-Transferprotein fördert LBP das Herauslösen von LPS aus Aggregaten und transportiert die Monomere an den zellulären LPS-Rezeptorkomplex. Somit übernimmt LBP eine Schlüsselfunktion bei der Pathogenerkennung und fungiert als Modulator einer Immunantwort bei einer Sepsis (Zweigner, 2001).

Es existieren noch weitere strukturell verwandte LPS-Bindungs- und Lipid-Transferproteine, wie das *Bactericidal/Permeability Increasing Protein* (BPI), *Cholesterol Ester Transfer Protein* (CETP) und das *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP). Aufgrund starker struktureller sowie funktioneller Homologien, werden diese Proteine zu einer Proteinfamilie zusammengefasst (Desrumaux, 2001). Die Aminosäuresequenz zwischen LBP und BPI stimmt zu 44 % überein, zwischen LBP und PLTP zu 25 % und zwischen LBP und CETP zu 23 % (Drayna, 1987; Gray, 1989; Day, 1994). Die Proteine dieser Familie weisen jedoch durchaus unterschiedliche Funktionen auf. BPI kann beispielsweise die Zellmembran von Bakterien permeabilisieren. Diese bakterizide Eigenschaft besitzt LBP nicht.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen LBP und BPI und der „großen Anzahl konservierter Aminosäuren (AS), konnte nach Computeranalyse eines kristallographierten BPI-Moleküls ein Homologiemodell für LBP abgeleitet werden“ (zit. Büttner, 2005).

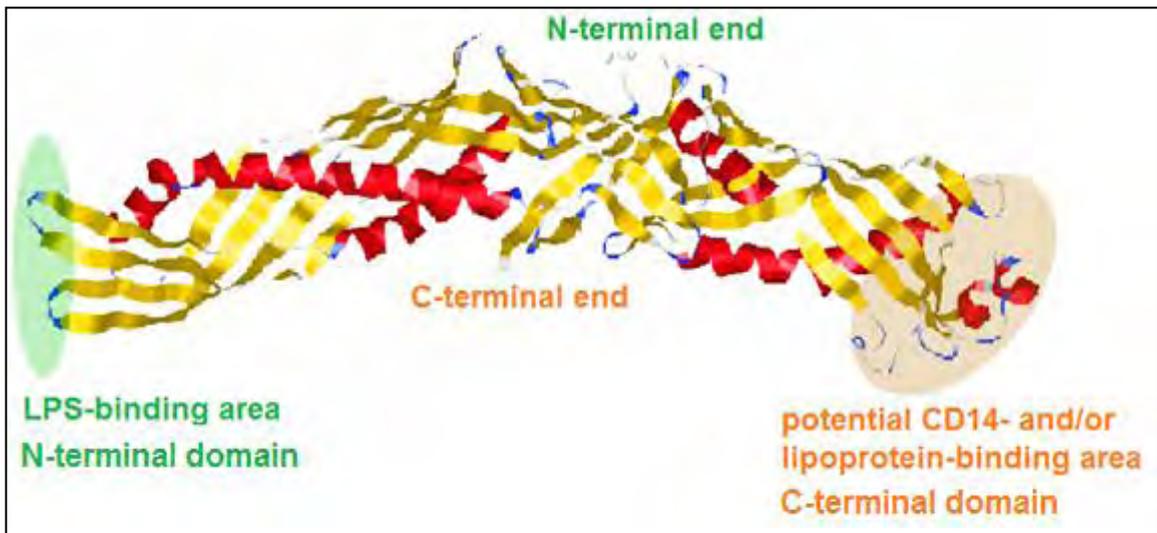


Abbildung 2: Modell der Struktur des LBP-bindenden Proteins

Die Computersimulation basiert auf kristallografischen Daten des strukturell verwandten BPI (verändert nach Schumann & Latz, 2000).

LBP weist demnach eine boomerangförmige Struktur auf. Die DNS-Sequenz für LBP codiert für 452 AS, 47 negativ geladene und 43 positiv geladene AS, sodass die Nettoladung des Proteins -4 beträgt (Gutsmann, 2001). 25 AS stellen eine Signalsequenz dar. Anhand dieser wird das Protein nach der Biosynthese ins Blut abgegeben (Schumann 1990, Ramadori, 1990). In dem LPS-bindenden Bereich, dem N-terminalen Bereich, befindet sich ein Cluster von Aminosäuren mit positiven Ladungen, Arg-94, Lys-95, Lys-99, (Lamping, 1996). Der gegenüberliegende Bereich, der C-terminale Bereich, bindet an CD14 oder Lipoproteine. Auch hier sind positive AS, Lys287, Lys290, Lys308 und Lys389, vorhanden (Schumann, 2000).

1.6 LPS-LBP Interaktion

Die Erkennung und Bindung von LPS durch Serum-LBP (sLBP) erfolgt über den N-terminalen Bereich des LBP, in welchem positiv geladene AS lokalisiert sind (Han 1994; Lamping, 1996). Dabei binden diese AS mit hoher Affinität die negativ geladenen Phosphatgruppen im Lipid-A des LPS ionisch und lösen so das LPS-Molekül aus den supramolekularen Aggregaten heraus (Tobias, 1989; Schumann, 2000). Dieses monomerisierte LPS, komplexiert mit LBP, kann so erleichtert mit anderen Mustererkennung-Rezeptoren im Serum (*solubleCD14* und HDL) und auf Zellmembranen

(*membrane-boundCD14*) interagieren (Freudenberg, 2001). Dabei bedingt die sLBP-Konzentration die funktionellen Auswirkungen. Bei normalen Serumkonzentrationen, von 5-10 µg/mL, katalysiert LBP die Bindung von LPS an CD14, löslich und membrangebunden, durch das Erkennen mittels der CD14-Bindungsstelle im C-terminalen Bereich des LBP (Han, 1994; Schumann, 2000). Dadurch wird die LPS vermittelte Stimulation CD14-positiver Zellen um das 100-1000-fache verstärkt (Schumann, 1990). Bei hohen LBP-Konzentrationen, z.B. während der Akute-Phase-Reaktion, kommt es zur LPS-Neutralisierung über HDLs (Gutsmann, 2001). Somit sind die funktionellen Auswirkungen der LBP-LPS-Interaktion konzentrationsabhängig (Zweigner, 2001). Das 55 kDa große CD14 ist ein Glykoprotein, welches hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und aktivierten Granulozyten exprimiert wird. Im Gegensatz zum sCD14 besitzt mCD14 einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, welche das Protein in der Zellmembran fixiert (Goyert, 1988). Durch das Fehlen einer transmembranären Domäne kann mCD14 selbst nicht aktiv an der Signaltransduktion, und somit an der Zellaktivierung, beteiligt sein. Es bedarf daher eines weiteren Rezeptorkomplexes, bestehend aus dem *Toll-like receptor 4* (TLR4) und dem *Myeloid differentiation factor 2* (MD-2) (Wright, 1990; Schumann, 2000; Haziot, 1988). TLR4 gehört zu der Rezeptorfamilie der Toll-ähnlichen Rezeptoren, welche strukturelle Übereinstimmungen aufweisen. Extrazellulär befinden sich *leucine-rich repeats* (LRRs), welche Protein-Protein-Interaktion vermitteln. Die intrazelluläre Domäne löst die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen, der eine Vielzahl proinflammatorischer Gene reguliert (Takeda, 2003; Hallatschek, 2005; Shimazu, 1999; Akira, 2004). MD-2 ist 25 kDa großes Protein, welches extrazellulär hydrophob mit TLR4 assoziiert ist und wird daher als membranverankert beschrieben (Park, 2009). Die Bindung von MD-2 an TLR4 ist notwendig für die Aktivierung von TLR4 (Shimazu, 1999). Viriyakosol et al. (2000) beschreiben MD-2 als Bindungspartner für LPS und nicht, wie lange Zeit angenommen, TLR4. So formt es mit TLR4 hufeisenförmige Heterodimere. Nach TLR4 Stimulation durch LPS werden intrazellulär Adapterproteine und Kinasen, wie MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*), TRAF6 (*tumor-necrosis-factor-receptor-associated 6*), TAK1 (*transforming-growth-factor-β-activated kinase*), TAB1 (*TAK1-binding protein 1*), gebunden und aktiviert. Diese Signalkaskade führt schließlich zur Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern und induziert dort die Transkription

proinflammatorischer Gene (Akira, 2004). Somit reagiert die Zelle auf eine Stimulation mit bakteriellem LPS mit der Expression von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 oder TNF- α (*tumor-necrosis factor α*).

1.7 LBP-GFP_{His}

In vorangegangenen Forschungsarbeiten wurde am Forschungszentrum Borstel eine GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsvariante des LBP hergestellt. Dazu wurde ein pEGFPN3-hLBP Plasmid verwendet, in dem die DNS-Sequenz des GFP an das C-terminale Ende des LBP in das Leseraster eingebracht ist (zur Verfügung gestellt von Dr. Lutz Hamann, Charité Berlin). Die Sequenz für die Hexahistidin-Aminosäuren (His) wurde C-terminal an das GFP fusioniert (Shokouhi, 2013). Die gesamte Sequenz für LBP-GFP_{His} lag im eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N3 vor, welcher anschließend durch Lipofektion transient in HEK293 Zellen transfiziert wurde. Die Zellkulturüberstände, welche das exprimierte LBP-GFP_{His} in Panserin-Medium enthielten, wurden abgenommen und das Protein über Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach diesem Aufarbeitungsschritt wurde die rekombinante LBP-GFP-Variante bei -20°C eingefroren.

Das rekombinant exprimierte LBP-GFP Fusionsprotein wurde im Western Blot mittels spezifischer Antikörper gegen GFP und gegen humanes LBP analysiert. Die biologische Aktivität des LBP-GFP_{His} konnte mittels LPS-induzierter Stimulation humaner Makrophagen nachgewiesen werden (Shokouhi, 2013).

2. MATERIAL

2.1 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN

Chemikalien

BSA:	ALBUMIN FRACTION V (FROM BOVINE SERUM) Pulver: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 9; Merck; 100 g
DMEM:	DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM Lösung: Kühlschranktür bei 4°C in Raum 9; Biochrom; 500 mL; Lot: 0625A
EtOH:	ETHANOL Aus dem Magazin; Lösemittelager; reinst
FCS:	FÖTALES KÄLBERSERUM Lösung: im Gefrierschrank bei -20°C im Wägeraum; Linaris; 500 mL; Endotoxingehalt < 0,02 ng/mL
KCl:	KALIUMCHLORID Pulver: bei RT im Wägeraum; AppliChem; 1 kg; MW = 74,5 g/mol Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 1/2; c(KCL) = 1 M 18,62 g in MQ-Wasser gelöst; auf 250 mL MQ-Wasser aufgefüllt
KH ₂ PO ₄ :	KALIUMDIHYDROGENPHOSPHAT Pulver: bei RT im Wägeraum; Merck; 1 kg; MW = 136,09 g/mol Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 1/2; c(KH ₂ PO ₄) = 0,5 M; 6,8 g in MQ-Wasser gelöst; auf 100 mL MQ-Wasser aufgefüllt
NaCl:	NATRIUMCHLORID Pulver: bei RT im Wägeraum; Merck; 500 g; MW = 58,44 g/mol; Lösung: w = 0,75 %; 75 mg NaCl auf 10 mL Mili-Q
Na ₂ HPO ₄ :	NATRIUMHYDROGENPHOSPHAT Pulver: bei RT im Wägeraum; Merck; 500 g; MW = 141,96 g/mol Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 1/2; c(Na ₂ HPO ₄) = 0,5 M; 17,75 g in MQ-Wasser gelöst; auf 250 mL MQ-Wasser aufgefüllt

NaN ₃ :	NATRIUMAZID Pulver: bei RT im Wägeraum; Merck 100 g; MW = 65,01 g/mol;
Panserin:	PANSERIN 293A Lösung: bei 4°C im Kühlschrank in Raum 9; Pan Biotech; 500 mL; Lot: 3240313
PBS (1x):	PHOSPHATGEPUFFERTE SALZLÖSUNG (1x) Lösung: bei RT in Raum 1/2; Biochrom; 500 mL; Lot: 1057A; w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺
PI:	PROPIDIUMIODID Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 9; Invitrogen; 10 mL; MW = 668,4 g/mol; β = 1 mg/mL in Wasser; Lot: 513352
Trypanblau:	3,3'-DIMETHYL-4,4'-BIS(5-AMINO-4-HYDROXY-2,7-DISULFONAPHTYL-3-AZO)-[1,1'-BIPHENYL] Pulver: bei RT im Wägeraum, Riedel-De Haen; 25 g; MW = 992,82 g/mol; C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₅ S ₂ ; Lot: 5275 Lösung: w = 0,2 % in NaCl (w = 0,75 %); 10 mg auf 5 mL NaCl (0,75 %)

Zelllinie

HEK293-TLR4/MD-2	<i>HUMAN EMBRYONIC KIDNEY</i> #33 und #15 HEK-Zellen mit humanen TLR4/MD-2 Rezeptoren auf der Zytoplasmamembran
------------------	--

Antikörper

Anti TLR4	MOUSE MONOCLONAL (HTA 125) Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 9; Lot: AB040209A-02; Imgenex; 1 mL; β = 0,5 mg/mL; lichtgeschützt
gαM IgG-Alexa Fluor 488	GOAT ANTI-MOUSE IgG (H+L)-ALEXA FLUOR 488 KONJUGIERT Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 9; Invitrogen; 250 μL; β = 2 mg/mL; lichtgeschützt

LPS-bindendes Protein

LBP-GFP _{His} :	LIPOPOLYSACCHARID BINDENDEN PROTEIN-GREEN FLUORESCENT PROTEIN-6xHISTIDIN Lösung: im Kühlschrank bei 4°C in Raum 1/2; in Panserin; Forschungszentrum Borstel
--------------------------	--

2.2 PUFFER

Durchflusszytometrie

Az-PBS pH 7,2

NaCl	35 g
Na ₂ HPO ₄	5,74 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaN ₃	5 g
MQ-Wasser	auf 4500mL auffüllen
	pH Wert mit HCl auf 7,2 einstellen
MQ-Wasser	auf 5000mL auffüllen
<hr/>	
Steril filtrieren	

Az-PBS + 2 % FCS pH 7,2

Az-PBS	49 mL
FCS	1 mL
<hr/>	
Steril filtrieren	

2.3 VERWENDETE GERÄTE

Gerät	Hersteller	Model
Analysenwaage	Sartorius	R200D
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACS Calibur
Laborschüttler	Stuart	
Mikroprozessor pH-Meter	WTW	pH 537
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415R
pH-Meter	Mettler Toledo	InLab Semi-Mikro pH
Präzisionswaage	Sartorius	ED 623S
Rotationsverdampfer	Thermo Savant	SPD Speed Vac

2.4 VERBRAUCHSMATERIAL

Pipettenspitzen	1000 µL, 200 µL, 20 µL SARSTEDT AG & Co, Deutschland
Falcon Röhrchen	4 mL, BD Biosciences San Jose, California, USA
Gewindeflaschen	4 mL, Macherey-Nagel GmbH & Co KG Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm, Deutschland
Reaktionsgefäße	13 mL, 15 mL, 50 mL SARSTEDT AG & Co, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL SARSTEDT AG & Co, Deutschland
Schraubdeckel	N8, 1,3 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Deutschland
Spritzen (steril)	2 mL, 5 mL, 10 mL BD Discardit
Spritzenaufsatzfilter	Filtropur S Plus, 0,2 µm SARSTEDT AG & Co, Deutschland
Pipetten (steril)	5 mL, 10 mL, 25 mL Corning Incorporated, New-York, USA
Sterilfilter	Vacuum Driven Disposable Filtration System Millipore Express Plus Membrane 0,22 µm Billerica, USA

3. METHODEN

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen werden unter Kapitel 2.1 und 2.2 beschrieben.

