

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Quantitativer PCR-Nachweis zur Bestimmung der  
Expression von Zytokin-, Chemokin-, Toll-like Rezeptor-  
und Adapterprotein-Genen nach Stimulation von  
peripheren mononuklearen Blutzellen mit  
Lipopolysacchariden und Phythämagglutinin**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Falko David Sprenger  
aus Konstanz

2006

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Orlikowsky

- Meinen Eltern gewidmet -



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zytokine</b>	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Pro- und antiinflammatorische Zytokine und das TH1-/TH2-Paradigma	4
1.1.3 Die Rolle der Zytokine bei GvHD-Reaktionen nach allogener Stammzelltransplantation	6
<b>1.2 Die Chemokine</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Die Toll-like Rezeptoren</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Die Rolle der Adapterproteine beim TLR-Signalweg</b>	<b>11</b>
1.4.1 MyD88, IRAK1 und TRAF6	11
1.4.2 Die intrazelluläre Signalkaskade der TLRs	12
1.4.3 Die negative Regulation des TLR-Signalweges	13
<b>1.5 Erkrankungen in der Zahnheilkunde unter besonderer Berücksichtigung der Zytokine</b>	<b>14</b>
1.5.1 Die marginale Parodontitis	14
1.5.1.1 Klassifizierung und Entstehung marginaler Parodontitiden	14
1.5.1.2 Die Destruktion des marginalen Parodonts	15
<b>1.6 Zielsetzung</b>	<b>17</b>

<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Materialien und Bezugsquellen</b>	<b>18</b>
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	19
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4 Kits	20
<b>2.2 Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1 Das LightCycler-System und seine Anwendung	20
2.2.1.1 Messprinzipien und Detektion der PCR-Produkte	22
2.2.1.2 Die quantitative PCR im LightCycler	23
2.2.2 Herstellung und Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-, Chemokin-, Adapterprotein- und TLR-mRNA mit Hybridisierungssonden (Hybridization Probes)	25
2.2.2.1 Probenmaterial	26
2.2.2.2 LightCycler-PCR	29
2.2.2.3 Herstellungsmöglichkeiten der externen Standards	33
2.2.2.4 Verwendung der externen Standards für die LightCycler-PCR	39
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Absolute Quantifizierung von Zytokin-mRNA mittels LightCycler-PCR</b>	<b>40</b>
3.1.1 Die Spezifität der Primer und Sonden	40
3.1.2 Linearität	42
3.1.3 Die Sensitivität	44
3.1.4 Die Amplifikationseffizienz	44
3.1.5 Die Reproduzierbarkeit der externen Standards im LightCycler	45
3.1.5.1 Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit	45
3.1.5.2 Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit	48

<b>3.2 Expression der Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs</b>	<b>50</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Die real-time RT-PCR bei der Detektion und Quantifizierung spezifischer mRNA</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Absolute Quantifizierung der cDNA-Expression über externe Standards und Hybridisierungssonden</b>	<b>53</b>
4.2.1 Spezifität	54
4.2.2 Sensitivität	54
4.2.3 Linearität	55
4.2.4 Amplifikationseffizienz	55
4.2.5 Reproduzierbarkeit	56
4.2.5.1 Intra-Assay Reproduzierbarkeit	56
4.2.5.2 Inter-Assay Reproduzierbarkeit	57
<b>4.3 Expression der Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs</b>	<b>57</b>
4.3.1 IL-15	58
4.3.2 RANTES	58
4.3.3 TLR3	59
4.3.4 MyD88	60
4.3.5 IRAK1	61
4.3.6 TRAF6	61
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>78</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
bp	base pair
C	Cytosin
cDNA	complementäre (copy) DNA
CP	Crossing Point
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	Amplifikationseffizienz
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
G	Guanin
GvHD	Graft versus Host Disease
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LED	light-emitting diode
log	Logarithmus auf der Basis 10
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK	natürliche Killerzellen
PHA	Phythämagglutinin
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
T	Thymin
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylethylendiamin
UV	Ultraviolett

k	kilo-; $10^3$
c	centi-; $10^{-2}$
m	milli-; $10^{-3}$
$\mu$	mikro-; $10^{-6}$
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
min	Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt

## 1. Einleitung

### 1.1 Zytokine

#### 1.1.1 Allgemeines

Zytokine sind zellregulatorische Proteine oder Glykoproteine, die von verschiedenartigen Zellen, hauptsächlich jedoch von Makrophagen und T-Lymphozyten, produziert werden. Je nach Ursprung eines Zytokins können auch folgende Begriffe benutzt werden: Interleukine sind spezifische Zytokine, die hauptsächlich Zellinteraktionen hervorrufen; Monokine sind Interleukine, die von Makrophagen/Monozyten gebildet werden. Lymphokine stattdessen werden von den Lymphozyten produziert. Sie werden von den genannten Zellen freigesetzt und dienen dann als interzelluläre Nachrichtenproteine. Je nachdem an welchem hochspezifischen Rezeptor die Zytokine ansetzen, können sie unterschiedlichste Wirkungen entfalten (z.B. Freisetzung von Mediatoren, Expression von Differenzierungsmolekülen, Regulation der Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle, Proliferation, Reifung und Aktivierung bestimmter Zellen). Diese Wirkung bezeichnet man als Pleiotropie. Des Weiteren können Zytokine parakrin (in der Nähe des Produktionsortes), autokrin (auf die produzierende Zelle selbst) oder viel seltener, nach Transport durch die Blutbahn *alio loco* wirken. Letzteres hängt jedoch von ihrer Halbwertszeit und davon ab, ob sie in den Kreislauf gelangen (Janeway et al., 2001).

Zytokine besitzen ein Molekulargewicht von < 60 kD (meist < 25 kD). Sie werden lokal produziert und haben sehr kurze Halbwertszeiten (Sekunden bis Minuten) und wirken bereits in äußerst niedrigen, femtomolaren ( $10^{-15}$ ) Konzentrationen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit werden Zytokine auf jeden Stimulus hin neu synthetisiert (Fitzgerald et al., 2001).

Zu ihren Hauptaufgaben zählt neben der Koordination der Wachstums- und Differenzierungsprozessen, der Hämato- und Lymphopoese, der Apoptose und Angiogenese selbstverständlich auch Regulation der adaptiven und

angeborenen Immunantwort: sie stellen die Botenstoffe dar, die aufgrund von bakteriellen oder viralen Antigenen, Pilzen und Parasiten oder infolge eines mechanischen, toxischen oder chemischen Reizes gebildet und sezerniert werden. Zytokine sind dann mitverantwortlich für den erfolgreichen Ablauf einer Immunreaktion; in diesem Zusammenhang wirken sie als Wachstumsfaktoren für immunkompetente Zellen und dienen als Schutz vor Gewebeschädigungen. Selbst einzelne Bestandteile bzw. Produkte kommensaler, z.B. sich auf der Schleimhaut befindender Keime, können an sich die Bildung von Zytokinen durch Epithelzellen auslösen; dass es trotzdem nicht zu einer ständigen Entzündungsreaktion auf der Mundschleimhaut kommt, wird der Tatsache verdankt, dass die Bakterien so genannte Bakteriokine bilden, die die Aktivität eukaryotischer Zytokine regelt. Gleichzeitig regulieren die Signalmoleküle der Epithelzellen die Bakteriokine; so beruht die Entzündungsfreiheit auf dem intakten Gleichgewicht zwischen Zytokinen und Bakteriokinen (Sanderink et al., 2004).

Die Wirkung der Zytokine ist oft redundant; d.h. dass es mehrere Zytokine gibt, die den gleichen Effekt hervorrufen. Dies wurde an so genannten Knock-out Mäusen beobachtet, denen ein bestimmtes Zytokin fehlte. Trotzdem zeigten diese Mäuse nur geringgradige Abweichungen in ihrer Immunantwort (Abbas et al., 1996).

Dies zeigt doch deutlich, dass nicht jedes Zytokin allein, sondern mehrere zusammen für einen biologischen Effekt verantwortlich sind. Häufig kommt es auch zu ganzen Zytokinkaskaden, bei der erst das zweite oder dritte Zytokin die eigentliche Wirkung entfacht. Gerade die Fähigkeit eines Zytokins, die Expression anderer Signalmoleküle zu erniedrigen oder zu erhöhen ist ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus bei Immun- oder Entzündungsantworten. Diese komplexen Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Zytokinen führen dann entweder zu physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Interleukin-15 (IL-15) ist auf dem menschlichen Chromosom 4q31 lokalisiert. Es wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet, hauptsächlich jedoch von Monozyten und dendritischen Zellen. Aufgrund gemeinsamer Untereinheiten in Rezeptorketten weist IL-15 eine IL-2-ähnliche Aktivität auf. Das IL-15 fördert die Proliferation von T-Zellen und die klonale Expansion aktivierter T-Lymphozyten; des Weiteren aktiviert es die natürlichen Killerzellen (NK) (Fitzgerald et al., 2001).

#### Übersicht über die 6 Zytokinfamilien:

Die Zytokine lassen sich in folgende Gruppen unterteilen (Sanderink et al., 2004):

- 1) Interleukine (IL-1 bis IL-32)
- 2) koloniestimulierende Faktoren (CSF)
- 3) chemotaktische Chemokine
- 4) Tumornekrosefaktoren (TNF)
- 5) Interferone (IFN)
- 6) hämatopoetische Wachstumsfaktoren

### **1.1.2 Pro- und antiinflammatorische Zytokine & das TH1-/TH2-Paradigma**

Wie bereits schon in Kap. 1.1.1 beschrieben, sind Zytokine zentrale Regulatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Klinisch relevant ist vor allem die Einteilung in pro- und antiinflammatorische Zytokine, die mit den T-Helferzellen vom Typ1 und Typ2 assoziiert werden (Mosmann et al., 1989).

T-Helferzellen vom Typ1 (TH1) und vom Typ2 (TH2) repräsentieren zwei polarisierte Formen der CD4+T-Helferzellen vermittelten, spezifischen Immunantwort und spielen jeweils unterschiedliche Rollen in pathophysiologischen Geschehen.

TH1-Zellen produzieren die typischen proinflammatorischen Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor necrosis Faktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), die eine zellvermittelte Immunität und phagozyten-abhängige Entzündung hervorrufen und unterstützen.

Dagegen werden die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 von den TH2-Zellen gebildet, die dann die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen, sprich die humorale Immunität, veranlassen (Abbas et al., 1996).

Die Möglichkeit, das Auftreten von TH1- oder TH2- dominierten Immunantworten unter normalen und pathologischen Bedingungen aufzudecken, wird durch methodische Probleme eingeschränkt. Viele Zytokine werden von den T-Zellen in kleinen Mengen produziert und einige von ihnen werden nicht freigesetzt, sondern direkt über Zell-zu-Zell-Kontakte übertragen. Deswegen ist es nahezu unmöglich die Mehrheit der spontan ausgeschütteten Zytokine in T-Zellsuspensionen zu detektieren (Romagnani, 2000).

In den vergangenen Jahren wurde die Möglichkeit, dass bestimmte Oberflächenmarker bevorzugt TH1- oder TH2-Zellen binden, weitreichend untersucht (Annunziato et al., 1998). Obwohl spezifische Marker für einen bestimmten Zelltyp vermutlich gar nicht existieren, so konnte doch eine bevorzugte Expression von Molekülen in TH1- oder TH2-Zellen beschrieben

werden. Z.B. ist CCR5 bevorzugt assoziiert mit TH1- und CRTH2 mit TH2-Zellen (Romagnani, 2000). Diese beiden Moleküle sind Chemokinrezeptoren, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Migration von TH1 oder TH2 ins entzündete Gewebe spielen.

#### Mechanismen, die für eine TH1/TH2-Polarisation verantwortlich sind:

Kommt es während einer Immunantwort zu einer frühen IL-4 Expression, so tritt entscheidend die Entwicklung der TH2-Zellen ein. Im Gegensatz dazu kommt es durch IL-12, IL-18 zur TH1-Differenzierung (Manetti et al., 1993 und Hsieh et al., 1993). Gleichzeitig führt IL-12 zu einer IL-4 Inhibition. Zusätzlich führt die Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege mit ihren unterschiedlichen Transduktionsfaktoren durch bestimmte Interleukine entweder zu einer TH1- oder TH2-Antwort: bindet IL-12 an seinen Rezeptor, so kommt es zu einer Tyrosinphosphorylierung von STAT4, das zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren zu einer unabhängigen Aktivierung des IFN- $\gamma$  Gens führt (Barbulescu et al., 1998). Im Gegensatz dazu stellt der Transkriptionsfaktor GATA-3 einen allgemeinen Regulator der TH2-Zytokinexpression dar (Szabo et al., 1997). Gleichzeitig führt dieser noch zu einer Herunterregulierung der IFN- $\gamma$ -Produktion (Ferber et al., 1999).

#### Die pathophysiologischen Konsequenzen der TH1/TH2-Polarisation:

Die T-Helferzellen TH1 und TH2 spielen nicht nur bei der Abwehr eine unterschiedliche Rolle, sie sind auch verantwortlich für eine Reihe unterschiedlicher immunopathologischer Erkrankungen. Erst wenn die Balance zwischen TH1- und TH2-Zytokinmuster gestört ist, so resultiert daraus ein pathophysiologische Immunreaktion (Romagnani, 1997).

Tritt während einer HIV-Infektion eine TH2-Immunantwort und folglich daraus eine TH1-Inhibition auf, so kommt es zu einem Kontrollverlust des Immunsystems über die HIV-Infektion, sodass ein rasches Fortschreiten dieser Infektionskrankheit eintritt (Clerici et al., 1993).

Im Gegensatz dazu findet bei Morbus Crohn, Sarkoidose und Multiple Sklerose eine TH1-dominierte Immunreaktion statt.

### **1.1.3 Die Rolle der Zytokine bei GvHD-Reaktionen nach allogener Stammzelltransplantation**

Das Auftreten einer GvH (graft versus host)-Krankheit kann nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation als eine mögliche Komplikation auftreten. Hierbei sind immunkompetente Zellen des Spenders gegen Körperzellen des Empfängers gerichtet. Dies findet statt, weil die Spender-T-Zellen die HLA-Antigene des Empfängers als fremd erkennen. Die Organe, die bei einer GvH-Krankheit (GvHD) hauptsächlich betroffen sind, sind Haut, Leber und Verdauungstrakt. Bei der akuten GvHD treten in den genannten drei Zielorganen Epithelzellnekrosen auf; das klinische Bild äußert sich in Hautausschläge, Ikterus und Diarrhöe. Bei ausgedehnten Nekrosen kommt es zur Abstoßung der Epidermis bei der Haut und des Epithelüberzugs des Darms, was dann zum Tode führen kann (Abbas et al., 1996).

Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Rolle der Zytokine in der Pathogenese der akuten GvHD. Gerade die dysregulierte Zytokinproduktion bedingt eine Monozyten- und T-Zell-Aktivierung, die für viele Manifestationen einer akuten GvHD verantwortlich ist (Hill et al., 1997). Diese Zytokindysregulation kann in drei Phasen eingeteilt werden:

Phase 1 wird durch die Radiatio- und/oder Chemotherapie ausgelöst, die zur Schädigung des Empfängergewebes führt, das daraufhin IL-1 und IL-6 freisetzt. Gleichzeitig bedingt auch LPS, das aufgrund der geschädigten Mukosa nun leichter in den systemischen Kreislauf gelangen kann, die Sezernierung von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-12 durch Makrophagen. Durch TNF- $\alpha$  und IL-1 werden vermehrt MHC-Antigene im Empfängergewebe exprimiert, sodass die Spender-T-Zellen, die MHC-Unterschiede leichter wahrnehmen.

Die Phase 2 ist gekennzeichnet durch die Aktivierung der Donor-T-Zellen, die eine TH1-Antwort induzieren.

Die TH1-Zytokine aktivieren zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, die das Gewebe schädigen. Außerdem werden noch die unspezifischen Abwehrzellen, wie Makrophagen aktiviert, die mit ihren

proinflammatorischen Zytokinen dafür sorgen, dass das Zielgewebe weiter geschädigt wird (Holler, 2002).

## 1.2 Die Chemokine

Obwohl die Chemokine als Mitglieder der Zytokin-Superfamilie betrachtet werden, so stellen sie doch eine eigenständige Klasse von Molekülen mit ausgeprägten Eigenschaften dar. Der Name Chemokin setzt sich aus den Wörtern „chemotaktisch“ und „Zytokin“ zusammen. Gerade die Fähigkeit der Chemotaxis ist, neben ihrer strukturellen Ähnlichkeit, das Charakteristikum, was diese Klasse von Proteinen zu einer Familie zusammenfasst. Erst nach der genauen Beschreibung und Charakterisierung des IL-8 (heißt jetzt: CXCL8) wurden die Chemokine als chemotaktische Moleküle erkannt (Yoshimura et al., 1987). Chemokine binden an ihre Rezeptoren, die sieben Transmembran- $\alpha$ -Helix-Domänen aufweisen (Abbas et al., 1996). Bis heute sind über 40 Chemokine identifiziert worden, die man entsprechend ihrer Konfiguration der Cysteinreste am  $\text{NH}_2$ -terminalen Bereich in vier Hauptgruppen unterteilt: CC, CXC, C und  $\text{CX}_3\text{C}$  (Rossi et al., 2000).

Zwar wirken Chemokine vor allem als Chemoattraktoren bei der Leukozytenmigration, doch beeinflussen sie auch die Degranulation von Leukozyten, Integrin-Aktivierung während Leukozyten-Endothel-Interaktionen und Angiogenese (MacKay, 2001; Yoshie et al., 2001).

