

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Evaluierung eines quantitativen PCR –
Nachweisverfahrens zur Bestimmung der Expression
von Zytokin- und Chemokingenen**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Diana Mariam Akhawi-Araghi
aus
Höxter**

2005

Dekan:

Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. T.Orlikowsky

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
1.1. Zytokine	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Chemokine	4
1.1.3. Transkriptionsfaktoren	5
1.1.4. Die Funktion der Zytokine während der Immunantwort	6
1.1.4.1. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine	7
1.1.4.2. TH1/TH2 Zell- Polarisierung	7
1.1.4.3. Die Rolle der Zytokine / Chemokine nach allogener Stammzelltransplantation.....	9
1.1.5. GVHD-Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation	10
1.1.6. Orale Mykosen bei Immundefizienz und nach allogener Stammzelltransplantation	11
1.2. Übersicht der untersuchten Zytokin-/Chemokingene	15
1.3. Zytokin-Nachweisverfahren	16
1.3.1. Einführung	16
1.3.2. Der quantitative Nachweis von Zytokin-mRNA mittels LightCycler RT- PCR.....	16
1.4. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Materialien und Bezugsquellen.....	20
2.1.1. Geräte	20
2.1.2. Verbrauchsgegenstände	21
2.1.3. Chemikalien.....	22
2.1.4. Kits	23
2.2. Methoden.....	24
2.2.1. Das LightCycler PCR Analysesystem.....	24
2.2.1.1. Detektion der PCR Produkte , Prinzipien	26
2.2.1.2. Quantitative PCR im LightCycler, Grundlagen	27
2.2.2. Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin- mRNA mittels Hybridization Probes Format.....	30

2.2.2.1.	Probenmaterial	31
2.2.2.2.	LightCycler PCR	34
2.2.2.3.	Generierung der externen Standards	39
2.2.2.4.	Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR.....	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	LightCycler Assay zur absoluten Quantifizierung der Zytokin- Genexpression.....	47
3.1.1.	Spezifität	47
3.1.2.	Linearität	49
3.1.3.	Sensitivität	50
3.1.4.	Amplifikationseffizienz	51
3.1.5	Reproduzierbarkeit	52
3.1.5.1.	Inter-Assay Reproduzierbarkeit	52
3.1.5.2.	Intra-Assay Reproduzierbarkeit	56
3.2.	Expression von IL - 2 und IL-1 β -mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs: Exemplarische Darstellung	58
4.	Diskussion.....	61
4.1	Real-time PCR im Kontrast zu anderen quantitativen Zytokin/ Chemokin – Nachweisverfahren	61
4.2	LightCycler-RT-PCR zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-mRNA- Expression über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden.....	65
4.2.1.	Spezifität	65
4.2.2.	Sensitivität	66
4.2.3.	Amplifikationseffizienz	67
4.2.4.	Reproduzierbarkeit	67
4.2.5.	Probenumsatz	68
4.3.	Der Vorzug der real-time RT-PCR hinsichtlich der absoluten Quantifizierung von Chemokin- und NF κ B-mRNA	69
4.4	Schlussfolgerung	71
5.	Zusammenfassung.....	73
6.	Literaturverzeichnis	75

7. Danksagung..... 86

8. Lebenslauf..... 87

Abkürzungen

A	Adenin
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
bp	base pair
C	Cytosin
C.albicans	Candida albicans
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementäre (copy) DNA
Cp	Crossing Point
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelstränige DNA
E	(Amplifikations-) Effizienz
EDTA	Ethylidiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-1 inked Immunospot Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
G	Guanin
GVHD	Graft versus Host Disease
HLA	humanes Leukozytenantigen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISH	In-situ-Hybridisierung
LC	LightCycler
LED	light-emitting diode
log	Logarithmus auf der Basis 10
MIP	Macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NFκB	Nuklearfaktor-kappa B
NK	natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	RNase Protection Assay
rpm	rotation per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCYB-11	INF-inducible T-cell-alpha chemoattractant
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymin

TAE
Taq-Polymerase
TF
TH
Tm
Tris
Tth-Polymerase
UV

Tris-Essigsäure-EDTA
Polymerase aus *Thermus aquaticus*
Transkriptionsfaktor
T-Helferzellen
Schmelztemperatur
Tris(hydroxymethyl)ethylendiamin
Polymerase aus *Thermus thermophilus*
Ultraviolett

k
c
m
 μ
n
p
f

kilo-, 10^3
centi-, 10^{-2}
milli-, 10^{-3}
mikro-, 10^{-6}
nano-, 10^{-9}
piko-, 10^{-12}
femto-, 10^{-15}

$^{\circ}\text{C}$
g
h
l
m
M
min
s
U
V

Grad Celsius
Gramm
Stunde
Liter
Meter
Molar (Mol pro Liter)
Minute
Sekunde
Unit
Volt

1. Einleitung

1.1. Zytokine

1.1.1. Allgemeines

Bei Zytokinen handelt es sich um lösliche Proteine/ Glykoproteine mit einer Länge von 100 - 200 Aminosäuren, die von mononukleären Zellen des Körpers freigesetzt werden und auf Zellen mit spezifischen Rezeptoren verschiedenste biologische Effekte ausüben. Jedes Zytokin ist ein zellregulatorisches Eiweiß und hat ein relativ geringes Molekulargewicht von rund 8 – 40 kD. Sie werden lokal produziert, haben sehr kurze Halbwertszeiten und sind schon in pikomolaren Konzentrationen wirksam.

Sie fungieren als Mediatoren. Durch bestimmte äußere Stimuli können sie von jeder einzelnen kernhaltigen Körperzelle freigesetzt werden und übertragen als extrazelluläre, lösliche Botenstoffe ihre Informationen über spezifische membranständige Rezeptoren an die Zielzelle. Dieser Mechanismus führt über interzelluläre Signalweiterleitung und second messenger Wege zu einer Modifikation der Genexpression im Inneren der Zelle.

Zytokine werden von folgenden Zellen des Körpers produziert wie beispielsweise von Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen, Nk-Zellen u. a. Sie zählen somit zu den antigen-unspezifisch wirksamen Komponenten des humoralen Immunsystems.

Innerhalb des Körpers spielen Zytokine eine wesentliche Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, der Homeostase, Hämatopoese, Apoptose und Angiogenese.

Besonders hervorzuheben ist jedoch Ihre Funktion, die ihnen bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort zukommt. Als Botenstoffe ermöglichen sie die Verständigung der Zellen des Immunsystems und koordinieren mit deren Hilfe die Abwehr gegen Angriffe des Organismus von außen. Infektionen mit Pilzen, Viren, Bakterien, Parasiten oder anderen infektiösen Mikroorganismen sowie toxische oder selbst mechanische Reize stellen einen Stimulus dar, der die Synthese und Freisetzung von Zytokinen rasch vorantreibt.

Einige Zytokine werden konstitutiv expremiert, wohingegen andere präsynthetisiert und in cytoplasmatischen Granula, als Membranproteine oder als Komplex in der extrazellulären Matrix gespeichert werden. Die meisten aller Zytokine werden allerdings auf einen Stimulus hin neu synthetisiert und freigesetzt (Fitzgerald et al., 2001).

Sie können autokrin wirken und das Verhalten der Zelle beeinflussen, die sie freisetzt, oder parakrin, das heißt durch Beeinflussung benachbarter Zellen sowie zum Teil endokrin, indem sie auf entfernt liegende Zellen einwirken. Wobei Letzteres davon abhängt, ob sie in den Kreislauf gelangen und von ihrer Halbwertszeit (Janeway et al.,2001).

Zytokine agieren und interagieren in Form eines Netzwerks, wobei sie reziprok ihre Bildung induzieren können und zusätzlich synergistische wie additive oder ebenso antagonistische Interaktionen in ihrer Reaktion auf biologische und pathophysiologische Zellfunktionen ausüben.

Als wesentliches Charakteristikum der Zytokine gilt ihre pleiotrope Wirkung, d.h., sie wirken in der Regel auf mehrere verschiedene Zellarten und können dabei unterschiedliche, z .T. sogar entgegengesetzte Wirkungen erzielen. So induziert beispielsweise IL – 6 zum einen Hepatozyten zur Synthese von Akutphase-Proteine, zum anderen ist IL – 6 auch für das Wachstum und die Differenzierung von B- Zellen verantwortlich (Fitzgerald et al ,2001).

Redundanz ist eine weitere kennzeichnende Eigenschaft der Zytokine. Es bestehen Analogien hinsichtlich der cytosolischen Gebiete der Rezeptoruntereinheiten, was zu identischen Tätigkeiten verschiedener Zytokine führen kann. Zu nennen wären in dieser Hinsicht IL – 2 und IL – 15, da beide aufgrund dieser Eigenschaft die T-Zell-Proliferation fördern.

Wie schon beschrieben, steht Zytokine als ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Zellarten gebildete und sezernierte Substanzen, die als interzelluläre Mediatoren die Steuerung der immunologischen Regelkreise überwachen.

Bedauerlicherweise hat sich bis heute noch keine einheitliche Zytokin-Nomenklatur durchgesetzt. Eine deutliche Einordnung hat sich bezüglich ihrer häufig analogen Eigenschaften in der Vergangenheit immer wieder als äußerst kompliziert erwiesen.

Es lässt sich erkennen, dass so gut wie kein systematischer Zusammenhang zwischen den Molekülen innerhalb der Zytokin- Nomenklatur besteht.

Anfangs orientierte sich die Terminologie nach Art der produzierenden Zelle (Interleukine, Lymphokine, Monokine, Wachstumsfaktoren) oder anhand des initialen definierenden Bioassy (nach ihren Effekten während einer Immunantwort).

Die Einführung der Interleukin-Nomenklatur stellte lediglich den Versuch dar, ein rationales und standardisiertes System hinsichtlich der Zytokin-Terminologie zu entwickeln. Das Prinzip bestand darin, die bekannten Zytokine durchnummerieren von IL-1 bis IL-18. Obwohl sich diese Art der Nomenklatur durchgesetzt hat, musste man bald feststellen, dass sie sich nicht universell auf alle Zytokingruppen anwenden ließ. Das gegenwärtige Ziel besteht darin, einen gemeinsamen Konsens in der Zytokin - Nomenklatur zu finden. In jüngster Zeit einigte man sich, die Zytokin – Klassifikation auf der Rezeptorstruktur des jeweiligen Zytokins basieren zu lassen. Demnach erfolgt die Einteilung derzeit anhand der Homologien der verschiedenen Rezeptorgruppen. (Oppenheim, 2001) Es existieren sechs Hauptgruppen unter denen sich die meisten Zytokine einordnen lassen. Jene Gruppen sind unter folgenden Namen bekannt: Hämatopoetin-, Interferon-, TNF-, IL-1/Toll-like-, Tyrosin- und Chemokinrezeptoren.

Es sei hinzugefügt, dass jede Gruppe über verwandte Sequenzen in der cytosolischen Domäne definiert wird (Fitzgerald et al., 2001).

Die Molekularbiologie sowie monoklonale Antikörper und Mikrosequenzierung ermöglichten, Zytokine in rekombinater Form herzustellen, die seitdem experimentell oder therapeutisch Anwendung finden (Oppenheim, 2001).

Dadurch ist die Differenzierung ihrer Wirkung zumindest in vitro beträchtlich erleichtert worden. Jedoch ist das Funktionsspektrum in vivo häufig noch recht unvollständig verstanden. Ein Grund dafür stellt das immense Netzwerk und das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Zytokine dar, dass es noch vollständig zu entschlüsseln gilt.

1.1.2. Chemokine

Chemokine stellen eine Superfamilie strukturell verwandter, chemotaktisch aktiver Zytokine dar, die in den allerersten Phasen einer Infektion im betroffenen Gewebe freigesetzt werden. Ihr Molekulargewicht beträgt annähernd 8-10 kDa, und sie bestehen aus einer Länge von 70-90 Aminosäuren. Alle Chemokine besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen. Die Mehrheit aller Chemokine binden an sieben transmembranöse G - Protein gekoppelte Rezeptoren und induzieren auf diesem Weg eine zelluläre Migration (De Vries et al., 1999; Krishna et al;1997)

Chemokine sind noch nicht allzu lange bekannt. Sie wurden erstmalig in Zytokintests nachgewiesen und aus diesem Grund anfangs als Interleukine bezeichnet. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten über 40 menschliche Chemokine identifiziert werden.

Chemokine wirken vor allem als Chemoattraktoren für Leukozyten, sie mobilisieren Monocyten, neutrophile Zellen und andere Effektorzellen aus dem Blut und leiten sie zu Infektionsherden. In jüngster Zeit konnten in kurzer Folge weitere Chemokine identifiziert werden; dabei stellte sich heraus, dass sie ebenso auch die Angiogenese und Hämatopoese beeinflussen (Yoshie et al.; 2001; Murdoch und Finn, 2000; Mackay, 2001; Thornhill und Li, 1997).

Die Familie der Chemokine lässt sich in zwei Hauptgruppen: die CC - Chemokine (beta), die CXC - Chemokine (alpha) und eine Nebengruppe die C - Chemokine unterteilen. Die erst genannte Gruppe wird beim Menschen vornehmlich im Bereich von Chromosom 4 codiert. Man bezeichnet sie als CC - Chemokine, da sie an ihrem aminoterminalen Bereich zwei nebeneinander liegende Cysteinreste aufweisen. Bei den CXC - Chemokinen befindet sich zwischen den beiden Cysteinen eine weitere Aminosäure, zudem lassen sie sich zumeist auf Chromosom 17 des menschlichen Genoms finden. Oben genannte Gruppe lässt sich dahingehend noch weiter unterteilen, ob vor dem ersten dieser beiden konstanten Cysteine ein bestimmtes Aminosäuretriplett vorhanden ist (Janeway et al., 2001; Krishna et al;1997; Thornhill und Li, 1997). C – Chemokine sind an anderen Stellen im Genom codiert und besitzen jeweils nur ein Cystein am aminoterminalen Ende.

Die CC – Gruppe wirkt vornehmlich auf Monozyten, Lymphozyten, Basophile und Eosinophile, wohingegen CXC – Chemokine primär über eine Wirkung auf Neutrophile verfügt.

Bei Autoimmunkrankheiten, Tumoren, Artherosklerose und chronischen Entzündungsprozessen wurden bedeutende Expressionen von Chemokinen beobachtet. Derzeit gibt es noch keinerlei therapeutische Verwendung für Chemokine.

1.1.3. Transkriptionsfaktoren

Grundlage vieler biologischer Prozesse in einem Organismus ist die Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription. Die sogenannten „Motoren“ der Genregulation sind die Transkriptionsfaktoren (TF), die am Ende von Signalübertragungsketten stehen und zugleich initiiierende Faktoren einer neuen regulatorischen Kaskade sind. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die den Start der Transkription steuern, indem sie an spezifische Stellen im Bereich des Promoters eines Gens an die DNA binden. Die meisten TFs regulieren die Expression mehrerer bis vieler Zielgene, häufig im Verbund mit anderen TF.

Transkriptionsfaktoren besitzen einen dreiteiligen Aufbau, der sich folgendermaßen zusammensetzt: DNA-Bindungsdomäne, Aktivierungsdomäne und die Proteininteraktionsdomäne. Durch diesen Aufbau besteht die Möglichkeit, mit Mitgliedern der TF-Familien Domänen zu tauschen, was zu großer Diversität führt.

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt durch eine Kaskade von MAP-Kinasen und ist Bestandteil von vielen Übertragungswegen in der Zelle (Janeway et al,2001).

Einer der heute bekanntesten Transkriptionsfaktoren ist der Nuklearfaktor Kappa-B (NF κ B). Dieser fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung und soll daher im Nachstehenden kurz vorgestellt werden: NF κ B ist ein ubiquitär vorhandener Transkriptionsfaktor, der die Expression der Gene regelt, die Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsions-Moleküle, sowie einige Akut-Phase-Proteine in Gesundheits- und diversen Krankheitszuständen

kodieren. Dieser TF wird durch einige Stimuli, wie beispielsweise Zytokine, sauerstofffreie Radikale, inhalierte Partikel, ultraviolette Bestrahlung und bakterielle/virale Produkte aktiviert. Die unangemessene Aktivierung von NF κ B ist mit der Entstehung inflammatorischer Prozesse verbunden; die sich in Form von: autoimmuner Arthritis, Asthma, septischen Schock, Lungenfibrose, Glomerulonephritis, Atherosklerose und AIDS. äußern. Im Kontrast dazu steht die komplette und persistente Inhibition von NF κ B, welche direkt mit Apoptose, unangemessener Immunzellentwicklung und verzögertem Zellwachstum einhergeht (Chen et al., 1999; Baldwin et al., 1996; Barnes, 1997).

1.1.4. Die Funktion der Zytokine während der Immunantwort

Der menschliche Körper ist durch eine Vielzahl an Krankheitserregern anfällig für Infektionen. Um eine Infektion auszulösen, müssen die Mikroorganismen einige Schutzmechanismen des Wirtes überwinden. Zytokine spielen bei der Abwehr von Krankheitserregern eine entscheidende Rolle, da sie an der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Wie schon in Kap. 1.1.1 erwähnt, agieren und interagieren Zytokine in Form von Netzwerken und Zytokinkaskaden. (Fitzgerald, 2001). Studien zeigten, dass Störungen dieses Netzwerkes in seiner Balance zu unerwarteten bis hin zu unangemessenen Immunreaktionen führen können und damit als Wegbereiter für immun – induzierte Krankheiten betrachtet werden. (Hibbert und Johnston, 2001). Jedoch benötigt es mehr als einen Defekt im Netzwerk, um eine gestörte Immunreaktion hervorzurufen (Haddad, 2002).

Im Weiteren soll ein kurzer Einblick in die Beziehungen des Zytokinsystems gegeben werden.

1.1.4.1. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine

Die Inflammation (=Entzündung) lässt sich als Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen charakterisieren.

Pro-inflammatorische Zytokine lösen einen Entzündungsprozess aus oder verstärken diesen, wohingegen anti-inflammatorische Zytokine eine Entzündung abschwächen/beenden. Als klassische proinflammatorische Zytokine gelten:

IL-1, TNF, IFN-gamma, IL-12, IL-18 und Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (M-SCF), wohingegen IL-4, IL-10, IL-13 und IFN-alpha als charakteristische anti-inflammatorische Zytokine bekannt sind. Es sei erwähnt, dass zudem auch Zytokine existieren, die sowohl über pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung verfügen (Cavallion, 2001), wie beispielsweise IL-2. Wenn die Balance und das Zusammenwirken von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen gestört ist, kommt es zu schwerwiegenden Erkrankungen, da entweder der Krankheitserreger nicht beseitigt werden kann oder die Immunreaktion nicht zum Erliegen kommt. Folglich spielt die Dysregulation der Zytokin - Produktion eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen (O`Shea, 2002).

1.1.4.2. TH1/TH2 Zell- Polarisierung

An dieser Stelle soll das Zytokin - Paradiagramm vorgestellt werden, das erstmals von Mosmann in den 80-ern identifiziert und beschrieben wurde, und sich als besonders aufschlussreich in Hinsicht auf das Zytokin – Netzwerk zeigt. Die sehr komplexe Immunregulation wird wesentlich mitbestimmt von CD4+-T-Zellen, den sogenannten T - Helferzellen.

Eine große Summe an Beweisen ließ auf die Entstehung von zwei Subpopulationen von T - Helferzellen, die während der Differenzierungsphase der CD4+-T-Lymphozyten entstehen, schließen. Diese zwei Subpopulationen sind als TH1 / TH2 - Zellen klassifiziert. Es zeigte sich, dass die zwei Subpopulationen Zytokine produzierten, die sich in ihren Eigenschaften vollständig

unterscheiden. So produzieren Typ 1 Helferzellen (TH1) IFN- gamma, IL-2 und TNF-beta, was zur Aktivierung von Makrophagen führt und die zellvermittelte Immunität fördert, wohingegen Typ 2 Helferzellen (TH2) IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 freisetzen, welche über die Aktivierung von B-Zellen eine durch Antikörper vermittelte humorale Immunität begünstigen.

Beide Zytokingruppen sind zudem in der Lage, sich gegenseitig zu antagonisieren oder sogar auch zu inhibieren (Mosmann et al, 1986; Mosmann und Coffmann, 1989, Abbas et al, 1996; Romagnani, 1997, Fitzgerald et al., 2001). Eine günstige Immunabwehr gegenüber infektiösen Keimen hängt, unter dem Aspekt der TH1/TH2 Polarisierung, von der Aktivierung der geeigneten TH - Zell Subpopulationen ab (Powrie und Coffmann, 1993).

Polarisierte TH1/TH2 Antworten spielen eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese immunvermittelter Krankheitsbilder. Der TH1-Typ vermag organ-spezifische Autoimmunerkrankungen, wie juvenilen Diabetes, Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis, Multiple Sklerose, Lupus erythematoses oder M.Crohn, zu erzeugen, aber er induziert auch Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ 4 und spielt demzufolge eine wesentliche Rolle bei der Entstehung akuter GVHD-Reaktionen (Kasakura, 1998). Dem gegenüber steht die allergenspezifische TH2-Antwort, welche allergische Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (Typ1) vermittelt und mit atopischen Störungen in Verbindung gebracht wird. (Romagnani, 1999, Romagnani, 2000). Jedoch spielen die Zytokine an sich den dominierenden Faktor hinsichtlich der TH-Zell-Polarisation. Die TH1/TH2 Differenzierung wird von zwei entscheidenden Zytokinen, IL-12 und IL-4, determiniert (O`Garra und Arrai, 2000; Glimcher und Murphy, 2000). IL-12 fördert die Differenzierung zu TH1- Zellen; während IL-4 die Entwicklung hin zur TH2-Zelle begünstigt (Romagnani, 2000 ;Fitzgerald, 2001). Beide Zytokine inhibieren des Weiteren die Differenzierung der jeweilig anderen Subpopulation (Maggi et al.,1992; Manchetti et al., 1993; Seder et al., 1993; Wu et al, 1993).