3.1 ZELLKULTUR UND ZELLERNTE

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Strömungsprofil durchgeführt. Die Zellen der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 #33 und #15 wurden in Kulturflaschen (KF) bei 37°C und 5 % CO₂ Zufuhr in einem Heraeus Brutschrank inkubiert. Je nach Wachstumsverhalten der adhären wachsenden Zellen fand 2-3 Mal wöchentlich die Umsetzung in eine neue Kulturflasche statt. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgegossen und die Zellen mit 7 mL PBS-Puffer gewaschen. Darauf folgte das Ablösen der Zellen von der Gefäßwand durch Zugabe von Trypsin/EDTA (500 µL bei einer kleinen, 1000 µL bei einer großen Kulturflasche) für 2 min bei 37°C. Nach der Inaktivierung des Trypsins mit 500 µL (kl. KF) bzw. 1000 µL (gr. KF) Nährmedium, DMEM/G418/Hygromycin, wurden diese in einer neuen Kulturflasche mit Nährmedium ausgesät.

Zusammensetzung des Nährmediums:

für eine kleine KF: 7 mL DMEM + 7 µL G 418 + 7 µL Hygromycin

für eine große KF: 17 mL DMEM + 17 µL G 418 + 17 µL Hygromycin

Für die Zellernte wurde das alte Nährmedium abgegossen und die Zellen mit 7 mL PBS-Puffer gespült. Das Ablösen erfolgte durch die Zugabe von 500 µL (kl. KF) bzw. 1000 µL (gr. KF) Trypsin/EDTA und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Darauf folgte die Zugabe von 500 µL (kl. KF) bzw. 1000 µL (gr. KF) DMEM (+ 10 % FCS + 2 % P/S/Glu) und die Überführung in ein 13 mL-Reaktionsgefäß, welches in einem Eisbad stand. Für das Zählen der Zellen mit der Neubauer Zählkammer wurde ein Aliquot der Zellsuspension zuerst mit DMEM in einem Verhältnis von 1:100 (v/v) verdünnt. Danach wurde das verdünnte Zellaliquot im Verhältnis 1:2 (v/v) mit Trypanblau (w = 0,4 %) versetzt, in die Zählkammer überführt und die intakten Zellen gezählt.

(PS/S/Glu = 100 mM Glutamin, 5000 U/mL Penicillin, 5000 U/mL Streptomycin)

3.2 ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON TLR4-REZEPTOREN

HEK293 Zellen sind Transformationsprodukte menschlicher embryonaler Nierenzellen mit DNS Fragmenten des menschlichen Adenovirus 5. Diese stabile Zelllinie wächst adhären und zeichnet sich durch eine einfache Kultivierung aus. Die in diesen Experimenten verwendete sterile Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 weist im Vergleich zu HEK293-Zellen die Expression der humanen LPS-Oberflächenrezeptoren TLR4 und MD-2 auf.

Für die Methodenoptimierung der Protein-Lokalisation wurden zuerst Vorversuche durchgeführt. Dafür mussten Zellen der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 antikörpermarkiert werden. Es wurde zuerst der 1. Antikörper „anti-TLR4 HTA 125“ an die Oberflächenrezeptoren TLR4 gebunden. Durch die Bindung des 2. Antikörpers „ γ M IgG-Alexa Fluor 488“, welcher ein Fluorochrom trägt, wurden die Zelloberflächen ausschließlich extrazellulär fluorezenzmarkiert.

Für die Färbung wurden jeweils 1×10^5 Zellen in 1,5 mL Az-PBS in 5 mL Falcon-Röhrchen aufgenommen und gewaschen (vortexen). Anschließend bei 4°C für 5 min mit 1400 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde, durch vorsichtiges abgießen, verworfen. Es folgte die Bindung mit dem 1. AK. Dazu wurden die Zellen in 50 μ L einer 20 μ g/mL AK-Lösung resuspendiert und für 30 min, lichtgeschützt und auf Eis, inkubiert. Zentrifugation bei 4°C für 5 min mit 1400 U/min trennte nicht gebundenen AK von den Zellen ab. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5 mL Az-PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation folgte die Bindung des 2. AK in 50 μ L einer 20 μ g/mL AK-Lösung. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 30 min auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit Az-PBS gewaschen und nach Zentrifugation bei 4°C für 5 min mit 1400 U/min als Zellpellet, lichtgeschützt und auf Eis, zum Messgerät transportiert.

3.3 BINDUNG VON LBP-GFP_{His} AN DIE ZELLMEMBRAN

Die Untersuchungen zur Interaktion von LBP-GFP_{His} mit der Zellmembran erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Dafür musste zunächst die LBP-GFP_{His}-Fusionsvariante an die Zellmembran der HEK293-TLR4/MD-2 Zellen gebunden werden. Um die Konzentration an LBP-GFP_{His} vor der Bindung zu erhöhen, wurde eine Aufkonzentration

der aufgetauten Probe durchgeführt. Dazu wurden 3 mL des LBP-GFP_{His} Zellkulturüberstandes in Gewindeflaschen aus Glas überführt und bei 35°C mit der Speed Vac eingengt. Die Aufkonzentration wurde durchgeführt, bis das Volumen auf 1 mL reduziert war. Anschließend wurde der eingengte Kulturüberstand bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Als negativ-Kontrolle zu den LBP-GFP_{His} Proben wurde Panserin, das Expressionsmedium der LBP-GFP_{His} Kultur, gleichermaßen behandelt und gelagert. Zur Untersuchung der LBP-GFP_{His} Bindung wurden die Zellen mit 1,5 mL Az-PBS in Falcon-Röhrchen aufgenommen, gewaschen (vortexen) und bei 4°C für 5 min mit 1400 U/min zentrifugiert. Die optimale Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Röhrchen wurde in Vorversuchen ermittelt. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µL DMEM aufgenommen und mit 100 µL LBP-GFP_{His} für 15 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das nicht gebundene LBP-GFP_{His} durch Zentrifugation bei 4°C für 5 min mit 1400 U/min von den Zellen abgetrennt. Das Zellpellet wurde im Anschluss zweimal mit 1,5 mL Az-PBS gewaschen (vortexen + zentrifugieren) und der Überstand jeweils verworfen. Die Zellen, mit dem gebundenen LBP-GFP_{His}, blieben als Pellet zurück.

3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen einer Suspension aufgrund morphologischer Unterschiede, wie Größe und Granularität, voneinander unterschieden werden können. Des Weiteren können mit einem Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben detektiert werden. Für die Fluoreszenzmessung werden die zu vermessenden Zellen mit entsprechenden Farbstoffen markiert.

Die Messung beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung von Zellen in Suspension mittels einer Trägerflüssigkeit. Die vereinzelt Zellen passieren dann in einer Messküvette einen Laserstrahl. So wird jede in der Probe enthaltene Zelle einzeln analysiert. Trifft ein Laserstrahl auf eine Zelle, wird das Licht beim Auftreffen gestreut. Es entstehen Vorwärtsstreulicht (forwardscatter, FSC), welches ein Maß für die relative Größe ist, und Seitenstreulicht (sidescatter, SSC), welches Informationen zur Zellgranularität liefert. Trifft der Laserstrahl auf einen gebundenen Farbstoff, wird ein Teil der Lichtenergie vom Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzstrahlung höherer Wellenlänge emittiert. Ein komplexes System aus Linsen, Spiegeln und Detektoren sammelt diese Informationen und gibt diese an einen Computer weiter.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Gerät des Herstellers Becton Dickinson verwendet. Die vorbereiteten Proben wurden als Zellpellets zum Durchflusszytometer transportiert. Dabei befanden sich die Probenröhrchen stets in einem Eisbad. Vor der Messung wurde das Zellpellet in 200 μ L Az-PBS + 2 % FCS aufgenommen. Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass ein Durchfluss von 800 Zellen/s nicht überschritten wurde. Additive, wie Trypanblau oder Propidiumiodid, wurden nach einer ersten durchgeführten Messung zugegeben und die Probe dann erneut gemessen. Die zu verwendenden Konzentrationen dieser Additive wurden in Vorversuchen ausgetestet. Die Messung der Grünfluoreszenz, für die AK-Färbung und LBP-GFP_{His}-Färbung, erfolgte auf dem Kanal FL1, die Messung der orangenen Fluoreszenz, für die Propidiumiodid-Färbung, auf Kanal FL3. Für die Messungen wurde das Programm „CellQuest Pro 6.0“ verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „*Flowing Software 2.5.0*“.

3.5 INTEGRITÄTSPRÜFUNG DER ZELLMEMBRAN MIT PROPIDIUMIODID

Eine Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche die Zellinhalte nach außen abgrenzt. In der Regel sind diese Membranen semipermeabel.

Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) wirkt als Nukleinsäureinterkalator. Bei 499 nm hat PI sein Absorptionsmaximum und emittiert daraufhin Licht der Wellenlänge 590 nm. Es interkaliert in die DNS bzw. RNS von Zellen mit rupturierter oder perforierter Zellmembranen. So kann PI zur Untersuchung der Membranintegrität verwendet werden. Intakte Membranen kann PI nicht passieren, so dass Zellen mit intakter Membran kein Fluoreszenzsignal abgeben. In der Durchflusszytometrie kann so untersucht werden, ob die verwendeten Zellen Beschädigungen der Membranen aufweisen.

Für diesen Test wurden die in Falcon-Röhrchen vorbereiteten Zellpellets in Az-PBS + 2 % FCS resuspendiert und gemessen. Danach folgte die Zugabe von 20 μ L einer Propidiumiodidlösung mit $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ (entspricht $2 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen). Die Messung erfolgte direkt im Anschluss auf Kanal FL3.

4. ERGEBNISSE

Für die Veranschaulichung der Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die Zweiparameterdarstellung als „Punktdarstellung“ (*Dot Plot*) gewählt. Dabei lassen sich die Verteilung von Populationen und die Korrelation der Parameter gut darstellen.

Bei der Quadrantenauswertung in der Darstellung von FSC gegen die Fluoreszenz (Kanal FL1) wurde darauf geachtet, dass der prozentuale Anteil, der gemessenen und ungefärbten Zellen, im oberen rechten Quadranten (rechts oben - RO) ca. 1 % betrug. Dadurch wurden die Berechnungen der Fluoreszenzabnahme unterschiedlicher Versuche miteinander vergleichbar.

4.1 FÄRBUNG DER TLR4-REZEPTOREN AN HEK293-TLR4/MD-2 ZELLEN

Für die Etablierung der Methode zur Protein-Lokalisation an der Zellmembran wurden die Parameter Zellzahl, Trypanblaukonzentration und Trypanblauvolumen in Vorversuchen optimiert. Dafür diente eine antikörpervermittelte Färbung des Oberflächenproteins TLR4. Für diese Versuche wurde aus der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 der Zellklon #33 verwendet.

Die Zellpellets wurden entsprechend Kapitel 3.2 hergestellt und wie in Kapitel 3.4 beschrieben gemessen. Die Färbung des TLR4-Rezeptors auf der Zelloberfläche erfolgte mittels eines monoklonalen anti-TLR4-Antikörpers und eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers (μM IgG-A488). Für die Fluoreszenzauslöschung wurden die AK-gefärbten Zellpellets unterschiedlich aufgenommen und gemessen. Als Kontrolle diente jeweils eine ungefärbte Probe. Diese wurde anstelle der AK mit Az-PBS + 2 % FCS inkubiert. Die Messung der Grünfluoreszenz erfolgte auf Kanal FL1.

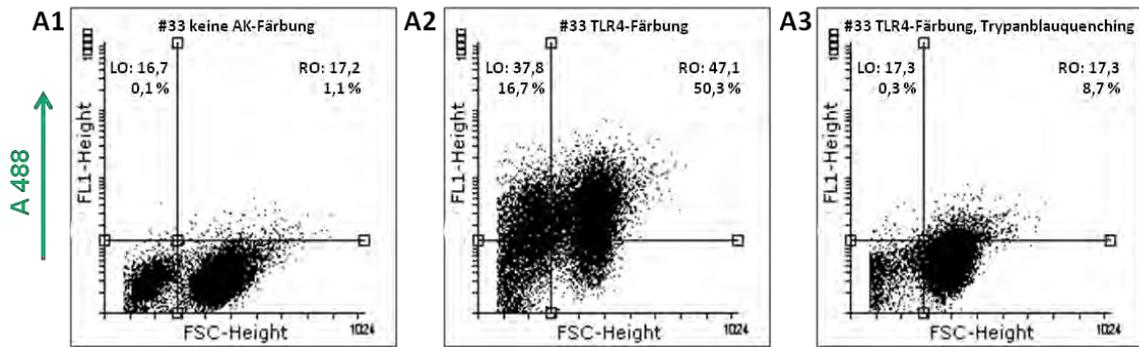


Abbildung 3: Dot Plot-Analyse der TLR4-Färbung und Fluoreszenzauslöschung durch Trypanblau an HEK293-TLR4/MD-2 #33

Dargestellt sind drei *Dot Plots* einer Antikörperfärbung für die Beurteilung der Effektivität des angewendeten Quenchings. Aufgetragen ist jeweils das Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen die Fluoreszenzintensität des Fluorochroms (FL1-Height). In diesem Versuch wurden für A1-A3 1×10^5 Zellen behandelt und 1×10^4 Zellen gemessen. A1: ungefärbte Zellen in 200 μ L Puffer resuspendiert, A2: mit 1. + 2. AK inkubierte Zellen in 200 μ L Puffer resuspendiert, A3: mit 1. + 2. AK inkubierte Zellen in 200 μ L Trypanblau (0,4 %) resuspendiert. Für die Auswertung sind in den oberen Quadranten (links oben-LO, rechts oben-RO) die mittlere Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) und der prozentuale Anteil der gemessenen Zellen angegeben.

In Abb. 3 ist exemplarisch eine Auswertung der Experimente zur Antikörperfärbung dargestellt. Es sind deutlich zwei Populationen zu erkennen, die sich durch unterschiedliche Signalstärken im *forwardscatter* unterscheiden. Die Berechnung der Fluoreszenzauslöschung erfolgt über den Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) der ungefärbten Kontrolle (A1) mit der Quenching-Probe (A3). Die ungefärbten Zellen zeigen im rechten oberen Quadranten ein *Y-Mean* von 17,2. Nach der AK-Färbung (A2) der Zellen steigt der Wert auf 47,1 an. Die Zugabe von Trypanblau bewirkt eine Fluoreszenzauslöschung und somit ein Sinken des *Y-Mean* auf 17,3. Daraus lässt sich ein Quenching-Effekt von 99 % zwischen der ungefärbten und der gequenchten Probe berechnen. Diese Auswertung lässt sich ebenso für den linken oberen Quadranten durchführen. Daraus ergibt sich für LO ein Quenching-Effekt von 97 %.

$$\text{Quenching-Effekt} = \frac{Y\text{-Mean (ungefärbt)}}{Y\text{-Mean (gefärbt+gequench)} } \cdot 100 \% \quad [1]$$

Aus den gesamten Analysen der AK-Färbung von TLR4 an der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2, mit anschließendem Quenching, ergaben sich für die Hauptversuche die folgenden optimierten Parameter:

- Zellzahl: 1×10^5 Zellen/FACS-Röhrchen

- Tb-Konzentration: 0,2 % (in 0,75 % NaCl)
- Tb-Volumen: 200 μ L
- die Resuspendierung der Zellen in Puffer und anschließendes Quenchen mit Tb beeinflusst den Quenching-Effekt nicht. Daher können bei den folgenden Versuchen die Zellen zuerst in Puffer resuspendiert und gemessen werden, dann mit Tb gequencht und wieder gemessen werden.

Im Anhang I. sind in den Tabellen 3-6 die Daten zu dieser Schlussfolgerung aufgeführt.

4.2 BINDUNG VON LBP-GFP_{His} AN HEK293-TLR4/MD-2 ZELLEN

Nach Festlegung der optimalen Parameter für die durchflusszytometrische Untersuchung zur Interaktion von LBP-GFP_{His} mit Zellmembranen, wurde in Experimenten die Bindung des Fusionsproteins an den Zellen der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 analysiert. Die Bindung von LBP-GFP_{His} an die Zellen erfolgte an Klon #33. Dabei wurden die Proben entsprechend Kapitel 3.3 vorbereitet und, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, gemessen.