Des Weiteren haben die Chemokine die Aufgabe Regelkreise von bestimmten Immunantworten (TH1-, TH2- und Lymphgewebs-Immunantworten) zu steuern. Jede dieser drei Immunantworten wird mit ganz bestimmten und definierten Zytokinen, Chemokinen und Leukozyten assoziiert. In jeder dieser drei Immunantworten scheinen Rückkopplungsmechanismen, im Sinne eines positiven Feedback, wirksam zu sein (Luther et al., 2000). Positive Rückkopplungsmechanismen bei TH2-Antworten kommen durch die Produktion von IL-4 und IL-13 zustande, die die Bildung von CCL11 in unterschiedlichen Zellen veranlassen; dies führt dann wieder zu einer verstärkten Stimulation der

Eosinophilen und der TH2-Zellen, die dann ihrerseits wieder vermehrt Zytokine produzieren (MacKay et al., 2001). Viele Leukozyten produzieren Chemokine, die sie selbst anziehen, was dazu dient unter bestimmten Umständen eine verstärkte Rekrutierung dieser Zellen zum Entzündungsort zu erlangen.

RANTES, für das in dieser Arbeit ein externer Standard etabliert worden ist, ist ein  $\beta$ -Chemokin, das potent chemotaktisch für natürliche Killerzellen, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und T-Lymphozyten ist. RANTES stellt das alleinige  $\beta$ -Chemokin dar, das in Thrombozyten präsent ist. RANTES wird in T-Lymphozyten, Epithelzellen, Monozyten, Fibroblasten, Thrombozyten, eosinophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Mastzellen, Karzinomzellen der menschlichen Lunge und in Melanomzellen gebildet.

Eine erhöhte Expressionsrate von RANTES wurde bei folgenden Krankheiten detektiert:

- 1) in der Synovia bei rheumatoider Arthritis
- 2) in der Tränenflüssigkeit bei Patienten mit allergischer Konjunktivitis
- 3) im Epithel von Nasenpolypen
- 4) in der Haut von Atopikern

RANTES ist auf dem menschlichen Chromosom 17 (q11.2-12) lokalisiert (Krishna et al., 1997).

### **1.3 Die Toll-like Rezeptoren**

Bei den Toll-like Rezeptoren (TLR) handelt es sich um Homologen des transmembranen Drosophila-Toll-Rezeptors, die innerhalb der Immunabwehr eine Schlüsselposition einnehmen. TLRs spielen eine entscheidende Rolle in der frühen Phase einer Wirtsabwehr gegen eindringende Pathogene (Janeway et al., 2002). Der Toll-Rezeptor der Tauffliege ist nicht nur für die Festlegung der

dorsoventralen Achse des sich entwickelnden Fliegenembryos verantwortlich; er spielt auch eine große Rolle bei der spezifischen, pathogengerichteten Immunantwort: ein Toll-Rezeptor ist, nach Stimulation, für die Induktion eines Peptids (Drosomycin), das gegen Pilze wirkt, verantwortlich; ein anderes Mitglied der Toll-Familie ist bedeutend für die Induktion eines antibakteriellen Gens (Cecropin; Attacin) (Kaisho et al., 2001).

Mittlerweile wurden bei Säugern 11 Mitglieder der TLR-Familie identifiziert. In ihrer zytoplasmatischen Domäne weisen die IL-1-Rezeptoren (IL-1R) und die TLRs beide eine stark konservierte Region von etwa 200 Aminosäuren (AS) auf, die man als Toll/IL-1R-Domäne (TIR) bezeichnet (Slack et al., 2000). In ihrem extrazellulären Bereich unterscheiden sich jedoch die beiden Rezeptortypen: der IL-1R weist drei immunglobulinähnliche Domänen auf, der TLR besteht dort aus Leucin-reichen Wiederholungen (LRR). Man nimmt an, dass der konkavgewölbte Teil der Oberfläche der LRR-Domäne direkt an der Erkennung der verschiedenen Pathogene beteiligt ist (Akira et al., 2004). Während TLR-1, TLR-2 und TLR-4 sich auf der Zelloberfläche befinden, sind TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9, die alle an der Erkennung von Nukleinsäuren und nukleinsäureartigen Strukturen beteiligt sind, intrazellulär lokalisiert (Heil et al., 2003 und Matsumoto et al., 2003).

Die Expression der TLRs ist neben der Zellstimulation (Zytokine und Pathogene) auch von den unterschiedlichen Zelltypen abhängig: TLR1 wird auf fast allen Zellen exprimiert, TLR2 und TLR4-10 auf Monozyten, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten (Kadowaki et al., 2001; Muzio et al., 2000; Hornung et al., 2002).

Im Folgenden soll TLR3, für den in dieser Arbeit ein externer LightCycler-Standard hergestellt und etabliert wurde, kurz näher beschrieben werden:

Der menschliche TLR3 besteht aus 904 Aminosäuren und besitzt ein molekulares Gewicht von 125 kD. Das TLR3-Gen ist auf dem menschlichen Chromosom 4q35 lokalisiert.

Lokalisation und Expression: TLR3 mRNA wurde in der Plazenta, in der Lunge, in der Leber, im Herzen, im Gehirn und im Pankreas detektiert. Dieser Toll-like Rezeptor wird auch in dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen aber

nicht in Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten, T- und B-Zellen und NK-Zellen exprimiert.

Die Hauptaufgabe des TLR3 sind Zytokinproduktion und Reifung der dendritischen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass IFN- $\beta$  das Hauptzytokin ist, welches durch ein TLR3-Signal induziert wird (Matsumoto et al., 2004).

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Triacyl- Lipopeptid Lösliche Faktoren	Bakterien, Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide Peptidoglykane Lipoteichonsäure Zymosan atypisches LPS atypisches LPS Hitze-Schock-Protein 70	verschiedene Pathogene grampositive Bakterien grampositive Bakterien Pilze <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> humanes Protein
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	LPS Taxole Fusionsproteine Hüllproteine Hitze-Schock-Protein 60+70	gramnegative Bakterien Pflanzen Respirator. Syncytialvirus (RSV) Maus-Mammatumor-Virus
TLR5	Flaggelin	Bakterien
TLR6	Diacyl-Lipopeptid Lipoteichonsäure Zymosan	Mykoplasmen grampositive Bakterien Pilze
TLR7	Imidazol Loxoribin einzelsträngige RNA	synthetisch synthetisch Viren
TLR8	Imidazol einzelsträngige RNA	synthetisch Viren
TLR9	CpG DNA	Bakterien, Viren
TLR10	noch nicht bekannt	-
TLR11	noch nicht bekannt	-

**Tabelle 1** : Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (nach Akira, S.,2004)

## 1.4 Die Rolle der Adapterproteine beim TLR-Signalweg

### 1.4.1 MyD88, IRAK1 und TRAF6

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) wurde ursprünglich als Gen isoliert, das bei der IL-6-stimulierten Differenzierung von M1 myeloleukämischen Zellen in Makrophagen sehr schnell induziert wurde (Lord et al., 1990). Dieses Adapterprotein hat eine N-terminale Todesdomäne (DD) und am C-terminalen Ende eine TIR-Domäne, die mit der TIR-Domäne aktivierter TLRs assoziiert. Anhand von MyD88-defizienten Mäusen konnte die bedeutende Rolle von diesem Adapterprotein bei der Signalübermittlung über TLRs oder den IL-1R bewiesen werden: die MyD88-defizienten Makrophagen waren nicht in der Lage nach Ligandenbindung an TLRs proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12p zu bilden. Außerdem konnte in MyD88-defizienten Zellen in Reaktion auf IL-1R-, TLR2-, TLR7-, TLR9-Ligandenbindung keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass TLR2, TLR7, TLR9 und IL-1R bei ihrer Signalübermittlung vollständig von MyD88 abhängen (Akira et al., 2004).

Die IRAK-Familie: bei Säugetieren konnten bislang vier Mitglieder der IRAK (IL-1R-associated kinase)-Familie identifiziert werden: IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M (Janssens et al., 2003). Die IRAKs besitzen eine N-terminale DD und eine zentrale Serin/Thyrosin-Kinase. Die Kinase-Aktivität von IRAK1 ist stark erhöht nach einer TLR/IL-1R-Stimulation und die Kinase-Domäne ist essentiell für den Signalweg über NF- $\kappa$ B.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IRAK1 ein direktes Substrat von IRAK4 ist, jedoch nicht vice versa; in Irak1-defizienten Mäusen war zwar die Zytokinproduktion als Antwort auf LPS vermindert, aber nicht unterdrückt (Swantek et al., 2000). IRAK4-defiziente Mäuse zeigten dagegen keine Antwort auf LPS oder andere bakterielle Komponenten, was die wichtige Rolle von IRAK4 beim TLR/IL-1R-Signalweg unterstreicht (Suzuki et al., 2002).

TRAF6: Die 6 Mitglieder der TRAFs (Tumor-necrosis-factor-receptor-associated-factor) bilden eine Familie konservierter Adapterproteine. Sie sind

charakterisiert durch eine N-terminale  $\alpha$ -Helix-Domäne und eine konservierte C-terminale Domäne. Die TRAF-C Domäne interagiert mit Upstream-Rezeptoren und –Signalproteinen, wohingegen die N-terminale Domäne essentiell für das Downstream-Signal ist.

TRAF6 tritt als Signalmediator sowohl bei der TNF-Rezeptor Superfamilie als auch bei der TLR/IL-1R Superfamilie in Erscheinung; hierbei interagiert TRAF6 direkt mit den TNF-Rezeptoren CD40 und TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine receptor) und indirekt mit den TLR/IL-1R Mitgliedern durch Assoziation mit den IRAKs (Akira et al., 2004).

#### **1.4.2 Die intrazelluläre Signalkaskade der TLRs**

Nach Stimulation der TLRs durch ihre spezifischen Liganden kommt es zur Signalweiterleitung in das Zellinnere, was letztendlich zur Bildung bestimmter Zytokinmuster führt. Der Signalweg kann zum einen MyD88-abhängig und zum anderen MyD88-unabhängig ablaufen. Der MyD88-abhängige Signalweg wird von den Toll-like Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 und TLR9 genutzt. Folge des MyD88-abhängigen Signalweges ist die Loslösung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B von seinem Inhibitor, sodass er in den Zellkern wandern kann und die Expression inflammatorischer Zytokine induziert. Bei TLR2 und TLR4 ist noch ein weiteres Adapterprotein neben MyD88 an der Signaltransduktion beteiligt: TIRAP (TIR-domain-containing adapter protein).

TLR4 weist neben dem MyD88-abhängigen Weg noch den MyD88-unabhängigen Weg auf, der zur späten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Aktivierung von Interferon-regulatory factor 3 (IRF3) führt; dadurch wird die Produktion von IFN- $\beta$  und IFN-induzierten Genprodukten (GARG16, IRG1, CXCL10) veranlasst.

Der TLR3-Signalweg ist von MyD88 unabhängig, jedoch abhängig von dem Adapterprotein TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ). Die Stimulation dieses Rezeptors durch seinen Liganden (dsRNA) führt zur Induktion von TypI-Interferonen (IFN- $\alpha/\beta$ ) (Akira et al., 2004).

### 1.4.3 Die negative Regulation des TLR-Signalweges

Inflammatorische Zytokine, die nach Stimulation der TLRs in großen Mengen produziert werden, können starke systemische Schäden, wie z.B. einen LPS induzierten endotoxischen Schock, hervorrufen. Deshalb gibt es Mechanismen, die diese TLR-vermittelten Immunantworten negativ beeinflussen können.

Das Protein IRAK-M, das nur von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, verhindert, dass sich der IRAK1-IRAK4-Komplex von MyD88 löst; die Folge ist, dass sich der IRAK1-TRAF6-Komplex nicht bilden kann; dadurch wird das TLR-Signal abgeschwächt (Kobayashi et al., 2002).

SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1), ein weiteres Protein, wird direkt durch Zytokine induziert. Es assoziiert mit IRAK1 und führt so zur negativen Regulation des TLR-Signalweges. SOCS1-defiziente Mäuse reagierten hypersensitiv auf LPS, was zu einem endotoxischen Schock führte (Kinjyo et al., 2002).

MyD88s, die *splice* Variante von MyD88, bindet nicht IRAK4, wodurch die Phosphorylierung von IRAK1 verhindert und die NF- $\kappa$ B-Aktivierung gehemmt wird (Burns et al., 2003).

SIGIRR (single immunoglobulin IL-1R-related molecule) ist ein membrangebundenes Molekül, das eine TIR-Domäne besitzt und an der negativen Regulation des TLR-Signalwegs beteiligt sein soll; SIGIRR-defiziente Mäuse reagierten stark sensitiv auf einen LPS-induzierten endotoxischen Schock (Wald et al., 2003).

## 1.5 Erkrankungen in der Zahnheilkunde unter besonderer Berücksichtigung der Zytokine

### 1.5.1 Die marginale Parodontitis

#### 1.5.1.1 Klassifizierung und Entstehung marginaler Parodontitiden

Die Klassifizierung marginaler Parodontitiden geht von ätiologischen, pathobiologischen Grundlagen und vom klinischen Erscheinungsbild aus. Es wird zwischen folgenden Parodontitisformen unterschieden: chronische Parodontitis (CP), aggressive Parodontitis (AP), nekrotisierende Parodontitis (NP), Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen (PS), Parodontalabszesse, Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen und entwicklungsbedingten und erworbenen Deformationen.

Damit es zur Entstehung einer Parodontitis kommt, müssen mehrere Faktoren zusammenwirken:

Von Bedeutung ist die Anwesenheit einer subgingivalen Plaque, die parodontopathogene Keime enthält; als besonders parodontopathogen gelten: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AA), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Tannerella forsythensis* (TF; ehemals: *Bacteroides forsythus*) und *Treponema denticola* (TD). Diese Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Parodont die Freisetzung von Entzündungsmediatoren ( $\text{PGE}_2$ ), gewebeschädigenden Enzymen (Kollagenasen) und proinflammatorischen Zytokinen veranlassen können.

Durch die parodontopathogenen Keime kommt es zur Unterdrückung der kommensalen Bakterien, die die Parodontalkeime in ihrer Wirkung abschwächen; dadurch verändert sich das Milieu zugunsten der PA-Keime, was zu einer verstärkten Destruktion des Parodonts führt.

Aber auch Wirtsfaktoren (Immundefekte, endokrine Veränderungen, entzündliche Erkrankungen, Vitamin C-Mangel, Nikotin- und Kaffeekonsum und emotionale Belastungen) sind daran beteiligt, dass es zur Entstehung progressiv verlaufender Parodontitiden kommt.

### 1.5.1.2 Die Destruktion des marginalen Parodonts

#### a) mikrobielle Mechanismen:

Die parodontopathogenen Keime können Toxine produzieren, die die kollagenbildenden Fibroblasten und Epithelzellen abtöten und die Funktionsfähigkeit von Leukozyten und gingivalen Keratinozyten einschränken.

Das bakterielle Stoffwechselprodukt Methylmercaptan ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) beeinträchtigt nicht nur die Kollagensynthese der gingivalen Fibroblasten, es erhöht zu dem noch die epitheliale Permeabilität für Mikroorganismen und fördert die Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  und  $\text{IL-1}\beta$ ; diese beiden Entzündungsmediatoren vermitteln den Knochenabbau im Rahmen parodontaler Erkrankungen.

Auch bilden die subgingival lokalisierten Keime proteolytische Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix schädigen und Kollagen des parodontalen Stützapparates abbauen.

#### b) entzündungsbedingte Mechanismen:

LPS, der bedeutendste Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien penetriert in die Gingiva und wird vom Akute-Phase-Protein LBP gebunden; dieser Komplex wird vom Rezeptorkomplex  $\text{CD14/MD-2/TLR4}$ , der sich auf der Oberfläche von Makrophagen befindet, erkannt und gebunden. Dadurch kommt es zur Signalübertragung in das Zellinnere und es werden daraufhin folgende Entzündungsmediatoren/Zytokine synthetisiert und freigesetzt: Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ),  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  und Matrixmetalloproteasen (MMP).

Das  $\text{PGE}_2$  aktiviert Osteoklasten und trägt so dazu bei, dass es zum Abbau des alveolären Knochens kommt. Das  $\text{IL-1}\beta$ , das neben den Makrophagen auch von den Fibroblasten gebildet wird, führt zur Proliferation aktivierter B- und T-Zellen und zur weiteren Induktion der  $\text{PGE}_2$ - und Zytokinproduktion in Makrophagen. Der  $\text{TNF-}\alpha$  aktiviert Phagozyten, die vermehrt ins entzündete Parodont einwandern.  $\text{IL-6}$  wird neben Makrophagen auch von TH-Zellen und Mastzellen gebildet und stimuliert das Wachstum und die Differenzierung von B- und T-Zellen und führt zur Induktion Akuter-Phase-Proteine. Durch die Ausschüttung von  $\text{IL-8}$  im subepithelialen Gewebe baut sich ein Konzentrationsgradient auf,

der dazu führt, dass polymorphkernige Granulozyten rekrutiert werden und ins Gewebe einwandern, was eine Auflockerung bewirkt und es den Bakterien ermöglicht leichter subepithelial vorzudringen.

Die von den Makrophagen sezernierten MMP führen zur Destruktion der extrazellulären Matrix der Gingiva und des Desmodonts. Unter gesunden Bedingungen sind die Gene aktiv, die die Bildung von Kollagen und den Inhibitoren der MMPs veranlassen. Unter pathologischen Bedingungen kehren sich jedoch die Verhältnisse um.