Die oben beschriebenen Zytokine aktivieren in den T- Zellen spezifische Signaltransduktionswege, welche dann mittels charakteristischer

Transkriptionsfaktoren entweder eine Th1- oder TH2- Antwort vermitteln (Glimcher and Murphy, 2000).

Letztendlich beeinflussen jedoch auch zahlreiche andere Faktoren das Zytokinnetzwerk. So besteht seit einiger Zeit die Annahme, dass Polymorphismus in den Zytokin-Genen zu einem Ungleichgewicht hinsichtlich des Zytokin-Netzwerks führt, was wiederum die Pathogenese vieler Krankheiten begünstigt (Fitzgerald et al., 2001; Vadenbroeck und Goris., 2003).

Im Hinblick auf die dargelegten Grundlagen des gegenwärtigen Verständnisses der Zytokine und ihrer Funktionen hinsichtlich des Netzwerks, soll nun im Folgenden der klinische Bezug hinsichtlich der Rolle von Zytokinen / Chemokinen nach allogener Stammzelltransplantation und insbesondere bei opportunistischen Infektionen im Mund-, Kiefer- Gesichtsbereich, dargestellt werden.

1.1.4.3. Die Rolle der Zytokine / Chemokine nach allogener Stammzelltransplantation

Patienten mit einer Immunschwäche, lassen sich im Allgemeinen klinisch aufgrund einer Krankengeschichte wiederholter Infektionen erkennen; da bei Immundefizienten wiederkehrend Infektionskrankheiten auftreten, die bei einem gesunden Wirt keinerlei Probleme verursachen.

Die allogene Stammzelltransplantation ist in den meisten dieser Patientenfällen das Therapiemittel der Wahl. Diese Therapie wird hauptsächlich angewandt, um kongenitale Defekte der Hämatopoese und des Immunsystems, als auch maligne hämatologische Erkrankungen zu beheben (Gemsa et al., 1991). Jedoch führt dieser Ansatz nicht immer zum gewünschten Ziel. Es lassen sich eine Reihe von Komplikationen beobachten, wie beispielsweise gravierende Infektionen, Transplantatabstoßungen und Tumorrezidive und die akute / chronische graft-versus-host-disease. (Tabbara et al., 2002).

Im molekular-zellbiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen steht besonders die akute GVHD nach

allogener Stammzelltransplantation im Vordergrund der Forschung. Diese wird im Nachstehenden jedoch nur recht knapp dargestellt, da bezüglich des zahnmedizinischen Aspekts die opportunistische Pilzinfektion nach allogener Stammzelltransplantation im Vordergrund stehen sollte.

1.1.5. GVHD-Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation

Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen ereignen sich nach Übertragung nichtautologer, immunkompetenter Zellen aus Knochenmark, Lymphknoten oder Milz, indem diese Zellen im Körper des Empfängers zelluläre Immunreaktionen vermitteln. Bei immunsupprimierten Empfängern, erkennen die reifen T-Zellen des Spenders, die das allogene Knochenmark kontaminieren, das Gewebe des Empfängers als fremd und reagieren mit einer Immunantwort. Sie rufen schwere Sekundärreaktionen hervor, die hauptsächlich Haut, Gastrointestinaltrakt, sowie Lunge und Leber betreffen. In knapp 10% der Fälle versterben sogar die Patienten an den Folgen der allogenen Transplantation. (Janeway et al., 2001; Schettler und Greten, 1998). Während dieser Reaktion spielen Zytokine/Chemokine eine entscheidende Rolle. Der Pathomechanismus lässt sich folgendermaßen beschreiben: eine Konditionierungsbehandlung (=hochdosierte Chemotherapie; ggf. in Kombination mit Bestrahlung) des Empfängers führt zur Schädigung dessen Gewebes, woraufhin von diesem zum einen pro-inflammatorische Zytokine :IL-1, IL-6, TNF-alpha und des Weiteren Endotoxine (LPS) freigesetzt werden. LPS wiederum bewirkt durch die Ausschüttung folgender Zytokine:IL-1,IL-12 und TNF-alpha die Induktion einer Th1-Antwort. Es kommt zu weiteren Schädigung des Empfängergewebes durch Nk-Zellen und cytotoxische T-Lymphozyten, welche durch Th-1-Zytokine (IL-2, INF-gamma) aktiviert werden. Es lässt sich eine Wechselbeziehung zwischen der Produktion von TH1-Zytokinen und dem Auftreten von akuten GVH-Reaktion erkennen (Holler, 2002; Krenger et al., 1997). Heutige Studienmodelle lassen schlussfolgern, dass eine manifeste Trennung von Th1-und Th2-Antworten im Rahmen der akuten GVHD nicht möglich scheint.

1.1.6. Orale Mykosen bei Immundefizienz und nach allogener Stammzelltransplantation

Die Candida-Infektion des Mundes hat unter den verschiedenen Pilzerregern die größte praktische Bedeutung. In der Regel ist bei fast allen Menschen die Mundhöhle mit *C.albicans* besiedelt, *C.albicans* erweist sich jedoch nur bei allgemeiner Abwehrschwäche als pathogen (Fidel, 2002). Daher gilt Candidiasis als „the disease of the diseased“. Als pathogenetische Faktoren gelten: zelluläre und humorale Immundefekte, aber auch schlecht gepflegte Prothesen und Zahnbürsten fungieren sekundär als sogenannte „Keimvermittler“ (Schwenzer, 2000). Ferner ist die zelluläre Immunität gegenüber Pilzen zumeist nach einer allogenen Stammzelltransplantation komplett unterdrückt. Die pathogenetischen Faktoren dabei sind: Immundefizienz und T-Zell-Anregung im Verlauf der GVH-Reaktion, aber auch Neutropenie, Steroid- als auch antibiotische Behandlungen tragen zur Pathogenese bei (Einsele und Hebart, 2002). Pilzinfektionen sind opportunistische Infektionen, abgeleitet von ubiquitär vorhandenen Mikroorganismen. Experimentelle Maus-Modelle legten dar, dass sowohl die angeborene Immunabwehr, als auch T-Helfer-Zellen eine zentrale Rolle in Bezug auf Pilzinfektionen, durch beispielsweise *C. albicans*, spielen (Einsele und Hebart, 2002; Mencacci et al., 2000).

Nach Eindringen eines Pilzpathogens wird zunächst die unspezifische Immunabwehr aktiviert. Dies geschieht durch Makrophagen, indem diese bestimmte Zyto- /Chemokine nach Antigenkontakt freisetzen, was die antimykotische Effektoraktivität neutrophiler Granulozyten steigert (Mehrad, 1999; Mencacci et al., 2000).

Bezüglich der spezifischen Abwehr, lässt sich bei genauerer Betrachtung, wie schon in Kapitel 1.1.3.2 beschrieben, erkennen, dass durch bestimmte Zytokine TH-Zellen in der Lage sind, den Ablauf der Infektion zu steuern. Anhand verschiedener Analysen ließ sich ableiten, dass dendritische Zellen den jeweiligen Entwicklungszustand von *C.albicans* differenzieren können, und dementsprechend TH1-Zytokine oder TH2-Zytokine ausschütten, was entweder eine TH1-oder TH2-Antwort hervorruft (Bozza, 2002; D´Ostiani et al., 2000;

Mencacci et al., 2000). Anhand von Mausmodellen und klinischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Erzeugung von Th1-Zytokinen Resistenz gegenüber Pilzinfektionen vermitteln. Wie jedoch schon in Kapitel 1.1.3.2 erwähnt, befinden sich TH1-/Th2-Zytokine in der Lage, sich gegenseitig zu antagonisieren. So zeigte sich bei Prädominanz an TH2-Zytokinen eine starke Anfälligkeit und ein Fortschreiten der Infektion. Dies lässt sich einerseits darin begründen, dass durch das prädominante Vorhandensein von IL-4 bzw. IL-10 TH-1-Antworten inhibiert und andererseits dadurch auch phagozytäre Effektorzellen deaktiviert werden. (Cenci et al., 1997; Romani, 1999; Hebart et al., 2002a). Aufgrund der vorliegenden Studien ist anzunehmen, dass bestehende Dysregulationen hinsichtlich TH-Zell-Zytokine mit der Anfälligkeit für opportunistische Pilzinfektionen korrelieren. Eine allogene Stammzelltransplantation zieht zumeist ein Ungleichgewicht in Bezug auf die TH1/TH2-Polarisierung nach sich, d. h., es können daher die TH1-Antworten stark unterdrückt sein. Daher kann auf Grund der irregulären Zytokinerzeugung die Bildung protektiver TH1-Antworten verhindert sein, wodurch der Weg hinsichtlich der Suszeptibilität für opportunistische Pilzkrankungen geebnet ist (Mencacci et al., 2002, Hebart et al., 2002). Derzeit werden zur Behandlung von oral-manifestierten Candida-Infektionen spezielle medikamentöse Maßnahmen angewandt. Mittel der Wahl sind zum einen Farbstoffe, wie Gentianaviolett 2 % sowie Castellansche Lösung, die lokal angewendet werden; zum anderen werden Antimykotika und Imidazolabkömmlinge lokal und systemisch eingesetzt (Schwenzer, 2000).



Abb.1,2: Chronische hyperplastische Candidiasis (l.) und chronische erythematöse Candidiasis bei HIV-positivem Patient (aus: Brostoff et al., 1993)

1.1.7. Orale Immunabwehr bei Viruserkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)

Im Hinblick auf die zelluläre Abwehr zeigte sich, dass Viren diverse Strategien entwickelt haben, das Immunsystem zu umgehen, indem sie die Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen umgehen können, und sich damit in der Lage befinden, das Zytokinnetzwerk zu manipulieren und sich diesem zu entziehen. Die Strategien lassen sich wie folgt beschreiben: Um die Elimination durch das Immunsystem zu vermeiden, werden von den Viren Zytokin-Homologe sezerniert, sog. Virokine, oder Zytokin-Bindungproteine als auch eine Anzahl anderer Proteine, welche die antiviralen Zytokin - Signalwege inhibieren können (Tortorella, 2000; Fitzgerald et al, 2001; Kalvakolanu, 1999).

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) befällt im Wesentlichen die für die zelluläre Abwehr verantwortlichen T-Helferzellen, daneben aber auch Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Ebenso ist auch die humorale Immunität insuffizient. Es resultiert ein schwerwiegender Defekt der Immunabwehr aufgrund der Funktionsbeeinträchtigung der T-Helferzellen. Die Anfälligkeit für opportunistische Infektionen ist deutlich erhöht, wenn die Anzahl der CD4+-Lymphozyten $\leq 200-300$ ml beträgt. Das sog. T-Zell-Defizit beruht auf der verminderten Anzahl und Funktion der CD4+-Lymphozyten. Hinzu kommt, dass zytotoxische CD8+-Suppressorzellen die Immunsuppression verstärken können. Das Auslösen der HIV-Gentranskription in den T-Zellen erfordert wahrscheinlich eine durch Antigen oder Zytokine (IL-6) induzierte Aktivierung der T-Zelle (Keller, 1994). Patienten mit der erworbenen Immunschwäche AIDS, hervorgerufen durch den lympho- und neurotrophen Retrovirus HIV, lassen sich zumeist anhand der typischen mit dieser Krankheit einhergehenden Manifestationen an Schleimhautoberflächen erkennen (Challacombe and Sweet, 2002). Als Ausdruck der Abwehrschwäche lassen sich folgende Krankheitsbilder anhand der Mundschleimhaut dieser Patienten erkennen: Candidiasis, rezidivierende Herpesinfektionen, nekrotisierende Gingivitis, Parodontitis, Haarleukoplakie, aber auch maligne Tumoren, wie beispielsweise das Kaposi-Sarkom oder das Non-Hodgkin-Lymphom (Schwenzer, 2000;

Hoffmann-Axthelm, 2000; Burmester und Pezzutto, 1998). Bei der Entstehung oraler Krankheitsbilder in Form opportunistischer Infektionen bei HIV-positiven Personen üben Zytokine einen enormen Einfluss gegenüber der Resistenz bzw. Anfälligkeit aus.

Anhand verschiedener Studien zeigte sich, dass bei einem veränderten TH1/Th2-Zytokinprofil die Entwicklung von Krankheitsbildern wie beispielsweise: oropharyngeale Candidiasis, Parodontitis etc. bei HIV positiven Patienten begünstigt ist. Mittels Speichel- und Blutproben ließ sich belegen, dass HIV-positive Patienten mit einer starken CD4+-T-Zell-Defizienz ein deutlich prädominantes TH2-Zytokin-Profil besitzen und daher stark anfällig für obengenannte Infektionen sind, aufgrund der bestehenden Zytokin-Dysregulation. Im Gegensatz dazu stehen HIV negative Patienten, bei denen sich ein ausgewogenes Gleichgewicht der TH1/TH2-Zytokin-Expression (TH0) erkennen lässt und daher resistent gegenüber Infektionskrankheiten sind (Vastardis et al., 2003; Fidel, 2002; Leigh et al., 2002; Leigh et al, 1998).

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung oraler Infektionen spielen, abgesehen von IL-4, IL-10, IL-12 und INF- γ , aber auch inflammatorische Zytokine wie: IL-1 β ; IL-6 und TNF- α . So zeigte sich eine nahezu 2-fach erhöhte Expression dieser Zytokine in der Sulkusflüssigkeit parodontaler Taschen bei HIV infizierten Patienten. Die oben genannten Zytokine sind bedeutende Mediatoren bei Entzündungsprozessen, der Destruktion von parodontalem Gewebe und bei periapikalen Prozessen (Sosroseno et al., 1994; Baqui et al., 2000).

Ziel der AIDS-Forschung ist ein adäquates Mittel gegen den HIV-Virus post infectionem zu finden. Derzeit befinden sich Interleukine als therapeutische Mittel im Gespräch der Forschung. Bei IL-2, ließ sich anhand von Studien erkennen, dass es die Proliferation und Zytotoxizität der T-Lymphocyten, als auch die Zytotoxizität von NK-Zellen, B-Lymphocyten, Makrophagen und Monocyten stimuliert und somit die Immunabwehr HIV-Infizierter steigern kann (Sule et al, 2001). Aber auch IL-16, und Chemokine wie: RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β hemmen die Virusvermehrung, durch die Blockade der für HIV notwendigen Chemokin-Rezeptoren (Burmester und Pezzutto, 1993) und gebieten dadurch dem tödlichen Krankheitsverlauf länger Einhalt.

1.2. Übersicht der untersuchten Zytokin-/Chemokingene

Tabelle1

Zytokin/ Chemokin	Weitere Namen	Struktur/ Genort	Quelle/ Produzierende Zellen	Zielzellen	Biologische Aktivität
IL-1 IL-1 α und IL1- β sind Formen von IL-1 mit geringer Homologie	LAF, EP, LEM, MCF, Catabolin	IL-1 α : 271AA / 2q12-21 IL1- β : 269AA / 2q13-21	Makrophagen, Monozyten, dentritische Zellen, Astrozyten, NK-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten	T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen, Organe: Hepatozyten, Knochen	Lymphozyten- Aktivierung, Makrophagen- Aktivierung, Erhöhung der Zelladhäsion, Fieber, Hypotonie, Gewichtsverlust, Akutphase-Reaktion
IL-2	T-cell Growth Factor (TCGF)	133AA, 15 kDa / 4q26-q27	T-Zellen	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Oligodendrozyten	T-Zell-Proliferation, B-Zell-Proliferation und Differenzierung, Monozyten-Aktivierung
IL-6	INF- β 2, BSF-2, HPGF, HSF, MGI-2	183AA, 26 kDa / 7p21p14	T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, KM- Stromazellen, Fibroblasten, Endothelzellen	B-Zellen, Plasmazellen, T-Zellen, Hepatozyten, KM-Zellen	B-Zell-Wachstum und Differenzierung, T-Zell-Proliferation, Akutphase-Reaktion
MiP3-α	LARC; SCYA-20, Exodus-1	70 AA / 2q33-q37	Leber, Lymphknoten, Appendix	Lymphocyten, dentritische Zellen, Monozyten	Chemotaxis naiver T- Zellen (in die lymphatischen Organe)
ICAM-1	CD 54	75- 115kDa / 19p13.3- p13.2	hämatopoet./ u. nichthämatopoetische Zellen	B-Zellen, T-Zellen	Rezeptor für Rhinoviren, Adhäsion: Ligand von LFA-1
SCYB-11	CXCL11 IP9 H 174	94AA / 4q23-q24	Pankreas, Leber, Thymus, Milz, Lunge	Aktivierte T-Zellen	Chemotaxis aktivierter T-Zellen, Granulozyten und Astrocyten
NFκB (TF)	NF κ B1	105 kDa / 4q23-q24	Kommt in Zellen vor, die Zytokine, Chemokine, Wachstum- faktoren, Zelladhäsions- moleküle und Akut-Phase- Proteine exprimieren	Immunzellen allgemein	reguliert die Aktivierung verschiedener Gene, ist an der Immunantwort, Entzündungsreaktionen, Zelladhäsion, Zellwachstum und Zellentwicklung stark beteiligt

1.3. Zytokin-Nachweisverfahren

1.3.1. Einführung

Zytokine sind bedeutende Mediatoren unseres Immunsystems und regulieren ein großes Spektrum biologischer Funktionen unseres Körpers einschließlich der Immunantwort. Jedoch ist ihre Rolle hinsichtlich der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder noch nicht in jeder Beziehung verstanden. Die Aufklärung der umfassenden Zytokin-Interaktionen ist das Ziel in klinischer und laboratorischer Forschung (Whiteside, 1994; Whiteside 2002).

Heutzutage stehen diverse Verfahren bezüglich des Nachweises von Zytokinen und Chemokinen zur Verfügung. Dieser kann auf Proteinebene mittels: ELISA-Reader erfolgen, wobei heute der sog. capture bzw. sandwich ELISA am häufigsten verwandt wird (Borg et al., 2002; Nemzek et al., 2001) oder mittels ELISPOT (= Enzyme-linked immunospot assay). Dabei handelt es sich um eine Abwandlung des sandwich ELISA. Bei dieser Methode werden Techniken der Durchflusszytometrie wie z.B. FACS-Analysen oder intrazelluläre Zytokinfärbung angewandt (Meierhoff et al., 2002; Hebart et al., 2002b; Mashishi und Gray, 2002).

Andererseits kann der Nachweis auch auf mRNA-Ebene mittels: RT-PCR-Techniken, Northern Blot, In-situ-Hybridisierungsmethoden (ISH), RNase Protection Assays (RPA), Microarrays oder DNA erbracht werden. Seit der Erforschung der reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion wurde eine mannigfaltige Anzahl von Anwendungen etabliert, welche Zytokin-mRNA-Expressionslevel bestimmen (Saiki et al 1998; Saiki et al 1985).

Im Falle dieser Arbeit wurde eine sogenannte Real-time (RT) PCR angewandt.

1.3.2. Der quantitative Nachweis von Zytokin-mRNA mittels LightCycler RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist gegenwärtig eine in der Forschung etablierte, moderne Methode, um bestimmte

DNA-Sequenzen exponentiell, schnell, und vollautomatisiert vervielfältigen zu können (Stordeur et al., 2002).

Bei herkömmlichen Methoden der RT-PCR wurden die amplifizierten Ergebnisse in einem Agarose-Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht, und deren Auswertung erfolgte quantitativ anhand der im Gel sichtbaren Banden.

Mittels LightCycler RT-PCR besteht heute jedoch die Möglichkeit, in einer abgeschlossenen Einheit (sog. "close-tube" PCR) eine schnelle Amplifikation als auch Detektion und Quantifikation in einem Schritt durchzuführen, ohne dass weitere aufwendige Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Guilietti et al., 2001; Overbergh et al., 2003; Higuchi et al., 1993). Derzeit wird dieses Verfahren in vielen Forschungs- und klinischen Bereichen verwandt, da sie gegenwärtig das sensitivste Verfahren hinsichtlich der Detektion geringer Mengen an m-RNA darstellt (Bustin, 2000; Heid et al., 1996; Gibson et al., 1996). Sie findet demzufolge verstärkt Anwendung zur Bestimmung von Zytokin- und Chemokin-m-RNA.

Die RT-PCR gestattet die direkte Detektion der PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Reaktion (Overbergh et al., 2003) mittels fluoreszenzstoff-markierter Sonden oder Fluoreszenzfarbstoff, welche in Kapitel 2.2.1.1 genauer beschrieben werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und binden innerhalb einer bestimmten Phase des PCR-Zyklus an die gewünschte Ziel-DNA. Es zeigte sich, dass der angeregte Farbstoff proportional gegenüber der Menge an amplifizierter DNA ist. Demzufolge kann diese mittels Software in „real-time“ dargestellt werden.

Es können dabei diverse Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen: zum einen gibt es für die Ziel-DNA sequenz-spezifische Oligonukleotide, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, wie beispielsweise die TaqMan-Sonden (Holland et al., 1991), die Molecular Beacons (Tyagi und Kramer, 1996) und die Hybridisierungs-Sonden (Wittwer et al., 1997b). Demgegenüber steht SYBR Green I, ein nicht-gekoppelter Farbstoff, der prinzipiell an jede dsDNA bindet (Morrison et al., 1998).