Bei der *Dot Plot*-Darstellung werden unterschiedliche Darstellungen verwendet. Die Auftragung von Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen das Seitenstreulicht (SSC) erlaubt Aufschluss über Unterschiede in der Morphologie der analysierten Zellen. Wird der FSC gegen eine Fluoreszenz aufgetragen, kann eine detektierte Fluoreszenz der Zellen veranschaulicht werden. Des Weiteren können zwei unterschiedliche Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen werden. Daraus lassen sich, je nach Versuchsaufbau, Eigenschaften der analysierten Zellen ableiten.

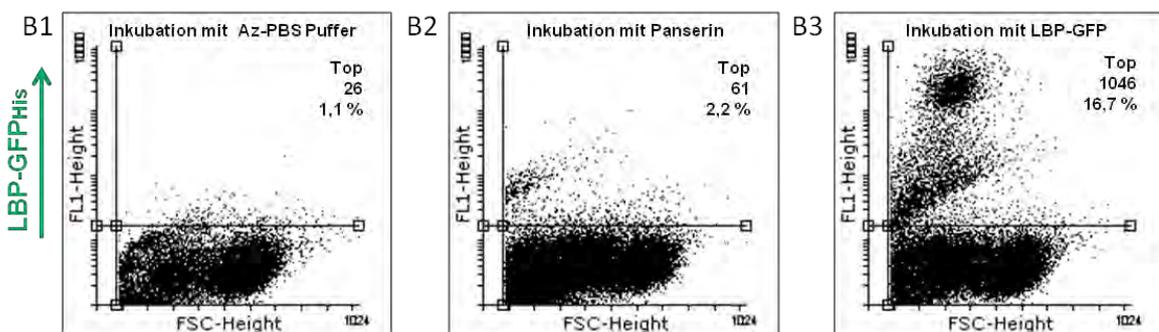


Abbildung 4: Dot Plot-Analyse der LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #33

Dargestellt sind drei *Dot Plots* eines Bindungsversuches von LBP-GFP_{His} an die Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2 #33. Aufgetragen sind jeweils das Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen die Fluoreszenz (FL1). Die Auswertung erfolgt über die gesamte obere Hälfte (*Top*). Dazu sind die mittlere Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) dieser Populati-

onen und der prozentuale Anteil an den gemessenen Zellen angegeben. B1: Zellen in Az-PBS + 2% FCS inkubiert, Messung in Az-PBS + 2% FCS. B2: Zellen in Panserin inkubiert, gemessen in Az-PBS + 2% FCS. B3: Zellen mit LBP-GFP_{His} inkubiert, Messung in Az-PBS + 2% FCS.

Abbildung 4 zeigt eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität zwischen der ungefärbten Kontrolle (B1) mit einem *Y-Mean* von 26 und der gefärbten, LBP-GFP_{His} gebundenen, Probe (B3) mit einem *Y-Mean* von 1046. Die 2. Kontrolle (B2), Panserin, weist mit einem *Y-Mean* von 61 ebenfalls einen geringen Wert, vergleichbar mit B1, auf. Panserin wurde als Kontrolle verwendet, da es als Expressionsmedium der LBP-GFP_{His} Kultur verwendet wurde. Der Anteil der Zellen, die nach LBP-GFP_{His} Bindung eine Erhöhung der Fluoreszenz aufweisen, vergrößert sich von 1,1 % (B1), bzw. 2,2 % (B2), auf 16,7 % (B3). Bei der Betrachtung der *Dot Plots* fällt auf, dass sich bei allen Proben zwei Populationen (Häufigkeitsverteilungen) von Zellen bilden. Diese Separation der Zellen wurde in weiteren Versuchen bestätigt. Daher musste geklärt werden aus welcher der beiden Populationen die Bindung von LBP-GFP_{His} erfolgte. Für diese Untersuchung wurde die *Dot Plot*-Darstellung von FSC gegen Kanal FL1 mit der *Dot Plot*-Darstellung FSC gegen SSC verglichen. Die Erstellung und farbliche Markierung einer LBP-GFP_{His}-positiven Region im FSC-FL1-*Dot Plot* kann, im genutzten Programm „Flowing Software 2.5.0“, mit der Darstellung des entsprechenden *Dot Plots* FSC-SSC verknüpft werden. Dadurch werden die Zellen innerhalb der kreierte Region auch in der FSC-SSC-Darstellung sichtbar und zeigen so die Herkunft der jeweiligen LBP-GFP_{His}-positiven Zellen. Um Aufschluss über die Selektivität der LBP-GFP_{His}-Bindung für die beobachteten Zellpopulationen zu erhalten, wurde für die Analyse zur LBP-GFP_{His}-Bindung und anschließendem Quenching bei weiteren Versuchen eine Separation der Populationen durchgeführt. Es wurden für jede Population die jeweilige gemessene Fluoreszenz und damit die LBP-GFP_{His}-Bindung getrennt ausgewertet. Für diese Unterteilung wurde jede LBP-GFP_{His}-Population entsprechend ihrer Zugehörigkeit entweder dem linken oder dem rechten Quadranten zugeordnet.

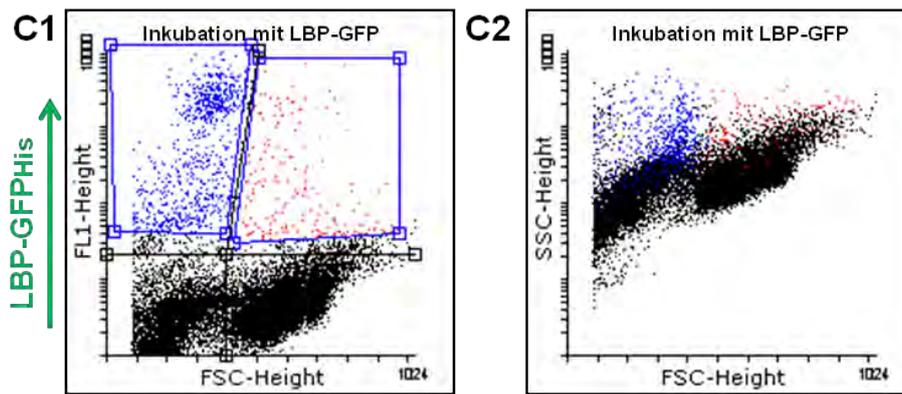


Abbildung 5: Dot Plot-Darstellungen zur Separation von LBP-GFP_{His}-gebundenen Zellen aus unterschiedlichen Populationen

Dargestellt sind zwei *Dot Plots* eines Bindungsversuches mit LBP-GFP_{His} an die Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2 #33. C1: Auftragung von Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen die Fluoreszenz (FL1) mit gekrümmter vertikaler Achse. Die Achse trennt die LBP-GFP_{His} Populationen unterschiedlichen Ursprunges voneinander. C2: Auftragung von FSC gegen Seitenstreulicht (SSC). Die in C1 markierten Zellen werden hier projiziert.

Abbildung 5 zeigt die Möglichkeit durch Krümmung der oberen vertikalen Achse die LBP-GFP_{His}-Populationen der jeweiligen Zellpopulation zuzuordnen. Für jedes Experiment muss die Krümmung der Achse neu festgelegt werden. Dazu wurden, wie in C1 gezeigt, Regionen kreiert und die Achse an der Stelle positioniert, an der sich die Populationen trennen. Dabei wurde die Trennung in der *Dot Plot*-Auftragung von FSC gegen SSC kontrolliert. Diese Methode sorgte bei der folgenden Analyse für eine Separation der LBP-GFP_{His}-positiven Zellen in linken und rechten Quadranten und ermöglichte gleichzeitig eine übersichtliche Darstellung.

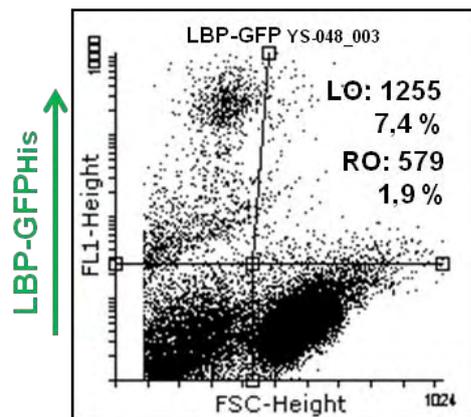


Abbildung 6: Dot Plot-Quadranten-Analyse einer Bindung von LBP-GFP_{His} an die Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2 #33

Dargestellt ist die *Dot Plot*-Auswertung eines Bindungsversuches von LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2. Aufgetragen ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen die Fluoreszenz (FL1). Die Darstellung veranschaulicht die beschriebene Methode zur Quadrantenauswertung, unter Nutzung einer gekrümmten vertikalen Achse. Für die

Auswertung der Quadranten werden die FL1-Intensität (*Y-Mean*) und der prozentuale Anteil der Zellen angegeben (LO-linker Quadrant oben; RO- rechter Quadrant oben).

In Abb.6 ist exemplarisch die Analyse der LBP-GFP_{His}-Bindung gezeigt. Die Graphen, welche für die zusammenfassende Auswertung herangezogen wurden, sind im Anhang II. Abb. 14, inklusive einer Wertetabelle (Tabelle 7), abgebildet. Die Zusammenfassung der Daten erfolgte, um die Bindung des LBP-GFP_{His} Proteins an die Zytoplasmamembran von HEK293-TLR4/MD-2 zu quantifizieren.

Zusätzlich zu #33 wurden Versuche mit Klon #15 der gleichen Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 durchgeführt. Diese Analyse sollte zeigen, ob die Bildung der beiden Zellpopulationen auf einen Klon zurückzuführen ist. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die beobachtete LBP-GFP_{His}-Bindung an einem zweiten Klon bestätigt werden kann und ob sich dabei Unterschiede in der prozentualen Bindungsstärke ergeben. Der Vergleich der zwei getesteten Klone, #33 und #15, zeigte keine Unterschiede in der Stärke der LBP-GFP_{His}-Bindung (vergl. Tabelle 7 im Anhang). Des Weiteren zeigt sich auch bei der Verwendung von #15 die Teilung der Zellen auf zwei Populationen (Anhang II. Abb. 15). Daher wurden in die zusammenfassende Auswertung der Bindungsversuche die Daten von #33 und #15 einbezogen.

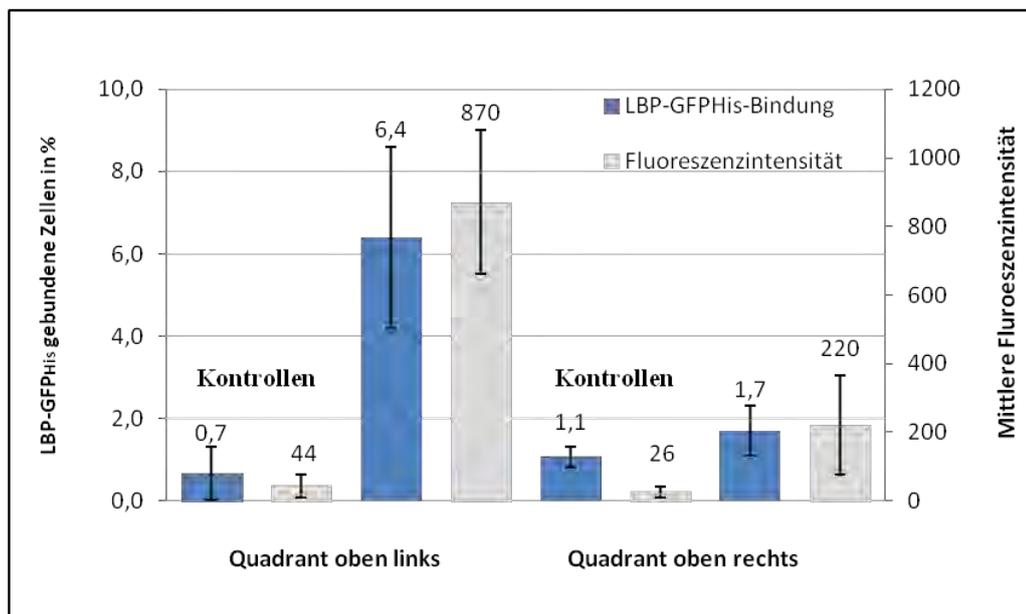


Abbildung 7: Analyse der LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2

Dargestellt ist die Auswertung der LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen von #33 und #15 aus unabhängigen Experimenten in einem Balkendiagramm. Die linke Achse zeigt die LBP-GFP_{His} gebundenen Zellen in % der gemessenen Zellen an. Die rechte Achse gibt die mittlere Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) wieder. Diese Auswertung bezieht sich auf 10 Bindungsversuche. Die Datenbeschriftung bezieht sich auf

die Balkenhöhe. Als Kontrollen wurden Mittelwerte der Panserin und ungefärbten Daten gebildet.

Für die Auswertung der Bindungsversuche von LBP-GFP_{His} ergab sich für den prozentualen Anteil der gemessenen Zellen mit LBP-GFP-Bindung der Mittelwert von 6,4 %, mit einer Standardabweichung von 2,2, für den linken oberen Quadranten. Der Mittelwert von 1,7 %, mit einer Standardabweichung von 0,6, wurde für den rechten oberen Quadranten ermittelt. Für das mittlere Fluoreszenzsignal dieser Populationen wurde für den linken oberen Quadranten ein *Y-Mean* von 870, mit einer Standardabweichung von 210, und für den rechten oberen Quadranten ein *Y-Mean* von 220, mit einer Standardabweichung von 144, festgestellt. Die Intensität des Fluoreszenzsignals entspricht dabei der Menge an zellgebundenem LBP-GFP_{His}. Obwohl der prozentuale Anteil der LBP-GFP_{His} gebundenen Zellen der Proben mit 1,7 % für RO ähnlich zu dem Kontrollwert von 1,1 % war, kann die Bindung des Fusionsproteins bestätigt werden, da sich das Fluoreszenzsignal von einem *Y-Mean* von 26 für die Kontrolle auf ein *Y-Mean* von 220 für die Probe erhöhte.

4.3 PRÜFUNG DER MEMBRANINTEGRITÄT MIT PROPIDIUMIODID

Ein auffallend kleineres FSC/SSC Signal einer Zellpopulation tritt häufig bei abgestorbenen/toten Zellen auf. Durch die Kondensation des Zytoplasmas kommt es zu einer Abnahme der Zellgröße, daher werden derartige Zellen als Zellschrott detektiert. Die Trennung der gemessenen Zellen in zwei Zellpopulationen legt daher nahe, die Membranintegrität zu prüfen. LBP interagiert als membranaktives Protein mit den Oberflächenrezeptoren von Zellen. Für die Bindung von LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen ist die Membranintegrität daher ein wichtiges Bewertungskriterium, da die angestrebte Charakterisierung der Orientierung von LBP-GFP_{His} beim Einbau in die Zellmembran durch Schädigungen der Membran beeinflusst werden könnte. Die in 4.2 dargestellten Ergebnisse zeigen zwei Häufigkeitsverteilungen der Zellen. Aus diesem Grund wurde eine Überprüfung der Membranintegrität durch Propidiumiodid-Färbung durchgeführt.