Daraus folgend lässt sich sagen, dass die parodontopathogenen Keime zwar eine Parodontitis initiieren können, der Hauptanteil der parodontalen Destruktion wird allerdings von entzündlichen und Immunreaktionen des Wirts verursacht (Müller, 2001).

## 1.6 Zielsetzung

Die fluoreszenz-basierte real-time RT-PCR ist mittlerweile die gebräuchlichste Methode um Mengen spezifischer cDNA in verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen und um Genexpressionen nachzuweisen (Orlando et al., 1998).

Des Weiteren stellt die real-time RT-PCR im Moment die sensitivste Methode zur Detektion von cDNA dar (Bustin, 2000). Dies ist für den Nachweis von Zytokin m-RNA von großer Bedeutung, da diese nur in sehr kleinen Mengen exprimiert wird.

Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine, Chemokine, Toll-like Rezeptoren und Adapterproteine spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort, sie sind auch bedeutend beteiligt an der Entstehung von pathophysiologischen Prozessen (Kapitel 1.1-1.5). Deshalb erscheint es erforderlich, das Expressionslevel dieser Signalmoleküle unter pathologischen Bedingungen mittels quantitativer RT-PCR zu bestimmen um so ihre Bedeutung und ihren Einfluss hinsichtlich des Verlaufs einer Krankheit eruieren zu können, so dass eventuelle neue Therapieansätze gefunden werden können.

Ziel der Arbeit war es nun für IL-15, RANTES, TLR3, MyD88, IRAK1 und TRAF6 externe Standards mit einem vorgegebenen, im Labor entwickelten PCR-Protokoll herzustellen und sie hinsichtlich ihrer Spezifität, Linearität, Sensitivität, Amplifikationseffizienz und Reproduzierbarkeit (inter/intra) mittels Testläufe zu überprüfen. Gleichzeitig wurden noch Proben von unstimulierten und mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Phythämagglutinin (PHA) stimulierten peripheren mononuklearen Blutzellen eingesetzt, sodass untersucht werden konnte, ob die Expression der Zielgene durch Stimulation verändert wurde.

Da diese externen Standards in ausreichend großen Mengen hergestellt wurden, konnten sie darauf folgend im Labor für weitere LightCycler-Läufe zur absoluten Quantifizierung bestimmter Proben verwendet werden, was so im Weiteren ein sensibles, spezifisches, schnelles und ökonomisches Arbeiten mit diesen externen Standards ermöglichte.

## 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
Software	Microsoft Word 2000 Microsoft Excel 97 LightCycler Software Version 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Drucker	DeskJet 695C	Hewlett Packard, München
PCR Systeme	LightCycler Instrument LightCycler Carousel Zentrifuge GeneAmp 2400	Roche Diagnostics, Mannheim Perkin Elmer, Drei Eichen
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
Sterilbänke	LaminAir HLB 2472 Biogard B40-112	Heraeus, Hanau Baker Company, Sanford, Maine, USA
Vortex	Top-Mix 94323	Heidolph Instruments
Pipettierhilfe	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte

Pipetten	Variopipetten 10 µl, 100µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
----------	--	--------------------

### 2.1.2 Verbrauchsgegenstände

LightCycler Capillaries	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 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 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Chemikalien

Primer, Sonden	Tib Molbiol, Berlin
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Gel-Star	FMC BioProducts, Rockland, USA
TAE Buffer	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Ready-Load 100bp DNA Ladder	
BlueJuice Gel loading Buffer	

## 2.1.4 Kits

Extraktion	Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit QIAquick Gel Extraction Kit	
Transkription	First Strand cDNA Synthesis	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR	Kit for RT- PCR PCR Core Kit LightCycler	
	<ul style="list-style-type: none"><li>• FastStart DNA Master Hybridization Probes</li></ul>	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Das LightCycler-System und seine Anwendung

Das LightCycler-System ist die zurzeit wohl innovativste PCR-Maschine, die erlaubt, dass eine komplette PCR von 45-50 Zyklen in etwa 40-50 Minuten durchgeführt wird. Den Verlauf der PCR (Fluoreszenzkurven) kann man direkt während eines Laufs am angeschlossenen PC verfolgen und die Anzahl der Zyklen können noch im Lauf verändert werden. Nach Beendigung eines Laufs erfolgt die eigentliche Auswertung am PC, sodass alle Einstellungen und Ergebnisse ausgedruckt werden können.

#### Das Funktionsprinzip des LightCyclers:

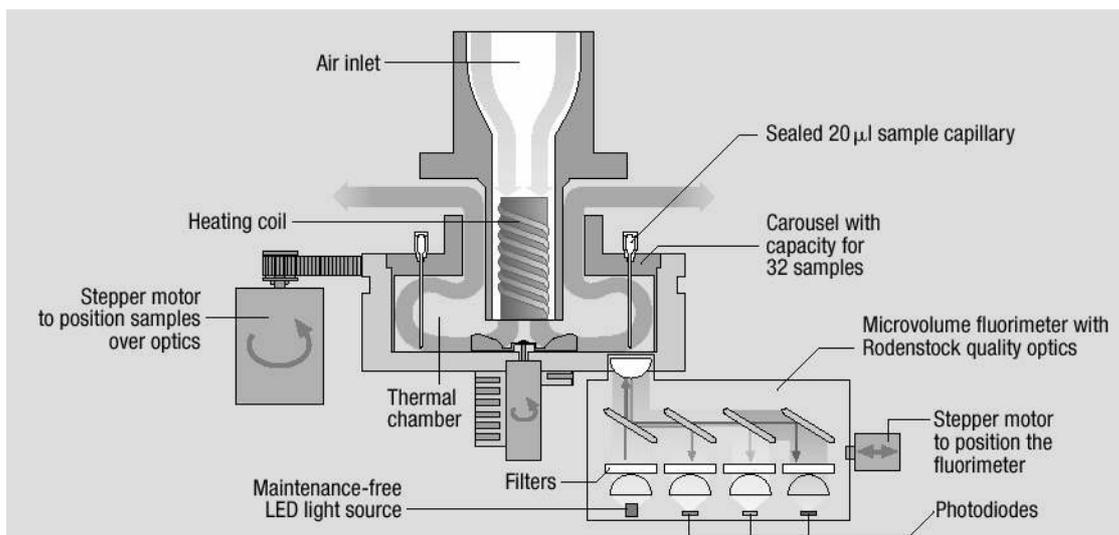
Während in konventionellen PCR-Geräten mit einem Heizblock die Proben erhitzt werden, wird bei LightCycler-Geräten Luft zum Erhitzen und Abkühlen

der Proben verwendet. Die Temperaturregulierung erfolgt mittels einer Widerstandsheizung und Temperatursensoren im Inneren der Reaktionskammer. Die Abkühlung des Reaktionsraumes wird durch Raumluftzufuhr erreicht. Da Reaktionskammer und Karussell aus Materialien mit geringer Wärmekapazität gefertigt sind und die Glaskapillaren ein optimales Oberflächen-Volumenverhältnis aufweisen, können Aufheiz- und Abkühlraten von 20° C pro Sekunde erreicht werden.

Das Karussell wird durch den so genannten Steppermotor bewegt. Wird nun das Probenkarussell eingesetzt, so bestimmt das Gerät automatisch die Anzahl der Glaskapillaren und optimiert ihre Positionen über den Fluorimeter und speichert für jede Probe den Wert ab.

Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in den Proben befinden, erfolgt durch eine LED über die Spitze der Kapillare, die als optische Einheit wirkt und die emittierte Fluoreszenz gebündelt nach unten wieder abgibt. Diese Fluoreszenzstrahlung wird von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern zu den drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 710 nm) weitergeleitet. Durch sie wird das optische Signal in ein elektrisches umgewandelt und über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt.

Die LightCycler Software (Version 3.5) dient der Analyse der PCR.



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau des LightCycler Instruments

(mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics)

### 2.2.1.1 Messprinzipien und Detektion der PCR-Produkte

Mittlerweile sind vier verschiedene, auf Fluoreszenz basierende Messmethoden bekannt:

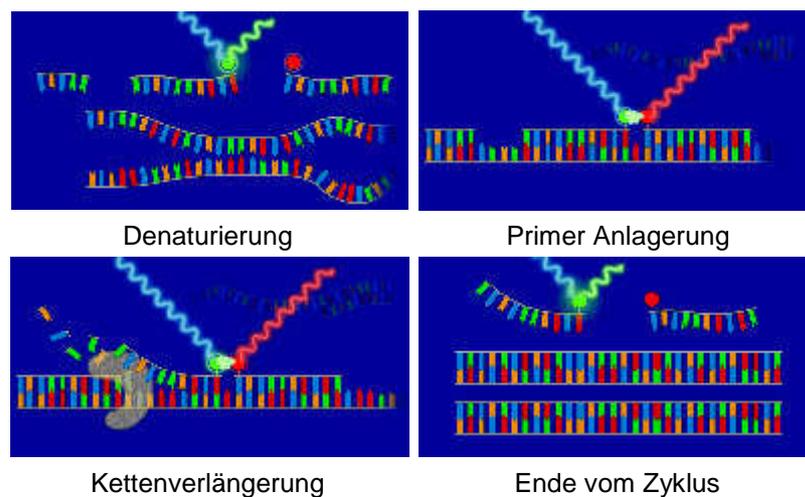
- Hybridization Probes Format
- TaqMan Probes
- Molecular Beacons
- DNA interkalierende Farbstoffe

Da in dieser Promotionsarbeit nur die erste Messmethode zum Zuge kam, soll auch nur diese etwas ausführlicher besprochen werden:

Bei der Verwendung des Hybridization Probes Format werden nur spezifische PCR-Produkte detektiert, die unspezifischen und die Primerdimere werden nicht von der Detektion erfasst. Grundlage dieser Methode ist, dass zusätzlich zum PCR-Ansatz zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisierungssonden) dazu gegeben werden, die DNA in einer räumlichen Nähe zueinander (1-5 Nukleotide Abstand) zwischen den Primern an die Ziel-DNA binden. Diese beiden Sonden besitzen jeweils einen Fluoreszenzfarbstoff. Sonde 1 trägt an ihrem 3'-Ende den sogenannten Farbstoff *Fluorescein*, während Sonde 2 an ihrem 5'-Ende den Farbstoff *LightCycler Red 640* trägt. Das Binden der Sonden an die Ziel-DNA geschieht während einer PCR in der sogenannten Annealing-Phase, da nur in dieser Phase die DNA in Form von Einzelsträngen vorliegt und die Sonden somit binden können.

Die Detektion basiert auf dem FRET-Prinzip („fluorescence resonance energy transfer“), das auch schon mehrmals in der Literatur beschrieben wurde (Wittwer et al., 1997b; Clegg, 1995): am Ende der Annealing-Phase wird der Farbstoff *Fluorescein* durch blaues Licht (470 nm) der LED angeregt. Dieser emittiert keine Fluoreszenz, sondern überträgt seine Energie auf den benachbarten, zweiten Fluoreszenzfarbstoff *LC Red 640*. Das *LC Red 640* emittiert rotes Licht der Wellenlänge 640 nm, das nun durch den Messkanal F2 aufgefangen und registriert wird. Die Intensität der roten Fluoreszenz ist direkt proportional der Menge an amplifizierter Ziel-DNA; die Messung des Signals

erfolgt einmal pro Zyklus und zwar am Ende der Annealingphase, wo beide Sonden an der Ziel-DNA gebunden sind und so ein Energietransfer stattfinden kann. Ungebundene Sonden diffundieren frei in der Lösung und geben kein Signal, weil dazu Ihre räumliche Nähe zueinander fehlt und so der FRET nicht stattfinden kann.



**Abb. 2:** Schematischer Ablauf einer PCR mit Hybridization Probes ([www.pcr.at](http://www.pcr.at))

### 2.2.1.2 Die quantitative PCR im LightCycler

Der typische Reaktionsablauf einer PCR lässt sich in drei Abschnitte unterteilen:

- 1. frühe oder background-Phase
- 2. Log-Phase (exponent. Wachstumsphase)
- 3. Plateauphase

Am Anfang eines Laufes sind es die Hintergrundsignale, die zunächst einmal dominieren. Diese erste Phase gilt dann als beendet, wenn die Hintergrundsignale von den Signalen der spezifischen PCR-Amplifikate übertroffen werden. Nun folgt die 2. Phase, in der sich die Signale der PCR-Amplifikate nun deutlichst von den Backgroundsignalen abheben. Diese Stelle

stellt den so genannten Crossing Point (CP) dar und ist auf dem Monitor als steiler Anstieg der Amplifikationskurve zuerkennen. Gemäß der Definition für den CP liegt nun die Zyklenzahl vor, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet und nun der Übergang zur Phase des exponentiellen Wachstums stattfindet. Die spezifischen DNA-Segmente werden nun exponentiell vervielfältigt. Bei einer ausreichend zur Verfügung stehenden Menge an Primer und Sonden dürfte die exponentielle Phase eigentlich nie enden, da mit jedem neuen Zyklus auch neue Amplifikate (Verdoppelung der DNA aus dem vorigen Zyklus) gebildet werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass dies nicht zutrifft und gegen Ende eines jeden Laufs die sogenannte Plateauphase eintritt. Grund hierfür sind 1. das ineffektive Primer-Annealing und 2. die Enzym-Limitierung. Erstes kommt dadurch zustande, dass die Amplifikats-DNA durch Re-Annealing an die Ziel-DNA in Konkurrenz zu den Primern steht und es so zu einer Primerinhibition kommt. Zweites ist die Folge der stetig zunehmenden Anzahl von DNA-Kopien bei gleichbleibender Menge an DNA-Polymerase Molekülen.

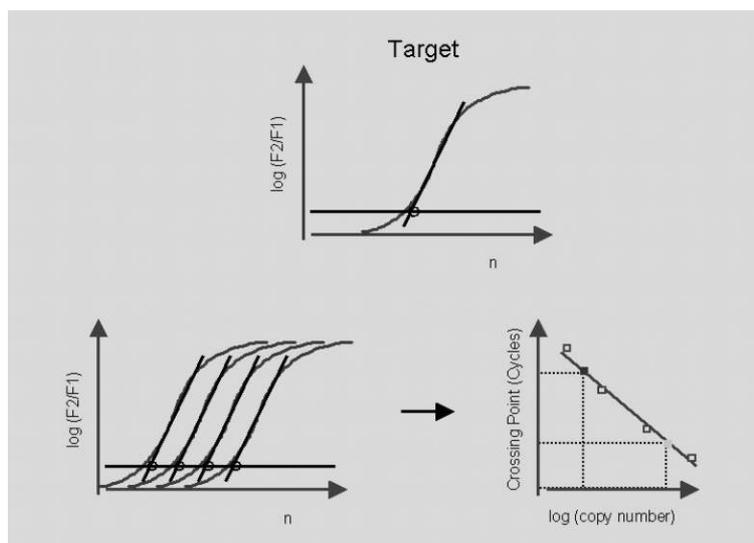
Anhand dieser oben beschriebenen Charakteristika, die bei einem LightCycler-Lauf auftreten, lässt sich unschwer erkennen, dass für quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge des Amplifikats nur die exponentielle Wachstumsphase (respektive der Crossing Point) zu gebrauchen ist.

Bei einer Quantifizierung mittels LightCycler werden nun die Crossing Points der zu untersuchenden Proben mit den Crossing Points einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen verglichen; aus der sich ergebenden Eichgeraden (Regressionsgerade) kann man nun die Konzentration der Probe bestimmen. Für diese Regressionsgerade trifft folgende Gleichung zu:

$$\text{CP} = -(1/\log E) \cdot T_0 + (\log K / \log E)$$

Hierbei beschreibt K die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist;  $T_0$  ist die Ausgangskonzentration; E stellt die Amplifikationseffizienz dar, die Werte von größer gleich 1 und kleiner gleich 2 annehmen kann. Der Wert von 2 entspricht nach einem jeden

Zyklus dem Idealwert, da eine Verdoppelung der Ziel-DNA nun stattgefunden hat. Dies wäre nun die beste Effizienz, die erreicht werden könnte. Würde die Amplifikationseffizienz 1 betragen, so hätte gar keine Amplifikation stattgefunden. Unter Verwendung dieser Gleichung ist es von Bedeutung, dass die Amplifikationseffizienz der Standards und der Proben annähernd gleich sein muss (Rasmussen, 2001).



**Abb. 3:** Methode zur Quantifizierung der Proben im LightCycler ([www.pcr.at](http://www.pcr.at))

### 2.2.2 Herstellung und Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-, Chemokin-, Adapterprotein- und TLR- mRNA mit Hybridisierungssonden (Hybridization Probes)

Die Primer und Sonden wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) bezogen. Für diese Promotionsarbeit wurden folgende Zytokine, Chemokine, Adapterproteine und TLR berücksichtigt: IL-15, RANTES, TLR3, Myd88, IRAK1 und TRAF6. Zuerst wurden alle hinsichtlich ihrer Spezifität in einer LightCycler-PCR getestet (Kap. 2.2.2.2). Danach wurde mit denselben spezifischen Primern und den gleichen Proben eine konventionelle PCR durchgeführt, um so spezifische Amplifikate zu bekommen. Anschließend wurden diese Amplifikate aufgereinigt,

vermessen und in Zehnerpotenzen verdünnt, sodass sie als externe Standards eingesetzt werden konnten.

### **2.2.2.1 Probenmaterial**

Das Probenmaterial wurde im zellbiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Hermann Einsele gewonnen.