Zur Zeit befinden sich diverse RT-PCR Systeme auf dem Markt. Im Falle dieser Arbeit kam aufgrund seiner Sensitivität, Leistungsfähigkeit, Kosteneffektivität, und der bestehenden Möglichkeit eine große Anzahl von Proben einsetzen zu können sowie die für den PCR-Prozess kurzen benötigten Zeit das LightCycler zum Einsatz.

Mittels RT-PCR ist neben der relativen Quantifizierung auch die absolute Quantifizierung bestimmter m-RNA möglich. Dies ist durch externe Standards erreichbar. Der Standard wird dabei wie folgt hergestellt: man benötigt dazu eine Probe der gewünschten Ziel-cDNA , wobei deren Konzentration bekannt sein muss. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe aus dieser Probe erzeugt, die in das PCR-System eingesetzt wird. Anhand dieser lässt sich eine sog. Standardkurve entwickeln und dementsprechend absolute Werte für die Ausgangskonzentrationen unbekannter Proben ermitteln.

1.4. Zielsetzung

Zytokine und Chemokine sind von großer Bedeutung hinsichtlich der körpereigenen Immunabwehr. Bei Dysregulationen in der zellulären Immunabwehr entstehen Komplikationen, welche die Entstehung von Infektionen begünstigen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Zyto- und Chemokine sowie der Transkriptionsfaktor NFκB sind bedeutend an der Entwicklung pathophysiologischer Komplikationen beteiligt. Besondere Bedeutung kommt ihnen dabei hinsichtlich der Entstehung von Komplikationen nach allogener Stammzellübertragung und GVH-Reaktionen zu, wie aus Tabelle 1 Kapitel 1.2 ersichtlich. Die untersuchten Zyto- und Chemokingene kamen aus diesen Gründen bei meiner Studie zum Einsatz, um deren Funktion bei der Entstehung oben genannter Komplikationen aufzuklären.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde folgendes Ziel verfolgt:

Für die oben genannte Auswahl an Zytokin- und Chemokingenen, einen Assay mittels LightCycler zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-/Chemokin-m-RNA über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden zu etablieren.

Die externen Standards sollten dabei im Labor selbstständig generiert werden, weil man dadurch von kommerziellen Standards unabhängig war.

Mittels eines spezifischen LightCycler PCR-Protokolls sollte eine Methode entwickelt werden, um im Weiteren ein sensibles, schnelles, spezifisches, kostengünstiges und ökonomisches Arbeiten mit diesem Assay zu gestatten.

Dieser LightCycler-Assay soll im Rahmen der Forschung auch zur Testung weiterer Zytokine und Chemokine Anwendung finden und damit das Spektrum erweitern.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Bezugsquellen

2.1.1. Geräte

Computer	T-Bird	Fujitsu Siemens Computers, Sömmerda
Betriebssystem	Windows Me	Microsoft, München
Drucker	DeskJet 695C	Hewlett Packard, München
Programme	Microsoft Word 2000	
	Microsoft Excel 97	
	LightCycler Software Version 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Systeme	LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
	LightCycler Carousel Centrifuge	
	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Drei Eich
Sterilbänke	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Hanau
	Biogard B 40-112	Baker Company, Sanford, Maine, USA

Pipetten	Variopetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettus-akku	Hirschmann, Laborgeräte
Vortex	Top-Mix 94323	Heidolph Instruments
Gelkammer	Horizon 11.14	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Ultrazentrifuge	Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Wasserbad	WB	Memmert, Leonberg
Mikrowelle		Bosch

2.1.2. Verbrauchsgegenstände

LightCycler Kapillaren	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	10 µl, 100µl, 1000µl	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Einwegpipetten	25 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA

Reaktionsgefäße	0,2 ml MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, USA
	1,5 ml, 2,0ml Tubes	Eppendorf, Hamburg
LightCycler Kit		Roche Diagnostics, Mannheim
	- SYBR Green I - Fast Start DNA Master Hybridzation Probes	
QIAquick PCR Purification Kit		Quiagen,Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit		Quiagen,Hilden

2.1.3. Chemikalien

Primer und Sonden		Tib Molbiol, Berlin
Agarose		Sigma, Deisendorf
TAE Buffer		Life Technologies, Gaithersburg,USA
Gel Star		FMC BioProducts, Rockland,USA

BlueJuice Gel Loading Buffer

READY-LOAD 100bp DNA Ladder

2.1.4. Kits

Extraktion	RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	
	QIAquick Gel Extraction Kit	
Transkription	1 st Strand cDNA Synthesis	Roche Diagnostics ; Mannheim
PCR	PCR Core Kit	
	LightCycler	
	<ul style="list-style-type: none">• FastStart DNA Master SYBR Green• FastStart DNA Master Hybridization Probes• RNA Master Hybridization Probes	

2.2. Methoden

2.2.1. Das LightCycler PCR Analysesystem

Der LightCycler findet im Wesentlichen zur Durchführung qualitativer und quantitativer PCR-Reaktionen innerhalb von 45- 60 Min. seine Anwendung.

Aufbau des LightCyclers:

Das Gerät ist aus einer oberen und unteren Einheit aufgebaut. Die obere Einheit enthält die Heizspirale, die untere enthält die Temperaturkammer, darin das Probenkarussell, das Fluorimeter, die Motoren sowie die Energieversorgung.

Arbeitsprinzip des LightCyclers:

Im Gegensatz zu herkömmlichen konventionellen PCRs, die mit einem Heizblock ausgestattet sind, wird beim LightCycler zum Erhitzen und Abkühlen der Proben Luft verwendet.

Die Temperaturregulierung im LightCycler erfolgt über eine Heizspirale.

Die von ihr erzeugte warme Luft wird mittels eines Ventilators, der sich am Boden der Temperaturkammer befindet, gleichmäßig in der Kammer verteilt.

Dadurch ist eine homogene Temperaturverteilung um die Proben herum gewährleistet. Eine Abkühlung in der Wärmekammer wird durch die Zufuhr von Raumluft erreicht.

Die Proben werden für die LC PCR in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Diese haben einen Außendurchmesser von 1,55 mm und sind 35 mm lang.

Das erforderliche Reaktionsvolumen ist mit 10-20 µl minimal.

Die Verwendung von Luft zur Wärmeregulation sowie das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Kapillaren ermöglicht die raschen Temperaturänderungen im LC.

Mittels eines Gebläses wird die erwärmte Luft gleichmäßig um die einzelnen Kapillaren verteilt. Dies ermöglicht eine zügige Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20 °C/ sek sowie eine Genauigkeit von $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

Ein weiterer Vorteil hinsichtlich des günstigen Verhältnisses zwischen der großen Oberfläche zum Volumen der Glaskapillaren besteht darin, dass auch durch das rasche Aufheizen und schnelle Abkühlen, eine verkürzte Zyklendauer (ein Zyklus beträgt ca. 30 s) ermöglicht wird.

Das optische System des LightCycler besteht aus drei Messkanälen für Wellenlängen im Bereich von 530 nm (Kanal 1), 640 nm (Kanal 2), 710 nm (Kanal 3). Es ermöglicht somit die Messung der Fluoreszenz aller im Karussell angeordneten Proben während einer PCR.

Hier erfolgt die Detektion der PCR-Proben. Mittels Photodioden misst das optische System die Fluoreszenz, die jeweils von der Spitze der einzelnen Kapillaren ausgeht.

Pro Kapillare beträgt die Messzeit rund 20 Millisekunden.

Die Amplifikation in Echtzeit kann auf dem Monitor simultan dargestellt und verfolgt werden, da der Motor im Probenkarussell jede einzelne Kapillare in die richtige Position zur optischen Einheit bringt (daher der Name: real-time PCR).

Die LightCycler Software (Version 3.5) dient zur Analyse.

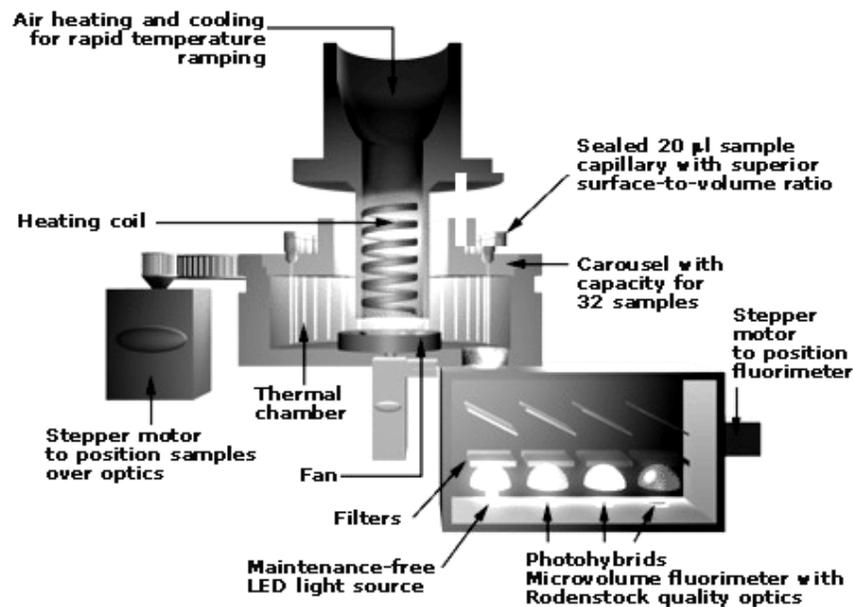


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der LightCycler Instruments

2.2.1.1. Detektion der PCR Produkte , Prinzipien

Im LightCycler kommen ganz bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die sich im Reaktionsansatz (Bsp. Sonden) befinden.

Diese Farbstoffe binden in ganz bestimmten Phasen des PCR-Zyklus an die gewünschte Ziel-DNA.

Die optische Einheit des LightCycler regt durch Licht einer bestimmten Wellenlänge die Fluoreszenzfarbstoffe an. Die Fluoreszenz steht dabei in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA.

Zur Detektion der PCR-Produkte mittels LightCycler bestehen mehrere Möglichkeiten. Zu erwähnen sind zum einen die Detektion über TaqMan Sonden (Holland, 1991), zum anderen der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Rasmussen, 2001) und das sogenannte Hybridization Probes Format (Hybridisierung-Sonden) .

Bei dieser Arbeit erfolgte die Detektion der PCR-Produkte über Hybridisierung-Sonden.

Daher soll dieses näher in Betracht genommen werden.

- Hybridization Probes Format

Das Hybridization Probes Format findet seine Anwendung bei der Detektion und Quantifikation von DNA. Es handelt sich dabei um zwei sequenzspezifische Oligonukleotide, die dazu dienen, DNA nachzuweisen.

Dabei ist jedes der beiden Oligonukleotide an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Sonde 1 trägt an ihrem 3^l-Ende den sogenannten Farbstoff : *Fluorescein* , wohingegen Sonde 2 an ihrem 5^l-Ende den Farbstoff: : *LightCycler Red 640* trägt. Die Sequenzen der Sonden sind so gewählt, dass sie im kleinstmöglichen Abstand (1-5 Nukleotide) zueinander liegen, in einem sog. "head-to-tail arrangement" und somit die Ziel-DNA hybridisieren. Dabei findet ebenso auch eine Annäherung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe statt.

Dies geschieht ausschließlich innerhalb der Annealing-Phase, da nur hier die DNA in Form von Einzelsträngen vorliegt und somit die Sonden binden können.

Der Farbstoff *Fluorescein* wird am Ende der Annealing-Phase durch das blaue Licht (470 nm) der LED angeregt und strahlt wiederum grünes Licht (530 nm) ab. Dadurch, dass die beiden Farbstoffe in engem Kontakt zueinander sind, wird die abgestrahlte Energie auf die zweite Sonde übertragen, wodurch deren Farbstoff (*LC Red 640*) angeregt wird. *LC Red 640* emittiert rotes Licht der Wellenlänge 640 nm, welches nun durch Kanal F2 registriert wird.

Die gemessene Fluoreszenz ist der Menge an amplifizierter Ziel-DNA direkt proportional.

Es ist äußerst günstig, die Fluoreszenz im Verhältnis F1 zu F2 (F1= Messkanal, dessen Signal mit steigendem Produkt fällt / F2=Messkanal, in welchem das Signal mit steigendem Produkt ansteigt) darzustellen.(Rasmussen, 2001)

Ein minimaler Abstand zwischen den zwei Fluoreszenzfarbstoffen spielt bei diesem Vorgang eine entscheidende Rolle für die Energieübertragung.

Der gesamte Vorgang ist unter der Bezeichnung FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) bekannt und wurde schon häufig beschrieben. (Wittwer et al.,1997; Clegg, 1995)

2.2.1.2. Quantitative PCR im LightCycler, Grundlagen

Im Nachstehenden soll das Prinzip der quantitativen real-time PCR zum besseren Verständnis eingehend aufgezeigt werden:

Mit jedem neuen PCR-Zyklus lässt sich ein Anstieg der Fluoreszenz erkennen. Die dabei gemessene Fluoreszenz korreliert dabei mit der PCR-Produkt-Akkumulation. Mittels Software lässt sich die gemessene Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl darstellen.

Das Reaktionsprofil einer PCR lässt sich in drei Segmente unterteilen: 1.) in die frühe Phase (oder auch background-Phase), 2.) in die Phase des exponentiellen Wachstums (oder auch log-Phase) und 3.) in die Plateau-Phase.

In der frühen Phase dominieren zunächst die Hintergrundsignale.

Die frühe Phase wird abgeschlossen, wenn die Signale des PCR-Produkts die Hintergrundsignale übertreffen. In Abhängigkeit von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die

Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts drastisch von denen des Backgrounds ab. Diese Stelle lässt sich anhand der Software deutlich erkennen und stellt den sogenannten Crossing Point (Cp) dar. Laut Definition ist der Cp als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet, festgelegt.

Im Anschluss daran erfolgt die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) - in dieser Phase wird nun die DNA exponentiell vervielfältigt.

Laut Theorie dürfte die Phase des exponentiellen Wachstums kein Ende nehmen, da mit jedem neuen Amplifikationszyklus eine erneute Verdopplung des Ausgangsmaterials stattfinden sollte. Es hat sich jedoch experimentell erwiesen, dass oben genannte Annahme nicht zutrifft, sondern dass in späteren Phasen der Reaktion die Amplifikation zunehmend weniger effizient verläuft oder sogar vollständig zum Erliegen kommt.

An dieser Stelle findet ein fließender Übergang von der Phase des exponentiellen Wachstums in die Plateau-Phase statt. Für den sogenannten Plateaueffekt sind multiple Faktoren verantwortlich :

- Inhibitor: durch das Ansteigen von weiteren Reaktionsprodukten
- Ineffektives Primer-Annealing: die zunehmenden Konzentrationen an DNA stehen mit den Primern bei der Bindung an die Ziel-DNA durch sog. Re-Annealing des PCR-Produkts in Konkurrenz
- Enzym-Limitierung: während die Reaktion fortschreitet, nimmt die Anzahl der zu amplifizierenden Ziel-Moleküle zu, wobei die Zahl der sich in Lösung befindlichen DNA-Polymerase Moleküle gleich bleibt

Aus den oben genannten Faktoren lässt sich schlussfolgern, dass weder die frühe Phase noch die der Plateau-Phase der Amplifikation sich dazu eignen bzw. verwenden lassen können, um quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge des amplifizierten Materials treffen zu können.

Letztendlich lässt nur die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) quantitative Aussagen über die Ausgangskonzentration an Ziel-DNA zu.

Die Phase des exponentiellen Wachstums kann innerhalb weniger Zyklen annähernd mathematisch erfasst werden. Die Quantifizierung mittels externen Standards (sog. „Kinetic PCR“) von m-RNA im LightCycler ist nach folgenden Überlegungen möglich (Rasmussen, 2001):

Das Verhältnis der Crossing Points ist umgekehrt proportional hinsichtlich des Logarithmus der initial eingesetzten Kopienzahl.

Bei Einsatz eines externen Standards als Verdünnungsreihe mit bekannten Ausgangswerten in das PCR-Gerät, legt die Software ebenso die Crossing Points der einzelnen Verdünnungen fest. Durch die Darstellung der ermittelten Crossing Points (Cp) gegen die Kopienzahl (To) der Verdünnung lässt sich eine Standardkurve (Regressionsgerade) mit folgender Gleichung darstellen:

$$\mathbf{Cpc = -(1/\log E) * \log To + (\log K / \log E)}$$

K= Kopienzahl am Crossing Point

E=Amplifikationseffizienz

Die Quantifizierung unbekannter Proben erfolgt dann über das Messen der Crossing Points. Diese werden dann anhand der Gleichung der Standardkurve durch die Software in Ausgangskonzentrationen (To) umgerechnet. Unter Einsatz oben genannter Gleichung ist von größter Bedeutung, dass die Amplifikationseffizienz der Standards und die der Proben mindestens ähnlich sein muss.

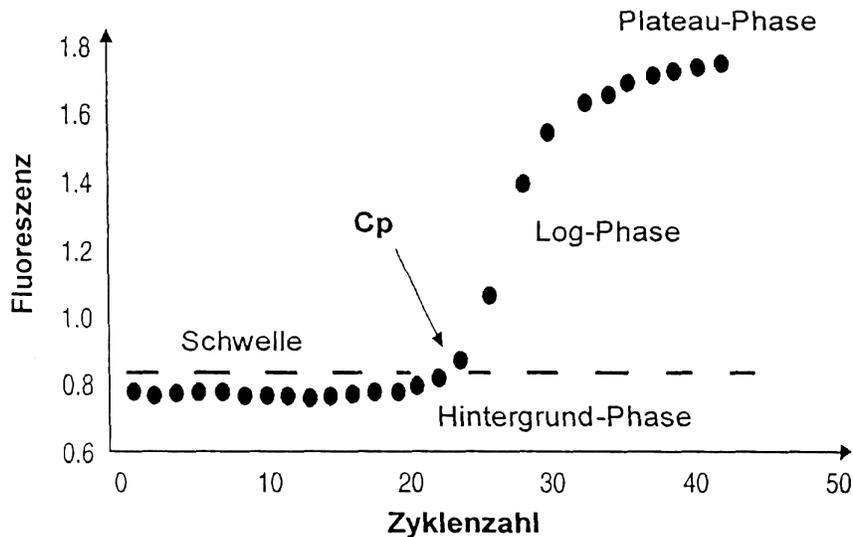


Abbildung 4: Die einzelnen Phasen der PCR – Produktakkumulation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zykluszahl. Cp = Crossing Point.

2.2.2. Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin- mRNA mittels Hybridization Probes Format

Primer und Sonden wurden von der Firma Tib Molbiol aus Berlin geliefert.

Folgende Zytokine und Chemokine wurden für diese Arbeit bezogen: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP-3 α , SCYB-11, ICAM-1, NF κ B.

Sowohl Zytokine als auch Chemokine wurden zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität mittels LightCycler getestet. (Kap 2.2.2.2)

Im Anschluss daran wurden die Primer und Sonden mittels einer konventionellen PCR getestet, um unabhängig vom LightCycler-Ergebnis auf deren Validität zu überprüfen.

Es wurden mit der konventionellen PCR daraufhin Protokolle erarbeitet, welche die Herstellung spezifischer Amplifikate ermöglichten.

Diese Amplifikate konnten nach ihrer Aufreinigung und Vermessung als externer Standard eingesetzt werden.

2.2.2.1. Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde durch Frau Marija Markulin im zellbiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von PD Dr. Holger Hebart gewonnen.

Gesunden Spendern wurde dabei 50 ml frisch heparenisiertes, venöses Blut entnommen, um daraus PBMCs zu erhalten.

Die PBMCs wurden über Ficoll (Biochrom AG, Berlin) durch Zentrifugation abgetrennt und in 1ml PBS resuspendiert. Die PBMC-Konzentration wurde auf 1×10^6 /ml RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum (Life Technologies, Karlsruhe) abgestimmt.

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation für 8 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ bei gleichzeitiger Stimulierung durch 1% Phytohämagglutinin (PHA), 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 1 µg/ml CAT (Phorol-Myrisat-Acetat)+Ionomycin (*Sigma, Deissenhofen*), 5µg/ml CAT (rekombinate Katalase) oder 5µg/ml SOD (rekombinate Mangan-Superoxiddismutase).

Sowohl CAT als auch SOD sind im Labor zur in vitro Stimulation angewendete *Aspergillus fumigatus* Extrakte.

Nach diesem Schritt erfolgte unverzüglich die RNA-Extraktion der Proben.

- **RNA Extraktion**

Mit dem *RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden)* wurde die Gesamt-RNA aus den PBMCs isoliert. Dies geschah über ein System aus Wasch – und Trennsäulen unter Verwendung verschiedener Pufferlösungen und einigen Zentrifugationsschritten mittels einer Standard-Mikrozentrifuge.

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Lyse

Eingangs wurden die Zellen für 5 Min. bei 2200 rpm abzentrifugiert.

Deren Überstand wurde daraufhin entfernt und verworfen. Das Pellet wurde entsprechend der Zellzahl in 350µl RLT-Puffer resuspendiert. Dadurch, dass der RLT-Puffer Guanidiisothiocyanat enthält, ist die Isolierung intakter RNA

möglich. Guanidiisothiocyanat gewährleistet nämlich zum einen die Denaturierung und zum anderen die Inaktivierung von RNase.