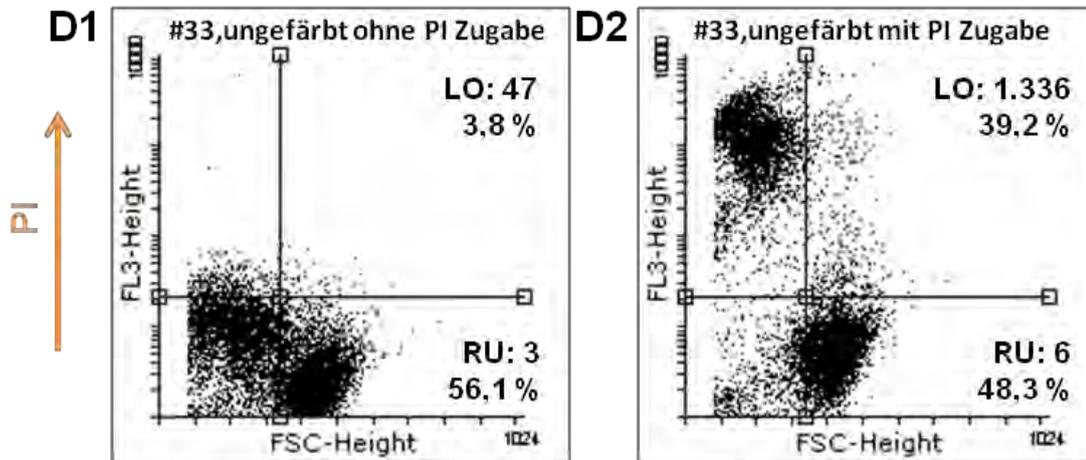


Abbildung 8: Dot Plot-Analyse einer Propidiumiodid-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 #33 zur Prüfung der Membranintegrität

Dargestellt sind zwei *Dot Plots* der ungefärbten (HEK293-TLR4/MD-2 ohne LBP-GFP_{His} Bindung) und PI gefärbten #33 Zellen. Es sind jeweils FSC gegen die Fluoreszenz (Kanal FL3) aufgetragen. Die Datenanalyse zeigt die Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) und den prozentualen Anteil der gemessenen Zellen jeweils im linken oberen (LO) und im rechten unteren (RU) Quadranten. D1: Messung der ungefärbten #33 Zellen. D2: Messung der ungefärbten #33 Zellen aus D1 nach Zugabe von 20 μ L PI-Lösung, $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$. Der Quadrant wurde so gesetzt, dass er die linke und rechte Population voneinander teilt.

In Abbildung 8 wird eine deutliche Reaktion auf das zugegebene PI sichtbar. Dabei ist gut zu erkennen, dass die Zellen der linken Population von D1 zu D2 deutlich an Fluoreszenz zunehmen, von 47 (D1) auf 1.336 (D2), und dabei fast komplett den unteren Quadranten verlassen. Im Vergleich dazu, blieb die Intensität der rechten Population, mit 3 (D1) und 6 (D2) fast konstant. Es ließ sich eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 28 für die linke Population berechnen. Daher kann ausgesagt werden, dass ein PI-Einstrom hauptsächlich in die Zellen der linken Zellpopulation stattfindet. In dem Quadranten RU reduzierte sich der Zellanteil von 56,1 % (D1) auf 48,3 % (D2). Demnach haben 7,8 % der gemessenen, und im unteren rechten Quadranten gezählten, Zellen der rechten Zellpopulation PI aufgenommen. Hingegen erhöhte sich der Anteil der linken Zellpopulation im Quadranten LO von 3,8 % (D1) auf 39,2 % (D2). Daraus resultiert, dass 35,4 % der gemessenen Zellen, welche der linken Zellpopulation zugeordnet werden, einen PI aufnehmen.

Die Populationsauftrennung konnte für beide untersuchten Klone gezeigt werden. Die Ursache dafür könnte in der Behandlung der Zellen bei der Versuchsdurchführung liegen. Kritische Schritte sind dabei das Ablösen der Zellen von der Kulturflasche, die Behandlung der Zellen während der Färbeprozedur (vortexen) oder die Aufnahme der Zellen in Az-PBS. Daher wurden diese möglichen Ursachen genauer untersucht.

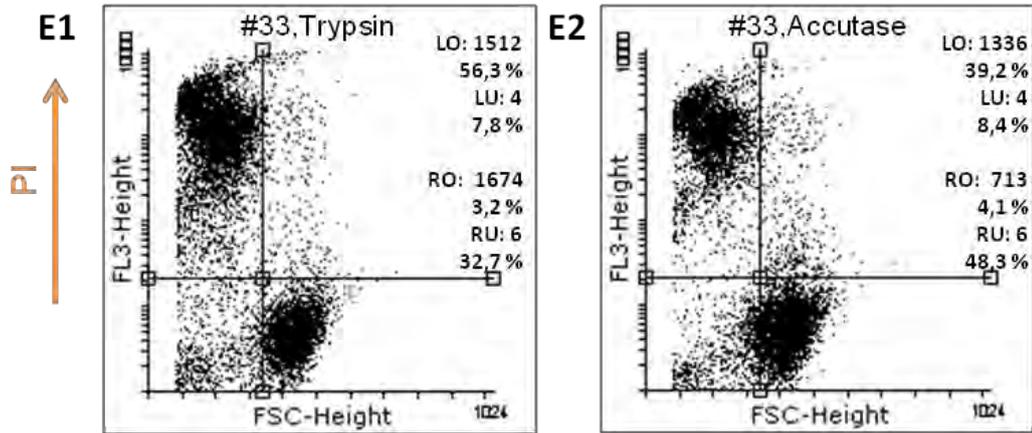


Abbildung 9: Dot Plot-Analyse einer Propidiumiodid-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 #33 zur Prüfung der Membranintegrität: Vergleich des Einflusses von Trypsin- und Accutasebehandlung

Dargestellt sind zwei *Dot Plots* der ungefärbten #33 Zellen nach PI-Zugabe. Aufgetragen sind jeweils FSC gegen Kanal FL3. Bei E1 wurde zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen ein Trypsin/EDTA Gemisch verwendet. Bei E2 wurde dazu Accutase verwendet. Für die Datenanalyse sind in mittlere Fluoreszenzintensität (Y-Mean) und der prozentuale Anteil der gemessenen Zellen für die rechten und linken oberen Quadranten angegeben.

In Abbildung 9 ist der Vergleich von Trypsin und Accutase, zum Ablösen der Zellen, in einer *Dot Plot*-Analyse dargestellt. Es lässt sich nur ein geringer Unterschied im PI-Einstrom feststellen. Bei beiden Methoden bleibt die rechte Population innerhalb des rechten unteren Quadranten. Die linke Population zeigt in beiden Abbildungen eine vergleichbar hohe FL3-Fluoreszenz. Allerdings unterscheidet sich das Größenverhältnis der Populationen im Vergleich von E1 zu E2. Die rechte Population, mit einem geringeren Anteil an PI-positiven Zellen, ist in E1 (RU) 32,7 % stark, in E2 (RU) hingegen 48,3 % stark. Im Anhang ist unter III. Abb. 16 das Ergebnis der PI-Färbung von #33 und #15 vergleichend abgebildet. In dieser Darstellung wird auch zwischen der Verwendung von Trypsin und Accutase unterschieden. Die Auswertung dieser unabhängigen Versuche zeigt keinen Unterschied bei der Behandlung von Zellen mit Trypsin und mit Accutase.

Tabelle 1: Zusammenfassung der *Dot Plot*-Analysen mehrerer Versuche zur PI-Färbung von HEK293-TLR4/MD-2 Zellen

Dargestellt sind die *Dot Plot* Analysen aus vier Experimenten mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur. Dabei wurden die Klone #33 und #15 ausgewertet. Abgelöst wurden die Zellen mit Accutase. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich Mittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Parameter der Quadrantenanalyse. Aus diesen Daten wurde die Fluoreszenzerhöhung (LO-LU; RO-RU) berechnet.

Ink. Temp. °C	Klon #	LU %	LU Y-Mean	RU %	RU Y-Mean	LO %	LO Y-Mean	RO %	RO Y-Mean	LO-LU Y-Mean	RO-RU Y-Mean
Eis	33	2,6	12	46,2	5	45,5	335	5,7	329	324	324
Eis	33	8,4	4	48,3	6	39,2	1336	4,1	713	1332	707
Eis	15	18,4	7	40,8	8	35,5	419	5,3	246	413	239
Eis	15	2,6	7	68,5	6	24,6	838	4,3	883	831	877
Eis	15	3,9	14	58,1	7	35,0	744	3,1	660	731	653
RT	15	22,3	5	39,6	8	33,4	772	4,7	374	767	366
RT	15	7,0	6	73,9	5	12,7	700	6,4	499	694	494
37°C	15	11,9	6	67,4	5	15,1	722	5,6	480	716	475
37°C	15	24,2	4	27,1	6	45,1	724	3,7	547	720	541
Mittelwert		11,3	7,1	52,2	6,2	31,8	732,2	4,7	525,7	725,2	519,5
Standardabweichung		8,4	3,3	15,7	1,2	11,9	281,5	1,1	201,2	283,1	201,5

Die Daten aus der PI-Färbung wurden zusammengefasst, um den PI-Einstrom in Zellen der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 Klon #33 und #15 und den prozentualen Anteil der PI-positiven Zellen zu quantifizieren.

Aus Tabelle 1 wird deutlich, dass die Daten zum PI-Einstrom unterschiedlich sind. Die Standardabweichungen der Fluoreszenzerhöhung der linken und rechten Quadranten entsprechen mit 283,1 (LO-LU) und 201,5 (RO-RU) ca. 2/5 der entsprechenden Mittelwerte (525,7 für LO-LU; 519,5 für RO-RU). Des Weiteren wird deutlich, dass der Anteil an PI-positiven Zellen, welche aus der linken Zellpopulation stammen, mit durchschnittlich 31,8 % (Mittelwert LO) sehr hoch ist. Im Vergleich zeigen nur durchschnittlich 4,7 % (Mittelwert RO) der gemessenen Zellen, welche zu der rechten Zellpopulation gehören, eine PI-Aufnahme. Diese Prozentangaben beziehen sich auf die gesamten 10.000 gemessenen Zellen. Bei der separaten Betrachtung der linken und rechten Quadranten wird das Ergebnis noch deutlicher. In den linken Quadranten befinden sich 43,1 % (11,3 % + 31,8 %; LU + LO) der Zellen (entspricht 4310 Zellen). Im Quadranten LO werden, bei 10.000 gemessenen Zellen, 3180 Zellen detektiert. Daraus ergibt sich, dass 74 % der Zellen aus der linken Population PI aufnehmen. Für die rechten Quadranten ergibt sich ein gesamter Prozentsatz von 56,9 % (52,2 % + 4,7 %; RU + RO) und damit eine Zellzahl von 5690, von denen 470 Zellen PI aufnehmen. Daraus wird ein Prozentsatz von 8 % PI-positiver Zellen für die rechte Population berechnet.

Um Informationen über den Zusammenhang zwischen der LBP-GFP_{His} Bindung und dem PI-Einstrom zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, in denen nach der LBP-GFP_{His} Bindung eine PI-Färbung durchgeführt wurde.

Für die Auswertung der Propidiumiodid-Färbung der LBP-GFP_{His}-Proben wurde zum einen der gesamte LBP-GFP_{His}-positive Bereich, ab einer Grünfluoreszenz mit einem X-Mean von 10 (Bereich aus Daten der LBP-GFP_{His} abgelesen), als Region 1 markiert. Zum anderen wurde jene LBP-GFP_{His}-positive Population als Region 2 markiert, welche sich in einem FL1-Bereich ab einem X-Mean von 500 befindet.

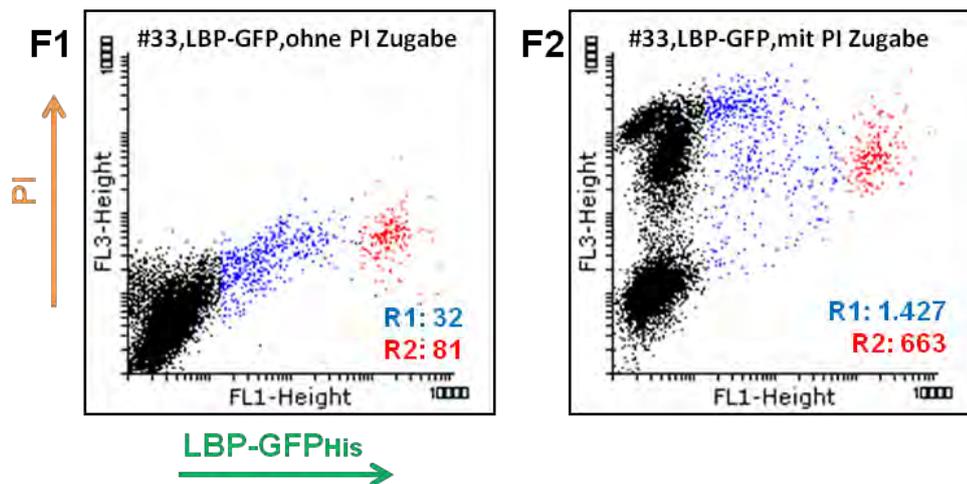


Abbildung 10: Dot Plot-Darstellung einer Propidiumiodid-Färbung nach LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #33

Dargestellt sind zwei *Dot Plots* der LBP-GFP_{His} gefärbten #33 Zellen. Es sind jeweils Kanal FL1 gegen die Kanal FL3 aufgetragen. Die Datenanalyse zeigt die FL3 Fluoreszenzintensität (Y-Mean) für die kreierten Regionen R1 (blau) und R2 (rot). F1: Messung der LBP-GFP_{His}-gefärbten #33 Zellen auf Kanal FL3. F2: Messung der LBP-GFP_{His}-gefärbten #33 Zellen aus F1 nach Zugabe von 20 µL PI-Lösung, $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$.

In den *Dot Plots* aus Abbildung 10 sind zwei Fluoreszenzen, Kanal FL1 gegen Kanal FL3, gegeneinander aufgetragen. Dadurch kann gezeigt werden, ob die Populationen keine, eine einfache (FL1 oder FL3) oder eine doppelte Fluoreszenz (FL1 und FL3) besitzen. Es fällt auf, dass sich die FL3 Fluoreszenz nach PI-Zugabe (beim Vergleich von F1 zu F2) deutlich erhöhte. So befinden sich in F1 die Zellen hauptsächlich unterhalb eines FL3 Y-Mean von 200. Nach Zugabe von PI, in F2, befindet sich der Hauptteil der Zellen deutlich oberhalb eines FL3 Y-Mean von 200. Für die Region 1 lässt sich eine Fluoreszenzverstärkung um 1.395, Y-Mean-Differenz von F1 zu F2 berechnen. Das entspricht einem Faktor von 44. Region 2 zeigt eine Fluoreszenzverstärkung um 582 und somit einem Faktor von 7. Daraus ergibt sich, dass beide LBP-GFP_{His}-positiven Populationen PI aufgenommen haben, allerdings in einem unterschiedlich starken Um-

fang. Die Analyse der PI-Färbung der Bindung von LBP-GFP_{His} an Zellen des Klons #15 erbrachte ähnliche Ergebnisse (Anhang III. Abb. 17).

4.4 FLUORESZENZAUSLÖSCHUNG VON EXTRAZELLULÄREM GFP DURCH TRYPANBLAU

Die Detektion der GFP-Fluoreszenz aus der Bindung von LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen gibt Aufschluss über die Intensität der Interaktion des Fusionsproteins mit den Zellen. Nur aufgrund der Fluoreszenzerhöhung kann jedoch noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Protein aufgenommen oder in die Membran eingebaut wurde. Es kann ebenfalls nicht zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Fluoreszenz unterschieden werden. Für diese Unterscheidung wurde die Fluoreszenzauslöschung von extrazellulärem GFP durch Trypanblau untersucht. Durch die Zugabe von Trypanblau sollte die Fluoreszenz von membrangebundenem LBP-GFP_{His}, welches sich auf der Außenseite der Membran befindet, ausgelöscht werden. LBP-GFP_{His}, welches sich auf der Innenseite der Zellmembran befindet, sollte dabei nicht beeinflusst werden und daher weiterhin die GFP-Detektion ermöglichen. Über das Verhältnis aus Gesamtfluoreszenz und intrazellulärer Fluoreszenz sollte so eine Aussage zur Lokalisation von LBG-GFP_{His} getroffen werden.