50 ml venöses Blut wurde gesunden Spendern entnommen, um daraus PBMCs zu gewinnen: die PBMCs wurden über Ficoll ( Biochrom AG, Berlin) durch Zentrifugation abgetrennt und in 1ml PBS resuspendiert. Die PBMC-Konzentration wurde abgestimmt auf  $1 \times 10^6$ /ml RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum ( Life Technologies, Karlsruhe).

Die Inkubation, die im Anschluss daran erfolgte, betrug 8 Stunden bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und gleichzeitiger Stimulierung durch 1% Phythämagglutinin (PHA) oder durch Lipopolysaccharid (LPS). Nach diesem Schritt erfolgte sofort die RNA-Extraktion aller Proben.

#### **1) RNA Extraktion**

Die gesamte RNA Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen für 5 Minuten bei 5400 rpm abzentrifugiert und der Überstand weggekippt.

Anschließend erfolgte die Extraktion gemäß den Angaben des Herstellers: über ein System von Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz von Pufferlösungen und mehreren Zentrifugationsschritten, unter Verwendung einer Standardzentrifuge, wurde die RNA isoliert:

- Lyse: das Pellet, welches übrig geblieben ist nachdem der Überstand entfernt worden ist, wurde in 350µl RLT-Puffer resuspendiert. Dieser enthält Guanidinothiocyanat, das für die Inaktivierung der RNase verantwortlich ist. Das Zellysate wurde dann direkt auf eine QIAshredder-

Säule gegeben, die in einem 2 ml Sammeltube steht. Für 2 Minuten wurde dann mit 13000 rpm zentrifugiert und anschließend das homogenisierte Material mit 350µl 70%igem Alkohol versetzt und gut durchmischt.

- Binden der RNA: das gesamte Lysat wurde nun auf die RNeasy Mini-Säule gegeben, die sich in einem 2ml Sammeltube befand, und bei 13000 rpm für 15 sec zentrifugiert.
- Waschen: das Waschen dient dazu noch vorhandenes kontaminiertes Material zu entfernen; dazu musste auf die RNeasy-Säule 700µl Puffer RW1 pipettiert und danach bei 13000 rpm für 15 sec zentrifugiert werden. In einem 2. Schritt wurde 500µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und dann für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde dabei nach jedem Waschprozess entfernt.
- Elution: Die Säule wurde nun in ein 1,5ml-Sammeltube gestellt und anschließend Rnase freies Wasser (30-50µl) direkt auf die Membran gegeben. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde für 1 min bei 13000 rpm durchgeführt. War ein Umschreiben der RNA nicht sofort möglich, so wurde die extrahierte RNA bei -70° C eingefroren.

## **2) Reverse Transkription**

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche, Mannheim) durchgeführt.

Vorgehen: Zuerst wurden 8µl der RNA-Probe in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend 2,2µl des OligoDT-Primers dazu gegeben. Das Eppendorfgefäß kam dann für 10 min in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 65° C (Annealing- Anlagerung des Primers an der RNA). Nach dieser Inkubation von 10 min wurde die Probe auf Eis gestellt und der Master-Mix wurde wie folgt vorbereitet:

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

(Lagerung des Master-Mix: stets auf Eis)

Der Master-Mix wurde anschließend kurz gevortext und anschließend zur RNA und dem Primer hinzu pipettiert.

Die zweite Inkubationsperiode (Wasserbad: 42° C) dauerte 50 min; hier erfolgte die Extension der cDNA. Die dritte Inkubationsperiode dauerte nur 5 min (Wasserbad: 90° C) und hatte den Zweck, das Enzym zu denaturieren, sodass es während einer PCR zu keiner Wechselwirkung zwischen Enzym und Reagenzien kommt (Kawasaki, 1990).

Nach Beendigung des Umschreibens erhielt man nun cDNA, die sowohl als Probe für die konventionelle PCR als auch für den LightCycler eingesetzt wurde. Wurde sofort mit der cDNA weitergearbeitet so genügte ihre Lagerung auf Eis; betrug das Zeitintervall zwischen dem Umschreiben und der PCR mehr als zwei Stunden, so mussten die Proben bei -20° C eingefroren werden.

### 2.2.2.2 LightCycler PCR

Zuerst wurden sogenannte Testläufe durchgeführt, mit denen gezeigt wurde, dass auch die Ziel-DNA durch die von Tib Molbiol (Berlin) bezogenen spezifischen Primer (und Sonden) im LightCycler amplifiziert wurden.

#### Das Primer- und Sondendesign:

Die Primer sind so lokalisiert, dass sie innerhalb der Exons zum Liegen kommen. So lassen sich Co-Amplifikate genomischer DNA verhindern. Die Amplifikationslängen der Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterproteingene lag zwischen 197 bp und 314 bp und entsprach so den von Roche (Mannheim) geforderten idealen Längen (< 700 bp). Da nach Anlagerung der Primer an die Ziel-DNA sofort die Neusynthese stattfindet und deshalb die Sequenz für die Sonden maskiert ist, liegen die Schmelzpunkte der Sonden um 15°C höher als die der Primer. Dadurch soll gewährleistet werden, dass die Hybridisierung der Sonden vor den Primern stattfindet.

Folgende Tabelle soll einen Überblick über die verwendeten Primer und Sonden schaffen:

**Tabelle 2: Primer und Sonden**

- 1) F= Forward-Primer; R= Reverse-Primer; A= Antisense; S= Sense
- 2) FL= Fluorescein markierte Sonde; LC= LC RED 640 markierte Sonde
- 3) A= Amplifikationslänge in Basenpaaren

Ziel-mRNA	Oligonukleotide (5'-3' Richtung)	A (bp)
IL-15	F: ATCTTATTCAATCTATgCATATTgATgCTA	227
	R: CCTCACATTCTTTgCATCCAg	
	FL:CCggAgATgCAAgtATTCATgATACAgTAg-fluorescein	
	LC: LCRED640-AATCTgATCATCCTAgCAAACAACAgTTTg	
RANTES	F: CggCACgCCTCgCTgTCATC	314
	R: gCAAgtCAgAAACAggCAAAT	
	FL: CCCgTgCCCACATCAAgtAgTAT-fluorescein	
	LC: LCRED640-CTACACCAgtggCAAgtgCTCCAAC	
TLR3	F: ggAAgtATAATgATATTCCAgtgCAT	294
	R:gCAAgtAgTTCCTAgTCAgC	
	FL: AAgTgCACTgTTAgCCATgAAgtTgC-fluorescein	
	LC: LCRED640-gACTgCAgCCACCTgAAgtTgACT	
MyD88	A: TCCggCggCACCTCTT	202
	S: TgACCCCCTggggCATAT	
	FL: TCCTgCACAACTggATgTCgCT-fluorescein	
	LC: LCRED640-ggCAATAgCAgtgAAgtCATCgAA	
IRAK1	F: gggACACggCAgtAgAAT	241
	R: CCCCTgCCTgTCCTgTTC	
	FL: TCgTCAgAgCCACCgCAgtATTATC-fluorescein	
	LC: LCRED640-TCAACCCTgCCCgACAgAAgtAg	
TRAF6	F: ggCATTTgAAgtATAAAgtAgATCC	197
	R: AggtggCgtgCCAAgtg	
	FL: ATCTAgACTgCCCTACAgCCCCAA-fluorescein	
	LC: LCRED640-CCATgCACATTCAgtTACTTTTggTTgC	

## Das LightCycler-Protokoll

Für den LightCycler wurde ein spezielles PCR- Protokoll verwendet, dass in diesem Labor, im Rahmen einer quantitativen Pilzdiagnostik, etabliert worden war (Löffler et al., 2000). Für diese Arbeit wurden lediglich die Annealing-Temperatur und die Denaturierungszeit modifiziert und neu definiert:

<b>Initialdenaturierung:</b>	9 min bei 95° C	(20° C/ sec)
<b>Amplifikation:</b>		(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)
<b>Cooling:</b>	3 min bei 40° C	(20° C/ sec)

Die Dauer eines kompletten LightCycler-Laufs betrug bei 45 Zyklen 60 Minuten. Für jede PCR im LightCycler-Instrument wurde das *FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit* ( Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die FastStart Taq Polymerase, die sich in diesem Kit befindet, basiert auf dem Prinzip der „Hot Start-Technologie“ und soll so die Vervielfältigung unspezifischer PCR-Produkte minimieren (Birch,1996).

Für die LightCycler-PCR wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsvolumen insgesamt:	20 µl (= 1 Kapillare)
Proben:	2 µl cDNA, ergänzt mit 8 µl H <sub>2</sub> O
Master-Mix:	10 µl

**Tabelle 3:** Pipettierschema für den Master-Mix

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	2,6 µl	-
MgCl <sub>2</sub>	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
FastStartTaq Polymerase+ PCR- Puffer+ dNTP-Mix (10xconc.)	2,0 µl	1x

Die Menge des zu pipettierenden Master-Mix entsprach der einzusetzenden Probenzahl plus zwei. So konnte, falls eine Kapillare zu Bruch gegangen ist, einfach eine neue eingesetzt werden, ohne den Master-Mix komplett neu ansetzen zu müssen.

Bei jedem LightCycler- Lauf wurde stets eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde wie folgt angesetzt: 60 µl des *FastStart Reaction Mix* wurden zum *FastStart Enzym* dazu pipettiert.

Die Primer und Sonden wurden in H<sub>2</sub>O aufgelöst: die Primer wurden in soviel H<sub>2</sub>O aufgelöst, dass eine Endkonzentration von 5 µM vorlag; bei den Sonden genügte eine Endkonzentration von 3 µM. Vor dem ersten Lauf wurden sowohl Primer als auch Sonden kurz gevortext und für 15 min auf Eis gelagert.

Die konstante Lagerung der Taq-Polymerase, Primer und Sonden erfolgte nach dem Ansetzen im Kühlschrank bei 4° C; hier waren sie für etwa 4 Wochen haltbar. Alle anderen Reaktionskomponenten wurden bei -20° C gelagert und waren so für etwa ein Jahr haltbar.

Für einen LightCycler-Lauf wurden nun in die in einem Kühlblock (4° C) sich befindenden Kapillaren 2 µl cDNA und 8 µl H<sub>2</sub>O pipettiert; nach diesem Schritt wurde der Master-Mix hergestellt und jeweils 10 µl von ihm in jede Kapillare gegeben. Die Kapillaren wurden nun verschlossen und ins Karussell eingesetzt, bevor sie für 15 sec bei 13000 rpm zentrifugiert wurden. Nun konnten die Proben ins LightCycler-Instrument gestellt und der Lauf gestartet werden.

#### Validierung der Testläufe:

Ziel der Testläufe war es herauszufinden, ob die Primer und Sonden an der Ziel-DNA spezifisch ansetzen und es so zu einer selektiven PCR kommen kann. Zeigte sich eine gleichmäßige log-Phase über einen breiten Bereich hin, so war der Testlauf erfolgreich und es konnte von einer spezifischen Amplifikation der Ziel-DNA ausgegangen werden. Mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde zusätzlich noch die Spezifität der Primer überprüft. Falls sich doch noch Nebenamplifikate im Gel gezeigt haben, so konnten diese in einem neuen PCR-Lauf z.B. durch Erhöhung der Annealingtemperatur entfernt werden.

#### **2.2.2.3 Herstellungsmöglichkeiten der externen Standards**

Grundvoraussetzung für die absolute Quantifizierung von Proben im LightCycler über externe Standards ist, dass die Sequenz der Ziel-DNA mit der Sequenz der zu verwendenden externen Standards übereinstimmt. Selbstverständlich müssen auch noch die Konzentrationen der einzelnen Standards bekannt sein. In der Literatur sind schon mehrere Methoden der Standardherstellung beschrieben worden. Zum einen gibt es die Möglichkeit cDNA-Plasmid Standards einzusetzen. Vorteil dieser Methode ist, dass die cDNA- Plasmide in sehr großen Mengen hergestellt werden können, sodass der gleiche Standard für sehr viele Läufe verwendet werden kann. Dadurch lassen sich die Interassay-Abweichungen minimieren (Overbergh et al., 2003; Whelan et al., 2003). Des Weiteren können auch in vitro transkribierte RNA-Abschnitte, so

genannte cRNA-Standards, zur absoluten Quantifizierung eingesetzt werden (Fronhoffs et al, 2002).

Als Alternative dazu kann auch eine mittels konventioneller PCR gewonnene und anschließend aufgereinigte Ziel-dsDNA als Standard eingesetzt werden (Yin et al., 2001). Diese Methode der Standardherstellung kam in dieser Arbeit zum Tragen. Nachdem die spezifischen Primer und Sonden in einem LightCycler-Testlauf überprüft wurden, wurde eine konventionelle PCR mit der Ziel-DNA durchgeführt und anschließend die aufgereinigten Amplifikate photometrisch vermessen und anhand der dsDNA-Konzentration in der Stammlösung entsprechend die Verdünnungsreihe hergestellt. Diese Verdünnungsreihe der Ziel-DNA konnte danach im LightCycler als externer Standard eingesetzt werden.

#### •Gewinnung der spezifischen Amplifikate über die konventionelle PCR

Im *GeneAmp 2400 (Perkin Elmer, Drei Eich)* wurde die konventionelle PCR mittels des *PCR Core Kit* und den spezifischen Primern, die auch schon im LightCycler-Testlauf zum Einsatz kamen, durchgeführt. Die Proben mit der gewünschten Ziel-DNA kamen zum Einsatz, bei denen anhand ihres Crossing Points auf eine größere Menge an Zytokin-cDNA geschlossen werden konnte. Die gewonnenen Amplifikate wurden nun gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht. Gleichzeitig konnte so überprüft werden, ob nicht noch Nebenprodukte mit amplifiziert wurden. Trat dies auf, so konnte über die Modifizierung der Annealingtemperatur versucht werden, die Nebenamplifikate zu entfernen.

Es konnte so ein PCR-Protokoll erstellt werden, dass für alle Zytokine, Chemokine, Toll-like Rezeptoren und Adapterproteine Verwendung fand. Nur für die Adapterproteine MyD88, TRAF6 und IRAK1 musste die Annealingtemperatur erhöht werden.

mRNA-Target	Initialdenaturierung	Zyklus			Extension	Zykluszahl
		Denaturierung	Annealing	Extension		
IL-15	95°C, 5 min	95°C, 45 sec	54°C, 45 sec	72°C, 60 sec	72°C, 10 min	36
RANTES						
TLR-3						
Myd88						
IRAK1						
TRAF6						

**Tabelle 4:** Protokoll der konventionellen PCR  
Die Annealing-Temperatur wurde für MyD88, IRAK1 und TRAF6 von 54° C auf 60° C erhöht.

Pipettierschema für die konventionelle PCR:

Reaktionsvolumen insgesamt: 50 µl  
 Proben: 2 µl cDNA  
 Master-Mix: 48 µl

Reagenz	Volumen
H <sub>2</sub> O	40,7 µl
PCR Puffer, 10xkonz. (MgCl <sub>2</sub> , KCl)	5,0 µl
DNTP	1,0 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl

Der Master-Mix und die Proben wurden zusammen in die 0,2 ml PCR-Tubes pipettiert; eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt; das *PCRCore Kit* wurde bei -20 ° C gelagert.

#### •Die Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einem 2%igen TAE Agarosegel für ca. 60 min bei einer angelegten Spannung von 100 Volt durchgeführt. Als Größenmarker diente der *READY LOAD 100 bp DNA Ladder* von *Life Technologies*. 10 µl von dem Amplifikat und 2,5 µl des *Blue Juice* Puffers wurden gemeinsam in jede Tasche des ausgehärteten Gels pipettiert. Die Gelkammern waren durch 1x *TAE Puffer* (40mM Tris-Acetat; pH 7,5; 2mM EDTA; *Life Technologies*) gepuffert. Die Zugabe von *GelStar* (Ethidiumbromid) bedingte, dass das Gel mit den spezifischen Banden direkt unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert werden konnten. Die Banden des Amplifikats konnten auf dem Bild nun abgelesen werden.

Die spezifische Amplifikatlänge konnte über ein Internetprogramm des *National Center of Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) errechnet werden. Anhand des sich im Gel befindenden Größenmarkers konnte nun verglichen werden, ob die theoretische mit der praktischen bp-Länge des Amplifikats übereinstimmt. War dies der Fall, dann war die Spezifität der Primer und so des Amplifikats bewiesen. Waren jedoch noch weitere Banden auf dem abfotografierten Gel zu erkennen, so musste die konventionelle PCR wiederholt und z.B. durch Erhöhung der Annealing-Temperatur versucht werden, die Nebenamplifikate zu entfernen.

#### •Das Aufreinigen

Die durch die konventionelle PCR gewonnenen und mittels Gelelektrophorese auf Spezifität überprüften Amplifikate von IL-15, RANTES, TLR-3, MyD88, IRAK1 und TRAF6 konnten nun mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt werden. So wurden 40 µl des PCR-Produkts durch DNA-Trennsäulen aufgereinigt.

Das Aufreinigungsprotokoll:

1. Binden der DNA: 200  $\mu$ l *PB Puffer* wurden zu den 40  $\mu$ l des PCR-Produkts dazu pipettiert. Dieses Gemisch gab man auf eine QIAquick Trennsäule und zentrifugierte diese bei 13000 rpm für 1 min. Der Überstand wurde verworfen und die Säule zurück in die Tube gestellt.
2. Waschen: nachdem man 0,75 ml *PE Puffer* auf die Trennsäule gegeben hatte, wurde diese für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem der Überstand verworfen wurde.
3. Elution der DNA: die *QIAquick* Trennsäule wurde in eine neue Sammeltube gegeben, bevor 30  $\mu$ l des *EB Puffers* mittig auf die Säule pipettiert wurden. Nach einer Warteperiode von 1 min konnte das Gefäß bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert werden.