Homogenisierung

Das erhaltene Zelllysate wurde nun mittels Pipette auf eine QIAshredder-Säule gegeben, die sich in einer 2 ml Sammel-Tube befand.

Zur Homogenisierung des Produkts erfolgte nun eine Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm. Im Anschluss daran wurde 1 Volumen 70% Ethanol zum Lysat hinzugegeben und gut gemischt.

Binden der RNA

Das Lysat (max. 700 µl) wurde jetzt auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben, auch diese befand sich in einer 2 ml Sammel-Tube. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 15 sek. bei 14000 rpm.

Mittels einer Silikatgel-Membran, die sich in der RNeasy Mini Säule befindet, war es möglich, selektiv RNA (mit einer Länge von über 200 Basen) zu adsorbieren. Das beigemengte Ethanol begünstigte diesen Vorgang.

Waschen

Das Waschen erfolgte in zwei Schritten, die dazu dienten, das unter Umständen existente kontaminierte Material zu entfernen.

Beim ersten Schritt wurde 700 µl Puffer RW1 auf die RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sek. bei 14000 rpm zentrifugiert. Der zweite Schritt entsprach in seinem Vorgehen dem ersten, nur dass dabei 500 µl des Puffers verwendet wurden. Der bei den einzelnen Schritten erzeugte Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugationsvorgang verworfen.

Elution

Zum Schluss wurde die RNeasy-Säule erneut in eine 1,5 ml Sammel-Tube eingebracht und 30–50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silikatgel-Membran pipettiert. Daran schloss sich der letzte Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14000 rpm an.

Mit diesem Arbeitsschritt war die RNA-Extraktion abgeschlossen, und es konnte mit der reversen Transkription fortgefahren werden.

Diese schloss sich geradewegs an die RNA-Extraktion an, und es musste unbedingt auf Eis weiter gearbeitet werden um einen Abbau der gewonnenen RNA zu vermeiden.

- **Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription wurde mittels *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT PCR* (Roche, Mannheim) durchgeführt, unter Einhaltung der Herstelleranweisungen.

Der Mechanismus der reversen Transkription lässt sich wie folgt veranschaulichen: Am 3' -Ende der RNA bindet ein Oligo-p(dt)₁₅-Primer. Dabei bindet er an eine ganz spezifische Position, nämlich am sog. Poly-A-Schwanz (= eine aus bis zu 200 Adenylresten bestehende Sequenz).

Dadurch ist es der RNA-abhängigen Polymerase (AMV Reverse Transkriptase) möglich, an genanntem Bindungspunkt anzusetzen und die RNA in DNA umzuschreiben. Zu diesem Schritt benötigt die AMV Reverse Transkriptase Trinukleotide (siehe Reaktionsansatz) und MgCl₂.

Vorgehen:

In ein Eppendorfgefäß wurden 2 µl des Oligo-p(dt)₁₅-Primers und 8,2 µl RNA – Probe pipettiert. Die Anlagerung des Primers an die RNA fand während der anschließenden Inkubation im Wasserbad (10 min bei 65° C) statt.

Danach lagerte man die Proben auf Eis, um während dessen den Master-Mix erstellen zu können. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10 x Reaktions Puffer	2,0 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	4,0 µl	5 mM
dNTP - Mix	2,0 µl	1 mM
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 U
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	> 20 U
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>9,8 µl</u>	

(Lagerung bei- 20 °C)

Bevor der Master-Mix zum Primer und der RNA hinzupipettiert wurde, musste er zunächst gevortext und zentrifugiert werden.

Es folgte eine zweite Inkubation (bei 42° C für 60 min), bei der die sog. Extension erfolgte und eine dritte Inkubation (bei 96° C), um das Enzym zu denaturieren. Auf diese Weise soll eine Interaktion des Enzyms mit den Reagenzien, die während der PCR hinzugegeben werden, vermieden werden (Kawasaki,1990).

Nach all diesen Schritten erhielt man einzelsträngige cDNA.

Sie wurde sowohl als Probe im LightCycler-Instrument eingesetzt, als auch in einem konventionellem PCR-Gerät.

Die cDNA ließ sich in einem Eppendorfgefäß von 20 µl auf zwei verschiedene Weisen zwischenlagern: 1) für einen kurzen Zeitraum von zwei Stunden auf Eis (bei 4°C) oder über einen Zeitraum von ein paar Monaten bei -20°C.

2.2.2.2. LightCycler PCR

Zu Beginn wurden die von Tib Molbiol (Berlin) gelieferten Primer und Sonden im LightCycler mittels Testläufe überprüft.

- **Primer und Sonden Design**

Innerhalb der Exons sind die Primer lokalisiert. Dadurch lassen sich Co-Amplifikate genomischer DNA verhindern. Die Amplifikationslängen liegen in einem Bereich von 208 bp bis hinzu 301 bp. Dies entspricht der von Roche geforderten idealen Länge (kleiner 700 bp). Die Schmelzpunkte der Sonden liegen durchschnittlich um ca. 15 ° C höher als die der Primer, dadurch besteht die Garantie, dass die Sonden vor den Primern hybridisiert werden.

Für IL-2 m-RNA ist der Einsatz der Sonden und Primer im LightCycler bereits beschrieben (Giese, 2001), allerdings fand dabei ein anderes PCR Protokoll Anwendung. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick:

m-RNA-Target	Oligonukleotide (5' - 3') ^a	A (bp)
IL – 1 α	F336: CgCCAATgACTCAgAgAggAAgA	239
	R575: TTTTAgCATCATCCTTTgATgATgACT	
	FLU416: TgACgCCCTCAATCAAAGTATAATTCgA-fluorescein	
	LC445: LCRed640-CCAATgATCAgTACCTCACggCTgC-p	
IL – 1 β	F528: gCAgACTCAAATTCAGCTTgTTA	250
	R778: CAgggACAggATATggAgCAA	
	FL666: gCTTATCATCTTTCAACACgCAggACA- fluorescein	
	LC638: LCRed640-gTACAgATTCTTTTCCTTgAggCCCA-p	
IL – 2	F136: CACAgCTACAACCTggAgCATTTA	324
	R460: AgAAATTCTACAATggTTgCTgTC	
	FL216: ACCAggATgCTCACATTTAAGTTTTACAT- fluorescein	
	LC246: LCRed640-CCCAAgAAggCCACAgAACTgAAACATCT-p	
IL – 6	F417: CgCAgAATgAgAgTTgTC	232
	R649: CTTTTggAgTTTgAggTATACCTAg	
	F532: TAgATgCAATAACCACCCCTgACCCA- fluorescein	
	LC559: LCRed640-CCACAAATgCCAgCCTgCTgAC-p	
MIP 3 α	F96: CTgTCTTggATACACAgACCgTA	249
	R345: ggTTCTTTCTgTTCTTgggCTA	
	FL210: gTTgTCTgTgTgCgCAAATCCAAA- fluorescein	
	LC235: LCRed640-CAgACTTgggTgAAATATATTgTgCgTC-p	
ICAM 1	F723: CAgCCCCgggTCCTAg	301
	R1024: AgACCTCTggCTTCgTCAgAATT	
	FL843: AgTCACCTATggCAACgACTCCTTCTC- fluorescein	
	LC872: LCRed640-CCAAggCCTCAgTCAgTgTgACC-p	
SCYB 11	F123: ggCTgTgATATTgTgCTACA	208
	R331: TCgATTTgggATTTAggCA	
	FL186: TgCTTTTACCCCAgggCCTATgC- fluorescein	
	LC160: LCRed640-gACAgCgTCCTCTTTTgAACATgg-p	
NFkBIA	F2732: gCCACCAgCTggCAggTA	270
	R3002: CTgTACCCCAgAgACCTCATAg	
	FL2917:TCTggggATACTTAATAATgCCTTCCg- fluorescein	
	LC2945:LCRed640-CTgAgTCCTgCTCCTTCCAAAACACTT-p	

Tabelle 2: Primer und Sonden-Design
^a F=forward-primer, R=reverse-primer
 FL und LC stehen für Fluorescein bzw. LCRed gekennzeichnete Sonde
 Die Zahlen markieren den Ansatz auf der Sequenz der Ziel-mRNA
 A=Amplifikationslänge in Basenpaaren
 T_m=Schmelztemperatur in °C

- **LightCycler PCR Protokoll**

Es wurde ein Protokoll für die PCR verwendet, dass zuvor im Rahmen einer Pilz-Diagnostik im Labor etabliert worden ist (Löffler et al.,2000).

Im Falle dieser Arbeit wurden allein die Annealing-Temperatur und die Denaturierungszeit neu definiert.

Initialdenaturierung:	9 min bei 95° C	(20° C / sec)
Amplifikation:		(20° C / sec)
Denaturierung :	3 sec bei 95° C	(20° C / sec)
Annealing :	15 sec bei 54° C	(20° C / sec)
Extension :	25 sec bei 72° C	(20° C / sec)
Cooling:	3 min bei 40° C	(20° C / sec)

Die Dauer einer kompletten PCR betrug ca. 60 Minuten bei 48 Zyklen.

Am Ende jeder einzelnen Annealing-Phase fand die Detektion der PCR-Produkte über den Kanal F2 der optischen Einheit des LightCyclers statt.

Die Darstellung einer jeden PCR erfolgte am Schluss – es wurden zur Darstellung der Fluoreszenz F1/F2 abgeglichen (wie bereits in 2.2.1.1 dargelegt).

Jede LightCycler-PCR wurde unter Verwendung des *FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (RocheDiagnostics, Mannheim)* durchgeführt.

Die enthaltene FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot Start“-Technologie und minimiert die Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten (Birch, 1996; Kellog, 1996).

Die Taq-Polymerase musste wie folgt angesetzt werden: zum *FastStart Enzym* wurden 60 µl des *FastStart Reaction Mix* dazu pipettiert.

Ebenso mussten auch die Primer und Sonden angesetzt werden, um sie in der PCR einsetzen zu können.

Die Primer des o.g. Kits wurden jeweils in 1000 µl.H₂O gelöst, dies entspricht einer Konzentration von je 5 µM. Die Sonden wurden je in 100 µl H₂O gelöst, entsprechend einer Konzentration von 3µM.

Sowohl Primer als auch Sonden wurden nach dem Lösen kurz gevortext und für eine Viertelstunde auf Eis gelagert.

Im Anschluss daran wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsvolumen gesamt: 20 µl (=1 Kapillare)

- Proben 2 µl cDNA + 8 µl H₂O
- Master-Mix 10 µl

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O	2,6 µl	-
MgCl ₂	2,4 µl	3 mM
Primer 1	0,5 µl	0,125 µM
Primer 2	0,5 µl	0,125 µM
Sonde 1	1,0 µl	0,15 µM
Sonde 2	1,0 µl	0,15 µM
FastStart Taq	2,0 µl	1 x

Zunächst wurde in die LightCycler Kapillaren je 8 µl Wasser und 2µl cDNA-Probe pipettiert.

Danach wurde der Master-Mix erstellt, die jeweilige Menge des Ansatzes orientierte sich dabei an der Anzahl der vorhandenen Proben.

Es wurde bei jedem Versuch bei einer Probenzahl x jeweils der Master-Mix für x+2 Proben angesetzt, dadurch erhielt man eine Master-Mix-Reserve.

Diese Reserve erlaubte es, bei einem möglichen Pipettierfehler oder Bruch einer Kapillare einen unnötigen Zeitverlust durch Erstellen eines neuen Master-Mix auszuweichen.

Sowohl die LightCycler Kapillaren als auch die Reagenzien des Master-Mix waren während des gesamten Vorgangs auf Eis gelagert (4⁰C).

Beim Erstellen des Master-Mix war auf ein sorgfältiges vortexen des MgCl₂ zu achten.

Nach Herstellung des Master-Mix wurde dieser in die LightCycler Kapillaren pipettiert (10 µl /Kapillare), diese wurden nun geschlossen und in das Probenkarussell eingesetzt. Es sei zu erwähnen, dass bei jedem LightCyclerlauf immer eine Negativkontrolle mitgeführt (10 µl H₂O) wurde.

Die Proben wurden im LightCycler Karussell für 15 sek bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Probenkarussell in den LightCycler eingesetzt und die PCR gestartet.

Es sei zu erwähnen, dass angesetzte Taq sowie Sonden und Primer bei 4°C für einen Monat gelagert werden können. Häufiges Erwärmen und Abkühlen sollte dabei vermieden werden.

Die übrigen Reagenzien lassen sich bei einer Temperatur von -15 bis -20° C für ein Jahr aufbewahren.

Die Validierung der Testläufe erfolgte nach folgendem Merkmal:

Der Verlauf einer jeden PCR wurde mittels LightCycler Software dokumentiert.

Es wurde jeweils die gemessene Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl dargestellt. Zeigten sich die wie in Kap2.2.1.2 erwähnten Phasen der PCR, insbesondere aber eine über breite Bereiche hinweg gleichmäßige Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase), war die Spezifität der jeweiligen Primer und Sonden damit erbracht.

Unabhängig davon erfolgte im Anschluss eine unabhängige Validitätsprüfung mittels einer konventionellen PCR.

2.2.2.3. Generierung der externen Standards

Wie schon beschrieben in Kapitel 2.2.1.2 ist es durchaus möglich, dass Standards zur absoluten Quantifizierung von Ziel-DNA dienen. Voraussetzung dabei ist, dass die m-RNA der Standards auch die Sequenz der Ziel-DNA enthält. Unter diesen Umständen gibt es diverse Möglichkeiten, die Standards zu generieren.

Zum einen über aufgereinigte spezifische Ziel-dsDNA, die mittels einer konventionellen PCR gewonnen wird (Yin et al., 2001; Giulietti et al., 2001; Rasmussen, 2001) und zum anderen über das Klonieren von Ziel-DNA anhand eines Plasmidvektors (Overberg et al., 2003). In manchen Fällen werden sogar in vitro transkribierte RNA-Standards verwandt (Stordeur et al., 2002; Giulietti et al., 2001).

Bei dieser Arbeit wurde die erst genannte Methode dazu verwendet, die externen Standards der einzelnen Zytokine bzw. Chemokine zur absoluten Quantifizierung von Zyto-/Chemokin-mRNA zu generieren.

Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Über die konventionelle PCR wurden spezifische Amplifikate gewonnen. Diese wurden anschließend aufgereinigt und photometrisch vermessen. Daraufhin war es möglich, die Kopienzahl in der Stammlösung zu berechnen und eine Verdünnungsreihe des Standards herzustellen. Die Verdünnungsreihe wurde hinterher im LightCycler eingesetzt und getestet.

• Gewinnung der spezifischen Amplifikate mittels konventioneller PCR

Die konventionelle PCR wurde mit dem Gerät namens :GeneAmp 2400 (*Perkin Elmer, Drei Eich*) in Kombination mit dem *PCR Core Kit* durchgeführt.

Es wurden dabei dieselben Zytokin- bzw. Chemokin-Primer angewandt, die auch schon zuvor mittels LightCycler getestet worden waren.

Ebenso fanden hier auch dieselben Proben, des vorangegangenen LightCycler-Laufes Anwendung. Allerdings wurden nur signifikante Proben eingesetzt.

Das heißt, es kamen nur jene Proben zum Einsatz, bei denen durch den LightCycler-Testlauf über die Crossing Points auf eine - im Vergleich zu den anderen Proben - höhere Ausgangskonzentration an Zytokin-mRNA geschlossen werden konnte.

Im Gegensatz zur LightCycler PCR mussten anschließend die Amplifikationsprodukte durch die Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Nach einigen Versuchen konnte für alle Zytokine und Chemokine ein PCR-Protokoll verwendet werden.

Es musste lediglich bei IL-1 β die Zyklenzahl sowie die Annealing-Temperatur und bei MIP3- α allein die Zyklenzahl verändert werden.

mRNA-Target	Initialdenaturierung	Zyklus			Extension	Zyklenzahl
		Denaturierung	Annealing	Extension		
IL-1 α	95°C, 5min	95°C, 45 sek	54°C* 45 sek	72°C 60 sek	72°C 10 min	36*
IL-1 β						
IL-2						
IL-6						
MIP3 α						
ICAM1						
SCYB11						
NF κ BIA						

Tabelle 3: * = die Annealing – Temperatur bei IL1- β und MIP3 α wurde von 54°C auf 57°C geändert.

* = bei IL1- β wurde die Zyklenzahl auf 32 reduziert

Pipettierschema:

Reaktionsvolumen gesamt: 50 μ l

- Proben: 3 μ l cDNA
- Master-Mix 47 μ l

Reagenz	Volumen
H ₂ O	40,7 μ l
PCR Puffer, 10xkonz. (MgCl ₂ , KCl)	5,0 μ l
DNTP	1,0 μ l
Primer 1	0,5 μ l
Primer 2	0,5 μ l
Taq Polymerase	0,3 μ l

Bevor der Master-Mix erstellt wurde, wurden die Proben in die für die konventionelle PCR zu verwendenden 0,2 ml PCR Tubes pipettiert.

Dann wurde der Master-Mix hinzugegeben.

Auch bei dieser PCR-Methode wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt.

Das *PCRCore Kit* wurde bei -20° C gelagert.

- **Gelelektrophorese**

Nach der Amplifikation fand die Auftrennung der Amplifikate nach ihrer Größe in einem 2 % TAE Agarosegel durch angelegte elektrische Spannung für ca. 1 Stunde statt. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte dabei mit einem Größenmarker (100bp; *READY LOAD 100 bp DNA LADDER, Life Technologies*). 10µl des Amplifikationsprodukts wurden mit 2,5µl Blue Juice Puffer versetzt, und das daraus entstandene Probenvolumen von 12,5µl wurde in die einzelnen Taschen des bereits vollständig ausgehärteten TAE Agarosegel pipettiert.

Die Pufferung der Gelkammer erfolgte durch 1x TAE-Puffer (40mM Tris–Acetat; ph 7,5 ; 2mM EDTA; Life Technologies).

Durch Zugabe von GelStar (Ethidiumbromid) bei der Gelherstellung konnte das Gel sofort unter UV-Licht (312 nm) ausgewertet und fotografiert werden.

Auf dem erstellten Foto konnten die Banden der Amplifikate in Bezug auf den mitgeführten Größenmarker miteinander verglichen werden, d. h., es ließen sich relative Angaben über die Amplifikatlänge in Basenpaaren (bp) machen.

Die Spezifität eines Amplikats war damit bestätigt, wenn sich im Gel eine Bande abzeichnete, die mit der Amplifikatlänge, die für den jeweiligen Primer und die jeweilige Zytokin-/Chemokin-mRNA berechnete Länge, überein kam. Berechnet wurden die Amplifikatlängen über ein Internetprogramm des *National Center of Biotechnology Information* (Adresse:www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

- **Aufreinigung**

IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP3 α , ICAM1, SCYB11, NF κ BIA

Die Amplifikate, die aufgrund ihrer starken Intensität im Gel imponierten, wurden im Anschluss aufgereinigt. Dies geschah anhand des *QIAquick PCR Purification Kit.*, unter Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls. Das Aufreinigen dient dazu, PCR-Beiprodukte zu entfernen, um reine cDNA zu erhalten.

Bei jedem Vorgang wurden jeweils 40 μ l des PCR-Produkts durch DNA-Trennsäulen aufgereinigt.

Die Aufreinigung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Binden der DNA: zu den 40 μ l des PCR-Produktes wurden 200 μ l PB Puffer hinzupipettiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine QIAquick Trennsäule gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss wurde verworfen, und die Trennsäule danach wieder in die Sammel-Tube eingebracht.

2. Waschen: Das Waschen erfolgte durch die Zugabe von 0,75 ml PE Puffer auf die Trennsäule, welche daraufhin für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach jedem Zentrifugationsvorgang wurde auch hier der Durchfluss verworfen.

3. Elution der DNA.: zunächst musste die QIAquick Trennsäule in eine neue Sammel-Tube gegeben werden. Im Anschluss daran wurde 30 μ l EB Puffer (10mM Tris Cl, pH 8,5) mittig auf die QIAquick Säule pipettiert und für 1 min abgewartet, bevor man sie für 1 min bei 13000rpm zentrifugierte

- **Vermessung**

Die Vermessung der aufgereinigten Amplifikate erfolgte mittels Photometer. Dabei ließ sich die Konzentration an dsDNA im Eluatpuffer bestimmen.

Bei jedem Messvorgang wurden jeweils 7 μ l vermessen. Vorab wurde jedoch erst ein Leerwert eingesetzt (7 μ l H₂O), und danach erfolgte das Messen der Proben.

Die Extinktion für dsDNA wurde bei 260 nm gemessen und die Extinktion der Proteine bei 280 nm. Als Maßstab für die Reinheit der DNA galt dann der

Quotient der zwei Ergebnisse. Dabei galt ein Quotient zwischen 1,7 bis hin zu 1,9 als ideal.

- **Berechnung der Kopienzahl**

Durch das Vermessen erhielt man die genaue Information über die Konzentration der (C) an dsDNA des jeweiligen aufgereinigten Amplifikats im Eluatpuffer (C[$\mu\text{g/ml}$]). Mittels dieser Information und der bekannten Amplifikatlänge des jeweils vorliegenden Zytokins bzw. Chemokins war es möglich, die genaue Kopienzahl des vorhandenen Amplifikats mit folgender Formel zu errechnen (Giulietti et al., 2001; Overberg et al., 2003).