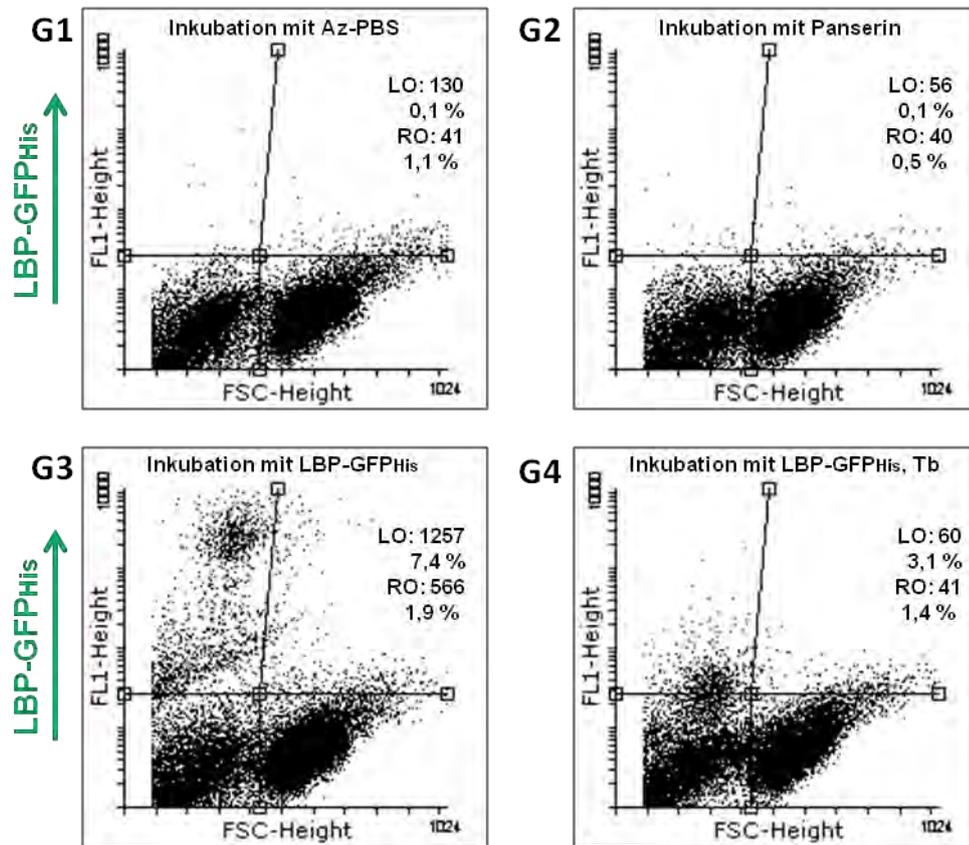


Abbildung 11: Dot Plot-Analyse einer Fluoreszenzauslöschung von extrazellulär gebundenem LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2 #33

Dargestellt sind vier *Dot Plots* eines Bindungsversuches von LBP-GFP_{His} an die Zellmembran von Klon #33 mit anschließendem Trypanblau-Quenching. Aufgetragen sind jeweils FSC gegen Kanal FL1. G1: Inkubation der Zellen mit Az-PBS + 2 % FSC Puffer, 1. Kontrolle. G2: Inkubation der Zellen in Panzerin, 2. Kontrolle. G3: Inkubation der Zellen mit LBP-GFP_{His}. G4: Inkubation der Zellen mit LBP-GFP_{His} (Probe aus G3), nach Messung: Zugabe von 200 µL Trypanblau (0,2 % Tb). Aus der Analyse sind jeweils die FL1-Fluoreszenz (*Y-Mean*) und die prozentuale Häufigkeit der linken (LO) und rechten (RO) oberen Quadranten angegeben.

In Abbildung 11 ist exemplarisch eine Analyse des Trypanblau-Quenchings dargestellt. Die in G1 und G2 abgebildeten *Dot Plots* stellen die Autofluoreszenz der HEK293-TLR4/MD-2 Zellen dar. In G3 ist sehr gut zu erkennen, dass die Bindung von LBP-GFP_{His} zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenz führte. Für die oberen Quadranten ergibt sich ein Anstieg von *Y-Mean* von 1201 (LO) und 526 (RO) in Bezug auf die Panzerin-Kontrolle (G2). Die Darstellung der zwei Kontrollen (G1 und G2) zeigt, dass eine Inkubation mit Panzerin zu keiner FL1-Erhöhung führte und daher für die Berechnung der Fluoreszenzauslöschung der LBP-GFP_{His} Probe als Bezug verwendet werden kann. Dafür wurden die *Y-Mean* Werte der Panzerin-Kontrolle (G2) mit denen der gequenchten LBP-GFP_{His} Probe (G4) verglichen und daraus wurde der Quenching-

Effekt für die jeweilige Population berechnet. Es ergibt sich so, unter Verwendung der Formel [1] auf Seite 28, ein Quenching-Effekt von 93 % für die linke und 98 % für die rechte Population. Daraus resultiert eine fast vollständige Fluoreszenzauslöschung, allerdings etwas stärker für die rechte Population.

Auch bei den Experimenten zur Fluoreszenzauslöschung wurden die Daten für den Gebrauch von Trypsin und Accutase zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche miteinander verglichen. Für den in Abb.11 gezeigten Versuch wurde Accutase verwendet. Die Darstellung des Versuches, unter Verwendung von Trypsin, ist im Anhang IV Abb.18 dargestellt und zeigt keine Unterschiede zu dem Ergebnis mit Accutase. Auch in diesem Fall wurde eine fast vollständige Fluoreszenzauslöschung durch Trypanblau erreicht.

Tabelle 2: Übersicht über die Effektivität des Trypanblau-Quenchings

Dargestellt sind die Ergebnisse der *Dot Plot*-Analysen zur Fluoreszenzauslöschung des GFP durch Trypanblau. Die Auswertung bezieht sich auf die oberen beiden Quadranten der *Dot Plots*. Die Berechnung der Fluoreszenzauslöschung basiert auf den Daten der gequenchten LBP-GFP_{His}-Proben im Vergleich zu der ungefärbten Probe. Für die Berechnung wurde die Formel [1] auf Seite 28 verwendet.

Versuch	Probe	LO %	LO Y-Mean	RO %	RO Y-Mean	LO Auslöschung %	RO Auslöschung %
YS-048	Panserin	0,1	56,2	0,5	40,3		
	LBP-GFP _{His}	7,4	1256,8	1,9	566,2		
	LBP-GFP _{His} Tb	3,1	60,2	1,4	40,8	93,4	98,7
YS-059 /1	ungefärbt	0,3	20,6	0,9	15,2		
	LBP-GFP _{His}	7,7	807,6	1,9	180,8		
	LBP-GFP _{His} Tb	2,4	20,1	1,3	15,9	102,7	95,6
YS-059 /2	Panserin	0,8	17,8	1,1	14,6		
	LBP-GFP _{His}	10,0	724,0	1,6	180,8		
	LBP-GFP _{His} Tb	2,0	16,7	1,2	15,9	106,7	91,8
YS-062	Panserin	0,3	82,0	0,2	64,8		
	LBP-GFP _{His}	3,0	877,3	0,6	496,8		
	LBP-GFP _{His} Tb	2,0	79,6	0,2	76,8	103,0	84,3
Mittelwert						101,4	92,6
Standardabweichung						5,7	6,2

Aus Tabelle 2 ergibt sich für die Betrachtung der Quadranten aus mehreren unabhängigen Versuchen ein Unterschied in der Effektivität des Quenchings. Für den linken oberen Quadranten kann eine vollständige Auslöschung der GFP-Fluoreszenz, bei einem Mittelwert von 101,4 % mit einer Standardabweichung von 5,7, festgestellt werden. Für den rechten Quadranten war die gemessene Fluoreszenzauslöschung nicht ganz vollständig. Bei einer mittleren Effektivität von 92,6 % mit einer Standardabweichung von 6,2 wurde zwar der größte Anteil an GFP-Fluoreszenz ausgelöscht, aber ein Prozentsatz von fast 10 % war durch das Trypanblau nicht zu quench.

4.5 EINFLUSS DER INKUBATIONSTEMPERATUR AUF DEN QUENCHING EFFEKT

Die Temperatur hat auf molekulare Mechanismen in der Regel einen großen Einfluss. Um festzustellen welchen Einfluss die Temperatur auf die LBP-GFP_{His}-Aufnahme in die Zelle bzw. die Zellmembran hat, wurde eine 15 minütige Inkubation an HEK293-TLR4/MD-2-Zellen bei 0°C, 20°C (Raumtemperatur-RT) und 37°C vorgenommen. Mit Ausnahme der Inkubationstemperatur während der Bindung, wurde die Probenvorbereitung entsprechend Kapitel 3.3 durchgeführt. Mit diesem Versuchsaufbau sollte getestet werden, ob zum einen die Interaktion von LBP-GFP_{His} mit der Membran mit steigender Temperatur zunimmt. Zum anderen sollte geprüft werden, ob sich Unterschiede in der Lokalisation des LBP-GFP_{His} zeigen. Diese Unterschiede sollten durch voneinander abweichende Effektivität des Trypanblau-Quenchings verdeutlicht werden.

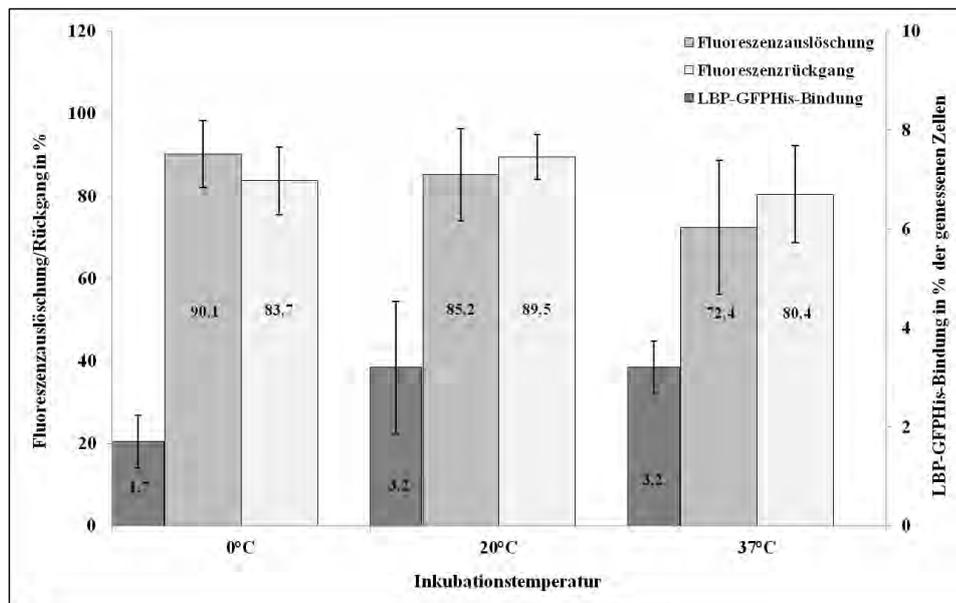


Abbildung 12: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die LBP-GFP_{His}-Bindung und den Trypanblau Quenching-Effekt

Dargestellt ist ein Balkendiagramm der *Dot Plot*-Auswertung aus Experimenten mit Variation der Inkubationstemperatur. Die Bindung von LBP-GFP_{His} erfolgte an HEK293-TLR4/MD-2 #33 und #15. Verglichen wurden die Mittelwerte aus vier Experimenten bei je drei verschiedenen Inkubationstemperaturen (0°C, RT, 37°C). Für jeden der dargestellten Mittelwerte wurde der Mittelwert aus vier Kontrollen (ungefärbt, ungefärbt + Tb, Panserin, Panserin + Tb) gebildet. Auf der Primärachse sind die Fluoreszenzauslöschung bzw. der Fluoreszenzrückgang in Prozent dargestellt. Fluoreszenzauslöschung bedeutet hier den Rückgang des *Y-Mean* Fluoreszenzsignals nach Tb-Quenching im Vergleich zu der Panserin Kontrolle. Fluoreszenzrückgang bedeutet hier den Rückgang des *Y-Mean* Fluoreszenzsignals nach Tb-Quenching im Vergleich zur

„nicht gequenchten“ Probe. Auf der Sekundärachse ist die LBP-GFP_{His}-Bindung in Prozent der gemessenen Zellen abgebildet. Des Weiteren sind bei allen Balken die Standardabweichungen eingezeichnet. Die Berechnungen basieren auf den Auswertungen der jeweils rechten oberen Quadranten der *Dot Plot*-Darstellungen.

Abbildung 12 zeigt für die untersuchten Temperaturen eine Abhängigkeit in der LBP-GFP_{His}-Bindung. Dabei wurde der Fokus auf den rechten oberen Quadranten gelegt, da bereits gezeigt werden konnte, dass diese Zellpopulation eine intakte Zytoplasmamembran besitzt. Bei 0°C haben im Durchschnitt 1,7 % der analysierten Zellen das Fusionsprotein gebunden bzw. haben dieses aufgenommen. Mit steigender Temperatur nahm die Bindungshäufigkeit zu. Bei RT und 37°C wurden im Durchschnitt 3,2 % der Zellen als LBP-GFP_{His}-positiv detektiert, womit sich die Häufigkeit der Interaktion fast verdoppelt hat. Bei der Fluoreszenzauslöschung ergaben sich ebenfalls temperaturabhängige Unterschiede. Bei 0°C konnten 90,1 % der GFP-Fluoreszenz durch Zugabe von Trypanblau ausgelöscht werden. Für die Inkubation bei RT fiel der Wert auf 85,2 % ab und bei 37°C wurde im Durchschnitt 72,4 % der Fluoreszenz gelöscht. Es ist also mit steigender Temperatur ein Rückgang der Quenching-Effektivität zu verzeichnen. Der Fluoreszenzrückgang ist eine weitere Charakteristik, die bei diesem Versuchsansatz untersucht wurde. Unter Fluoreszenzrückgang wird die Differenz der Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) in Prozent verstanden. Dabei wurde der *Y-Mean*-Wert der LBP-GFP_{His}-positiven Probe mit dem Wert nach *Tb-Quenching* verglichen.

$$\text{Fluoreszenzrückgang} = \frac{Y\text{-Mean (Quenching-Probe)} \cdot 100 \%}{Y\text{-Mean (ungequenchte Probe)}} \quad [2]$$

Für 0°C wurde ein Fluoreszenzrückgang von 83 % berechnet. Bei RT ergaben sich 89,5 % und für 37°C waren es 80,4 %. Aus diesen Mittelwerten lässt sich keine Temperaturabhängigkeit ableiten.

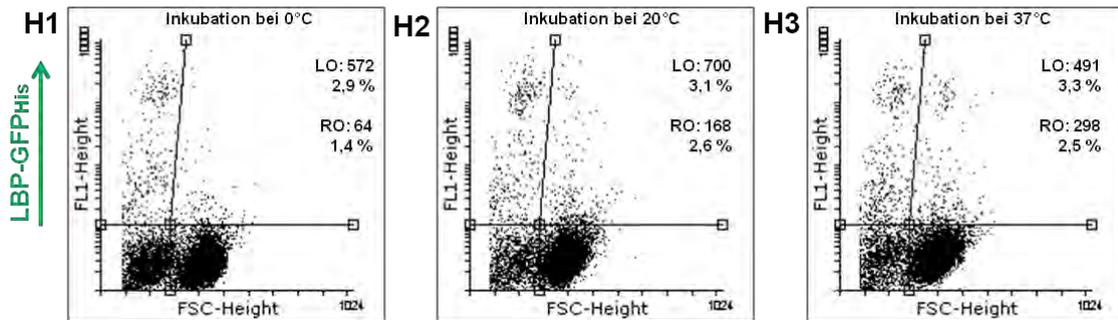


Abbildung 13: Vergleich der *Dot-Plots* bei Variation der Inkubationstemperatur

Dargestellt sind drei *Dot Plot*-Analysen mit unterschiedlicher Inkubationstemperatur (0°C, RT, 37°C) für die Bindung von LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2 #15. Aufgetragen sind jeweils FL1 gegen FSC. Für die Auswertung sind die Fluoreszenzintensität (*Y-Mean*) und die Häufigkeit der LBP-GFP_{His}-Interaktion mit den gemessenen Zellen für die oberen beiden Quadranten abgebildet.

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Zunahme der LBP-GFP_{His}-Interaktion mit Zellen von #15 bei steigender Inkubationstemperatur für die rechte Population. So steigt die prozentuale Häufigkeit der Interaktion von 1,4 %, bei 0°C (H1), auf 2,6 % bei RT (H2) und 2,5 % bei 37°C (H3). Im Gegensatz dazu zeigte die linke Population diese temperaturabhängige Steigerung nicht. Die Interaktion lag hier bei allen drei Temperaturen zwischen 2,9 % und 3,3 %.