#### • Das Vermessen

Im Photometer wurde danach die Konzentration an dsDNA im Eluatpuffer bestimmt. Pro Messvorgang benötigte man 7  $\mu$ l der Probe. Davor legte man jedoch den Leerwert mit einer 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O Probe fest.

Die Extinktion der DNA wurde bei 260 nm gemessen, die der Proteine bei 280 nm; bildete man den Quotienten beider Werte und das Ergebnis betrug 1,7-1,9, so konnte dies als ideal betrachtet werden und sprach für die Reinheit der DNA.

#### • Die Berechnung der Kopienzahl

Die Konzentration der dsDNA des gewünschten Amplifikats im Eluatpuffer benötigte man zur Berechnung der exakten Kopienzahl pro  $\mu$ l des Amplifikats. Mit nachfolgenden Formeln konnte dies durchgeführt werden (Overbergh et al., 2003):

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

$$2) K = C (\mu\text{g/ml}) \cdot x (\text{Kopien/ } \mu\text{g})$$

Am Beispiel des IL-15-Standards werden die nun folgenden Rechenschritte exemplarisch dargelegt:

Die Amplifikatlänge von IL-15 beträgt: 227 bp

Daraus folgt nach obigen Formeln:

$$\begin{aligned} 227 \text{ bp dsDNA} &= 4,41 \cdot 9,1 \cdot 10^{11} \text{ Kopien/ } \mu\text{g} \\ X &= \underline{40,13 \cdot 10^{11} \text{ Kopien/ } \mu\text{g}} \end{aligned}$$

Die Konzentration (C), die für das Amplifikat (IL-15) berechnet wurde hatte folgenden Wert:

$$C = 17,65 \mu\text{g/ml}$$

Daraus lässt sich folgende Kopienzahl (K) berechnen:

$$\begin{aligned} K &= C (\mu\text{g/ml}) \cdot x (\text{Kopien}/\mu\text{g}) \\ &= 17,65 \mu\text{g/ml} \cdot 40,13 \cdot 10^{11} \text{ Kopien}/\mu\text{g} \\ &= 7,08 \cdot 10^{13} \text{ Kopien/ml} \\ &= \underline{7,08 \cdot 10^{13} \text{ Kopien}/\mu\text{l}} \end{aligned}$$

Diese Vorgehensweise wurde ebenfalls beibehalten für RANTES, TLR-3, MyD88, IRAK1 und TRAF6. So konnte für jedes spezifisches Amplifikat die exakte Kopienzahl/ $\mu\text{l}$  berechnet werden; anhand dieser Daten wurden die externen Standards entsprechend angesetzt; der Verdünnungsbereich ging bei allen Amplifikaten von  $10^9$  bis  $10^0$ .

#### **2.2.2.4 Verwendung der externen Standards für die LightCycler-PCR**

Nachdem die Standardverdünnungsreihen hergestellt waren, konnten nun die Standards und zusätzlich Proben gleicher Ziel-DNA, jedoch unbekannter Kopienzahl in den LightCycler eingesetzt werden. Die Software stellte anhand der Crossing Points der unterschiedlichen Standardkurven eine Eichgerade auf, in die die Crossing Points der unbekanntenen Proben eingesetzt und die dazu korrelierende Kopienzahl einfach abgelesen wurde.

Auf diese Weise konnte z.B. nach unterschiedlicher Stimulation von PBMCs festgestellt werden, ob durch diese Stimuli, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, eine Hoch- oder Herunterregulierung spezifischer Zytokin-mRNA stattgefunden hat.

Bei allen LightCycler-Läufen wurde stets eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mitgeführt.

Durch den mehrmaligen Gebrauch dieser Standardverdünnungsreihen konnten neben der Linearität auch noch die Reproduzierbarkeit (Intra- und Interassay), die Amplifikationseffizienz und die Sensitivität überprüft werden. Exemplarisch wurde außerdem noch im Falle des Adapterproteins TRAF6 die Spezifität der Primer und Sonden nach Einsatz der Standards in einem LightCycler-Lauf mittels Gelelektrophorese überprüft.

Es wurden mit den Standardverdünnungsreihen von IL-15, RANTES und IRAK1 jeweils 5 LightCycler-Läufe durchgeführt. Mit den Standards von TLR3 und TRAF6 je 4; bei MyD88 lag die Anzahl der Läufe bei 3.

### 3. Ergebnisse

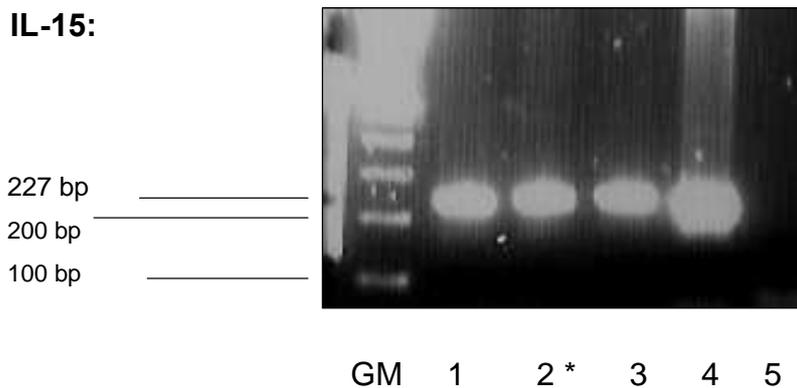
#### 3.1 Absolute Quantifizierung von Zytokin-mRNA mittels LightCycler

##### 3.1.1 Die Spezifität der Primer und Sonden

Zuerst wurde die mRNA der Proben in cDNA umgeschrieben; danach wurden die Primer und Sonden, zusammen mit den Proben, in den LightCycler eingesetzt, um so ihre Spezifität überprüfen zu können. Hierbei stellte sich stets eine gleichmäßige log-Phase dar.

Nach der konventionellen PCR und einmal exemplarisch nach Einsatz einer Verdünnungsreihe in den LightCycler wurde die Spezifität der Amplifikate mittels Gelelektrophorese überprüft.

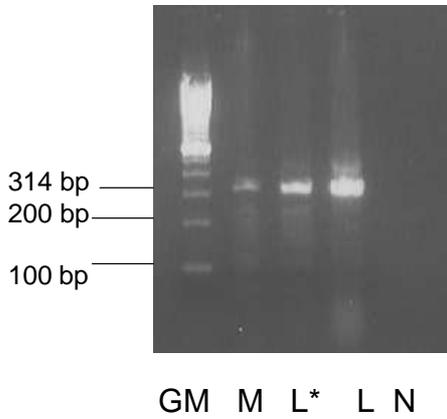
##### IL-15:



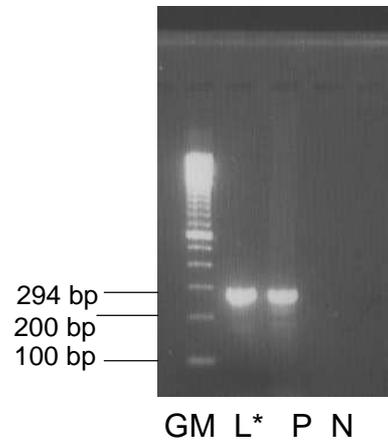
##### Abb. 4:

Gelelektrophorese der spezifischen Amplifikate von IL-15 nach konventioneller PCR. GM= DNA-Größenmarker (100bp); 1=Medium (unstimulierte PBMCs); 2=LPS stimulierte PBMCs; 3= PHA stimulierte PBMCs; 4= PHA stimul. PBMCs; 5= H<sub>2</sub>O; das mit \* markierte Amplifikat wurde aufgereinigt, vermessen und dann als externer Standard im LightCycler eingesetzt.

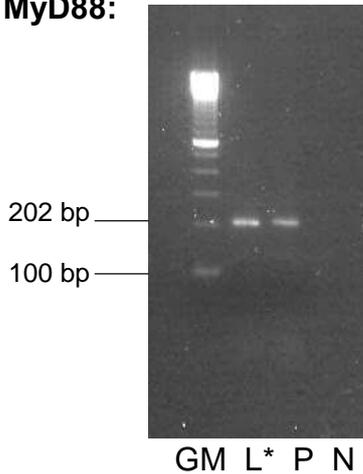
**RANTES:**



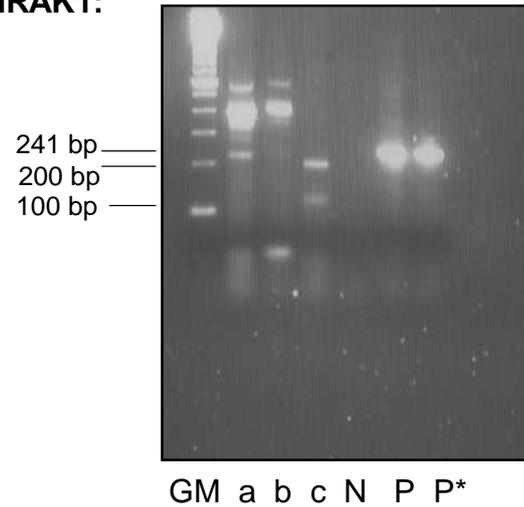
**TLR3:**



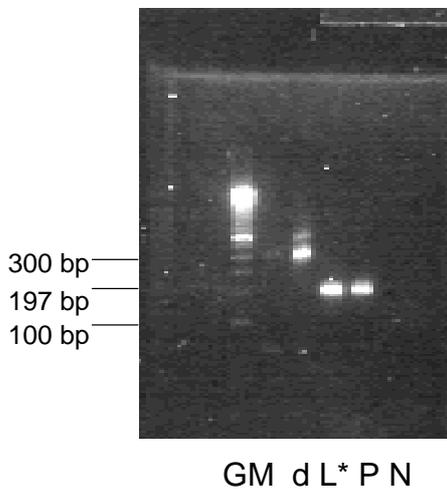
**MyD88:**



**IRAK1:**

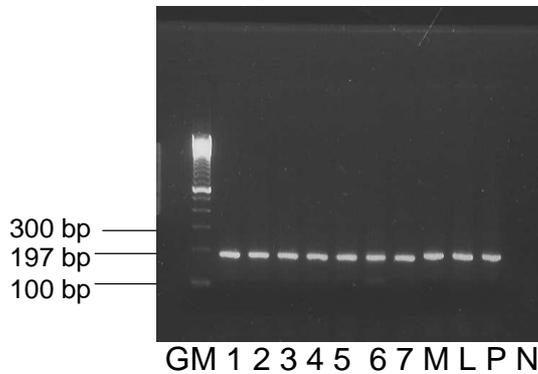


**TRAF6:**



**Abb. 5:** Gelelektrophoresen der spezifischen Amplifikate; GM= Größenmarker; L= cDNA von LPS stimulierten Zellen; P= cDNA von PHA stimulierten Zellen; die mit einem \* gekennzeichneten Proben wurden aufgereinigt, vermessen und zur Herstellung des externen Standards verwendet; a, b und d sind MyD88-Proben, die neben den spezifischen auch unspezifische Amplifikate enthalten; in der Bande der Probe d sind nur Nebenamplifikate zu erkennen; N= H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle).

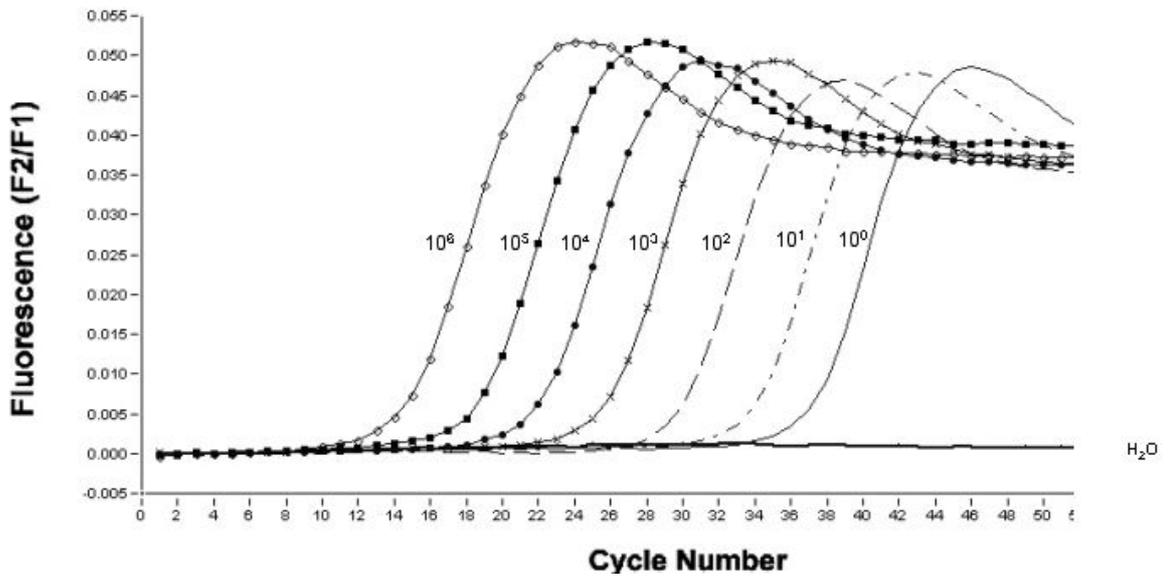
## TRAF6



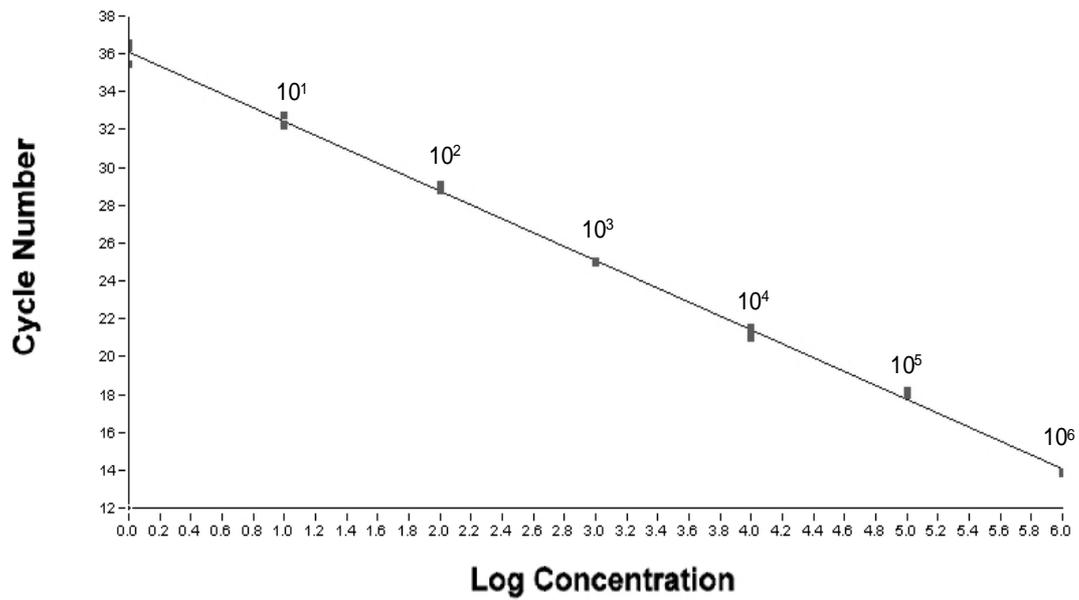
**Abb. 6:** Gelelektrophorese nach Einsatz in den LightCycler am Beispiel der TRAF6-Standardverdünnungsreihe ( $10^7$ - $10^1$ ) und 3 Proben; M= unstimulierte PBMCs; L= mit LPS stimulierte PBMCs; P= mit PHA stimulierte PBMCs; N= Negativkontrolle ( $H_2O$ ); GM= Größenmarker (100 bp);  $10^7=1$ ;  $10^6=2$ ;  $10^5=3$ ;  $10^4=4$ ;  $10^3=5$ ;  $10^2=6$ ;  $10^1=7$ ; für jede Probe ist die spezifische Bande zu erkennen; es hat keine Coamplifikation stattgefunden

### 3.1.2 Linearität

Der lineare Korrelationskoeffizient  $r$  wurde für jede Standardkurve von der LightCycler Software angegeben. Hierbei zeigte sich für jede Standardkurve der lineare Korrelationskoeffizient von  $r = -1$ . Die folgende Abbildung zeigt den originalen LightCycler-Ausdruck für die TLR3-Verdünnungsreihe



**Abb. 7:** TLR3-Standardverdünnsreihe ( $10^6$ - $10^0$  Kopien/ $10\mu\text{l}$ ) und Negativkontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ )



**Abb. 8:** Regressionsgerade des TLR3-Standards;  $r=-1$

### 3.1.3 Die Sensitivität

Unter der Sensitivität des Assays versteht man die kleinste Konzentration der Standardverdünnungsreihen, die unter den LightCycler-PCR-Bedingungen amplifiziert wird. Die unterste Detektionsgrenze lag für die IL-15- und RANTES-Standards bei  $10^1$ , für die TLR3-, TRAF6- und IRAK1-Standards bei  $10^0$  und für den MyD88-Standard bei  $10^2$ .

### 3.1.4 Die Amplifikationseffizienz

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

Eine theoretisch optimale Amplifikationseffizienz ist  $E=2$ , was der Verdoppelung der DNA mit jedem PCR-Zyklus entspricht.

