



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Herstellung eines standardisierten Bio-Assays zur Messung von Funktionsunterschieden des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP)

Autor: Katharina Caesar
Institut / Klinik: Institut für Klinische Chemie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Neumaier

Bei der Sepsis handelt es sich um eine Erkrankung mit hoher Letalität, die zudem hohe Kosten verursacht. Bei der gramnegativen Sepsis fungiert das Lipopolysaccharid (LPS/Endotoxin) der bakteriellen Zellwand als wesentlicher Stimulus für die systemische Entzündungsreaktion. LPS bindet über das LPS-bindende Protein (LBP), CD14 und MD2 an TLR4 und führt über spezifische Signaltransduktion zu einer Sekretion von Alarmzytokinen. Eine überschießende Wirtsreaktion ist letztendlich für die Schwere der Krankheitssymptome mitverantwortlich. Bei nicht rechtzeitiger und erfolgreicher Behandlung kommt es zu Multiorganversagen und Tod. Die frühzeitige Erkennung von Patienten mit einer besonderen Gefährdung, an einer Sepsis zu erkranken, ist für eine erfolgreiche Therapie oder präventive Maßnahmen entsprechend bedeutsam.

LBP nimmt eine wichtige Zwischenstellung bei der Vermittlung des LPS-Signals an den LPS-Rezeptor (CD14) auf Makrophagen ein und wird als Akutphaseprotein in der Leber sehr früh hochreguliert. Mehrere Publikationen beschreiben eine reduzierte Endotoxinempfindlichkeit in LBP-k.o.-Mäusen. Dies kann dahingehend gedeutet werden, dass eine veränderte Proteinzusammensetzung des LBP für eine veränderte Wirts-Reaktion auf bakterielles LPS verantwortlich ist. Humane Genvarianten des LBP sind bekannt, geben aber keine Auskunft über die Proteinfunktionen in Hinsicht auf LPS- oder auf CD14-Bindung. Ein Funktionsassay hätte für Fragen zur Reaktivität des Systems direkte Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird ein molekularer Bio-Assay zur *in-vitro* Testung der LBP-Funktion in Zellkultur entwickelt. Hierzu wurden zwei eukaryote Reportersysteme unter dem Einfluss des TNF- α -Promotors konstruiert und verwandt. Murine RAW264.7 sowie humane U937 Makrophagenzellen wurden transfiziert, ihre Stimulierbarkeit durch LPS bzw. Phorbol ester über Zunahme der zellulären „green Fluorescent Protein-Fluoreszenz“ geprüft. Schließlich wurde untersucht, inwieweit in diesem System rekombinantes humanes LBP oder LBP aus Humanserum diese Modulation der Zellreaktionen beeinflussen kann. Die Auswertungen geschahen durch Mikroskopie und FACS-Analyse. In den humanen U937 wurde zudem ein humanspezifischer TNF- α -Test verwendet. Insbesondere die murinen RAW264.7-Zellen ließen sich zuverlässig über LPS stimulieren. Eine Modulation durch rekombinantes LBP konnte nachgewiesen werden. Demgegenüber ließen sich keine LBP-Effekte im Humanserum zeigen, möglicherweise verursacht durch dessen vorangeschaltete notwendige Komplementinaktivierung durch Hitze. Zudem zeigte sich im Verlauf der Experimente eine Instabilität der Fluoreszenzexpression der vektortransfizierten Zellen, so dass die Stimulierbarkeit durch LPS zunehmend rückläufig war. Insgesamt können die Ergebnisse als Proof-of-Principle verstanden werden. Eine Anwendung würde aber eine deutlich höhere Stabilität und den Nachweis der Differenzierungsfähigkeit von LBP-Varianten erfordern. Während der Erstellung dieser Arbeit wurde von unabhängiger Seite ein kommerzielles System vorgestellt, welches die Funktion des LBP/LPS-Systems in sehr ähnlicher Weise wie hier beschrieben testet.