5. DISKUSSION

Die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten zeigen, dass die LBP-GFP_{His}-Fusionsvariante an Zellen der Zelllinie HEK293-TLR4/MD-2 bindet. Es wurden für die Zellen zwei Häufigkeitsverteilungen (Populationen) festgestellt. Die LBP-GFP_{His}-Bindung konnte für beide Populationen nachgewiesen werden, wobei die linke Population mit durchschnittlich 6,4 % eine stärkere Interaktion zeigt. Für die rechte Population wurden durchschnittlich 1,7 % der Zellen als LBP-GFP_{His}-positiv detektiert (vergl. Abb.7). Damit ist die Bindung des Fusionsproteins an die Zellen der linken Population fast viermal stärker als an den Zellen der rechten Population. Die Unterschiede in der Stärke der Interaktion können unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der PI-Färbung erklärt werden. Für die linke Population wurden 74 % der Zellen und für die rechte Population 8 % der Zellen als PI-positiv detektiert. Da Propidiumiodid ausschließlich in Zellen mit beschädigten Membranen eindringen kann, zeigen die Versuche zur PI-Färbung, dass die linke Population in großer Zahl Beschädigungen an der Membran aufweist. Durch mögliche Risse oder Poren in der Membran, können Proteine wesentlich leichter mit der Zellmembran interagieren bzw. in das Zellinnere eindringen. Da die rechte Population kaum einen PI-Einstrom verzeichnet, kann die unterschiedliche Membranintegrität der Populationen als Ursache für die unterschiedlich starke Interaktion interpretiert werden. Der PI-Einstrom in die Zellen könnte allerdings auch die Folge der Bindung von LBP-GFP_{His} an die Zytoplasmamembran sein. Als membranaktives Protein könnte die Interaktion des Fusionsproteins Veränderungen an der Membran hervorrufen, die ihre Integrität beeinflussen. Diese mögliche Hypothese konnte mit den vorliegenden Daten nicht geprüft werden.

Die Entstehung von zwei so deutlich unterschiedlichen Populationen einer Zelllinie ist ungewöhnlich. Daher wurden zur Prüfung möglicher Ursachen verschiedene Versuchsansätze gewählt, um nach dem Ausschlussprinzip die Entstehung einzugrenzen. Dazu wurden Trypsin und Accutase, als Reagenzien zum Ablösen der Zellen von der Kulturf flasche, miteinander verglichen. Um auszuschließen, dass es sich um einen Zellklonspezifischen Effekt handelt, wurde die Bindung und PI-Färbung an zwei verschiedenen Zellklonen durchgeführt. Als eine weitere mögliche Ursache wurde die Verwendung von Az-PBS als Waschpuffer bei der Probenvorbereitung überprüft. Da Natriumazid ein bekanntes Zytotoxin ist, wurden Versuche durchgeführt, bei denen auf diesen Zusatz

verzichtet wurde (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Bei keiner der Untersuchungen konnte die Ursache der Zellseparation identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen. Diese Prokaryonten ernähren sich parasitär, wobei es bei ihrem Wirt zu Veränderungen im Stoffwechsel und somit im Wachstum kommt. Für eine derartige Infektion spräche die beobachtete Membranschädigung der Zellpopulation. Die Auswirkungen einer Mykoplasmeninfektion sind sehr vielfältig und reichen bis zu einer Erhöhung der Anfälligkeit für Mutationen, Transformationen und der vorzeitigen Apoptose (Institut für angewandte Zellkultur, München). Mykoplasmen benötigen für ihr Wachstum Cholesterin. Eine mögliche Hypothese ist, dass die Mykoplasmen das benötigte Cholesterin aus der Zellmembran der HEK293-TLR4/MD-2-Zellen verstoffwechseln. So würde die Fluidität und Integrität der Zellmembran gestört, was eine leichtere Passage für ansonsten nicht zugängliche Stoffe ermöglichen könnte. Zum anderen zeigt sich die klare Teilung der Population in den *Dot Plot*-Darstellungen von FSC gegen SSC. Für den Nachweis einer solchen Infektion kann eine Mykoplasmen-PCR im verwendeten Medium angewendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Untersuchung auf Mykoplasmen nicht mehr durchgeführt werden.

In einer anderen Untersuchung ist die Bindung und Analyse von LBP, an welches chemisch der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt wurde (LBP-A488), an HEK293-TLR4/MD-2-Zellen durchgeführt worden (Kopp, 2013-unveröffentlicht). Ein Vergleich der *Dot Plot*-Analysen aus der Arbeit von Kopp (2013) mit den hier dargestellten Ergebnissen weist auf Unterschiede im Mechanismus der Bindung der verwendeten LBP-Varianten an die Zellmembran hin. Bei Kopp ergibt sich eine gleichmäßige Bindung des LBP-A488 an die gesamte Zellpopulation, welche ebenfalls eine Teilung in zwei Zellpopulationen aufweist. Des Weiteren fällt auf, dass die LBP-A488-positiven Zellen keine erkennbaren Häufigkeitsansammlungen, im Vergleich zu LBP-GFP_{His}-positiven Zellen (vergl. Abb.13 H1-H3), ausbilden. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder die Art der Kopplung, chemisch oder genetisch fusioniert, oder der Farbstoff für Unterschiede in der Interaktion von LBP mit der Membran verantwortlich ist.

Die durchgeführten Quenching-Experimente, für die LBP-GFP_{His}-Inkubation bei 0°C, zeigten Unterschiede in der Effizienz der Fluoreszenzauslöschung. Aus Tabelle 2 ist für die linke Population eine vollständige Auslöschung, mit durchschnittlich 101,4 %, zu entnehmen. Alle prozentualen Angaben über 100 % sind für diesen Versuchsaufbau als

100 % und damit als vollständige Fluoreszenzauslöschung anzusehen. Diese Angaben ergeben sich aus den sehr geringen Werten für die Kontrollen. Die rechte Population zeigt im Durchschnitt eine Fluoreszenzauslöschung von 92,6 %. Für diese Population war daher 7,4 % des LBP-GFP_{His}-Proteins nicht durch das Trypanblau zu erreichen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich bei 7,4 % der Zellen das GFP auf der Innenseite der Zellmembran befand. Der Unterschied in der Fluoreszenzauslöschung ergibt sich aus den Unterschieden in der Membranintegrität. Zellen, deren Membranen einen PI-Einstrom zulassen, sind wahrscheinlich auch für Trypanblau zugänglich. Daher wird in diesen Zellen nicht nur das extrazelluläre, sondern auch das intrazelluläre GFP gequench und es ergibt sich eine vollständige Fluoreszenzauslöschung. Daher ist die linke Zellpopulation für die Bewertung der Interaktion und der Aussage zu einer Orientierung von LBP-GFP_{His} mit der Membran nicht relevant. Sie kann allerdings als ein „interner Standard“ zur Fluoreszenzauslöschung betrachtet werden. Durch die Membranschädigung der linken Population ist es vorstellbar, dass ein wesentlich höherer Anteil als 7,4 % an GFP intrazellulär vorliegt. Aber durch die Schädigung der Zytoplasmamembran kann der Nachweis nicht erfolgen. Für die Analyse der Bindung bzw. Interaktion des Fusionsproteins ist ausschließlich die Charakterisierung an intakten Zellmembranen sinnvoll. Daher wurde die linke Population nicht in die Bewertung mit einbezogen. Diese Art der selektiven Datenanalyse intakter Zellen zeigte, dass der Großteil (92,6 %) der GFP-Fluoreszenz auf der Außenseite der Membran vorliegt und nur ein kleiner Teil (7,4 %) intrazellulär lokalisiert ist. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei diesen Aussagen um die Position des GFP handelt. Es besteht die Möglichkeit, dass das LBP vollständig in die Membran integriert ist und nur das GFP an der Außenseite vorliegt. Genauere Rückschlüsse lassen sich hier nicht ziehen, da zwar bekannt ist, dass das GFP an das C-terminale Ende des LBP fusioniert wurde, allerdings befindet sich dieses zwischen den beiden Bindungsdomänen (vergl. Abb. 2). Das GFP ist mit 30 kDa ca. halb so groß wie das LBP (ca. 59 kDa). Wenn ein, im Verhältnis, so großes Protein fusioniert wird, muss dessen Größe bei der Betrachtung der möglichen Interaktionen berücksichtigt werden. Über die Proteinfaltung des GFP nach der Fusion an LBP gibt es keine Daten.

Aus den Experimenten zur Variation der Inkubationstemperatur lassen sich zwei Abhängigkeiten erkennen. Die Steigerung der Inkubationstemperatur erhöhte deutlich die prozentuale Bindung des Fusionsproteins an die rechte Zellpopulation (vergl. Abb.12).

Zum anderen sind molekulare Mechanismen, wie Stoffwechselwege temperaturempfindlich. Tiefe Temperaturen setzten grundsätzlich die zelluläre Kommunikation herab und zu hohe Temperaturen lassen Proteine denaturieren. Da 37°C die durchschnittliche menschliche Körpertemperatur darstellt, ist es verständlich, dass die meisten Proteine auch bei dieser Temperatur ihr Reaktions-Optimum haben. Dieser Effekt konnte für die linke Population nicht beobachtet werden. Diese Tatsache ist ein weiteres Anzeichen für eine Beschädigung der Membran. Eine weitere Abhängigkeit ist der Rückgang der Quenching-Effektivität in der rechten Zellpopulation. Mit steigender Temperatur konnte eine Reduktion der Fluoreszenzauslöschung festgestellt werden (vergl. Abb.12). Diese Beobachtung kann mit der Zunahme der Phagozytose-Geschwindigkeit erklärt werden. Bei Erhöhung der Temperatur findet die Phagozytose schneller statt. Das bedeutet zum einen, dass bei gleicher Inkubationszeit (in diesen Experimenten 15 min) mehr LBP-GFP_{His} mit den Zellen interagiert und zum anderen auch schneller aufgenommen wird. Daraus ergibt sich eine Erhöhung des intrazellulären, durch Phagozytose aufgenommenen, LBP-GFP_{His}. Für die intakten Membranen der rechten Population resultiert daraus ein geringerer Quenching-Effekt, weil mehr GFP intrazellulär vorliegt und somit für das Trypanblau nicht zugänglich ist.

Eine Aussage über die Lokalisation bzw. Orientierung des mLBP in der Membran erwies sich mit dem LBP-GFP_{His} als schwierig, da die genaue Position des GFP in Relation zu dem LBP nicht bekannt ist. Die vorliegenden Experimente bestätigen die Interaktion des Fusionsproteins mit der Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2. Allerdings ist eine Aussage über die Bindungsaffinität nicht einfach, da Teile der analysierten Zellen eine verminderte Membranintegrität aufwiesen. Es ist mit diesen Experimenten ebenfalls gelungen intrazelluläres LBP, welches durch Einbau in die Membran oder Phagozytose aufgenommen wurde, nachzuweisen. Es gibt allerdings keine Hinweise auf eine Unterscheidung zwischen LBP als Transmembranprotein oder als extrazelluläres Protein. In beiden Fällen wäre es möglich, dass das GFP extrazellulär, und damit quencherbar, vorliegt.

Die Eignung des FPP-Assays nach Lorenz, bzw. die hier verwendete Abwandlung, eignet sich grundsätzlich sehr gut um die Fluoreszenz des Fusionsproteins zu detektieren. Ein Durchflusszytometer ist wesentlich empfindlicher, als beispielsweise ein Fluoreszenzmikroskop. Ein Nachteil bei diesem Versuchsansatz ist die geringe Bindungsstärke des LBP-GFP_{His} an die Zellmembran. Um diese zu Erhöhen könnte der LBP-GFP_{His}

enthaltene Zellkulturüberstand noch weiter aufkonzentriert werden. In einem einzelnen Versuch wurde dies bereits getestet und die Bindungsstärke hat sich dabei im Vergleich zu den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen auch gesteigert. Allerdings muss dabei sichergestellt werden, dass das Fusionsprotein nicht ausfällt. Eine weitere Möglichkeit wäre das Senken der Zellzahl für die Probenvorbereitung. Je weniger Zellen in der Suspension, umso mehr Protein interagiert mit einer einzelnen Zelle. Bei zu geringen Zellzahlen wird die durchflusszytometrische Untersuchung allerdings wenig praktikabel, daher wurde in den Vorversuchen 1×10^5 als optimale Zellzahl bestimmt. Für die Quadrantenauswertung sind die geringen Fluoreszenzen der Kontrollen ein Nachteil. Da Unterschiede von wenigen relativen Einheiten im *Y-Mean* zwar einen mathematischen Einfluss haben können, z.B. bei der Berechnung der Fluoreszenzauslöschung, in Relation zu den maximalen Intensitäten von bis zu 1500 relativen Einheiten allerdings nicht zu beachten sind. Eine Erhöhung der zu messenden Zellzahl ist nicht sinnvoll, da mit Zunahme der Ereignisse auch die Messfehler steigen. Die Erhöhung der Fehlmessungen sollte unbedingt vermieden werden, da durch einzelne viel zu hohe Ereignisse eine ganze Probe nicht auswertbar werden kann.

Das größte Problem bei diesen Untersuchungen stellt jedoch die Teilung der Population dar. Dadurch kann weder auf die gesamte Bindungsstärke und somit Interaktionshäufigkeit geschlossen werden, noch ein wissenschaftlich gut zu bewertendes Resultat aus den Quenching-Versuchen gezogen werden. Dieses Problem ist wahrscheinlich, wie weiter oben in der Diskussion dargelegt wurde, kein methodisches Problem, sodass der FPP-Assay grundsätzlich als geeignet bezeichnet werden kann.

Eine andere Möglichkeit Protein-Interaktion mit einer Membran zu detektieren ist der *Förster resonance energy transfer* (FRET)-Assay. Dabei kommt es zur Übertragung von Energie eines angeregten Farbstoffes (Donor) auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor), die beide in der Zellmembran verankert vorliegen. Das LBP-GFP_{His} besitzt bereits ein fluoreszierendes Protein, also einen Donor. Für FRET-Untersuchungen mit dem LBP-GFP_{His} muss demnach ein passender Akzeptor gefunden werden. Aoki et al. (2006) nutzen einen FRET-basierenden Assay, um die Interaktion eines GFP-markierten DNA-bindenden Proteins mit der DNA zu untersuchen. Als Akzeptor wird dabei der Farbstoff Rhodamin verwendet. Die GFP-Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 400 nm, woraufhin eine Emission bei 530 nm detektiert wird. Nach Energietransfer auf Rhodamin emittiert dieses bei 590 nm. In der Arbeit von Aoki et al. (2006) wird allerdings diskutiert, dass diese Methode keinen absoluten Messwert für die Bindungsaffinität ei-

nes GFP-markierten Proteins hervorbringt. Es lassen sich aber zwei unterschiedliche Proteine, z.B. Wildtyp und Mutante, untersuchen. Daher kommt dieser Assay zurzeit noch nicht für Untersuchungen mit LBP-GFP_{His} in Frage.