Die Amplifikationseffizienz der Standards von IL-15, RANTES, TLR3, MyD88, IRAK1 und TRAF6:

Standardverdünnungsreihe	E	M	s	n
IL-15	1,84	1,84	0,057	5
RANTES	1,99	1,98	0,018	5
TLR3	1,87	1,86	0,039	4
MyD88	1,62	1,60	0,053	3
IRAK1	1,86	1,84	0,058	5
TRAF6	1,93	1,90	0,083	4

**Tabelle 5:** E=Mittelwerte der Amplifikationseffizienzen der Standardverdünnungsreihe; M=Median der Effizienzen; s=Standardabweichung vom Mittelwert

### 3.1.5 Die Reproduzierbarkeit der externen Standards im LightCycler

Hierbei wurde die Reproduzierbarkeit der hergestellten externen Standards zum einen zwischen einer bestimmten Anzahl n von PCR-Läufen (Inter-Assay Reproduzierbarkeit) und durch dreifach Einsatz des Standards in einem PCR-Lauf (Intra-Assay Reproduzierbarkeit) bestimmt. Anhand der gemessenen Crossing Points ermittelte die LightCycler Software die absolute Kopienzahl der einzelnen Standards, die dann für die Berechnung der Reproduzierbarkeit herangezogen werden konnte.

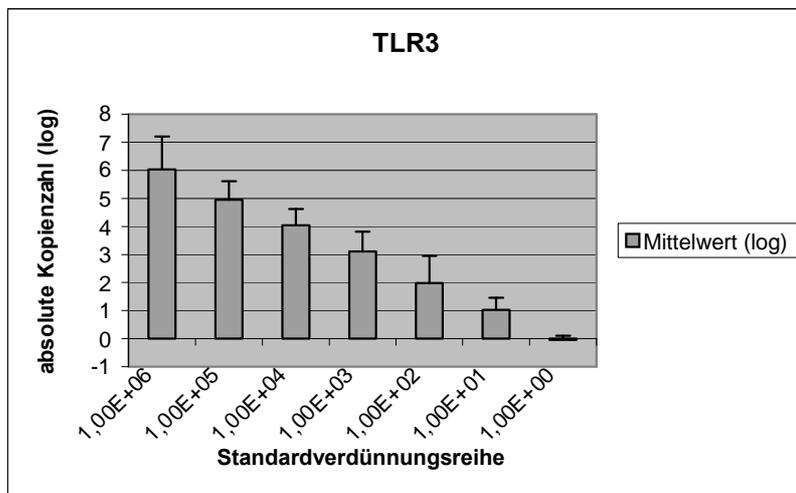
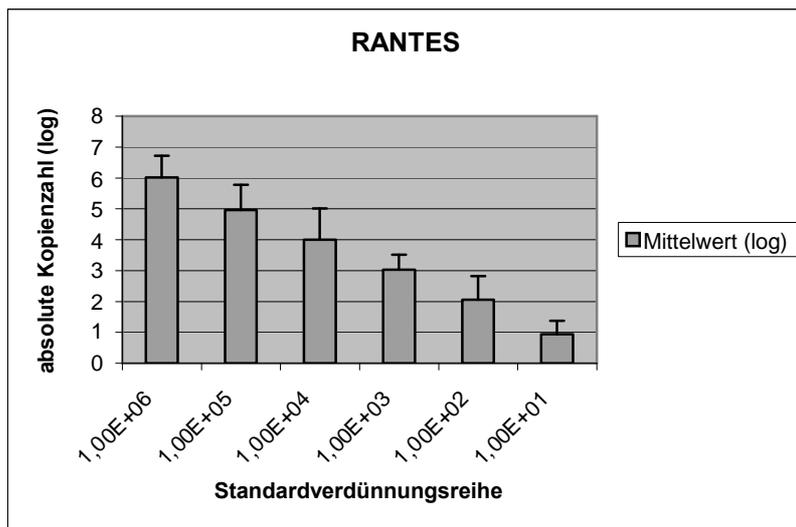
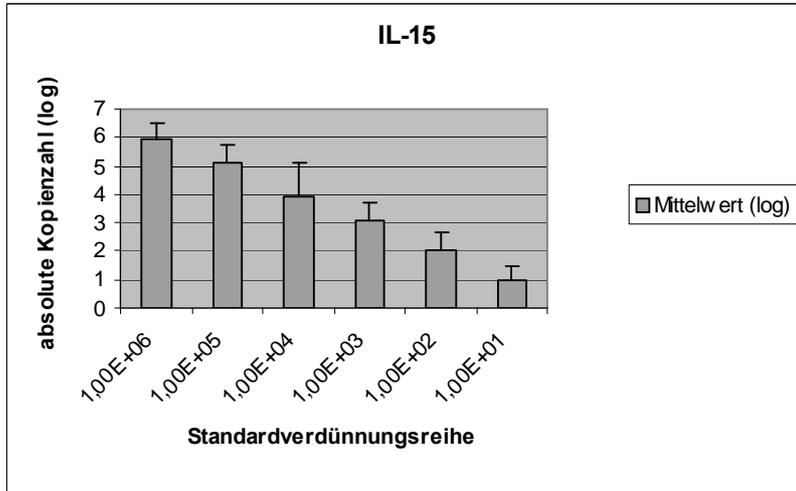
#### 3.1.5.1 Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit

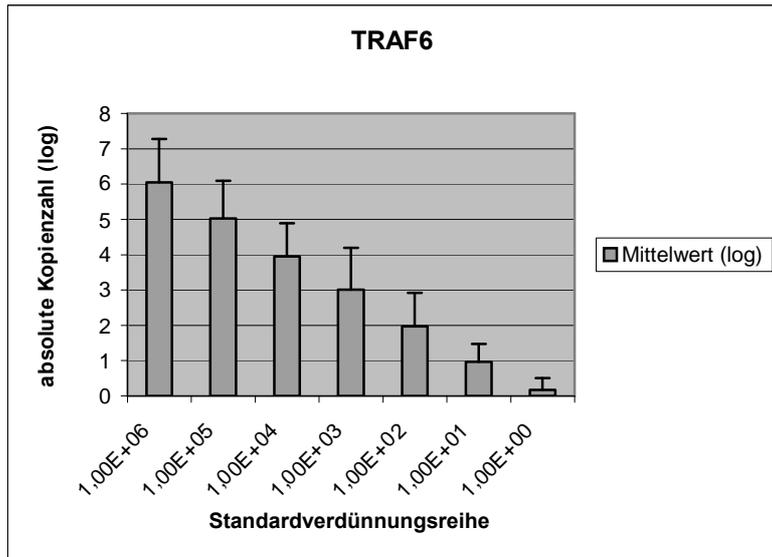
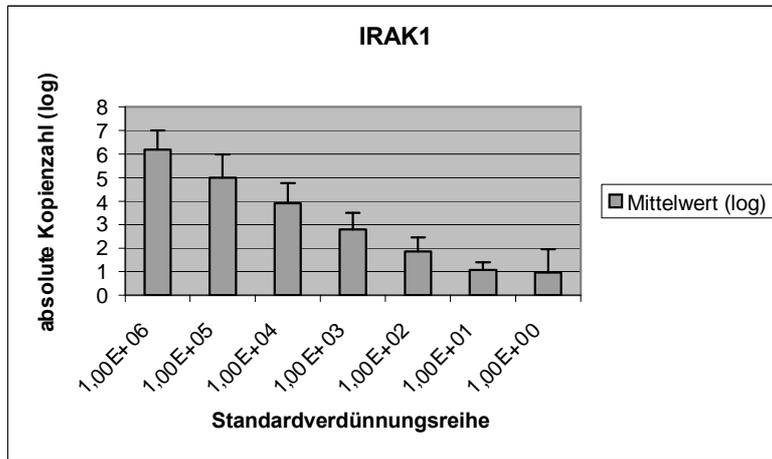
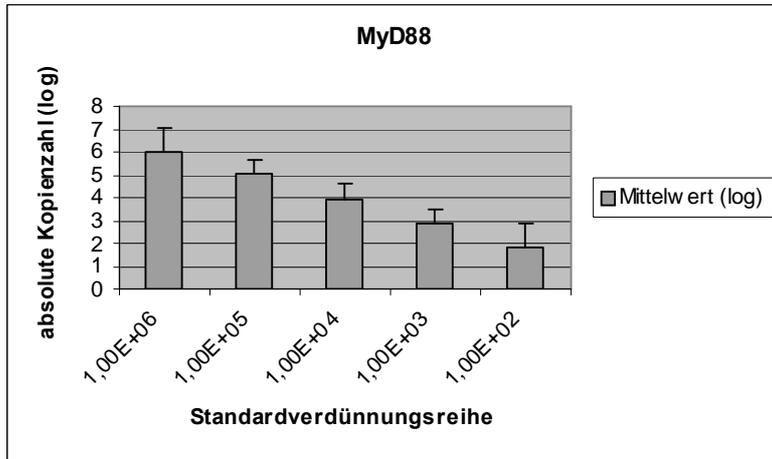
Hierbei wurde der Variationskoeffizient  $CV_{conc.}$  der absoluten Kopienzahlen bestimmt (Tabelle), sowie die mittleren Kopienzahlen und die Standardabweichung für die jeweilige Verdünnung berechnet (Abbildung).

	Standardverdünnungsreihe						
	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^0$
IL-15 (n=5)	29%	24%	7%	27%	23%	32%	-
RANTES (n=5)	20%	15%	10%	33%	17%	38%	-
TLR3 (n=4)	7%	22%	27%	20%	11%	37%	72%
MyD88 (n=3)	9%	25%	23%	24%	9%	-	-
IRAK1 (n=5)	15%	10%	14%	19%	24%	46%	98%
TRAF6 (n=4)	6%	9%	12%	7%	11%	31%	46%

**Tabelle 6:** Variationskoeffizient  $CV_{conc.}$  (%) der absoluten Kopienzahlen für die einzelnen Verdünnungen ( $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l) der Standards in n LightCycler-Läufen.

**Abb. 9:** Bestimmung der Inter-Assay-Reproduzierbarkeit der Standards nach Einsatz der Verdünnungsreihen ( $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l) in n LightCycler-Läufen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der absoluten Kopienzahlen der jeweiligen Verdünnung.





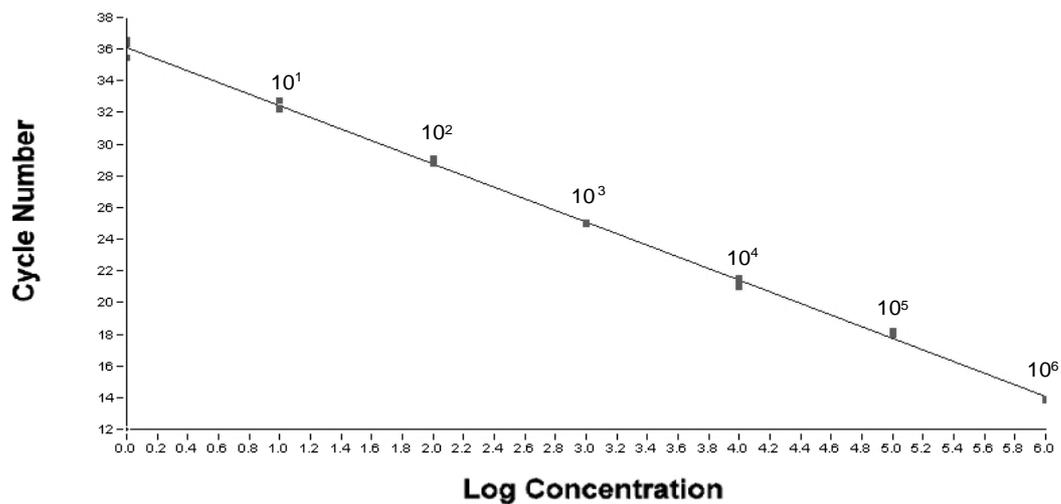
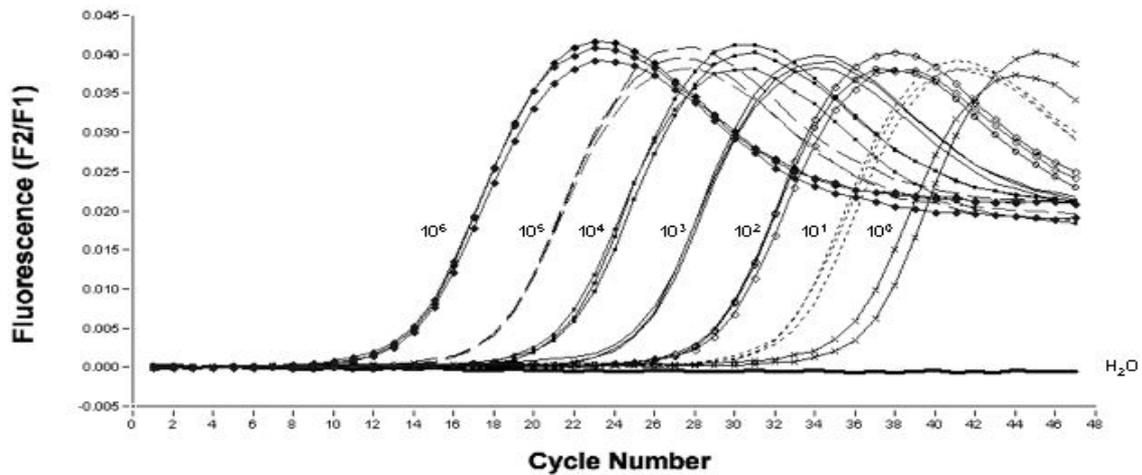
### 3.1.5.2 Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde für die Standardverdünnungsreihen von TLR3 und TRAF6 überprüft; hierbei wurde die jeweilige Verdünnungsreihe dreifach in einen LightCycler-Lauf eingesetzt; der Konzentrationsbereich lag bei  $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l. Des Weiteren wurde auch hier der Variationskoeffizient  $CV_{\text{conc.}}$  der absoluten Kopienzahlen der unterschiedlichen Verdünnungen berechnet.

Variationskoeffizient $CV_{\text{conc.}}$ (%)							
	Standardverdünnungsreihe						
	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^0$
TLR3	2,6%	8,4%	19,1%	2,0%	11,4%	17,5%	38,7%
TRAF6	0,5%	7,4%	3,2%	4,7%	13,4%	63,7%	52,9%

**Tabelle 7:** Variationskoeffizient  $CV_{\text{conc.}}$  der absoluten Kopienzahlen für die Verdünnungsreihen von TLR3 und TRAF6 (Verdünnungsintervall:  $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l) nach dreimaligem Einsatz der Verdünnungsreihen in den LightCycler.

**Abb. 10** :Intra-Assay-Reproduzierbarkeit am Beispiel des TLR3-Standards; Einsatz der Verdünnungsreihe (n=3) ( $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l) und der Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) in den LightCycler



**Abb. 11** : Regressiondgerade des TLR3-Standards nach dreimaligem Einsatz in den LightCycler;  $r=-1,00$

### 3.2 Expression der Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs

Hierbei wurde im LightCycler untersucht, ob sich nach Stimulation der PBMCs mit LPS oder PHA der Expressionslevel der untersuchten Gene (IL-15, RANTES, TLR3, MyD88, IRAK1 und TRAF6) im Vergleich zu einer unstimulierten Probe verändert hat. Die Stimulationsdauer betrug 8 h.

Es wurde folgendes ermittelt:

**Tabelle 8:** Mittelwerte der absoluten Kopienzahlen und Crossing Points (CP) von stimulierten und unstimulierten Proben

#### **IL-15:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$1,7 \times 10^3$	30,22
LPS	$2,6 \times 10^3$	29,62
PHA	$1,1 \times 10^3$	31,38

#### **RANTES:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$1,2 \times 10^3$	26,03
LPS	$2,0 \times 10^2$	28,75
PHA	$2,70 \times 10^4$	21,55

#### **TLR3:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$2,0 \times 10^1$	32,23
LPS	$5,0 \times 10^1$	31,07
PHA	$7,0 \times 10^0$	34,21

**Fortsetzung der Tabelle 8:**

**MyD88:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$9 \times 10^1$	42,06
LPS	$1,2 \times 10^3$	36,83
PHA	$9,0 \times 10^2$	37,84

**IRAK1:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$1,3 \times 10^3$	28,30
LPS	$8,0 \times 10^3$	25,71
PHA	$2,4 \times 10^3$	27,73

**TRAF6:**

	Kopien	CP
unstimuliert	$5,0 \times 10^2$	28,24
LPS	$9,0 \times 10^2$	27,25
PHA	$5,0 \times 10^2$	28,19

## 4. Diskussion

### 4.1 Die real-time RT-PCR bei der Detektion und Quantifizierung spezifischer mRNA

Die real-time RT-PCR stellt eine Methode dar, mit der exakt und zuverlässig spezifische mRNA bzw. cDNA detektiert und quantifiziert werden kann. Durch den Einsatz spezifischer Primer und Sonden wird der qualitative Nachweis der Ziel- mRNA bzw. cDNA möglich. Dies kann durchgeführt werden mit Hybridisierungssonden (sequenzspezifische Oligonukleotide), TaqMan Probes, Molecular Beacons oder DNA interkalierende Farbstoffe. Bei dieser Arbeit kamen nur spezifische Hybridisierungssonden zum Einsatz (siehe Kapitel 2.2.1.1).