Dies soll an dieser Stelle anhand der Rechenschritte zur Bestimmung der Kopienzahl in der Stammlösung veranschaulicht werden am Beispiel von IL-2 :

Die zur Berechnung benötigte Formel lautet:

$$\text{Kopienzahl (K)} = C_{\text{photometer}} * x$$

Die über *NCBI* ermittelte Amplifikatlänge für IL – 2 beträgt: 324 bp

Nach folgender Überlegung errechnet sich **x**:

$$1000\text{bp} = 9,1 * 10^{11} \text{ Kopien} / \mu\text{g}$$

$$324\text{bp} = x$$

$$x = (1000\text{bp} / 324\text{bp}) * 9,1 * 10^{11} \text{ Kopien} / \mu\text{g}$$

$$x = 28,09 * 10^{11} \text{ Kopien} / \mu\text{g} \quad \text{bzw} \quad 2,81 * 10^{12} \text{ Kopien} / \mu\text{g}$$

Die im Photometer ermittelte **Konzentration (C)** an vorliegender dsDNA betrug beim IL – 2 Amplifikat bei:

$$C = 13 \text{ ng} / \mu\text{l} \quad \text{daraus folgt} \quad 390\text{ng} / 30\mu\text{l}$$

Die **Kopienzahl (K)** errechnete sich wie folgt aus:

$$\begin{aligned} K &= (390\text{ng}/30\mu\text{l}) * (2,81 * 10^{12}\text{K}/\mu\text{g}) \\ &= 1,096 * 10^{12}\text{K} / 30\mu\text{l} \\ &= \underline{\underline{3,65 * 10^{10} \text{ Kopien}/\mu\text{l}}} \end{aligned}$$

Auf diese Weise ermittelte man aus einem aufgereinigten, spezifischen Amplifikat eines jeden Zyto- bzw Chemokins die genaue Konzentration, die an spezifischer dsDNA vorlag.

Mit diesem Wissen konnte somit ein definitiver externer Standard im LightCycler eingesetzt werden. Es erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe ($10^9 - 10^0$ Kopien/ μl) , die anschließend mittels LightCycler getestet wurde.

Damit steht fest, dass eine absolute Quantifizierung (=Angabe der Kopienzahl) von Zyto- bzw. Chemokin-mRNA in unbekanntenen Proben anhand der Standardkurve der Verdünnungsreihe im LightCycler möglich ist.

Die LightCycler PCR wurde mit den generierten Standards, wie in Kapitel 2.2.2.3 (LightCycler PCR) beschrieben, durchgeführt.

2.2.2.4. Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR

Nach der Herstellung von Verdünnungsreihen der Amplifikate folgte die Durchführung der LightCycler PCR mit den Standardverdünnungsreihen aller Zytokine anhand des in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen LightCycler Protokolls.

Es wurden die Verdünnungen des Standards zu je 10 μl eingesetzt. Dabei lag der eingesetzte Verdünnungsbereich zwischen 10^{10} - 10^1 bzw. 10^9 - 10^1 Kopien (Verdünnung jeweils 1:10).

Eine negativ Kontrolle (H_2O) wurde stets mitgeführt.

- Reproduzierbarkeit

Nachdem sich alle 8 Zytokine und Chemokine absolut quantifizieren ließen, wurden die Standards auch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit mittels LightCycler überprüft.

Dies geschah zum einen in verschiedenen, voneinander unabhängigen PCR-Läufen (Inter-Assay) und zum anderen in einem PCR-Lauf durch 2- oder 3-maligen Einsatz des Standards.

In diesem Fall wurde die Standardabweichung der Crossing Points berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. LightCycler Assay zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-Genexpression

3.1.1. Spezifität

Vorab war die Spezifität der Primer und Sonden durch Einsatz in die LightCycler PCR geprüft worden. Bei allen Läufen zeigte sich bei der Darstellung der Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl eine regelmäßige Phase des exponentiellen Wachstums (=Log-Phase).

Die nachfolgenden Abbildungen legen die Kontrolle der Spezifität der externen Standards mittels Gelelektrophorese dar:

Die Abbildung zeigt die Kontrolle bei Generierung des Standards nach konventioneller PCR. (Abb.5)

IL-1 α

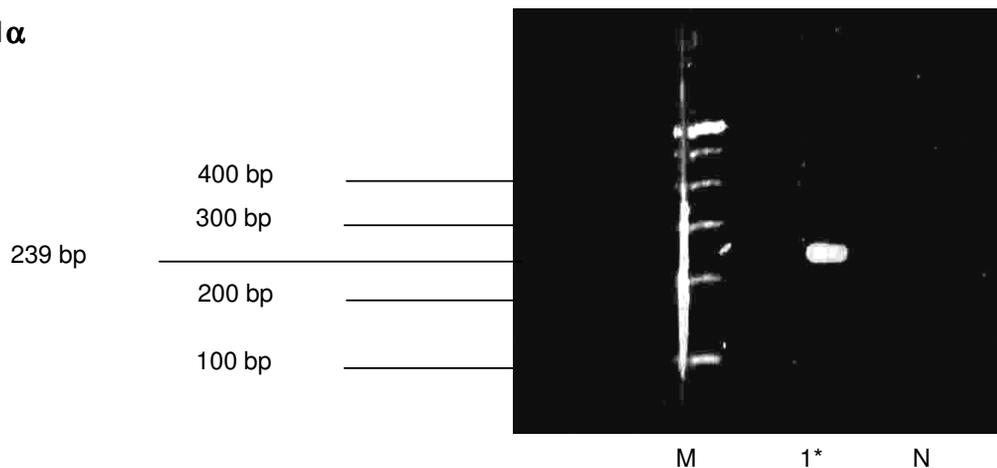


Abbildung 5:

Gel-Elektrophorese des spezifischen Amplifikats IL-1 α nach konventioneller PCR. Das mit * gekennzeichnete Amplifikat wurde aufgereinigt und vermessen und diente danach als externer Standard.

M: DNA-Größenmarker (100 bp)

N: Negativkontrolle (H₂O)

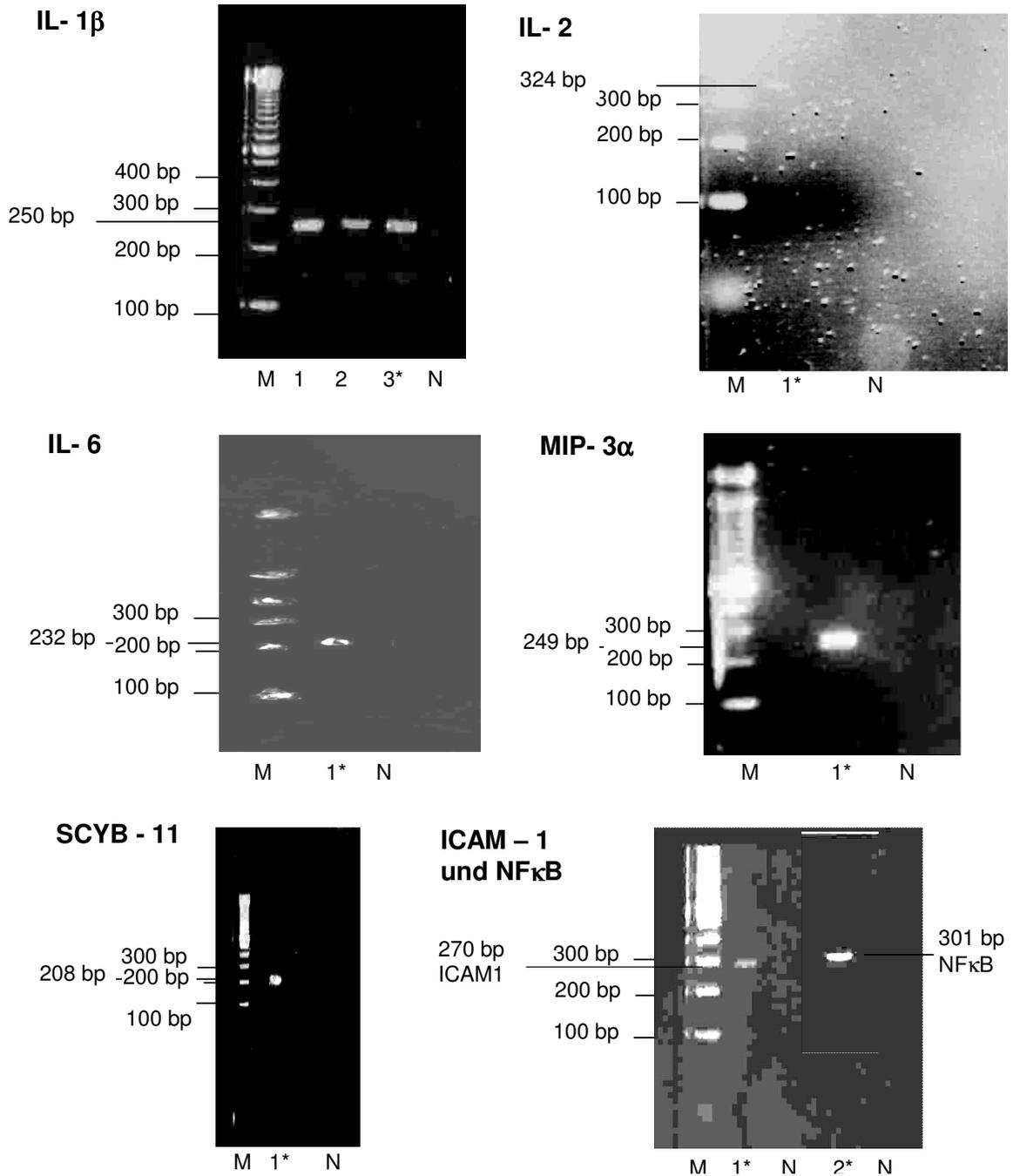


Abbildung 6: Gel-Elektrophorese der spezifischen Amplifikate für IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP-3 α , SCYB-11, ICAM-1 und NF κ B nach konventioneller PCR.

M:Größenmarker (100 bp) / N:Negativkontrolle (H₂O)

Die Amplifikate sind durchnummeriert; das mit * gekennzeichnete Amplifikat wurde aufgereinigt und vermessen und diente als externer Standard.

Die berechneten Amplifikatlängen sind orientierend markiert. Unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeiten der Gel-Elektrophorese ist in jedem Gel die für das entsprechende Zytokin-Target signifikante Bande zu erkennen. Es findet keine Coamplifikation unspezifischer DNA statt.

3.1.2. Linearität

Für jede Standardkurve wurde von der LightCycler Software der lineare Korrelationskoeffizient r angegeben. In jedem PCR-Lauf wurde für alle Standardkurven ein linearer Korrelationskoeffizient von $r=1$ ermittelt.

Die folgende Abbildung zeigt am Beispiel des IL-2-Standards den original LightCycler-Ausdruck nach Einsatz der Standardverdünnungsreihe in die LightCycler PCR.

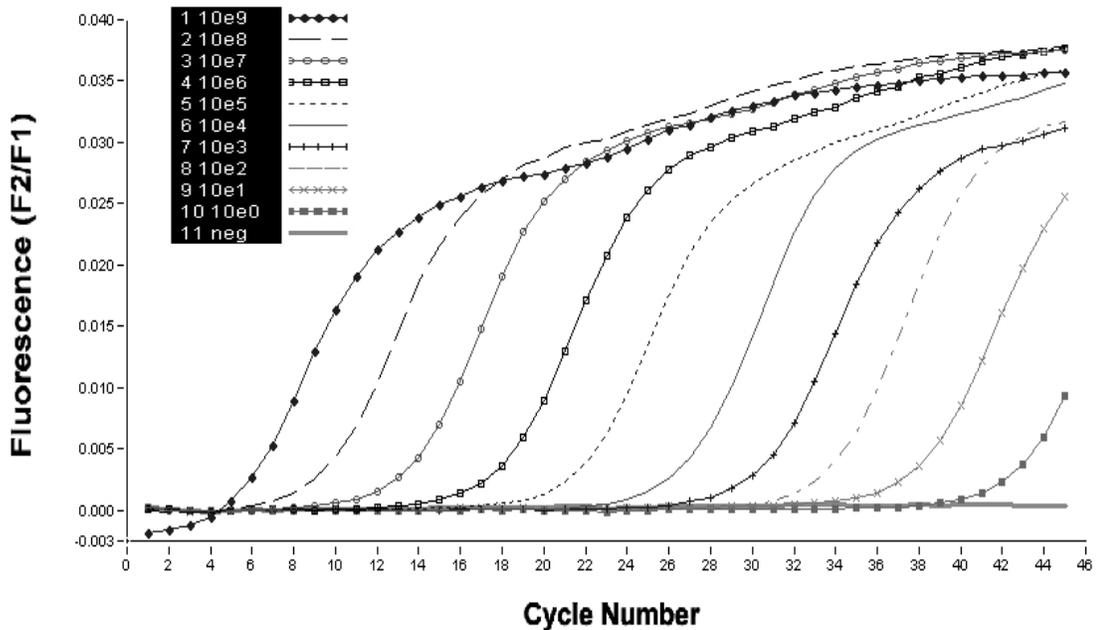


Abbildung 7: Verdünnungsreihe IL-2 Standard (10^{10} - 10^1 Kopien / $10\mu\text{l}$)

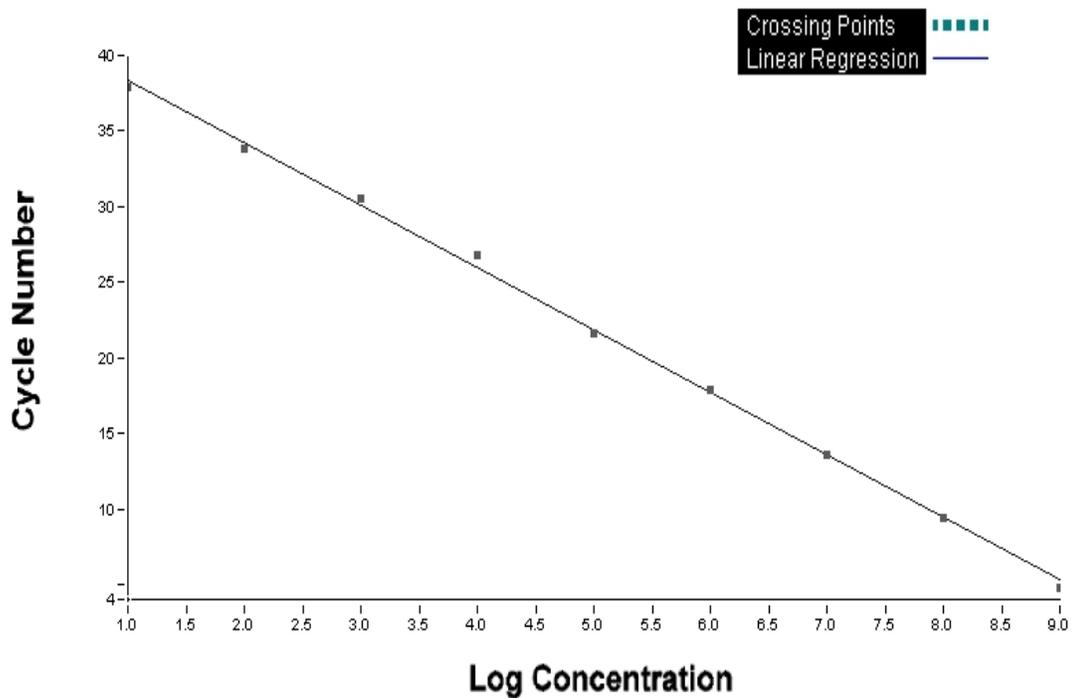


Abbildung 8: Entsprechende Regressionsgerade des IL-2 Standards.

$r = -1,00$

3.1.3. Sensitivität

Für die Sensitivität des Assays fungierte die minimalste Konzentration der Standardverdünnungsreihen, die unter diesen PCR-Bedingungen amplifiziert wird, als Indikator. Die untere Detektionsgrenze lag dabei zwischen 10^1 Kopien für: IL-2, IL-6, MIP3- α , NF κ B und ICAM-1 Standard. Beim IL-1 β und IL-1 α Standard lag die Grenze bei 10^2 Kopien und beim SCYB-11-Standard befand sich die Detektionsgrenze bei 10^3 Kopien.

3.1.4. Amplifikationseffizienz

Die Amplifikationseffizienz errechnet sich aus der Steigung m der Regressionsgeraden nach folgender Formel: $E = 10^{-1/m}$

- Amplifikationseffizienz der Standards:

Die theoretisch optimale Amplifikationseffizienz entspricht $E=2$, was der Verdoppelung der DNA mit jedem PCR-Zyklus gleich kommt.

Die nachstehenden Amplifikationseffizienzen wurden für die Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihen ermittelt:

Tabelle 4: Mittelwerte E der Amplifikationseffizienzen Standardverdünnungsreihen für n LightCycler-PCRs.

M: Median der Effizienzen

s: Standardabweichung vom Mittelwert

Standardverdünnungsreihe	E	M	s	n
IL-1 α	1,592	1,562	0,147	3
IL-1 β	1,758	1,720	0,116	6
IL-2	1,818	1,793	0,065	4
IL-6	1,614	1,656	0,175	6
MIP- 3 α	1,567	1,596	0,143	4
SCYB-11	1,876	1,890	0,031	5
ICAM-1	1,881	1,903	0,047	3
NF κ B	1,872	1,871	0,002	4

3.1.5 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der hergestellten Standards wurde zum einen zwischen den n verschiedenen PCR-Läufen (Inter-Assay) und zum anderen in einem PCR-Lauf durch 3-fachen Einsatz des Standards (Intra-Assay) im LightCycler kontrolliert.

Nach Einsatz der Standardverdünnungsreihen bestimmte die LightCycler Software anhand der gemessenen Crossing Points die absoluten Kopienzahlen der Verdünnungen. Diese Werte wurden zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit herangezogen.

3.1.5.1. Inter-Assay Reproduzierbarkeit

Für die von der LightCycler Software bestimmten Kopienzahlen der eingegebenen Standardverdünnungen wurde der Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ der absoluten Kopienzahl berechnet (Tabelle 5).

Zudem wurden die mittleren Kopienzahlen und die Standardabweichungen für die jeweilige Verdünnung errechnet. Sie sind in Abbildung 9 dargestellt.

Tabelle 5 und Abbildung 9 verdeutlichen, dass die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit hinsichtlich der niedrigen Konzentrationen der Standardverdünnungen abnimmt.

Variationskoeffizient CV_{conc.} (%)						
	Standardverdünnungsreihe					
	1 x 10⁶	1 x 10⁵	1 x 10⁴	1 x 10³	1 x 10²	1 x 10¹
IL-1 α (n=3)	12,84%	22,94%	28,23%	26,05%	35,24%	--
IL-1 β (n=6)	11,07%	21,61%	34,07%	27,59%	49,52%	--
IL-2 (n=4)	16,07%	17,45%	20,55%	27,73%	52,74%	63,25%
IL-6 (n=6)	14,10%	30,02%	18,51%	58,42%	73,17%	76,40%
MIP-3 α (n=4)	17,00%	41,15%	53,21%	55,22%	58,34%	61,62%
NfκB (n=4)	9,67%	15,79%	24,85%	32,15%	45,82%	64,32%
SCYB-11 (n=5)	4,12%	10,83%	35,28%	40,59%	--	--
ICAM-1(n=3)	7,79%	7,18%	19,57%	24,28%	48,94%	66,32%

Tabelle 5: Variationskoeffizient CV_{conc.} (%) der von der Software determinierten absoluten Kopienzahlen für die einzelnen Verdünnungen (10⁶ - 10¹ Kopien / 10µl) der Zytokin-/Chemokin-Standards in n LightCycler-Läufen.