Gutsmann et al. (2001) haben umfassende Untersuchungen zur Lokalisation von LBP in rekonstituierten Membranen, durch Messungen des Membranpotentials, publiziert. Darin zeigen sie eine transmembrane Ausrichtung von LBP in negativ geladenen Lipid-Doppelschichten. Es wird angenommen, dass dabei die N-terminale Domäne des LBP auf der als extrazellulär gestalteten Seite der Membran herausragt. Diese These wird durch die Arbeit von Roes et al. (2006) bestätigt. Darin wird gezeigt, dass transmembran, in mononuklearen Zellen, eingebautes LBP die LPS induzierte Zellaktivierung verstärkt. Diese Arbeiten postulieren zum einen die Existenz von transmembranem LBP und zum anderen eine mögliche immunologische Funktion des Proteins. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen zwar eine hohe Fluoreszenzauslöschung des GFP, und somit einen hohen Anteil extrazellulärem LBP, allerdings kann die Bindungsaffinität des LBP, durch die Fusion mit GFP, beeinträchtigt sein. Des Weiteren beschreiben Roes et al. (2006) einen Einbau des LBP als Transmembran-Molekül, bei dem ein Teil extrazellulär herausragt, erst für höhere LBP Konzentrationen. Bei geringen Konzentrationen ist auf der Membranoberfläche kein Hinweis für transmembranes LBP gegeben. In diesem Fall wäre auch eine vollständige LBP-Aufnahme in die Zelle denkbar. Diese vollständige Aufnahme kann mit der in dieser Arbeit durchgeführten Methode detektiert werden. Daher wäre es sinnvoll, die Experimente auf unterschiedliche LBP-GFP_{His}-Konzentrationen, bei physiologischen Inkubationstemperaturen, zu erweitern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgestellte Arbeit beschäftigte sich mit der Interaktion eines LBP-GFP-Fusionsproteins mit der Zellmembran von HEK293-TLR4/MD-2 Zellen. Dazu wurde das Protein an die Zellen gebunden und mittels Durchflusszytometrie die Bindung detektiert. Quenching-Experimente, durchgeführt bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen, sollten Aufschluss über die mögliche Orientierung des Proteins an der Membran liefern.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine GFP-Fusionsvariante des LBP an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen von unterschiedlichen Klonen bindet. Die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fluoreszenz des GFP durch Zugabe von Trypanblau ausgelöscht werden kann. Durch die beobachteten morphologischen Unterschiede in der untersuchten Zelllinie, veranschaulicht durch die PI-Färbung und die daraus resultierende unterschiedliche Membranintegrität, kann keine Aussage zur Bindungsstärke getroffen werden. Von den zwei gezeigten Häufigkeitsverteilungen (Populationen) kann nur eine (die rechte) für die wissenschaftlichen Zwecke dieser Arbeit ausgewertet werden. Die untersuchte Temperaturabhängigkeit, bezüglich des LBP-Einbaus in die Zellmembran, zeigt für 0°C, 20°C und 37°C Unterschiede in der Fluoreszenzauslöschung des GFP. Mit steigender Inkubationstemperatur sinkt der Anteil an gequenchem GFP. Daraus resultiert eine gesteigerte Membranintegration oder Aufnahme des Fusionsproteins mit steigender Temperatur.

Der Einbau von LBP in die Membran wird in einigen Forschungsarbeiten als transmembran beschrieben. Die vorliegende Arbeit kann diese Konformation in der Membran weder bestätigen noch widerlegen, da nicht sichergestellt ist, auf welcher Seite sich das GFP bei einer transmembranen Orientierung befinden würde.

7. AUSBLICK

Für künftige Arbeiten sollte zuerst die Herkunft der Separation der Zellen geklärt werden. Dafür empfiehlt es sich eine mögliche Infektion mit Mykoplasmen, beispielsweise durch eine PCR, zu prüfen. Im Falle eines positiven Ergebnisses, kann eine Behandlung mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin die Infektion beseitigen. Des Weiteren kann eine Annexin-V-Färbung Aufschluss darüber geben, ob die Zellpopulationen abgestorben oder nekrotisch sind. Wenn die Trennung der Zellen in zwei Populationen behoben werden kann, sollten die Versuche zur Temperaturabhängigkeit wiederholt werden, um daraus auch Aufschluss über die gesamte Bindungsstärke des LBP-GFP_{His} an die Zellmembran zu erhalten. Ebenfalls sollten Versuche mit erhöhter LBP-GFP_{His}-Konzentration durchgeführt werden. Roes et al. (2006) haben gezeigt, dass der LBP Einbau in die Membran von der LBP-Konzentration abhängig zu sein scheint. Diese These kann mit der verwendeten Variante des FPP-Assay geprüft werden. Des Weiteren empfiehlt sich die Untersuchung von Phagozytoseinhibitoren. Dadurch könnte geprüft werden, ob LBP-GFP_{His} in die Membran eingebaut wurde oder durch Phagozytose intrazellulär aufgenommen wurde. Unter Zugabe von Phagozytoseinhibitoren wäre, nach Quenching mit Trypanblau, die verbleibende Fluoreszenz auf jenes LBP-GFP_{His} zurückzuführen, welches in der Membran integriert wurde.

Eine weitere Möglichkeit die Membraninteraktion des Fusionsproteins zu untersuchen, sind durchflusszytometrische Untersuchungen unter Nutzung von Liposomen. Die Bindung von farbstoffmarkiertem LBP an große unilamellare Vesikel konnte in Experimenten bereits nachgewiesen werden (Kopp, mündliche Kommunikation). Dieser Versuchsaufbau ist wahrscheinlich auf LBP-GFP_{His} übertragbar.

8. ANHANG

I. AK-Färbung von TLR4-Rezeptoren

Tabelle 3: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von der Zellzahl

Die Tabelle zeigt die berechnete Fluoreszenzauslöschung durch den Einsatz von unterschiedlichen Zellzahlen. Die Tb-Konzentration und Tb-Volumina blieben konstant. Die Auswertung der Messdaten erfolgte für den rechten oberen Quadranten (RO).

Behandlung	Zellzahl	V Tb [μ L]	Tb Konz. [%]	V Puffer [μ L]	RT [%]	Y-Mean RT	Auslöschung [%]
ungefärbt	1x10e5	-	-	300	1,1	31,2	-
gefärbt	1x10e5	-	-	300	24,5	43,3	-
gefärbt	1x10e5	100	0,4	-	17,7	37,0	84
gefärbt	8x10e4	100	0,4	-	10,3	32,4	96
gefärbt	6x10e4	100	0,4	-	11,7	34,0	92
gefärbt	5x10e4	100	0,4	-	11,1	33,4	93

Tabelle 4: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von der Tb-Konzentration bei unterschiedlichen Zellzahlen

Die Tabelle zeigt die berechnete Fluoreszenzauslöschung durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Konzentrationen einer Trypanblau-Lösung. Beide Konzentrationen (0,4 und 0,2 %) wurden für drei Zellzahlen ausgetestet. Das Volumen der Trypanblau-Lösung blieb konstant. Die Auswertung der Messdaten erfolgte für den rechten oberen Quadranten (RO).

Behandlung	Zellzahl	V Tb [μ L]	Tb Konz. [%]	V Puffer [μ L]	RT [%]	Y-Mean RT	Auslöschung [%]
ungefärbt	1x10e5	-	-	300	1,1	23,3	-
gefärbt	1x10e5	-	-	300	49,1	45,8	-
gefärbt	1,0x10e5	300	0,4	-	10,0	21,9	107
gefärbt	1,5x10e5	300	0,4	-	9,2	21,8	107
gefärbt	2,0x10e5	300	0,4	-	9,4	21,7	107
gefärbt	1,0x10e5	300	0,2	-	6,1	20,9	112
gefärbt	1,5x10e5	300	0,2	-	6,6	21,2	110
gefärbt	2,0x10e5	300	0,2	-	7,4	21,2	110

Tabelle 5: Abhängigkeit der Fluoreszenzauslöschung von dem Tb-Volumen

Die Tabelle zeigt die berechnete Fluoreszenzauslöschung durch den Einsatz von unterschiedlichen Volumina einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung. Die Zellzahl blieb konstant. Die Auswertung der Messdaten erfolgte für den rechten oberen Quadranten (RO).

Behandlung	Zellzahl	V 0,4 % Tb [μ L]	V Puffer [μ L]	RT [%]	Y-Mean RT	Auslöschung [%]
ungefärbt	1x10e5	-	200	1,1	17,1	-
gefärbt	1x10e5	-	200	48,3	47,5	-
gefärbt	1x10e5	300	-	8,6	17,3	99
gefärbt	1x10e5	200	100	12,7	18,3	93
gefärbt	1x10e5	100	200	21,5	20,2	85
gefärbt	1x10e5	50	250	30,7	22,8	75
gefärbt	1x10e5	25	275	37,8	25,2	68
gefärbt	1x10e5	10	290	40,2	26,8	64

Tabelle 6: Einfluss der Applikationsreihenfolge von Tb-Lösung und Puffer auf die Fluoreszenzauslöschung

Die Tabelle zeigt die berechnete Fluoreszenzauslöschung AK-markierter Zellen durch die Zugabe von unterschiedlichen Volumina einer 0,4 %igen Tb-Lösung. Des Weiteren zeigt sie den Einfluss der Reihenfolge von Tb-Zugabe und Puffer-Zugabe. Bei den Messungen 3-5 wurden die Zellen in dem angegebenen Tb-Volumen resuspendiert. Danach folgte die Zugabe des Puffer-Volumens und die Messung. Bei Messung 6-8 erfolgte die Zugabe von Tb und Puffer in umgekehrter Reihenfolge. Die Auswertung der Messdaten erfolgte für den rechten oberen Quadranten (RO).

Messung	Behandlung	Zellzahl	V Tb [μ L]	Tb Konz. [%]	V Puffer [μ L]	RT [%]	Y-Mean RT	Auslöschung [%]
1	ungefärbt	1x10e5	-	-	300	1,1	17,1	-
2	gefärbt	1x10e5	-	-	300	48,3	47,5	-
3	gefärbt	1x10e5	200	0,4	100	12,7	18,3	93
4	gefärbt	1x10e5	100	0,4	200	21,5	20,2	85
5	gefärbt	1x10e5	50	0,4	250	30,7	22,8	75
6	gefärbt	1x10e5	50	0,4	250	34,3	23,5	73
7	gefärbt	1x10e5	100	0,4	200	26,9	20,9	82
8	gefärbt	1x10e5	200	0,4	100	13,6	18,0	95

II. Bindung von LBP-GFP_{His} an die Zellmembran

Tabelle 7: Übersicht der Auswertung der LBP-GFP_{His}-Bindungsversuche an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen aus unabhängigen Experimenten

Versuchsnr.	HEK293-TLR4/MD-2 YS-0	Klon #	LO		RO	
			Bindung in %	Y-Mean	Bindung in %	Y-Mean
46		33	5,4	1160	2,6	294
48		33	7,4	1255	1,9	579
59		15	10,1	732	1,5	170
59		15	7,8	803	1,8	174
61		15	4,6	824	1,2	251
62		33	3,8	717	1,6	133
62		15	6,8	667	1,1	137
63		15	8	837	2,9	256
64		15	2,8	589	1,5	62
65		15	7,4	840	1	147
		Mittelwert	6,4	842,4	1,7	220,3
		Standardabweichung	2,2	209,7	0,6	143,8

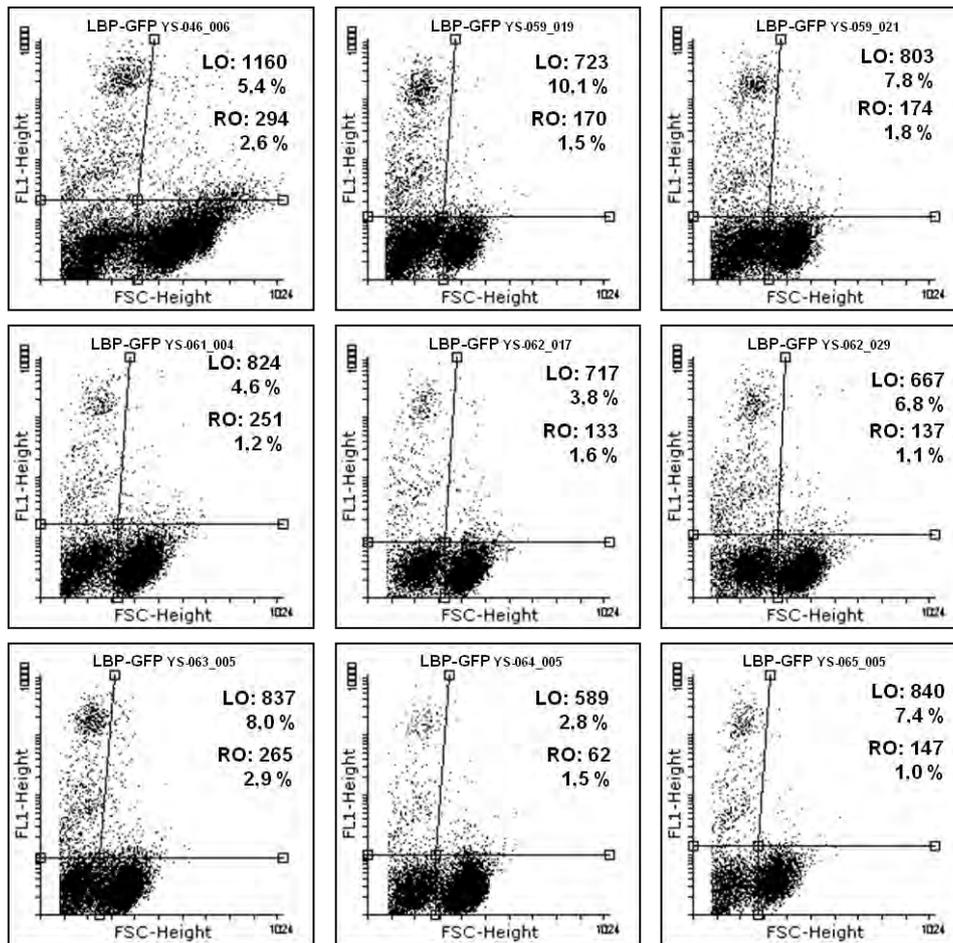


Abbildung 14: Übersicht über die *Dot Plot*-Analysen der LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 Zellen #15 und #33 aus unabhängig durchgeführten Experimenten

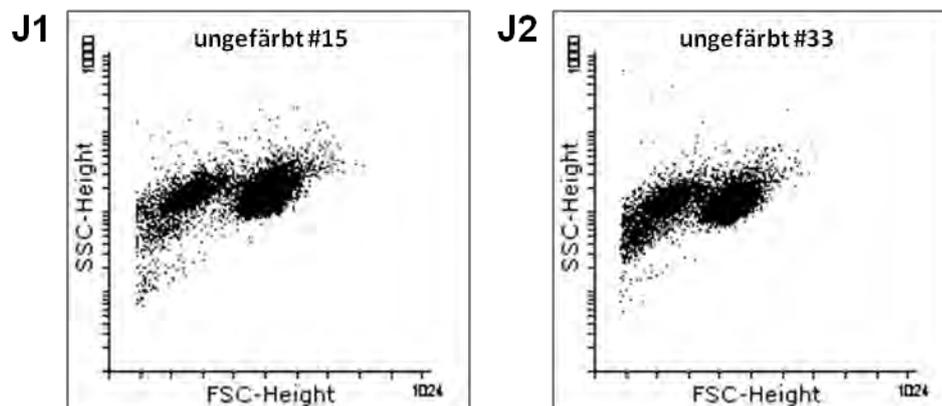


Abbildung 15: Vergleich der *Dot Plot*-Darstellung zweier Klone von HEK293-TLR4/MD-2 auf Bildung von Populationen

Dargestellt sind zwei *Dot Plots* der ungefärbten Zellen HEK293-TLR4/MD-2. Aufgetragen sind jeweils Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitenstreulicht (SSC). J1: Inkubation der Zellen von Klon #15 mit Az-PBS + 2 % FCS. J2: Inkubation der Zellen von Klon #33 mit Az-PBS + 2 % FCS.