Die absoluten Quantifizierungen wurden anhand von gegebenen Kalibrierungskurven durchgeführt, die auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten basierten. Ebenso können zur absoluten Quantifizierung Verdünnungsreihen von Plasmid DNA, *in vitro* transkribierte RNA, synthetisierter DNA oder RNA Oligomere verwendet werden (Pfaffl et al., 2001). Bei jeder quantitativen RT-PCR können Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA, sowie Unterschiede in der reversen Transkription oder in den PCR-Effizienzen zu erheblichen Variationen der Ergebnisse und damit zu Fehlinterpretationen der Expressionslevel führen. Hierbei wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben diese Variationen zu korrigieren: so kann die ermittelte Kopienzahl des Ziel-Gens relativ zur Zellzahl oder zur Masse der Gesamt-RNA ausgedrückt werden. Bei diesen Methoden werden weder PCR- noch RT-Effizienz berücksichtigt (Vandesompele et al., 2002).

Bei der so genannten relativen Quantifizierung wird dagegen die Genexpression des Zielgens in Relation zu einem nicht regulierten „Housekeeping Gen“ gesetzt; dieser Vorgang wird als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet (Rasmussen, 2001). Vor der Normalisierung mit einem Housekeeping Gen muss selbstverständlich überprüft und sichergestellt werden, dass seine Expression unter den gegebenen

experimentellen Bedingungen auch gleich bleibt. Die relative Quantifizierung kann zu dem noch optimiert werden, indem man die unterschiedlichen real-time PCR Effizienzen mitberücksichtigt. Diese Methode wird dann als effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels real-time RT-PCR bezeichnet und stellt im Moment die genaueste Form der mRNA- bzw. cDNA- Quantifizierung dar (Pfaffl, 2001).

In dieser Arbeit wurde auf eine Normalisierung der Expressionsergebnisse durch ein Housekeeping Gen verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass es bei starken Stimuli wie LPS oder PHA zu keinerlei Fehlinterpretationen der Expressionsergebnisse bei nicht durchgeführter Normalisierung gekommen ist (Swatoch, 2003).

#### **4.2 Absolute Quantifizierung der cDNA-Expression über externe Standards und Hybridisierungssonden**

Ein Teil dieser Arbeit war es für das untersuchte Zytokin IL-15, das Chemokin RANTES, den Toll-like Rezeptor TLR-3 und die Adapterproteine MyD88, TRAF6 und IRAK1 externe Standards mittels spezifischer PCR-Produkte herzustellen; die Standards wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer Spezifität, Sensitivität, Amplifikationseffizienz, sowie Intra- und Inter-Reproduzierbarkeit überprüft.

Anhand dieser Standards war es möglich den Ziel-cDNA Gehalt von stimulierten (LPS und PHA) und unstimulierten PBMCs zu bestimmen und quantitativ miteinander zu vergleichen.

#### **4.2.1 Spezifität**

Für das Zytokin, Chemokin, den Toll-like Rezeptor und die Adapterproteine wurden jeweils spezifische Primer-Paare eingesetzt. Durch Gelelektrophorese wurde überprüft, ob es zu einer Co-Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte gekommen ist. Trat dies auf wie im Falle von MyD88, TRAF6 und IRAK1, so wurde die konventionelle PCR mit einer höheren Annealing-Temperatur durchgeführt, um so die unspezifischen PCR-Produkte zu entfernen. Nach einem LightCycler Lauf wurde exemplarisch für die PCR-Produkte der Standardverdünnungsreihe von TRAF6 und für die zu untersuchenden Proben eine Gelelektrophorese durchgeführt, wo eindeutig die Spezifität der verwendeten Primer gezeigt werden konnte.

Durch die Verwendung von sequenzspezifischen Hybridisierungssonden konnte weiterhin eine hohe Spezifität gewährleistet werden, denn Hybridisierungssonden zeigen eine weitaus höhere Spezifität als im Gegensatz dazu der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Wittwer et al., 1997b). Nachteil dieses Fluoreszenzfarbstoffes ist es, dass er an jede dsDNA bindet, so dass zur Prüfung der Spezifität der PCR-Produkte zusätzlich noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden muss (Ririe et al., 1997).

#### **4.2.2 Sensitivität**

Unter der Sensitivität des Assays versteht man die kleinste Konzentration der Standardverdünnungsreihen, die unter den gegebenen LightCycler Bedingungen amplifiziert wird.

Bei den Standardverdünnungsreihen konnten unterschiedliche Detektionslimits erreicht werden; die unterste Detektionsgrenze lag für den MyD88-Standard bei  $10^2$ , für IL-15 und RANTES bei  $10^1$  und für die Standardverdünnungsreihen von TLR3, TRAF6 und IRAK1 bei  $10^0$ . Durch diese externen Standards war so ein sehr großer Detektionsbereich von bis zu 10 log-Einheiten ( $10^9$ - $10^0$ ) möglich, so dass Expressionslevel von Zytokinen, Chemokinen, Toll-like Rezeptoren und

Adapterproteinen in stimulierten und unstimulierten Zellen ohne weiteres bestimmt und miteinander verglichen werden können.

Während bei manchen Autoren die Sensitivität der Assays nur bei größer gleich  $10^3$  Kopien lag ( Stordeur et al., 2002; Hein et al.,2001), so konnten Kühne et al. (2002) auch ein unteres Detektionslimit von  $10^0$  Kopien bei der Quantifizierung von humanen IL-4, IL-4R, IFN- $\gamma$  und IFN- $\beta$  im LightCycler unter Verwendung von Hybridisierungssonden erreichen.

#### **4.2.3 Linearität**

Es konnte in allen LightCycler-Läufen eine hohe Linearität gezeigt werden. Die Steigung der Regressionsgerade in allen Läufen zeigte einen Wert von  $r=1$ . Dies zeigt deutlich, dass über einen sehr großen Bereich von bis zu sechs Zehnerpotenzen eine gleichmäßige und konstante Quantifizierung stets stattgefunden hat. Daraus lässt sich schließen, dass mit diesem LightCycler Protokoll sowohl in Bereichen großer als auch geringer Kopienzahlen eine konstante Quantifizierung zu erreichen ist. Gerade bei der Untersuchung von Zytokinen mit Proben sehr geringer als auch sehr hoher Konzentration ist es wichtig durch gleichmäßige Quantifizierungen gesicherte Ergebnisse zu erlangen, so dass auch exakte Aussagen über Expressionsänderungen gemacht werden können.

#### **4.2.4 Amplifikationseffizienz**

Die Amplifikationseffizienzen der unterschiedlichen Standardverdünnungsreihen wurden über ihren Einsatz in die LightCycler PCR bestimmt. Die Effizienz errechnete sich nach folgender Formel:  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  (Rasmussen, 2001).

Die mittleren Amplifikationseffizienzen (IL-15:  $E=1,84$ ; RANTES:  $E=1,99$ ; TLR3:  $E=1,87$ ; MyD88:  $E=1,62$ ; IRAK1:  $E=1,86$ ; TRAF6:  $E=1,93$ ) lagen, mit Ausnahme von MyD88, sehr nahe am theoretisch maximal möglichen Wert von  $E=2$  (Standardabweichung:  $0,018 < s < 0,083$ ). Mit den hohen Effizienzen lässt sich so auch die erzielte hohe Sensitivität der Assays erklären.

Errechnet man die Effizienz nach obiger Formel, so ergeben sich 2 Nachteile: zum einen werden bei dieser Formel die probenindividuellen Unterschiede nicht mitberücksichtigt, zum anderen überschätzt sie auch die real-time PCR, so dass häufig Effizienzen von 2,0-2,2 errechnet werden, was theoretisch nicht zu erklären ist. Bei der momentan innovativsten Methode wird die Effizienz anhand eines exponentiellen Modells berechnet, was der Kinetik der PCR am ehesten entspricht (Tichopad et al, 2003 und Pfaffl, 2004).

#### **4.2.5 Reproduzierbarkeit**

##### **4.2.5.1 Inter-Assay Reproduzierbarkeit**

Durch einen mehrmaligen Einsatz der einzelnen Standardverdünnungsreihen in den LightCycler, wurde die Inter-Assay Reproduzierbarkeit ermittelt (für IL-15 und RANTES lag der Konzentrationsbereich bei  $10^6$ - $10^1$  Kopien/10 $\mu$ l; für MyD88 bei  $10^6$ - $10^2$  Kopien/10 $\mu$ l und für TLR3, IRAK1 und TRAF6 bei  $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l).

Betrachtet man nun den Variationskoeffizienten  $CV_{conc.}$  der von der LightCycler determinierten Kopienzahlen, so wird deutlich, dass sich die Reproduzierbarkeit zu den niedrigen Konzentrationen ( $10^1$  und  $10^0$ ) hin deutlich verschlechtert. Während  $CV_{conc.}$  Werte von 6-33% für den Konzentrationsbereich von  $10^6$ - $10^2$  Kopien/10 $\mu$ l annimmt, so nimmt  $CV_{conc.}$  für den Konzentrationsbereich von  $10^1$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l Werte von 31-98% an. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass die Standards mit geringeren Kopienzahlen einem länger dem exponentiellen Prozess unterliegen, bevor eine ausreichend hohe Menge an detektierbaren PCR-Produkten vorliegt. Geringe Unterschiede in den PCR-Effizienzen oder geringe Unterschiede in der initial eingesetzten Konzentration durch Pipettierungenauigkeiten, die gerade bei Standards mit geringer

Konzentration auftreten, führen zu der schlechten Inter-Assay Reproduzierbarkeit (Rasmussen, 2001).

#### **4.2.5.2 Intra- Assay Reproduzierbarkeit**

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde für die Standardverdünnungsreihen von TLR3 und TRAF6 durchgeführt und überprüft. Der Konzentrationsbereich lag bei beiden Standards bei  $10^6$ - $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l. Für Konzentrationen von  $10^6$ - $10^2$  Kopien/10 $\mu$ l lag der  $CV_{conc.}$  bei 0,5-19,1%. Bei  $10^1$  und  $10^0$  Kopien/10 $\mu$ l nahm der  $CV_{conc.}$  Werte von 17,5-63,7% an. Auch wenn sich die Reproduzierbarkeit zu den niedrigen Konzentrationen hin wieder verschlechterte, so trat insgesamt doch ein besseres Ergebnis im Vergleich zur Inter-Assay Reproduzierbarkeit auf. Dadurch dass für die Verdünnungsreihe, die dreifach in den LightCycler eingesetzt wird, der gleiche Reaktionsansatz verwendet wird, lassen sich Variationen durch äußere Störfaktoren minimieren und die Reproduzierbarkeit wird optimiert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse bei der Intra- und Inter-Assay Reproduzierbarkeit erzielt, die sich mit denen aus bereits publizierten Arbeiten decken. Stordeur et al., (2002) konnten ebenfalls für die Quantifizierung von Maus-IL-9 im LightCycler über Hybridisierungssonden eine bessere Intra-Assay ( $CV_{conc.}$  absolute Kopienzahlen: 8,81% für  $10^7$ ; 7,41% für  $10^5$ ; 8,78% für  $10^3$ ) wie Inter-Assay Reproduzierbarkeit (21,95% für  $10^7$ ; 12,91% für  $10^5$ ; 30,61% für  $10^3$ ) zeigten.

### **4.3 Expression der Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs**

Hierbei wurde untersucht, ob die Stimulanzen LPS und PHA das Expressionslevel der untersuchten Gene (IL-15; RANTES; TLR3; MyD88;

IRAK1; TRAF6) im Vergleich zu einer unstimulierten Probe verändern (hoch- bzw. herunterregulieren) können.

Bei den gegebenen Versuchsbedingungen konnte für MyD88, IRAK1 und TRAF6 eine Hochregulierung, für IL-15, RANTES und TLR3 dagegen keine Hochregulierung festgestellt werden.

#### **4.3.1 IL-15**

Bei dem Zytokin IL-15 konnten nur leicht erhöhte Expressionslevel nach Stimulation der PBMCs mit LPS festgestellt werden. Die PHA- stimulierte Probe dagegen zeigte einen erniedrigten Expressionslevel im Vergleich zur Medium-Probe. Berücksichtigt man auch die Tatsache, dass für den LightCycler-Lauf lediglich die 10µl Probe, ohne vorherige photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in der Probe, eingesetzt wurde, so kann die Differenz der absoluten Kopienzahlen der beiden Proben eher auf die unterschiedliche Startkonzentration zurückzuführen sein, als auf stimulationsbedingte Veränderungen des Expressionslevels von IL-15. Auch Neely et al., (2001) zeigten, dass es nach LPS-Stimulation (6- max. 72h) zu keiner Hochregulierung von IL-15 mRNA in PBMCs gekommen ist.

Dagegen scheint IL-15 eine entscheidende Rolle bei viralen Infektionen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von IL-15 zu einer kompletten Eliminierung von Epstein-Barr Virus infizierten Lymphozyten geführt hat (Sharif-Askari et al., 2001).

Golden-Mason et al. (2004) konnten in HCV-infizierten Lebern einen signifikanten Anstieg von IL-15 Protein beobachten, was auf die bedeutende Rolle von IL-15 bei der antiviralen Antwort schließen lässt.

#### **4.3.2 RANTES**

In allen für das Chemokin RANTES durchgeführten LightCycler Läufen konnte keine Hochregulierung dieses Gens nach LPS- Stimulation beobachtet werden.

Diese Ergebnisse decken sich nicht mit Angaben aus der Literatur. Hier nach kommt es durch Lipopolysaccharide zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Sprenger et al. (1997) demonstrierten, dass nach 16h Stimulation humaner Monozyten mit LPS der RANTES Expressionslevel um das 7-fache gesteigert wurde.

Auch Antonicelli et al. (2004) konnten in LPS-stimulierten THP-1-Zellen (macrophage-derived cell line) ebenfalls eine gesteigerte RANTES Genexpression feststellen. Und Fessele et al. (2001) zeigten, dass es durch LPS-Stimulation sogar zu einer schnellen Hochregulierung von RANTES mRNA in menschlichen Monozyten kommt. Wenn man die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen aus der Literatur vergleicht muss man jedoch stets berücksichtigen, dass in den unterschiedlichen Ansätzen unterschiedliche Zellen und Stimulationsdauern verwendet wurden. Auch existieren von LPS unterschiedliche Typen mit jeweils veränderter Stimulationskraft, was letztlich zu unterschiedlichen Genexpressionsänderungen führen kann.

Im Gegensatz dazu konnte bei PHA-stimulierten PBMCs im Vergleich zu unstimulierten Zellen ein deutlicher Anstieg der RANTES Genexpression nachgewiesen werden. Es ergab sich ein gesteigertes Expressionslevel um das 22 fache. Auch in ihrer Studie zeigten Rhyne et al., dass sich durch PHA-Stimulation die RANTES Genexpression in PBMCs deutlich steigern lässt.

### **4.3.3 TLR3**

Der Toll-like Rezeptor 3 spielt eine entscheidende Rolle in der Erkennung von viralen Pathogenen, respektive von doppel-strängigen RNA-Viren (Akira et al., 2004). Im Gegensatz dazu erkennt der Toll-like Rezeptor 4 LPS gramnegativer Bakterien. Zwar konnte eine leichte Hochregulierung von TLR3 nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Mediumkontrolle beobachtet werden; doch ist diese geringe Differenz dieser beiden Proben auf Ungenauigkeiten beim Umschreiben oder Pipettieren und nicht auf Genexpressionsänderungen

zurückzuführen, da LPS nur spezifisch von TLR4 und nicht von TLR3 erkannt wird und demzufolge auch keine Hochregulierung von TLR3 zu erwarten wäre. Auch PHA konnte keine TLR3-Hochregulierung herbeiführen. Auch wenn in der PHA-Probe weniger TLR3 mRNA als in der Medium-Probe detektierbar war, so muss auch hier aufgrund der geringen Anzahl von Kopien in den einzelnen Proben eher an unterschiedliche cDNA-Ausgangskonzentrationen bzw. Pipettiergenauigkeiten als an Genexpressionsveränderungen gedacht werden.

#### **4.3.4 MyD88**

Das Adapterprotein MyD88 spielt eine entscheidende Rolle im TLR-Signalweg und führt letztlich über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B zur erhöhten Zytokin-Genexpression oder zur Ausdifferenzierung dendritischer Zellen. MyD88-defiziente Mäuse zeigten eine vollständige LPS-Resistenz, sodass es weder zur Zytokinproduktion, Proliferation von Makrophagen/B-Zellen und einem endotoxischen Schock kam. Auch konnten keine biologischen Antworten in MyD88-defizienten Zellen beobachtet werden, sodass daraus geschlossen werden kann, dass MyD88 ein essentieller Baustein im LPS-induzierten Signalweg darstellt (Akira S, 2000).

In den durchgeführten LightCycler-Läufen konnte eine klare Hochregulierung des MyD88-Gens sowohl bei LPS- als auch bei PHA-Stimulation festgestellt werden. Im Vergleich zur unstimulierten Probe war die mRNA Expression bei der LPS-Probe durchschnittlich um das 14- fache und bei der PHA-Probe um das 11- fache erhöht.

Anhand der Bedeutung von MyD88 beim LPS-induzierten TLR4-Signalweg wird ersichtlich, warum es zu einer solchen Hochregulierung dieses Adapterproteins nach LPS-Stimulation kommt.