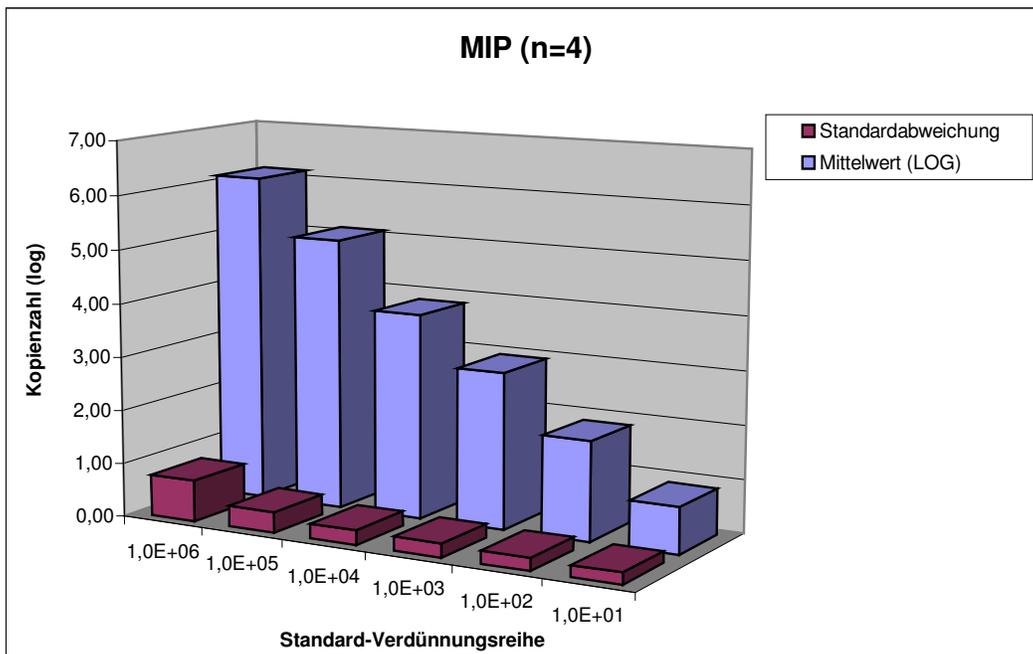
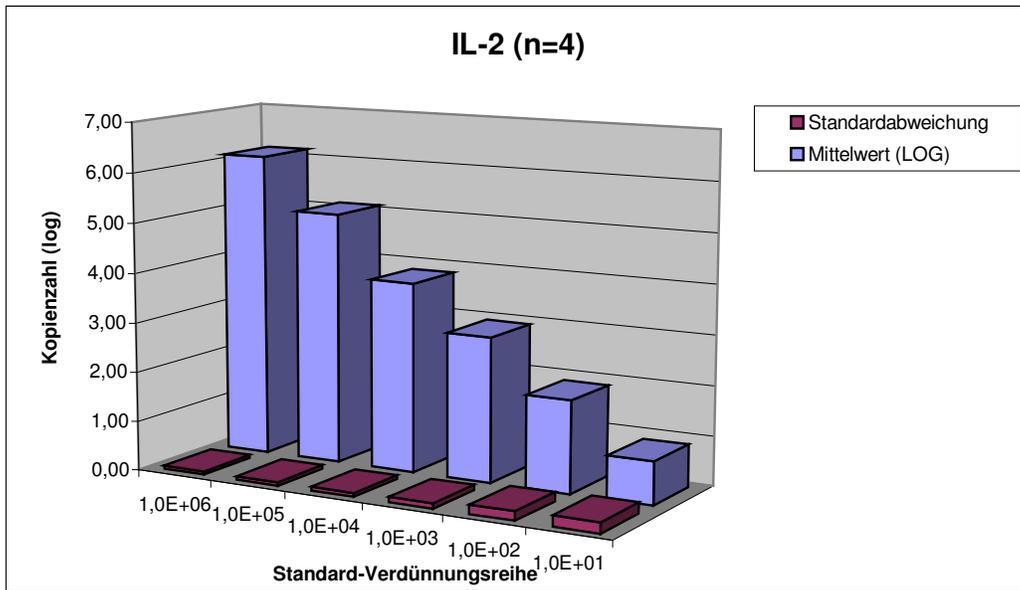
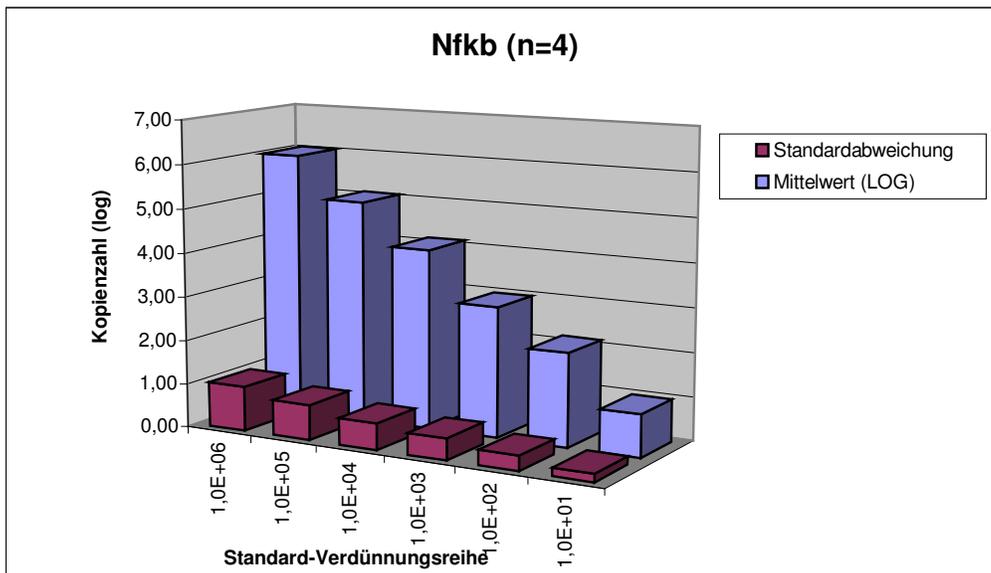
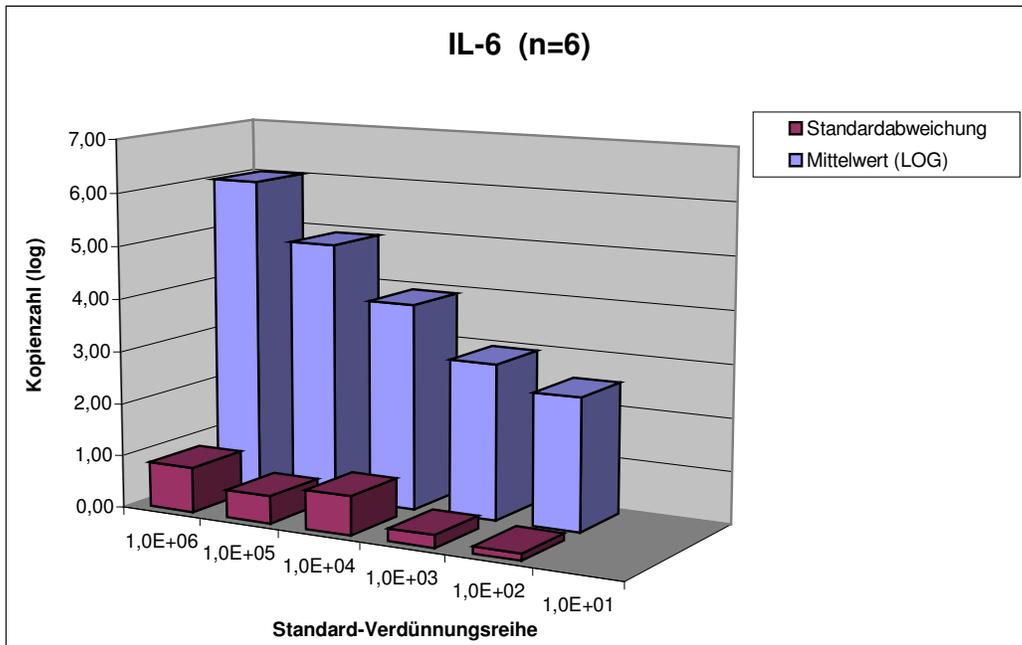


Abbildung 9: Inter-Assay Reproduzierbarkeit exemplarisch für 4 Zytokin/ Chemokin-Standards. Einsatz der Verdünnungsreihe (10^6 - 10^1 Kopien/ $10\mu\text{l}$) in n LightCycler Läufen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standard-Abweichung der von der LightCycler Software determinierten absoluten Kopienzahlen der jeweiligen Verdünnung.



Fortsetzung Abbildung 9

3.1.5.2. Intra-Assay Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde beispielhaft durch den Einsatz des IL-2 und MIP3- α Standards überprüft. Dazu wurden Verdünnungsreihen über einen Konzentrationsbereich von 10^6 - 10^1 Kopien /10 μ l 3mal im selben LightCycler-Lauf mitgeführt (Abbildung 10).

Auch hier wurde der Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ der absoluten Kopienzahl für die einzelnen Verdünnungen berechnet. Es zeigte sich, dass auch in diesem Falle eine Abnahme der Reproduzierbarkeit im Bereich der niedrigen Konzentrationen der Standardverdünnungen ersichtlich ist.

Jedoch erhielt man ein besseres Ergebnis, hinsichtlich der Intra-Assay Reproduzierbarkeit im direkten Vergleich zur Inter-Assay Reproduzierbarkeit Tabelle 6.

Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%)						
	Standardverdünnungsreihe					
	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1
IL-2 (n=3)	7,04%	11,53%	15,95%	25,78%	26,66%	60,08%
MIP3-α (n=3)	2,98%	18,94%	15,61%	20,12%	37,48%	83,04%

Tabelle 6: Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%) der von der Software determinierten absoluten Kopienzahlen für die Standardverdünnungsreihen 10^6 - 10^1 Kopien /10 μ l IL-2 und MIP-3 α nach 3 maligem Einsatz der Verdünnungen in einen LightCycler-Lauf.

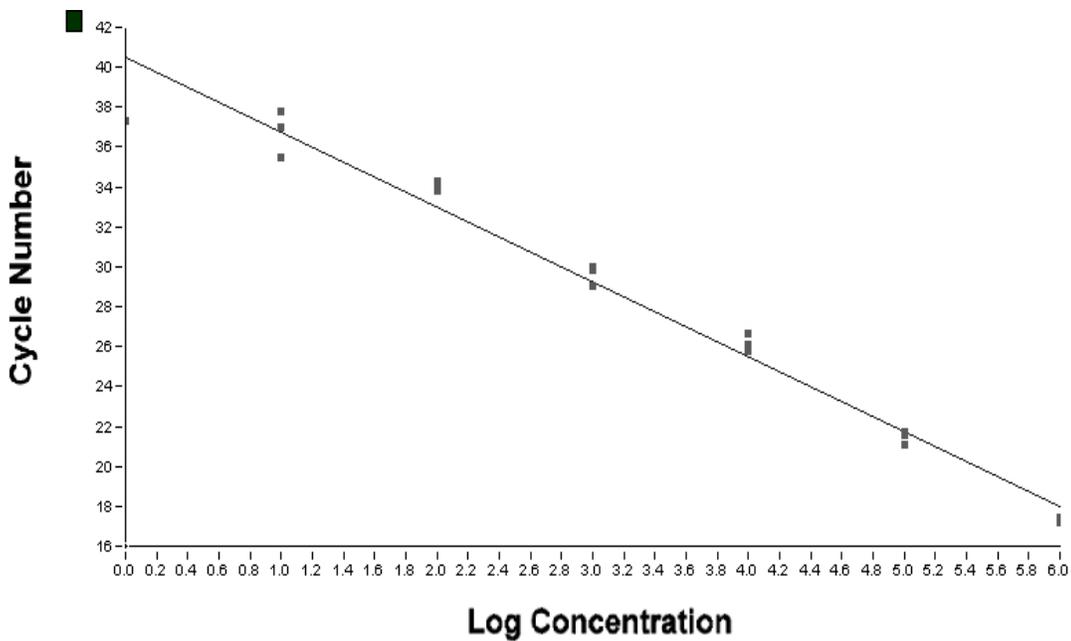
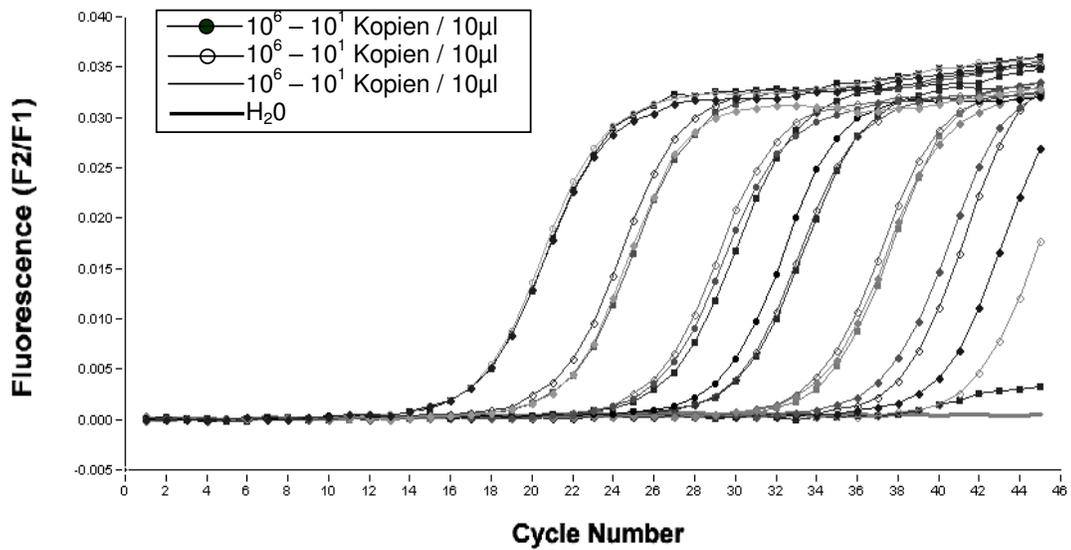


Abbildung 10: Prüfung der Intra-Assay- Reproduzierbarkeit am Beispiel des IL-2-Standards. Einsatz der Verdünnungsreihe (10^6 - 10^1 Kopien / $10\mu\text{l}$) $n = 3$ mal im selben LightCycler-Lauf. Entsprechende Regressionsgerade für alle 3 Verdünnungsreihen mit $r=-1,00$.

3.2. Expression von IL - 2 und IL-1 β -mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs: Exemplarische Darstellung

Der Vergleich der Expressionslevel von IL-2 und IL-1 β in stimulierten Proben zu einer unstimulierten Kontrollprobe wurde in 2 Versuchen durchgeführt (Abbildung 11 und Tabelle 7). Dabei wurden PBMCs mit PHA und LPS stimuliert, um festzustellen, ob diese die Ausschüttung des jeweiligen Zytokins im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe erhöhen.

Dabei wurde Folgendes ermittelt:

- IL-2

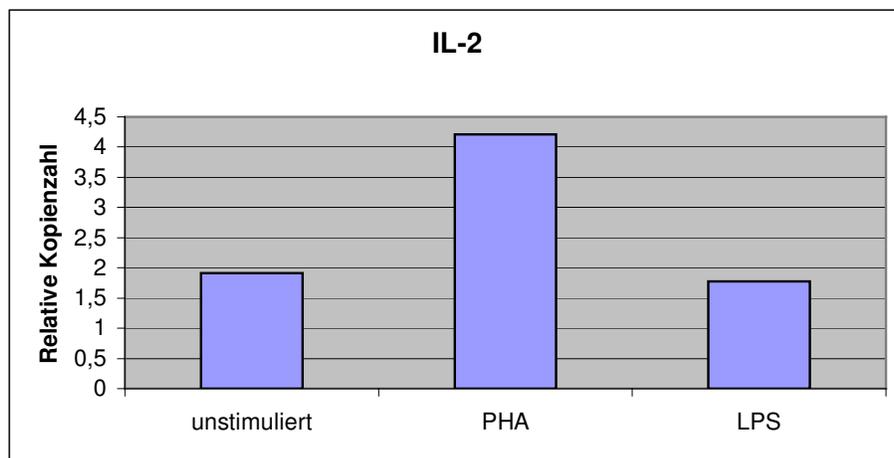


Abbildung 11: IL-2 Expressionslevel PHA und LPS stimulierte Proben relativ zur unstimulierten Kontrollprobe in n=2 Läufen.

Tabelle 7: Mittelwerte x der absoluten Kopienzahlen und Crossing Points (Cp), die ermittelt wurden.

	Kopien	Cp
	x	x
Unstimuliert	$8,14 \times 10^1$	34,85
PHA	$1,63 \times 10^4$	25,54
LPS	$6,00 \times 10^1$	35,41

- **IL-1 β**

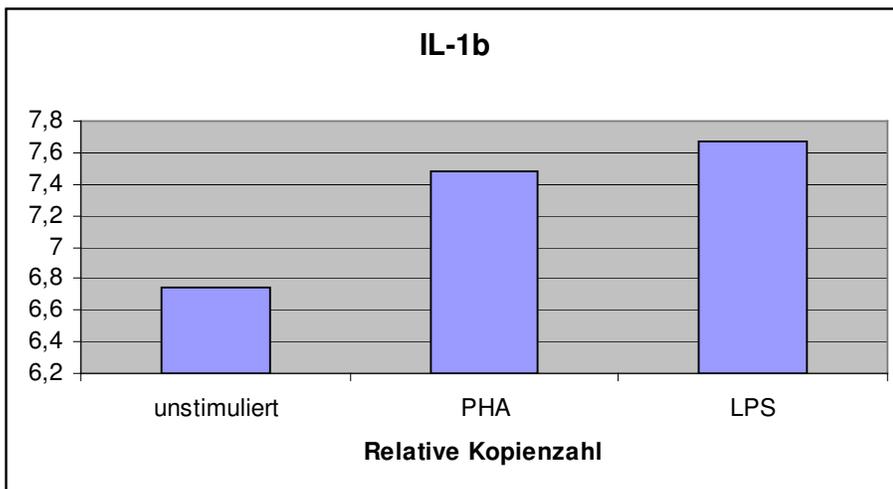


Abbildung 12: IL-1 β Expressionslevel in stimulierten PBMCs relativ zu unstimulierten PBMCs (US).PHA und LPS stimulierte Proben relativ zur unstimulierten Kontrollprobe in n=2 Läufen.

Tabelle 8: Mittelwerte \bar{x} der absoluten Kopienzahlen und Crossing Points (Cp), die für IL-1 β ermittelt wurden.

	Kopien	Cp
	\bar{x}	\bar{x}
Unstimuliert	5,55x10 ⁶	24,23
PHA	3,02x10 ⁷	18,43
LPS	4,71x10 ⁷	17,21

Schlussfolgerung

- **IL-2:**

Anhand von Abbildung 11 lässt sich deutlich erkennen, dass das Expressionslevel der mit PHA stimulierten PBMCs mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu mit LPS stimulierten und unstimulierten PBMCs ist.

Entsprechend zeigt Tabelle 7, dass der Crossing Point der mit PHA stimulierten PBMCs 10 Zyklen vor den beiden anderen Proben liegt. Dies entspricht einer gesteigerten Kopienzahl von 2¹⁰ Kopien (=1024 Kopien) im Kontrast zu den zwei anderen Proben.

Anhand des Versuchs wird deutlich, dass die Stimulation von PBMCs mit PHA die Expression von IL-2 um etwas mehr als das Doppelte steigert, wohingegen die Stimulation mit LPS keine wesentliche Veränderung des Expressionslevels erkennen ließ.

- **IL-1 β :**

Abbildung 12 zeigt ein eindeutig höheres Expressionslevel der mit LPS und PHA stimulierten PBMCs im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe.

Anhand der Crossing Points wird deutlich, dass der Cp der mit PHA stimulierten Proben um knapp 6 Zyklen und die mit LPS stimulierte Probe um 7 Zyklen vor der unstimulierten Probe liegen. Dies entspricht einer gesteigerten Kopienzahl von 2⁶Kopien (=64 Kopien) PHA und 2⁷ Kopien (=128 Kopien) LPS gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe. Dieser Versuch verdeutlicht, dass PBMCs, die mittels LPS und PHA stimuliert wurden, das Expressionslevel für IL-1 β offensichtlich anheben.

4. Diskussion

4.1. Real-time PCR im Kontrast zu anderen quantitativen Zytokin/ Chemokin – Nachweisverfahren

Um bestehende Immunprozesse diagnostizieren zu können, ist der quantitative Nachweis der Zyto- und Chemokin-Produktion unter pathologischen Bedingungen essentiell.

In Kapitel 1.3.1 wurden diverse Methoden zur Quantifizierung von Zyto- und Chemokin-Produktion, die gegenwärtig zur Verfügung stehen, vorgestellt. Dabei sind die genannten Methoden in 2 Hauptgruppen zu unterteilen: 1.) das mRNA-basierte Nachweisverfahren und 2.) das Protein-basierte Nachweisverfahren. Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung einer Real-time PCR gewählt, und somit das m-RNA basierte Nachweisverfahren angewandt. Anhand von Studien ließ sich jedoch erkennen, dass die Zyto-/Chemokin-mRNA-Expression nicht jederzeit mit der Menge an Proteinen korrelieren muss (Benveviste et al., 1998; Romagnani, 2000). Es sollte jedoch bei der Auslegung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass mittels diverser post-translationeller und post-transkriptioneller Faktoren ein mögliches Missverhältnis zwischen gemessenen Zytokin-mRNA-Expressionsleveln und sezerniertem Protein auftreten kann (Overbergh et al., 2003). Einige Veröffentlichungen präsentierten eine vorteilhafte Korrelation von Zytokin-mRNA Expressionsleveln, welche mittels Real-time PCR quantifiziert und über ELISA (Mena et al., 2002; Hein et al., 2001; Weghofer et al., 2001) oder ELISPOT (Mena et al., 2002) determiniert wurden.

Hinsichtlich der Zytokin-/Chemokin-Biologie ist der Nachweis der Zyto-/Chemokin-Genexpression im Vergleich zum Nachweis des freigesetzten Proteins prinzipiell von Vorteil. Dies lässt sich wie folgt begründen:

Nahezu alle Zytokine und Chemokine haben nur eine kurze Halbwertszeit, werden in sehr kleinen Mengen gebildet, und nach ihrer Freisetzung tritt deren schnelle Nutzung bei Zell-zu-Zell-Kontakt ein. Aus oben genannten Gründen

bewies es sich als besonders problematisch, unwillkürliche Zytokin- und Chemokin-Freisetzungen in biologischen Geweben oder Zellsuspensionen zu ermitteln (Whiteside, 2002; Romagnani, 2000; Benveniste et al., 1998).

Speziell bei ausgesprochen kleinen Probengrößen (limitierte Anzahl von Zellen, Gewebsbiopsien oder Zell-Subpopulationen), hat es sich als besonders vorteilhaft erwiesen, mRNA-basierte Techniken anzuwenden (Overbergh et al., 2003; Stordeur et al., 2002; Giulietti et al., 2001; Blaschke et al., 2000), da Zytokine und Chemokine sich äußerst diffizil auf Protein-Ebene, z.B. mittels ELISA, nachweisen lassen.