III. Prüfung der Membranintegrität mit Propidiumiodid

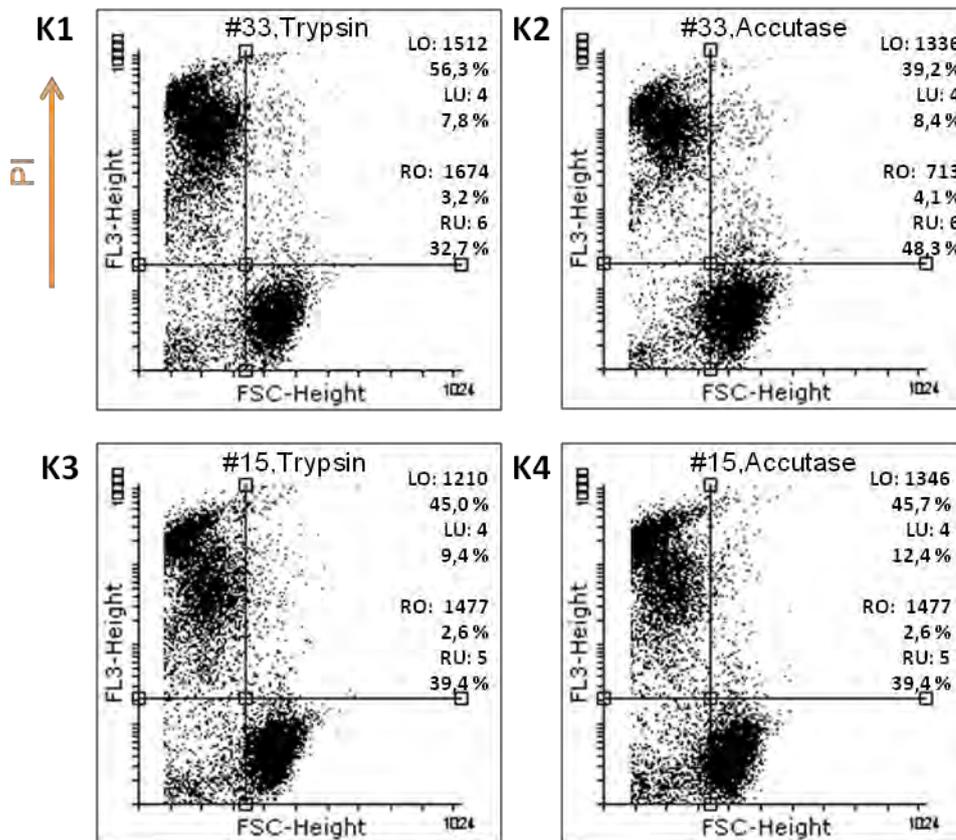


Abbildung 16: Vergleich der Effekte der Zellablösung auf Accutase und Trypsin von #15 mit #33

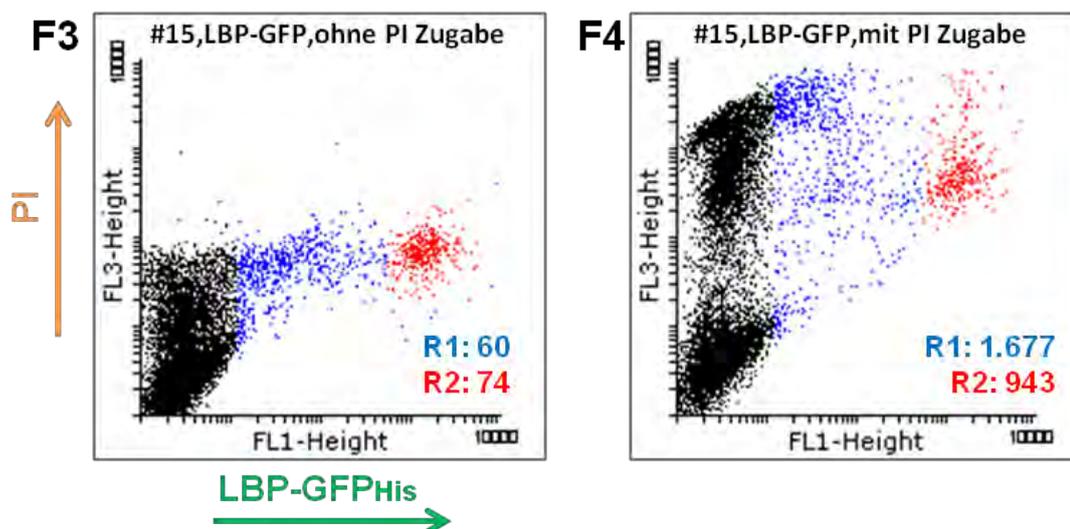


Abbildung 17: Dot Plot-Darstellung einer Propidiumiodid-Färbung nach LBP-GFP_{His}-Bindung an HEK293-TLR4/MD-2 #15

IV. Fluoreszenzauslöschung von extrazellulärem GFP

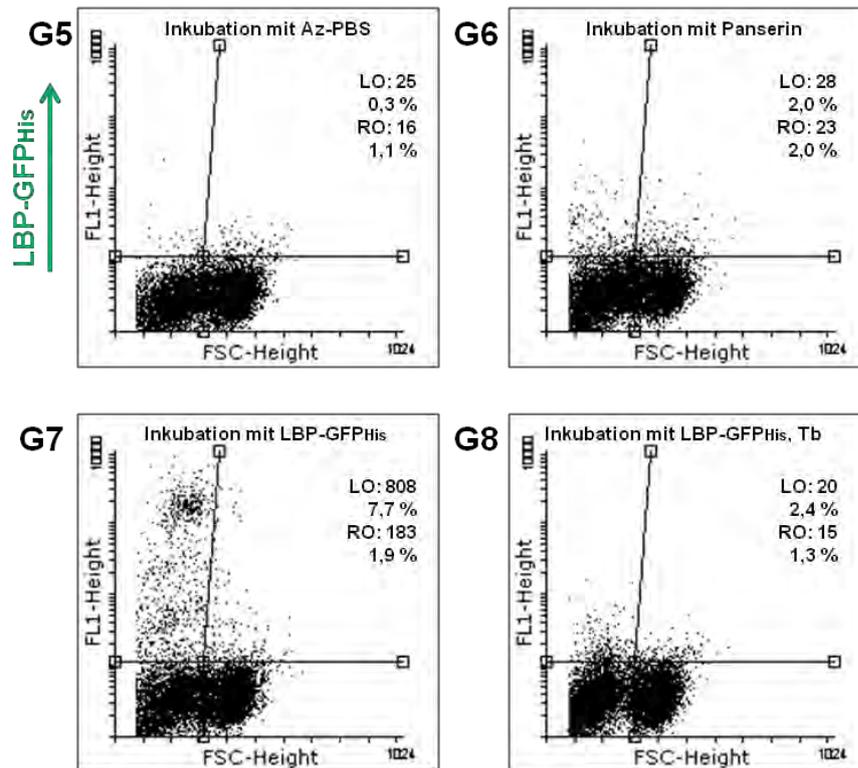


Abbildung 18: Dot Plot-Analyse einer Fluoreszenzauslöschung von extrazellulär gebundenem LBP-GFP_{His} an HEK293-TLR4/MD-2 #15

V. Literaturverzeichnis

- Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi (2004): Toll-like receptor signalling. In *Nat Rev Immunol* 4 (7), S. 499–511.
- Alexander, C.; Rietschel, E. T. (2001): Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. In *J Endotoxin Res* 7 (3), S. 167–202.
- Aoki, Takashi; Imamura, Tomoko; Ozaki, Hiroyuki; Ideuchi, Hideki; Tsuchida, Shirou; Watabe, Hiroyuki (2006): Fluorescence resonance energy transfer-based assay for DNA-binding protein tagged by green fluorescent protein. In *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (8), S. 1921–1927.
- Beamer, L. J.; Carroll, S. F.; Eisenberg, D. (1997): Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. In *Science* 276 (5320), S. 1861–1864.
- Beutler, Bruce; Rietschel, Ernst Th (2003): Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. In *Nat Rev Immunol* 3 (2), S. 169–176.
- Böttner, Mirjam R. (2005): Synthetische LPS-bindende Peptide. In-vitro-Untersuchungen zur Peptid-LPS-LBP-Interaktion. Humboldt-Universität, Berlin.
- Day, J. R.; Albers, J. J.; Lofton-Day, C. E.; Gilbert, T. L.; Ching, A. F.; Grant, F. J. et al. (1994): Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. In *J Biol Chem* 269 (12), S. 9388–9391.
- Dentener, M. A.; Vreugdenhil, A. C.; Hoet, P. H.; Vernooij, J. H.; Nieman, F. H.; Heumann, D. et al. (2000): Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by res-

- piratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. In *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 (2), S. 146-153.
- Desrumaux, C.; Labeur, C.; Verhee, A.; Tavernier, J.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Peelman, F. (2001): A hydrophobic cluster at the surface of the human plasma phospholipid transfer protein is critical for activity on high density lipoproteins. In *J Biol Chem* 276 (8), S. 5908–5915.
- Drayna, D.; Jarnagin, A. S.; McLean, J.; Henzel, W.; Kohr, W.; Fielding, C.; Lawn, R. (1987): Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. In *Nature* 327 (6123), S. 632–634.
- Eckert, Jana Kristin (2009): Funktionelle Analyse von Mutanten des LPS-bindenden Proteins (LBP). Humboldt-Universität, Berlin.
- Freudenberg, M. A.; Merlin, T.; Gumenscheimer, M.; Kalis, C.; Landmann, R.; Galanos, C. (2001): Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. In *Microbes Infect* 3 (14-15), S. 1213–1222.
- Freudenberg, Marina A. (2005): Die Rolle von Lipopolysaccharid im Wechselspiel zwischen Bakterien und Immunsystem. Tätigkeitsbericht, aufgerufen 29.12.12. Max-Planck-Gesellschaft.
- Goyert, S. M.; Ferrero, E.; Rettig, W. J.; Yenamandra, A. K.; Obata, F.; Le Beau, M. M. (1988): The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. In *Science* 239 (4839), S. 497–500.
- Gray, P. W.; Flaggs, G.; Leong, S. R.; Gumina, R. J.; Weiss, J.; Ooi, C. E.; Elsbach, P. (1989): Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional correlations. In *J Biol Chem* 264 (16), S. 9505–9509.
- Gutsmann, T.; Haberer, N.; Carroll, S. F.; Seydel, U.; Wiese, A. (2001): Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. In *Biol Chem* 382 (3), S. 425–434.
- Gutsmann, T.; Muller, M.; Carroll, S. F.; MacKenzie, R. C.; Wiese, A.; Seydel, U. (2001): Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. In *Infect Immun* 69 (11), S. 6942–6950.
- Hallatschek, Werner (2005): Die Regulation des humanen Lipopolysaccharid bindenden Proteins (hLBP). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Han, J.; Mathison, J. C.; Ulevitch, R. J.; Tobias, P. S. (1994): Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. In *J Biol Chem* 269 (11), S. 8172–8175.
- Haziot, A.; Chen, S.; Ferrero, E.; Low, M. G.; Silber, R.; Goyert, S. M. (1988): The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. In *J Immunol* 141 (2), S. 547–552.
- Janeway, Charles A.; Travers, Paul (1997): Immunologie. 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Knapp, Sylvia; Vos, Alex F. de; Florquin, Sandrine; Golenbock, Douglas T.; van der Poll, Tom (2003): Lipopolysaccharide binding protein is an essential component of the innate immune response to *Escherichia coli* peritonitis in mice. In *Infect Immun* 71 (12), S. 6747–6753.
- Kopp, Franziska (2013): Mechanistic Studies on the Interaction of the Lipopolysaccharide-binding Protein with Host Cell Membranes, unveröffentlicht.
- Lamping, N.; Hoess, A.; Yu, B.; Park, T. C.; Kirschning, C. J.; Pfeil, D. et al. (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. In *J Immunol* 157 (10), S. 4648–4656.

- Latz, Eicke; Visintin, Alberto; Lien, Egil; Fitzgerald, Kate A.; Monks, Brian G.; Kurt-Jones, Evelyn A. et al. (2002): Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. In *J Biol Chem* 277 (49), S. 47834–47843.
- Lorenz, Holger; Hailey, Dale W.; Lippincott-Schwartz, Jennifer (2008): Addressing membrane protein topology using the fluorescence protease protection (FPP) assay. In *Methods Mol Biol* 440, S. 227–233.
- Lorenz, Holger; Hailey, Dale W.; Wunder, Christian; Lippincott-Schwartz, Jennifer (2006): The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology. In *Nat Protoc* 1 (1), S. 276–279.
- Male, David (2005): Immunologie auf einen Blick. 1. deutsche Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Morrison, D. C.; Ryan, J. L. (1987): Endotoxins and disease mechanisms. In *Annu Rev Med* 38, S. 417–432.
- Muller, M.; Scheel, O.; Lindner, B.; Gutschmann, T.; Seydel, U. (2003): The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. In *J Endotoxin Res* 9 (3), S. 181–186.
- Muller, M.; Scheel, O.; Lindner, B.; Gutschmann, T.; Seydel, U. (2003): The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. In *J Endotoxin Res* 9 (3), S. 181–186.
- Ohto, Umeharu; Fukase, Koichi; Miyake, Kensuke; Satow, Yoshinori (2007): Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. In *Science* 316 (5831), S. 1632–1634.
- Park, Beom Seok; Song, Dong Hyun; Kim, Ho Min; Choi, Byong-Seok; Lee, Hayyoung; Lee, Jie-Oh (2009): The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. In *Nature* 458 (7242), S. 1191–1195.
- Raetz, C. R. (1990): Biochemistry of endotoxins. In *Annu Rev Biochem* 59, S. 129–170.
- Ramadori, G.; Zum Meyer Buschenfelde, K.-H; Tobias, P. S.; Mathison, J. C.; Ulevitch, R. J. (1990): Biosynthesis of Lipopolysaccharide-Binding Protein in Rabbit Hepatocytes. In *Pathobiology* 58 (2), S. 89–94.
- Rehm, H. (2006): Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Reyes, O.; Vallespi, M. G.; Garay, H. E.; Cruz, L. J.; Gonzalez, L. J.; China, G. et al. (2002): Identification of single amino acid residues essential for the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein (LBP) residues 86-99 by using an Ala-scanning library. In *J Pept Sci* 8 (4), S. 144–150.
- Rietschel, E. T.; Brade, H.; Brade, L.; Kaca, W.; Kawahara, K.; Lindner, B. et al. (1985): Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. In *Prog Clin Biol Res* 189, S. 31–51.
- Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H. et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. In *FASEB J* 8 (2), S. 217–225.
- Roes, Stefanie; Mumm, Florian; Seydel, Ulrich; Gutschmann, Thomas (2006): Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. In *J Biol Chem* 281 (5), S. 2757–2763.
- Roger, Thierry; Froidevaux, Celine; Le Roy, Didier; Reymond, Marlies Knaup; Chanson, Anne-Laure; Mauri, Davide et al. (2009): Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. In *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (7), S. 2348–2352.

- Schumann, R. R.; Latz, E. (2000): Lipopolysaccharide-binding protein. In *Chem Immunol* 74, pp. 42–60.
- Schumann, R. R.; Leong; Flaggs, G. W.; Gray, P. W.; Wright, S. D.; Mathison, J. C. et al. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. In *Science* 249 (4975), S. 1429–1431.
- Schütt, Christine; Bröker, Barbara (2011): Grundwissen der Immunologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Seydel, Ulrich; Koch, Michel H. J.; Brandenburg, Klaus (1993): Structural Polymorphisms of Rough Mutant Lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. In *Journal of Structural Biology* 110 (3), S. 232–243.
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K.; Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. In *J Exp Med* 189 (11), s. 1777–1782.
- Shokouhi, Mona (2013): Rekombinante Expression, Aufreinigung und funktionelle Analyse einer GFP-Fusionsvariante des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP-GFPHis). Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, Hamburg.
- Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2003): Toll receptors and pathogen resistance. In *Cell Microbiol* 5 (3), S. 143–153.
- Theofan, G.; Horwitz, A. H.; Williams, R. E.; Liu, P. S.; Chan, I.; Birr, C. et al. (1994): An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity. In *J Immunol* 152 (7), S. 3623–3629.
- Tobias, P. S.; Soldau, K.; Ulevitch, R. J. (1989): Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. In *J Biol Chem* 264 (18), S. 10867–10871.
- Viriyakosol, S.; Kirkland, T.; Soldau, K.; Tobias, P. (2000): MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. In *J Endotoxin Res* 6 (6), S. 489–491.
- Vreugdenhil, A. C.; Dentener, M. A.; Snoek, A. M.; Greve, J. W.; Buurman, W. A. (1999): Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. In *J Immunol* 163 (5), S. 2792–2798.
- Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In *Science* 249 (4975), S. 1431–1433.
- Zanoni, Ivan; Ostuni, Renato; Marek, Lorri R.; Barresi, Simona; Barbalat, Roman; Barton, Gregory M. et al. (2011): CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. In *Cell* 147 (4), S. 868–880.
- Zweigner, J.; Gramm, H. J.; Singer, O. C.; Wegscheider, K.; Schumann, R. R. (2001): High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. In *Blood* 98 (13), S. 3800–3808.