#### **4.3.5 IRAK1**

Irak1 stellt beim TLR-vermittelten Signalweg und der NFκB Aktivierung einen wichtigen Eckpfeiler dar. So wurde gezeigt, dass IRAK1 ein wichtiger Mediator beim TLR2-, TLR4- und TLR5-Signalweg ist (Swantek et al., 2000, Brightbill et al., 1999 und Moors et al., 2001). Durch entsprechende Stimuli kommt es bei den Leukozyten zur schnellen Aktivierung mit darauf folgender schneller Inaktivierung von IRAK1. Diese schnelle Inaktivierung könnte als negativer Feedback- Mechanismus beim IL-1R/TLR- vermittelten Signalweg und darauf folgender Zytokin- Gentranskription zu verstehen sein (Hu et al., 2002).

In THP-1 Zellen kam es nach LPS-Stimulation zu einer schnellen Aktivierung von IRAK1. Das aktivierte IRAK1 wiederum interagiert mit MyD88 und führt so zum weiteren Downstreaming des LPS-induzierten TLR-Signalweges mit daraus resultierender Transkription proinflammatorischer Zytokine. Nach 60-90 min LPS-Stimulation nahm der IRAK1 Level jedoch wieder ab und blieb daraufhin auf einem niedrigen Level (Li et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch nach LPS-Stimulation der PBMCs eine verstärkte IRAK1 Expression festgestellt werden.

Nach 8h Stimulation war jedoch immer noch, im Vergleich zur Mediumkontrolle, der IRAK1 Expressionslevel erhöht. Die PHA-Probe wies nur eine leicht erhöhte Expressionsrate auf.

#### **4.3.6 TRAF6**

TRAF6 nimmt bei der IL-1R/TLR- Signaltransduktion eine wichtige Position ein. Dies konnte mehrfach an TRAF6-defizienten Mäusen gezeigt werden. In Abwesenheit von TRAF6 konnte eine IL-1 Behandlung keine T-Zell Proliferation hervorrufen; auch war die LPS-stimulierte Proliferation von B-Zellen dramatisch reduziert. Folglich ist TRAF6 erforderlich für die IL-1- und LPS-induzierte NFκB Aktivierung (Wu et al., 2003).

In dieser Arbeit kam es nach LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe zu einem leichten Anstieg der TRAF6 Expressionsrate. Im Durchschnitt lag der CP

der LPS-stimulierten Probe (27,25) einen Zyklus vor der Mediumprobe (28,24), was einer Verdoppelung der Genexpressionsrate entspricht. Nach PHA-Stimulation kam es dagegen praktisch zu keiner Erhöhung der TRAF6 Expression.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es nach Stimulation von humanen peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs) mit Lipopolysacchariden (LPS) oder Phythämagglutinin (PHA) zu einer Veränderung der Expressionsrate von spezifischen Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein- Genen gekommen ist. Hierbei wurde die Technik der real-time RT-PCR angewendet, die sich durch ihre leichte Durchführbarkeit, hohe Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit auszeichnet. Nachdem im LightCycler die Spezifität der Primer und Sonden überprüft war, wurden für IL-15, RANTES, TLR3, MyD88, IRAK1 und TRAF6 Standardverdünnungsreihen im Labor selbst hergestellt, so dass in weiteren Läufen quantitative Aussagen hinsichtlich der cDNA spezifischer Proben getroffen werden konnten. Die im Labor gefertigten Standardverdünnungsreihen zeigten eine Reproduzierbarkeit, die sich mit denen anderer real-time RT-PCR Assays aus der Literatur deckt. Des Weiteren konnte für alle untersuchten Zytokin-, Chemokin-, TLR- und Adapterprotein-Gene ein sehr hohes Detektionslimit erzielt werden (MyD88:  $10^2$ ; IL-15 und RANTES:  $10^1$ ; TLR3, IRAK1 und TRAF6:  $10^0$ ).

Die verwendeten Hybridisierungssonden erlaubten außerdem eine hochspezifische PCR-Produkt Detektion, was durch die gelelektrophoretische Auftrennung der TRAF6 LightCycler-PCR-Produkte eindrücklich gezeigt werden konnte.

Auch konnte gezeigt werden, dass mit dem in dieser Arbeit verwendeten PCR-Assay eine hohe Intra- und Inter-Reproduzierbarkeit erreicht werden kann. Auch war über einen Bereich von 6 Zehnerpotenzen die Linearität der Amplifikation gegeben.

Nach LPS-Stimulation konnte gezeigt werden, dass MyD88, IRAK1 und TRAF6, die alle Schlüsselrollen beim LPS-induzierten Signalweg einnehmen, eine erhöhte Genexpressionsrate aufwiesen. IL-15, das bedeutend bei der antiviralen Immunantwort ist, RANTES und TLR3, welches für die Erkennung doppelsträngiger RNA von Viren verantwortlich ist, zeigten hingegen keinen erhöhten Expressionslevel.

Nach PHA-Stimulation zeigten lediglich RANTES (22-fach gesteigert) und MyD88 (11-fach gesteigert) eine signifikante Änderung der Genexpression.

Es stellt sich jedoch als schwierig heraus, die Ergebnisse aus der Literatur mit den eigenen Ergebnissen zu vergleichen, da eigentlich nie die identischen Versuchsbedingungen (Art der stimulierten Zellen, Stimulationsdauer und Stärke des stimulierenden Agens) vorliegen und es deshalb zu unterschiedlichen Genexpressionen kommen kann.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1996)

In: Immunologie.

Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle

Annunziato F, Galli G, Cosmi L (1998)

Molecules associated with human TH1 or TH2 cells.

Eur Cytokine Netw., 9, 12-16

Antonicelli F, Brown D, Parmentier M, Drost EM, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, MacNee W (2004)

Regulation of LPS-mediated inflammation in vivo and in vitro by the thiol antioxidant Nacystelyn.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 286 (6), 1319-1327

Akira S, Takeda K (2004)

Toll-like receptor signalling.

Nature Reviews Immunology, 4, July 2004, 499-511

Akira S, Hoshino K, Kaisho T (2000)

The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses.

J Endotoxin Research, 6 (5), 383-387

Barbulescu K, Becker C, Schlaack JF,

IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- $\gamma$  promoter in primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

J Immunol., 160, 3642-3647

Birch DE (1996)

Simplified hot start PCR.

Nature, 381, 445-446

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JB, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SR, Smale ST (1999)  
Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors.  
Science 285:732

Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J (2003)  
Inhibition of interleukin-1 receptor/ Toll-like receptor signalling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4.  
J Exp Med., 197, 263-268

Bustin SA (2000)  
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.  
J Mol Endocrin., 25, 169-193

Clegg RM (1995)  
Fluorescence resonance energy transfer.  
Curr Opin Biotechnol., 6, 103-110

Clerici M, Shearer GM (1993)  
A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.  
Immunol Today, 14, 107-111

Ferber IA, Lee HJ, Zonin F (1999)  
GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing TH1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels.  
Clin Immunol, 91, 134-144

Fessele S, Boehlk S, Mojaat A, Miyamoto NG, Werner T, Nelson EL, Schlondorff D, Nelson PJ (2001)  
Molecular and in silico characterization of a promoter module and C/EBP element that mediate LPS-induced RANTES/CCL5 expression in monocytic cells.  
The FASEB Journal, 15, 577-579

Fitzgerald KA, O'Neill LA, Gearing AJH, Callard RE (2001)  
In: The Cytokine Facts Book.  
2. Aufl., Academic Press, New York, Boston, San Francisco, San Diego, London, Sydney, Tokyo

Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y (2002)  
A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction.  
Mol Cell Probes., 16(2), 99-110

Garcia-Gonzalez MA, Lanas A, Savelkoul PHM, Santolaria S, Benito R, Crusius JBS, Pena AS (2003)  
Association of IL-1 gene family polymorphisms with duodenal ulcer disease.  
Clin Exp Immunol, 134, 525-531

Golden-Mason L, Kelly AM, Doherty DG, Traynor O, McEntee G, Kelly J, Hegarty JE, O'Farrelly C (2004)  
Hepatic interleukin 15 expression: implications for local NK/NKT cell homeostasis and development.  
Clin Exp Immunol., 138 (1), 94-101

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S (2003)  
The TLR7-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily.  
Eur J Immunol., 33, 2987-2997

Hein J, Schellenberg U, Bein G, Hackstein H (2001)  
Quantification of murine IFN- $\gamma$  mRNA and protein expression : impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye.  
Scand. J. Immunol., 54, 285-291

Hill GR, Krenger W, Ferrara JL (1997)  
The role of cytokines in acute graft-versus-host disease.  
Cytokines Cell Mol Ther., 3, 257-266

Holler E (2002)  
Cytokines, viruses and graft-versus-host disease.  
Curr Opin Hematol., 9, 479-484

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G (2002)  
Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxy-Nucleotides. J Immunol., 168, 4531-4537

Hu J, Jacinto R, McCall C, Li L (2002)  
Regulation of IL-1 receptor-associated kinases by lipopolysaccharide.  
Journal of Immunology, 168, 3910-3914

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS (1993)

Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Leisteria-induced macrophages.

Science, 260, 547-549

Janeway CA Jr., Medzhitov R (2002)

Innate immune recognition.

Annu Rev Immunol., 20, 197-216

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001)

in: Immunobiology: the immune System in health and disease.

5. Auflage, Garland Publishing, New York

Janssens S, Beyaert R (2003)

Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated Kinase (IRAK) family members.

Mol Cell, 11, 293-30

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F,

Liu YJ (2001)

Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.

J Exp Med, 194, 863-869

Kaisho T, Akira S (2001)

Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity.

Acta Odontol Scand., 59, 124-130

Kawasaki ES (1990)

Amplification of RNA, 23

In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR Protocols:

A Guide to Methods and Applications.

Academic Press, San Diego, CA

Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H,

Kubo M, Yoshimura A (2002)

SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation.

Immunity, 17, 583-591

Kluth DC, Rees AJ (1996)

Inhibiting inflammatory cytokines.

Semin Nephrol., 16, 576-582

Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R,

Flavell RA (2002)

IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signalling.

Cell, 110, 191-202

Krishna V, Keller M, Newton RC (1997)

In: The Chemokine facts book.

1. Aufl., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney,

Tokyo, Toronto

Kühne BS, Oschmann P (2002)

Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported  
standard curves for cytokine gene expression analysis.

Biotechniques, 33, 1078-1089

Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE (2000)  
Characterization of Interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and  
endotoxin-tolerant cell.

J Biol. Chem., 275 (30), 23340-23345

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

Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA (1990)

Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel  
myeloid differentiation primary response gene induced by IL6.

Oncogene, 5, 1095-1097

Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG (2000)

BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-  
dependent lymphoid neogenesis.

Immunity, 12, 471-481

Manetti R, Parronchi P, Giudizi M-G (1993)

Natural killer cell stimulatory factor (IL-12) induces T helper type 1 (TH1)-  
specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th  
cells.

J Exp Med., 177, 1199-1204

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y,  
Yamamoto A, Seya T (2003)

Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells.

J Immunol., 171, 3154-3162

Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T (2004)  
Toll-like receptor 3: A link between toll-like receptor, interferon and viruses.  
Microbiol. Immunol., 48(3), 147-154

McKay CR (2001)  
Chemokines: immunology's high impact factors.  
Nature Immunology, 2, 95-101

Mosmann TR, Coffman RL (1989)  
TH1 and TH2 Cells: different patterns of lymphokine secretion lead to functional properties.  
Annu. Rev. Immunol., 7, 145-173

Moors MA, Li L, Mizel SB (2001)  
Activation of Interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin.  
Infect. Immun., 69, 4424

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, v'ant Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000)  
Differential expression and regulation of TLR in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.  
J Immunol., 164, 5998-6004

Müller HP (2001)  
Checklisten der Zahnmedizin: Parodontologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Neely GG, Robbins SM, Amankwah EK, Epelman S, Wong H, Spurrell JCL, Jandu KK, Zhu W, Fogg DK, Brown CB, Mody CH (2001)  
Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis.  
J Immunol., 167, 5011-5017

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M (1998)  
Developments in quantitative PCR.  
Clinical Chemistry Laboratori Medicine, 36, 255-269

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

Page RC, Kornmann KS (1997)  
The pathogenesis of human periodontitis: an introduction.  
Periodontol., 14, 9-11

Pfaffl MW (2004)  
Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.  
BIOspektrum I/04; 10.Jahrgang

Pfaffl MW, Hageleit M (2001)  
Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR.  
Biotechnology Letters, 23, 275-282

Pfaffl MW (2001)

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Nucleic Acids Res., 29 (9), e45

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

Rhyne PW, Scull JD, Lewis KL, Jubin K, Eisinger D, Stephen L

Multiplex analysis and detection of 22 human cytokines using Beadlyte®

suspension arrays.

Upstate cell signalling solutions; [www.upstate.com](http://www.upstate.com)

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997)

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.

Anal. Biochem., 245, 154-160

Romagnani S (1997)

The TH1/TH2 paradigm.

Immunol Today, 18, 263-266

Romagnani S (2000)

T-cell subsets (TH1 versus TH2).

Ann. Allergy Asthma Immunol., 85, 9-18

Rossi D, Zlotnik A (2000)

The biology of chemokines and their receptors.

Annu Rev Immunol., 18, 217-242

Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Alfredo D (2004)  
Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie.  
Quintessenz, Berlin

Sharif-Askari E, Fawaz LM, Tran P, Ahmad A, Menezes J (2001)  
Interleukin 15- mediated induction of cytotoxic effector cells capable of  
eliminating Epstein-Barr virus-transformed/immortalized lymphocytes in culture.  
J Natl Cancer Inst., 93 (22), 1724-1732

Slack JL, Schooley K, Bonnert TB, Mitcham JL, Qwarnstrom EE,  
Sims JE, Dower SK (2000)  
Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic  
region responsible for coupling to pro- inflammatory signalling pathways.  
J Biol Chem., 275, 4670-4678

Sprenger H, Krause A, Kaufmann A, Priem S, Fabian D, Burmester GR,  
Gemsa D, Rittig MG (1997)  
Borrelia burgdorferi induces chemokines in human monocytes.  
Infection and Immunity, 65 (11), 4384-4388

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

Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H  
Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW,  
Yeh WC (2000)  
Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice  
lacking IRAK-4.  
Nature, 416, 750-756

Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA (2000)  
IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin.  
J Immunol., 164, 4301-4306

Swatoch PC (2003)  
Etablierung und Evaluierung einer real-time RT-PCR zur quantitativen Analyse  
der Genexpression von 7 humanen Zytokinen.  
Medizinische Dissertation, Universität Tübingen

Szabo SJ, Glimcher LH, Ho I-C (1997)  
Genes that regulate IL-4 expression in T cells.  
Curr Opin Immunol, 9, 776-781

Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW (2003)  
Real-time PCR efficiency standardized estimation from single reaction setup.  
Nucleic Acids Res., 31 (10): e122

Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A,  
Speleman F (2002)  
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric  
averaging of multiple internal control genes.  
Genome Biology, 3, research 0034.1-0034.11

Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE,  
Stark GR, Li X (2003)  
SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1  
receptor signalling.  
Nature Immunol., 4, 920-927

Whelan JA, Russell NB, Whelan MA (2003)  
A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR.  
J Immunol., 278, 261-269

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997b)  
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.  
*Biotechniques*, 22, 130-131

Wu H, Arron JR (2003)  
TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and  
osteimmunology.  
*BioEssays*, 25, 1096-1105

Yin JL, Shakel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV,  
McCaughan GW, Eris JM, Bishop GA (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 (2001)  
Chemokines in immunity.  
*Adv Immunol.*, 78, 57-110

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Apella E, Oppenheim JJ,  
Leonard EJ (1987)  
Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has  
peptide sequence similarity to other host defense cytokines.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 9233-9237

## **7. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Herrn Prof. Dr. Einsele danke ich für die freundliche Überlassung dieses Themas.

Herrn PD Dr. Jürgen Löffler danke ich ganz besonders für die intensive Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit, die stete und geduldige Beantwortung meiner unzähligen Fragen, sowie für die Mithilfe bei der Beurteilung der experimentellen Ergebnisse.

Ein großes Dankeschön auch an Friederike Frank und Marija Markulin für ihre Geduld und Zeit, die sie beim Erlernen aller Labortechniken für mich aufgebracht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Diana Akhawi-Araghi und Andreas Rau, die mir bei der Erstellung der Excel-Tabellen mit Rat und Tat zur Seite standen. Meiner Freundin Rhea Piel vielen lieben Dank für die vielen Anregungen und Tipps beim Überarbeiten und Layouten dieser Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich recht herzlich meinen Eltern für die uneingeschränkte moralische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums!

## Lebenslauf

Name: Falko David Sprenger

geboren am: 02.11.1977 in Konstanz

Nationalität: deutsch

Eltern: Dr. Frank Sprenger, Zahnarzt  
Hannelore Sprenger, Heilpraktikerin

Schulbildung: 1984-1988 Grund- und Hauptschule Stockach  
1988-1997 Nellenburg Gymnasium Stockach  
Juni 1997 Abitur

Ersatzdienst: 09/1997-09/1998  
Caritaswerkstätten St. Georg in Freiburg i. Br.

Studium der Zahnheilkunde:

1998-2004	Universität Tübingen
10/1999	Vorphysikum
04/2001	Physikum
17.06.2004	Staatsexamen/ Approbation

Beruf: 11/2004-12/2004 zahnärztliche Famulatur in Nepal  
01/2005-03/2005 Assistenzzeit in väterlicher Praxis  
04/2005-03/2006 Assistenzzeit in der zahnärztlichen  
Praxis Dr. Breitschwerdt in Esslingen  
seit 04/2006 Assistent in der oralchirurgischen  
Praxis Dr. Jens Kleine in Mosbach  
(Baden)