Methoden, wie beispielsweise der Northern Blot, RPA und ISH, sind ebenfalls zu vernachlässigen. Es handelt sich zwar um spezifische Methoden, um die Zyto-/ Chemokin-mRNA-Expression zu quantifizieren. Im Vergleich zur RT-PCR ist anhand dieser Methoden eine effiziente Untersuchung verschiedener Zyto- und Chemokine in einer großen Menge von Proben nicht möglich, da diese Methoden äußerst arbeitsintensiv und schwer standardisierbar sind (Whiteside, 2002; Benveniste et al., 1998).

Demgegenüber steht die Verwendung von Microarrays und DNA-Chips. Diese Techniken gestatten eine synchrone Analyse der Expression unzähliger Gene verschiedenartigster Herkunft (Whiteside, 2002).

Nach der Gegenüberstellung der diversen mRNA-basierten Methoden, die zur Quantifizierung der gewünschten Zyto- und Chemokin- Expression dienen, zeigt sich schlussendlich allein die RT-PCR als die sensitivste Technik, da sie im Stande ist, auch geringfügige Mengen an Zyto-/Chemokin-mRNA, die oft in äußerst geringen Leveln exprimiert werden, zu quantifizieren (Guiletta et al., 2001).

Die exponentielle Produkt-Amplifikation stellt jedoch das bedeutendste Problem konventioneller RT-PCR-Techniken hinsichtlich einer exakten Quantifizierung von mRNA-Transkripten über die klassische Endpunktanalyse dar, weil schon geringe Unterschiede in den Amplifikationseffizienzen unter den Proben zu großen Differenzen der ermittelten Expressionslevel am Ende der Reaktion führen (Rasmussen, 2001). Um oben genannte Variationen zu umgehen, fand die Entwicklung verschiedenster RT-PCR-Methoden statt mit dem

Zielgedanken, eine Methode zu schaffen, die eine akkurate Quantifizierung von Zyto-/Chemokin-mRNA-Leveln ermöglicht. Zu diesen Methoden zählen auch die semi-quantitative und die quantitative kompetitive RT-PCR-Techniken (Gilliland et al., 1990; O'Garra und Vieira, 1992; Benveniste et al., 1998). Verglichen mit neueren RT-PCR Technologien zeigten die oben genannten Techniken zwar eine gute Korrelation, jedoch traten diverse Probleme bezüglich einer exakten Quantifizierung auf, (Guilietti et al., 2001; Hein et al., 2001; Blaschke et al., 2000; Benvensiste et al., 1998) die im Folgenden beschrieben werden.

Die semiquantitative Methode : bei dieser Technik misst man die PCR-Produkt-Akkumulation in der Phase des exponentiellen Wachstums, während die PCR nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen unterbrochen wird.

Als Nachteile dieser Technik, lassen sich zum einen der Erhalt lauter „semiquantitativer“ Ergebnisse und zum anderen der verhältnismäßig kleine log-linearen Bereich, welcher zudem in aufwendiger Vorarbeit determiniert werden muss, nennen.

Im Gegensatz dazu gestatten die kompetitiven PCR-Methoden eine absolute Quantifizierung. Die Menge an Ziel-DNA wird durch die Verdünnungsreihe eines internen Kompetitors und die Co-Amplifikation einer Proben-Verdünnungsreihe, welche die Ziel-DNA enthält, ermittelt. Die Validation dieses Verfahrens gestaltet sich allerdings besonders zeit- und arbeitsintensiv. Obgleich sie eine Strategie hinsichtlich einer exakten Quantifizierung ist, zeigte sich, dass sie Effizienzunterschiede zwischen dem Standard und der Ziel-DNA nicht zu detektieren vermag. Dies ist der Grund, der die Nennung absoluter Werte als umstritten erscheinen lässt (Bustin, 2000).

Abgesehen von der Quantifizierungsstrategie und der Amplifikationsstrategie der jeweiligen konventionellen PCR-Methode werden unterschiedliche Praktiken zur PCR-Produkt-Detektion angewandt. Zu nennen sind dabei: die Ethidium-Bromid-Färbung, Agarose-Gel-Elektrophorese, Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Analyse mittels Polyacrylamid-Gele, radioaktive Markierung und Southern Blot oder die Detektion mittels Phosphorimaging.

All diese herkömmlichen Detektionssysteme besitzen einige Mängel, wie beispielsweise das Handling mit riskanten Chemikalien, oder deren hoher Arbeits- und Zeitaufwand. Des Weiteren besteht das Risiko der Kontamination (Guiletti et al., 2001; Overbergh et al., 1999).

Die obengenannten Probleme der konventionellen PCR wurden durch die Entwicklung der Real-time RT-PCR deutlich verbessert, indem der Prozess vollautomatisiert und bequem anwendbar ist. Durch den Einsatz des sog. close-tube Systems besteht die Möglichkeit folgender Schritte : Amplifikation, Produkt-Detektion und- Quantifizierung zu verknüpfen. Aus diesem Grund ist dieses System um ein Mehrfaches zügiger gegenüber der konventionellen PCR. Ebenso wird durch diese Verfahren das Risiko der Kontamination mittels post-PCR-Manipulation umgangen. Anhand der eigens für dieses Verfahren erstellten Software, ist durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffmarkierte-Sonden oder Fluoreszenzfarbstoffen, die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation realisierbar. Mit Hilfe der ermittelten Crossing Points lassen sich die PCR-Produkte quantifizieren. Die Crossing Points werden über die Software bestimmt. Diese liegen direkt am Start der log-linearen Phase des PCR-Verlaufs. Folglich erscheinen Effizienzunterschiede zwischen den einzelnen Proben in nicht so drastischer Form, im Vergleich zu den klassischen Endpunktanalysen der konventionellen PCR-Techniken. Demgemäß lässt sich auch die bessere Reproduzierbarkeit der Real-time PCR begründen (Yin et al., 2001; Bustin, 2000).

Durch den Einsatz der externen Standards ist die Möglichkeit einer absoluten Quantifizierung gegeben. Ein weiterer Vorteil der Real-time PCR gegenüber beispielsweise der kompetitiven PCR besteht darin, dass sie sowohl die Amplifikationseffizienzen von Standards und Proben zu definieren vermag. In Folge dessen lässt sich überprüfen, ob erhebliche Abweichungen zwischen Proben und Standards vorliegen, dies würde jedoch eine zuverlässige Quantifizierung ausschließen (Rasmussen, 2001).

Davon abgesehen ist die Detektion der Real-time PCR mittels Fluoreszenzfarbstoffe in Kontrast zur herkömmlichen Gel-Elektrophorese und Ethidium-Bromid-Färbung um einiges sensitiver (Hein et al., 2001).

4.2. LightCycler-RT-PCR zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-mRNA-Expression über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, für die untersuchten, immunrelevanten Zyto- und Chemokine : IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, ICAM-1;MIP-3 α und SCYB-11, sowie für den Transkriptionsfaktor NF κ B mittels LightCycler-Instrument eine absolute Quantifizierung der m-RNA-Expression zu etablieren.

Als erster Schritt fand daher die Generierung der externen Standards statt. Daraufhin erfolgte die Validation des Assays durch Einsatz des Standards in die LightCycler PCR.

Dies ermöglichte den Vergleich gegenüber anderen Real-time-PCR-Assays.

Im Folgenden sind die technischen Daten dazu aufgeführt:

4.2.1. Spezifität

Für alle 8 Zyto-/Chemokine wurden spezifische Primer-Paare eingesetzt. Mittels Gel-Elektrophorese erfolgte die Kontrolle der Amplifikate. In allen 8 Fällen ließ sich keine Co-Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte erkennen.

Durch den Einsatz sequenz-spezifischer Sonden während der Detektion der PCR-Produkte war ferner eine hohe Spezifität garantiert. Des Weiteren besitzen Hybridisierungs-Sonden eine bei weitem höhere Spezifität im Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Wittwer et al., 1997). Dieser Farbstoff birgt folgende Mängel: zum einen bindet er prinzipiell an jede dsDNA, was somit eine weitere Schmelzkurvenanalyse unumgänglich macht, um dadurch die Detektion des spezifischen PCR-Produkts zu verifizieren und die Detektion unspezifischer DNA auszuschließen (Ririe et al., 1997). Zum anderen ist das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I stets abhängig von der Amplifikatlänge im Gegensatz zu den sequenz-spezifischen Sonden, bei denen das Signal mit je einem amplifizierten Molekül überein stimmt (Bustin, 2000).

Dieser Farbstoff kam unter anderem auch in den Arbeiten von Autschbach et al., (2002); Hein et al., (2001); Weghofer et al., (2001) und Blaschke et al., (2000) zum Einsatz.

4.2.2. Sensitivität

Über einen weiten Bereich von bis zu 10 log-Einheiten, gestaltete sich die Amplifikation linear ($r = -1$ für alle Verdünnungsreihen in allen LightCycler-Läufen).

Anhand der Standards wurde ein unteres Detektionslimit von 10^1 Kopien für den Nachweis von IL-2, IL-6, MIP-3 α , NF κ B und ICAM-1, sowie für 10^2 Kopien für den Nachweis von IL-1 α und IL-1 β und 10^3 Kopien für die Detektion von SCYB-11 erkannt.

Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, Zytokin-/Chemokin-Expression-Level über ausgedehnte Bereiche zu vermessen. Des Weiteren kann auch eine basale Zytokin-/Chemokin-Expression detektiert werden, was sich anhand von IL-2 und IL-1 β in unstimulierten PBMCs demonstrieren ließ.

Eine weitaus geringer sensitive Detektion von Maus- oder menschlichen Zytokinen wurde in verschiedenen Publikationen für die Anwendung von Hybridisierungs-Sonden, TaqMan-Sonden und SYBR Green I im LightCycler (Stordeur et al., 2002; Weghofer et al., 2001; Hein et al., 2001), dargestellt. Bei jenen Assays ließ sich nur eine Sensitivität von größer oder gleich 10^3 Kopien nachweisen.

Im Kontrast dazu steht die Studie von Kühne et al (2002); bei der mittels LightCycler durch den Einsatz von Hybridisierungs-Sonden zur Quantifizierung von humanen Zytokinen eine durchaus hohe Sensitivität von 10^0 Kopien zu erkennen war.

4.2.3. Amplifikationseffizienz

Die Reaktionsansätze der Proben differieren ausschließlich in den angewandten Primer- und Sonden-Paaren des jeweiligen Zytokin-Targets.

Die Amplifikationseffizienz ließ sich folglich durch den Einsatz der entsprechenden Standards in das LightCycler-PCR-Gerät definieren.

Es zeigte sich, dass die mittleren Amplifikationseffizienzen in einem Bereich von $E=1,567$ (MIP-3 α) und $E=1,881$ (ICAM-1) liegen. Sie befinden sich somit verhältnismäßig nahe der theoretisch maximal erreichbaren Effizienz von $E=2$ (Standardabweichung: $0,002 < s < 0,175$). Durch die hohen Effizienzen ist des Weiteren auch die hohe Sensitivität der Assays begründet.

4.2.4. Reproduzierbarkeit

Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde durch den mehrmaligen Einsatz jeder einzelnen Standardverdünnungsreihe in die LightCycler PCR geprüft (10^6 - 10^1 Kopien /10 μ l).

Anhand des Variationskoeffizienten $CV_{conc.}$, welcher die von der LightCycler determinierten Kopienzahlen anzeigt, ließ sich aufweisen, dass die Reproduzierbarkeit in Richtung der niedrigen Konzentrationen abnimmt ($CV_{conc.}$ 8 Standards im Bereich von 4,12% - 17,00 % für 10^6 Kopien, und von 24,28% - 58,42% für 10^3 Kopien).

Es besteht folgende Erklärung für die abnehmende Reproduzierbarkeit hin zu den niedrigen Konzentrationen: die niedrigen Kopienzahlen sind einem längeren exponentiellen Prozess ausgesetzt, ehe eine hinreichende Menge an detektierbarem PCR-Produkt existiert. Geringe Variationen innerhalb der PCR-Effizienzen von Lauf zu Lauf, wie sich in den einzelnen Standardverdünnungsreihen erkennen ließen, oder aber auch minimale Abweichungen in der initial eingesetzten Konzentration, bedingt durch einen unpräzisen Pippetiervorgang, bewirken eine schlechte Inter-Assay Reproduzierbarkeit (Rasmussen, 2001).

Faktisch ist bei einer Anzahl von 1-2 Kopien die Zufallsverteilung in Bezug auf Pipettierfehler bedeutsam (siehe: Poisson'sches Gesetz) (Rasmussen, 2001;

Bustin, 2000). Diese Tatsache lässt die Resultate hinsichtlich der ausgesprochen hohen Sensitivität in den Untersuchungen von Kühne et al (2002) (s.o) bezweifeln.

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde anhand von IL-2 und MIP-3 α beispielhaft demonstriert und über den 3-maligen Einsatz der Standardverdünnungsreihen in einen einzigen LightCycler-Lauf (10^6 - 10^1 Kopien/10 μ l) dargestellt. Es ließ sich hier ebenfalls eine schlechtere Reproduzierbarkeit in Richtung der geringeren Konzentrationen beweisen.

Jedoch zeigte sich im Vergleich zur Inter-Assay Reproduzierbarkeit ein im Ganzen besseres Ergebnis. Dies lässt sich auf folgende Umstände zurückführen: durch die Verwendung des selben Reaktionsansatzes für alle 3 Verdünnungsreihen war die Veränderung durch äußere Störfaktoren auf ein Minimum begrenzt, was sich schließlich in einem besseren Gesamtergebnis darstellte.

Derzeit existieren nur wenige Arbeiten zum Thema :quantitative Analyse der Zyto-/Chemokin-Expression mittels Real-time PCR und externe Standards, die genauere Aussagen zur Reproduzierbarkeit der ermittelten Kopienzahlen über einen umfassenden log-linearen Abschnitt machen.

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich dieser Arbeit unter Betrachtung des Aspekts der Inter- und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit legte zum einen Swoatch (2003) in seiner Studie sowohl hinsichtlich der Inter- und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit vor. Aber auch die Gruppe von Stordeur et al., (2002) demonstrierte vergleichbare Ergebnisse.

4.2.5. Probenumsatz

Im LightCycler PCR Gerät finden insgesamt 32 Proben Platz. Mit dem vorhandenen LightCycler-Assay lässt sich nach Einsatz einer Standard-Verdünnungsreihe über einen Bereich von 10^6 - 10^1 Kopien sowie einer Negativkontrolle (H₂O) die Expression eines Zyto-/Chemokins in max. 25 verschiedenen Proben quantifizieren. Im Gegensatz zu diversen anderen Real-time PCR Instrumenten, die durchaus größere Dimension aufweisen (Bsp. ABI

Prism 7700, Gene Amp 5700 oder ABI Prism 7900), erscheint das kleine LightCycler–Probenkarussell als unvorteilhaft.

Jedoch darf die Tatsache, dass sich mittels LightCycler eine komplette PCR innerhalb 45-60 min. durchführen lässt, für die andere Geräte 2-3 Stunden benötigen, keinesfalls außer Acht gelassen werden.

4.3. Der Vorzug der real-time RT-PCR hinsichtlich der absoluten Quantifizierung von Chemokin- und NF κ B-mRNA

Die Analyse von Zytokin-, Chemokin- und Transkriptionsfaktor-Profilen in der vorliegenden Arbeit, dient dazu, deren funktionelle Eigenschaften in Bezug auf Immunzellen und deren Korrelation aufzuklären. Reges Interesse hinsichtlich dieser Aufklärung besteht besonders seitens der Forschung, als auch auf Seiten der klinischen Diagnostik, da Chemokine und Transkriptionsfaktoren leistungsfähige Vermittler- und Kommunikationsmoleküle sind, die ein weites Spektrum biologischer Funktionen, einschließlich der Immunantwort, regulieren. Chemokine und die TF's wurden erst einige Zeit nach den Zytokinen entdeckt (bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 40 Chemokine identifiziert werden), besitzen multiple Eigenschaften und bedeutende Rollen in vivo (Traynor und Huffnagle, 2001). Ihre Rolle hinsichtlich der Pathogenese von menschlichen Krankheiten ist noch nicht gänzlich geklärt. Daher ist derzeit die Erstellung von Chemokin-/TF-Assays in klinischen Labors äußerst sinnvoll. Die real-time RT-PCR ist dabei mittlerweile eine häufig angewandte Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression, welche auch bei äußerst geringen Proben-Mengen durchgeführt werden kann. Aus den oben aufgeführten Gründen ist dieses Verfahren Mittel der Wahl bezüglich der Quantifizierung von Zytokin- und Chemokin-Profilen in Immunzellen oder entzündeten Geweben (Guillett et al., 2001).

Für MIP-3 α , ICAM-1, SCYB-11 und NF κ B wurden aus folgenden Gründen externe Standards zur absoluten Quantifizierung der mRNA etabliert:

Im molekular-zellbiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen wurden einige Geneexpressionsanalysen im

Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurden zum einen dendritische Zellen und Monocyten mit *A. fumigatus*-Hyphen stimuliert. Dabei wurde beobachtet, dass Chemokine, wie ICAM-1 und MIP-3 α , durch diesen Stimulus überexprimiert wurden.

Bei SCYB-11 handelt es sich um ein bedeutendes Chemokin der Klasse I Interferon-Pathway. Durch die Stimulation dendritischer Zellen mit CMV ließ sich eine sehr hohe Expression von SCYB-11 erkennen.

NF κ B wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, da dieser Faktor eine zentrale Rolle gegen Immunpathogene im Allgemeinen inne hat.

Eine Hochregulation verschiedener Chemo- und Zytokine nach Stimulation diverser Immunzellen mit Pilzspezies haben auch Pylkkanen et al, 2004, Shanan et al, 1998 und Chu et al, 1996 in ihren Publikationen beschrieben.

Chu et al, 1996 demonstrierte anhand von Mausmodellen, dass ICAM-1, TNF und IL-1 α bei den mit *A.fumigatus* behandelten Tieren stark hochreguliert wurde. Shanan et al, 1998 zeigte mittels Makrophagen, welche mit mykotischen Sporen (z.B. *A.fumigatus*) stimuliert wurden, eine bedeutende Hochregulation von MIP-2, KC und MIP-1 α . Dabei bediente er sich der Northern Blot-Technik.

Besonders hervorzuheben ist jedoch das aktuelle Resultat der Publikation von Pylkakknen et al, 2004, mittels real-time PCR einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 in Maus-Makrophagen nach Stimulation mit *A.fumigatus*-Sporen.

Durch die Etablierung der hier vorliegenden Assays sollten die oben aufgeführten Beobachtungen durch ein zweites hochsensitives Verfahren, d.h. mittels LightCycler, manifestiert werden. Dieses Verfahren bietet im Vergleich zu anderen obengenannten Verfahren den Vorteil, dass es optimal hinsichtlich der klinischen Evaluation des jeweiligen Chemokin- bzw TF-Status eingesetzt werden kann, da es sich derzeit um eine der akkuratesten und genauesten Techniken handelt, die sich auf dem Markt befinden und dadurch zuverlässige Aussagen ermöglicht.

4.4 Schlussfolgerung

Um die gegenwärtige Zytokin-Produktion nachweisen zu können, ist ein äußerst sensitives Verfahren von Nöten. Aufgrund seiner hohen Sensitivität ist die RT-PCR im Falle der vorliegenden Arbeit das Mittel der Wahl. Gegenüber der konventionellen PCR-Technik, gestaltet sie sich als ein schnelleres, bequem durchführbares, exakteres und sensitiveres Verfahren.

Der hier verwendete Real-time PCR-Assay lässt unter Verwendung eines konstanten Reaktionsansatzes und eines identischen PCR-Protokolls die absolute Quantifizierung der mRNA-Expression für ein ausgedehntes Spektrum von 8 verschiedenen Zytokin- bzw. Chemokin-Targets: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP-3 α , SCYB-11, ICAM-1 und NF κ B zu.

Die für diese Arbeit ausgesuchten Zytokin- und Chemokingene spielen, wie schon einleitend beschrieben, eine wichtige Rolle bezüglich der Entwicklung pathophysiologischer Komplikationen.

Das derzeitige Ziel der Forschung ist, die Funktion und Profile der einzelnen Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren zu ermitteln. In dieser Hinsicht liefert die TH1/TH2 Polarisierung die Grundlage für die Anfertigung von Zytokin-/Chemokin-Profilen.

Mit einem weiten Spektrum an Zytokinen / Chemokinen besteht die Möglichkeit, Profile in diversen Zellpopulationen und Geweben anzufertigen. Dadurch lässt sich deren Aktivität unter pathologischen Bedingungen und die Entstehung von Komplikationen in vivo beobachten und verstehen, aber auch therapeutische Effekte lassen sich auf diesem Wege im Auge behalten, und ebenso können auf diese Weise auch ihre Reaktion auf antigenwirksame Reize oder therapeutische Anwendungen in vitro ermittelt werden.

Das LightCycler System kam bei dieser Arbeit zum Einsatz, da es im Vergleich zu anderen Real-time PCR-Assays eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit aufweist. Eine hochspezifische Detektion des PCR-Produkts ermöglicht dabei die Verwendung von Hybridisierungs-Sonden. Ein weiterer Vorteil bietet die rasche Durchführung der PCR mittels LightCycler in weniger als einer Stunde und zudem noch mit einem erheblichen Probenumsatz.

Folglich ist der dargestellte Assay eine sehr leistungsfähige Methode, um die quantitative Zytokin-/Chemokin-Expression zu analysieren.

In dieser Arbeit wird aufgezeigt, auf welche Weise externe Standards bequem und simpel generiert werden können, durch die Anwendung eines konstanten PCR-Protokolls und eines einheitlichen Reaktionsansatzes. Die einzigen Variablen stellen dabei die charakteristischen Primer und Sonden dar.

Unter dem Aspekt der umfassenden Interaktionen der Zytokine und Chemokine ist die Untersuchung eines denkbar breiten Spektrums von Zyto- und Chemokinen äußerst sinnvoll und erstrebenswert.

Dies lässt sich, wie beschrieben, mittels LightCycler RT-PCR realisieren, da durch diese Methode die schnelle und einfache Analyse der Expression einer stetig anwachsenden Menge neuer Zyto- und Chemokine einschließlich Transkriptionsfaktoren und weiterer Mediatoren des Zytokinnetzwerks, die in naher Zukunft für die Forschung und Klinik von Interesse sein werden, bewertet werden können.

5. Zusammenfassung

Der quantitative Nachweis von Zytokin-/Chemokin-Produktion unter pathophysiologischen Bedingungen ermöglicht die Gewissheit von ablaufenden immunologischen Prozessen im Körper eines Patienten.

Aufgrund dessen wird dabei die verhältnismäßig moderne Technologie der Real-time RT-PCR, angesichts ihrer simplen Durchführbarkeit, hohen Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit verstärkt angewendet, um die vorliegende Zytokin- /Chemokin-Genexpression quantifizieren zu können.

Bei dieser Arbeit wurde mittels LightCycler-Gerät unter der Verwendung des einheitlichen Reaktionsansatzes und eines konstanten PCR-Protokolls ein Real-time-Assay zur absoluten Quantifizierung der mRNA-Expression für die nachstehende Auswahl an Zytokinen und Chemokinen sowie einen Transkriptionsfaktor etabliert: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP-3 α , SCYB-11, ICAM-1 und NF κ B.

Sie alle sind, neben vielen anderen, an der Entwicklung pathophysiologischer Komplikationen beteiligt.

Um die absolute Quantifizierung zu gewährleisten, wurden für jedes einzelne Zytokin / Chemokin ein externer Standard generiert. Die Methode wurde mittels Einsatz der Standards in den LightCycler evaluiert. Im direkten Vergleich zu anderen Real-time PCR-Assays, hat sich eine vergleichbare Reproduzierbarkeit und eine hohe Sensitivität für die einzelnen Zyto- und Chemokine erwiesen (Detektionslimit: 10¹ Kopien für: IL-2, IL-6, MIP3- α , NF κ B und ICAM-1 Standard, 10² Kopien für IL-1 β und IL-1 α Standard und 10³ Kopien beim SCYB-11-Standard).

Die hochspezifische PCR-Detektion war durch die Verwendung von Hybridisierungs-Sonden gesichert.

Die vorliegende Methode lässt ein effizientes System zur Anfertigung von Zyto- und Chemokin-Profilen erkennen, vor allem wegen seines hohen Durchsatz

(25 Proben/ \leq 60 min) sowie dem Einsatz eines ausgedehnten Spektrums an Zyto-und Chemokinen.

Dieses Verfahren lässt sich auch weiterhin im Labor für die Forschung, besonders auf dem Gebiet der allogenen Stammzelltransplantation und GVH-Reaktionen, einsetzen.

Das derzeitige Ziel der Forschung besteht jedoch darin, diese äußerst sensitive, schnelle, simple und effektive Methode für die quantitative Analyse der Expression vieler weiterer Zytokine, Chemokine, Transkriptionsfaktoren und anderer Mediatoren des Zytokinnetzwerks zu nutzen, um über die Evaluierung und Etablierung weiterer Zytokine und Chemokine einen besseren Überblick gewinnen zu können und neue therapeutische Ansätze zu schaffen.

6. Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996)
Functional diversity of helper T lymphocytes.
Nature 383. 787-793

Autschbach F., Giese T., Gassler N., Sido B., Heuschen G., Heuschen U., Zuna I., Schulz P., Weckauf H., Berger I., Otto H.F., Meuer S.C. (2002)
Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease.
Virchows Arch. 441., 500-513

Baldwin, A.S. (1996)
The NF-kappa-B and I-kappa-B proteins: new discoveries and insights
Annu.Rev. Immun. 14, 649-683

Barnes, P.J.; Karin, M. (1997)
Nuclear factor-kappa B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.
New Eng. J. Med. 336: 1066-1071

Baqi, A., Meiller, T.F., Jabra-Rizk, M.A., Zhang, M., Kelley, J.I., Falkler, W.A. Jr. (2000)
Enhanced interleukin 1 β , interleukin 6 and tumor necrosis factor α in gingival crevicular pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1
Oral Microbiol. Immunol. 15; 67-73

Benveniste, O. Martin, M., Villinger, F., Dormono, D. (1998)
Techniques for quantification of cytokine mRNAs.
Cytokines Cell. Mol. Ther. 4, 207-214

Birch, D.E. (1996)
Simplified hot Start PCR.
Nature 381. 445-446

Blaschke S., R V., Reich K., Zipprich S., Neumann C. (2000)
Rapid quantification of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology.
J. Immunol. Methode 246. 79-90

Borg, L., Kristiansen, J., Christensen, Ü.M., Jepsen, K.F., Poulsen. L.K. (2002)
Evaluation of accuracy and uncertainty of ELISA assays for determination of interleukin-4, interleukin-5, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha
Clin. Chem. Lab. Med. 40, 509-519

Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., Romani, L. (2002)

Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus.

J. Immunol. 168,1362-1371

Brostoff, J., Scadding, G.K., Male, D., Roitt, I.M. (1993)

in: Clinical Immunologie

1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, Basel, Cambridge, New York

Burmester, G.R., Pezzutto, A. (1998)

in: Taschenatlas der Immunologie

1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Bustin, S.A. (2000)

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.

J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193

Cavaillon, J.M. (2001)

Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality.

Cell. Mol. Biol. 47, 695-702

Cenci, E., Perito, S., Enssle, K.H., Mosci, P., Latge, J.P., Romani, L., Bistoni, F. (1997)

Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis.

Infect. Immun. 65, 564-570

Challacombe, S.J., Sweet, S.P. (2002)

Oral mucosal immunity and HIV infection: current status

Oral. Dis. 2, 55-62

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. (1999)

New insights into the role of nuclear factor-kappa-B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases.

Clin. Chem. 45; 7-17

Chu, H.W., Wang, J.M., Laviolette, M. (1996)

Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha expression in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis.

Lab. Anim. Sci. 46, 42-47

Clegg, R.M. (1995)v

Fluorescence resonance energy transfer.

Curr. Opin. Biotechnol. 6, 103-110

- DeVries, M.E., Ran, L., Kelvin, D.J. (1999)
 On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological response.
 Semin. Immunol. 11, 95-104
- D'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Motagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Romani, L. (2000)
 Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for Initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo.
 J. Exp. Med. 15. 1661-1674
- Einsele, H., Hebart, H., (2002)
 Cellular immunity to viral and fungal antigens after stem cell transplantation.
 Curr. Opin. Hematol. 9, 485-489
- Fidel, P.L. Jr. (2002)
 Immunity to *Candida*
 Oral. Dis. 2, 69-75
- Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A.J., Gearing, A.J.H., Callard, R.E. (2001)
 in: The Cytokine FactsBook
 2. Aufl., Academic Press, New York, Boston, San Francisco, San Diego, London, Sidney, Tokyo
- Gemsa, D.; Kalden, J.R.; Resch, K. (1991)
 in: Immunologie ; Grundlagen-Klinik-Praxis
 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996)
 A novel method for real-time quantitative RT-PCR.
 Genome Res. 6, 995-1001
- Giese, T. (2001)
 Development of quantitative RT-PCR tests for expression of cytokine genes on the LightCycler. 251-261
 in: Meuer, S. Wittwer, C. Nakagawara, K.: Rapid Cycle Real-Time PCR : Methods and Applications;
 1. Aufl., Springer, Heidelberg
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H.F. (1990)
 Analysis of cytokine mRNA and cDNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725-2729

Giulietti, A.; Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001)

An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.

Methods 25, 386-401

Glimcher, L.H., Murphy, K.M. (2000)

Lineage commitment in the immune System: the T helper lymphocyte grows up.

Genes Dev. 14,1693-1711

Haddad, J.J. (2002)

Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways

Biochem. Biophys. Res. Commun. 297, 700-13

Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Bauer, M., Löffler, J., Monod, M., Latge, J.P., Einsele, H. (2002a)

Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies.

Blood 100, 4521-4528

Hebart, H., Dagainik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Löffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.G., Einsele, H. (2002b)

Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation.

Blood 99, 3830-3837

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996)

Real-time quantitative PCR.

Genome Res. 6, 986-994

Hein, J., Schellenberg, U., Bein, G., Hackstein, H. (2001)

Quantification of murine IFN- γ mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye.

Scand. J. Immunol. 54, 285-291

Hibbert, L., Johnston, JA (2001)

Cytokine signalling and disease.

Expert. Opin. Ther. Targets 5, 641-653

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G.; Watson, R. (1993)

Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.

Biotechnology 11, 1026-1030

- Hoffmann-Axthelm, W. (2000)
Lexikon der Zahnmedizin
6. Aufl., Quintessenz Verlag GmbH, Berlin, Chicago, London, Sao Paulo,
Tokio, Moskau, Prag, Warschau, Sofia
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991)
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the
5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A. 88, 7276-7280
- Holler, E. (2002)
Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease.
Curr. Opin. Hematol. 9, 479-484
- Janeway, C.A., Travers. P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001)
in: Immunobiology: the immune System in health and disease
5. Aufl., Garland Publishing, New York
- Kalvakolanu, D.V. (1999)
Virus interception of cytokine-regulated pathways.
Trends Microbiol. 7, 166-171
- Kasakura, S. (1998)
A role of type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human
diseases
Rinsho Byori, 46, 915-921
- Kawasaki, E.S. (1990)
Amplification of RNA, 23
in: Innis, MA Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. White, T.J.: PCR Protocols:
A Guide to Methods and Applications
Academic Press, San Diego, CA
- Kellogg, D.E., Rybalkin, L, Mukhamedova, N, Vlasik, T., Siebert, P.D.,
Chenchik, A. (1994)
TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing antibody directed
against Taq DNA polymerase.
Biotechniques. 16, 1134-1137
- Krenger, W., Hill, G.R., Ferrara, J.L.M. (1997)
Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease.
Transplantation 64, 553-558
- Krishna, V., Keller, M., Newton R.C. (1997)
in: The Chemokine facts book
1. Aufl., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney,
Tokyo, Toronto

- Kühne B.S., Oschmann P. (2002)
Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported Standard curves for cytokine gene expression analysis.
Biotechniques 33, 1078-1089
- Leigh, J.E., Steele, C., Wormley, F., Fidel, P.L. Jr. (2002)
Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with Candida-associated denture stomatitis
Oral Microbiol. Immunol. 17; 311-314
- Leigh, J.E., Steele, C., Wormley, F.L. Jr., Luo, W., Clark, R.A., Gallaher, W., Fidel, P.L. Jr (1998)
TH1/TH2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 19, 373-380
- Löffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U., Einsele, H. (2000)
Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler System.
J. Clin. Microbiol. 38, 586-590
- Mackay CR. (2001)
Chemokines: immunology's high impact factors
Nat. Immunol. 2; 95-101
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccini, M.P., Ruggi, F.S., DeCarli, M., Ricci, M., Romagnani, S. (1992)
Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the development of human Th1 and TH2 clones.
J. Immunol. 148,2142-2147
- Mashishi, T., Gray, C.M. (2002)
The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes.
Clin. Chem. Lab. Med. 40, 903-910
- Mehrad, B., Strieter, R.M., Standiford, T.J. (1999)
Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis.
J. Immunol. 162,1633-1640
- Meierhoff, G., Ott, P.A., Lehmann, P.V., Schlott, N.C. (2002)
Cytokine detection by ELISPOT: relevance for immunological studies in type1 diabetes.
Diabetes Metab. Res. Rev. 18, 367-380

Mena, A., Ioannou, X.P., Van Kessel, A., Van Drunen Little-Van Den Hurk, S., Popowych, Y., Babiuk, LA, Godson, D.L (2002)
Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR.
J. Immunol. Methods 263, 11-21

Mencacci, A., Perruccio, K., Bacci, A., Cenci, E., Benedetti, R., Martelli, M.F., Bistoni, F., Coffman, R., Velardi, A., Romani, L. (2001)
Detective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists.
Blood 97, 1483-1490

Mencacci A., Cenci E., Bacci, A., Montagnoli, C., Biston, F., Romani, L. (2000)
Cytokines in Candidiasis and Aspergillosis
Curr. Pharm. Biotechnology 1, 235-251

Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998)
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.
Biotechniques 24, 954-8. 960, 962

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, MA, Coffman, R.L. (1986)
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
J. Immunol. 136. 2348-2357

Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989)
TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173

Murdoch, C.; Finn, A. (2000)
Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases.
Blood 95: 3032-43

Nemzek, JA, Siddiqui, J., Remick, D.G. (2001)
Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs.
J. Immunol. Methods 255, 149-157

O'Garra, A., Arai, N. (2000)
The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 differentiation.
Trends Cell Biol. 10, 542-550

O'Garra, A., Viera, P. (1992)
Polymerase chain reaction for detection of cytokine gene expression.
Curr. Opin. Immunol. 4, 211-215

- Oppenheim, J.J. (2001)
Cytokines: past, present, and future.
Int J. Hematol. 74, 3-8
- O'Shea, J.J., Ma, A., Lipsky, P. (2002)
Cytokines and autoimmunity.
Nat. Rev. Immunol. 2, 37-45
- Overbergh L., Valckx D., Waer M., Mathieu C. (1999)
Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR
Cytokine 11, 305-312
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, R., Bouillon, R., Mathieu, C. (2003)
The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression.
J. Biomol. Tech. 14, 33-43
- Powrie, F., Coffman, R.L (1993)
Cytokine regulation of T-cell function; potential for therapeutic Intervention.
Immunol. Today 14, 270-274
- Pylkkanen, L., Gullsten, H., Majuri, M.L., Andersson, U., Vanhala, E., Maatta, J., Meklin, T., Hirvonen, M.R., Alenuis, H., Salvolainen, K. (2004)
Exposure to Aspergillus fumigatus spores induces chemokine expression in mouse macrophages.
Toxicology 5, 255-263
- Rasmussen, R. (2001)
Quantification on the LightCycler, 21-34
in: Meuer, S. Wittwer, C. Nakagawara, K.: Rapid Cycle Real-Time PCR :
Methods and Applications;
1. Aufl., Springer, Heidelberg
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997)
Product differentiation by analysis of DMA melting curves during the polymerasechain reaction.
Anal. Biochem. 245.154-160
- Romagnani, S. (1997)
The Th1/Th2 paradigm.
Immunol. Today 18, 263-266
- Romagnani, S. (1999)
Th1/TH2 cells
Inflamm. Bowel. Dis. 5; 285-94

- Romagnani, S. (2000)
T-cell subsets (Th1 versus Th2).
Ann. Allergy Asthma Immunol. 85, 9-18
- Romani, L. (1999)
Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond.
Curr. Opin. Microbiol. 2, 363-367
- Saiki, R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Hörn G.T., Erlich H.A.,
Arnheim N. (1985)
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction
site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science 230, 1350-1354
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Soffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R.,
Hörn. G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA
polymerase.
Science 239.487-491
- Schettler, G., Greten, H. (1998)
in: Innere Medizin
9. Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York
- Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. (2000)
In: Zahnärztliche Chirurgie ; Erkrankungen der Mundschleimhaut-
klinische Erscheinungsbilder
3. Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993)
Interleukin 12 acts directly on CD4⁺T cells to enhance priming for interferon
gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10188-10192
- Shanan, T.A., Sorenso, W.G., Paulauskis, J.D.,
Lewis, D.M. (1998)
Concentration and time-dependent upregulation and release of
the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar
macrophages by fungal spores implicated in airway
inflammation.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 18, 435-440
- Sosroseno, W., Herminajeng, E., Goeno, S. (1994)
The interleukin network in the immunopathogenesis of oral
diseases
Asian Pac. J. Allergy Immunol. 12, 85-106

Stordeur P., Poulin L.F., Craciun L, Zhou L., Schandene L., Je Lavareille, A., Goriely, S., Goldman, M. (2002)
Cytokine mRNA quantification by real-time PCR.
J. Immunol. Methods 259, 55-64

Sule, N.S., Nerurkar, R.P., Kamath, S. (2001)
Interleukin-2 as atherapeutic agent
J.Assoc. Physicians India 49, 897-900

Swoatch, P.C. (2003)
Etablierung und Evaluierung einer Real-time RT-PCR zur
quantitativen Analyse der Genexpression von 7 humanen
Zytokinen
Med. Dissertation, Universität Tübingen

Tabbara, I.A., Zimmerman, K., Morgan, C., Nahleh, Z. (2002)
Allogenic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results
Arch. Intern. Med. 162, 1558-1566

Thornhill, M.H., Li, J. (1997)
Chemokines and chemokine receptors: the key to understanding AIDS
Oral Diseases 3, 3-8

Tortorella, D.; Gewurz, B.E., Fumarn, M.H., Schust, D.J., Ploegh, H.L. (2000)
Viral subversion of the immune system
Annu. Rev. Immunol. 18, 861-926

Traynor, T.R., Huffnagle G.B. (2001)
Role of chemokines in fungal infections
Med. Mycol. 39, 41-50

Tyagi, S.; Kramer, F.R. (1996)
Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization
Nature Biotechnology 14, 303-308

Vandenbroeck, K., Goris, A. (2003)
Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel
targets for immunotherapy?
Trends Pharmacol. Sei. 24, 284-289

Vastardis, S.; Leigh, J.E.; Wozniak, K.; Yukna, R.; Fidel, P.L. JR. (2003)
Influence of periodontal disease on Th1/TH2-type cytokines in saliva of hiv-
positive individuals
Oral Microbiology Immunol. 18, 88-91

Weghofer, M., Karlic, H., Haslberger, A. (2001)
Quantitative analysis of immune-mediated stimulation of tumor necrosis factor- α in macrophages measured at the level of mRNA and protein synthesis.
Ann. Hematol. 80, 733-736

Whiteside, T.L. (2002)
Cytokine assays.
Biotechniques 33, 4-15

Whiteside, T.L. (1994)
Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1, 257-260

Wittwer, C.T., Fillmore, G.C., Garling, D.J. (1990)
Minimizing the time required for DNA amplification by efficient transfer to small samples.
Anal. Biochem., 186, 328-331

Wittwer, C.T., Garling, D.J. (1991)
Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization.
Biotechniques 10, 76-83

Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Grundy, R.A., Balis, U. (1997a)
The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control.
Biotechniques 22, 176-181

Wittwer, C.T., Hermann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997b)
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.
Biotechniques 22, 130-131, 134-138

Wu, C.Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M., Delespesse, G. (1993)
IL-12 induces the production of INF- γ by neonatal human CD4 T cells
J. Immunol. 151: 1938

Yin, J.L., Shakel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., McCaughan, G.W., Eris, J.M., Bishop, G.A. (2001)
Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I.
Immunol. Cell. Biol. 79, 213-221

Yoshie, O., Imai, T., Nomiya, H. (2001)
Chemokines in immunity.
Adv. Immunol. 78, 57-110

7. Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen Dank aussprechen:

Herrn Prof. Dr. Einsele für die Überlassung des Themas dieser Dissertation

Herrn Privatdozent Dr. T. Orlikowsky für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Herrn Dr. rer. Nat. Jürgen Löffler danke ich für die vielen geduldigen Stunden der Betreuung, seiner ständigen Hilfsbereitschaft und aufmunternden Worte immer wieder; sowie für die Schaffung einer netten Atmosphäre im Labor.
Herzlichen Dank, Jürgen!

Philipp Swoatch für die Einarbeitung im Labor und Hilfsbereitschaft, die beim Erstellen dieser Arbeit von großem Nutzen waren.

Marija Markulin und allen Mitarbeitern des GVH-Labors für Ihre Hilfe und Geduld bei den Laborarbeiten.

All den anderen Doktoranden danke ich für die stets kollegiale Zusammenarbeit.

Meinem Freund Andreas danke ich für seine Unterstützung und Geduld in Bezug auf diese Arbeit und in meinem Leben.

Besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir meinen Traum des Studiums der Zahnmedizin ermöglicht haben und mir stets mit Ihrem Verständnis und Ihrer Unterstützung zur Seite standen.

8. Lebenslauf

Personalien

Name: Diana Mariam Akhawi-Araghi
Geburtsdatum: 09.12.1977
Geburtsort: Höxter / NRW
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Vater: Mohammad Akhawi-Araghi; Dipl.-Ing./
Architekt
Mutter : Barbara Akhawi-Araghi; Verw.-Angestellte

Schulische Ausbildung

1984-1988 Grundschule Sindelfingen-Maichingen
1988-1997 Lise-Meitner-Gymnasium, Böblingen

Studium

Seit Herbst 1997 Studium der Zahnmedizin
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 2001 Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
Feb.-Juni 2004 Examen 1/04
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
26.Mai 2004 Zahnärztliche Prüfung in Tübingen
Juli 2004 Erhalt der zahnärztlichen Approbation

Beruf

Seit Jan.2005 Vorbereitungsassistentin
Zahnarztpraxis Dres. med. dent. Drachler und Wöhr,
Weil der Stadt