Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Etablierung und Evaluierung einer Real-time RT-PCR zur quantitativen Analyse der Genexpression von 7 humanen Zytokinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Phillipp Christopher Swatoch
aus
Tübingen

2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Einsele
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Melms

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1 Zytokine 1

1.1.1 Allgemeines 1

1.1.2 Klinische Bedeutung der Zytokine in der Immunologie 3

1.1.2.1 Grundlagen 3

1.1.2.2 Zytokin-Dysregulation und Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation 8

1.2 Verfahren zum Nachweis der Zytokin-Produktion 13

1.2.1 Überblick 13

1.2.2 Real-time RT-PCR zum quantitativen Nachweis von Zytokin-mRNA 15

1.3 Ziel der Arbeit 17

2. Material und Methoden **19**

2.1 Materialien und Bezugsquellen 19

2.1.1 Geräte 19

2.1.2 Verbrauchsgegenstände 20

2.1.3 Chemikalien 20

2.1.4 Kits 20

2.2 Methoden 21

2.2.1 Real-time PCR im LightCycler, Grundlagen 21

2.2.1.1 Das LightCycler Instrument 21

2.2.1.2 Detektion der PCR-Produkte über Hybridisierungs-Sonden 22

2.2.1.3 Quantitative PCR im LightCycler 23

2.2.2 Etablierung einer LightCycler RT-PCR zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden 26

2.2.2.1 Probenmaterial 27

2.2.2.2 LightCycler PCR 30

2.2.2.3 Generierung der externen Standards 34

2.2.2.4 Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR 41
2.2.3 Exemplarische Darstellung der Normalisierung absoluter Werte der Zytokin-Genexpression gegen die Expression des Housekeeping-Gens h-β2M 42
2.2.3.1 Absolute Quantifizierung von h-β2M-mRNA als Ein-Schritt-RT-PCR 42
2.2.3.2 Normalisierung der Zytokin-Expressionslevel in stimulierten und unstimulierten PBMCs über das Housekeeping-Gen h-β2M 45
3. Ergebnisse **47**
3.1 LightCycler-Assay zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-Genexpression 47
3.1.1 Spezifität 47
3.1.2 Linearität 49
3.1.3 Sensitivität 51
3.1.4 Amplifikationseffizienz 51
3.1.5 Reproduzierbarkeit 53
3.1.5.1 Inter-Assay Reproduzierbarkeit 53
3.1.5.2 Intra-Assay Reproduzierbarkeit 57
3.2 Assay zur absoluten Quantifizierung der h-β2M-mRNA-Expression 59
3.2.1 Überprüfung der Amplifikationseffizienzen von Standard und Proben 59
3.2.2 Überprüfung der Regulation der h-β2M mRNA-Expression in stimulierten und unstimulierten PBMCs 60
3.3 Expression von IL-12- und IFN-γ-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs: Exemplarische Darstellung der Quantifizierung von Zytokin-mRNA und Normalisierung der Ergebnisse über das Housekeeping-Gen h-β2M 61

4. Diskussion **63**

4.1 Real-time RT-PCR im Vergleich zu anderen quantitativen Nachweisverfahren der Zytokin-Produktion 63

4.2 LightCycler-RT-PCR zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-mRNA-Expression über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden 66

4.2.1Spezifität 67

4.2.2 Sensitivität 67

4.2.3 Amplifikationseffizienz 68

4.2.4 Reproduzierbarkeit 69

4.2.5 Normalisierung 70

4.2.6 Probenumsatz 73

4.3 Schlussfolgerungen 74

5. Zusammenfassung **76**

6. Literaturverzeichnis **78**

Abkürzungen

A	Adenin
bp	base pair
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementäre (copy) DNA
Cp	Crossing Point
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	(Amplifikations-) Effizienz
EDTA	Ethyldiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
G	Guanin
GVHD	Graft versus Host Disease
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISH	In-situ-Hybridisierung
LED	light-emitting diode
log	Logarithmus auf der Basis 10
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK	natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	RNase Protection Assay
rpm	rotation per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymin
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq-Polymerase	Polymerase aus Thermus aquaticus
TH	T-Helferzellen
Tm	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrose Faktor
Tris	Trishydroxymethylethylendiamin
Tth-Polymerase	Polymerase aus Thermus thermuphilus
UV	Ultraviolett

k	kilo-, 10^{3}
c	centi-, 10^{-2}
m	milli-, 10^{-3}
µ	mikro-, 10^{-6}
n	nano-, 10^{-9}
p	piko-, 10^{-12}
f	femto-, 10^{-15}

℃	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

Der Begriff Zytokine steht heute für eine Gruppe kleiner löslicher Proteine oder Glykoproteine (~25kDa), die als interzelluläre Mediatoren sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen funktionelle Aktivitäten von Zellen und Geweben modulieren. Dabei sind sie an zahlreichen Prozessen beteiligt wie Zellwachstum- und Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Homeostase und Hämatopoese, und spielen insbesondere in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle.

Zytokine werden generell von jeder kernhaltigen Zelle im Körper auf einen aktivierenden Stimulus hin freigesetzt und induzieren eine Antwort durch Binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen, was über intrazelluläre Signaltransduktion und second messenger Wege zur Änderung der Genexpression in diesen Zellen führt.

Einige Zytokine werden auch konstitutiv exprimiert, andere werden vorsynthetisiert und in cytoplasmatischen Granula, als Membranproteine oder als Komplex in der extrazellulären Matrix gespeichert, um nach Stimulation schnell freigesetzt werden zu können. Die meisten Zytokine werden jedoch auf Stimulation hin rasch neusynthetisiert und dann sezerniert. Infektiöse Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten, sowie allgemein physikalische, mechanische und toxische Stimuli, aber auch Zytokine selbst stellen dabei potente Zytokin-Induktoren dar.

Die interzelluläre Signalübermittlung kann lokal durch Wirkung des Zytokins auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin) erfolgen. Abhängig von ihrer Konzentration, der Halbwertszeit und der Möglichkeit in den systemischen Kreislauf einzutreten, wirken Zytokine auch auf entfernte Zellen (endokrin). Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Zytokine ist ihre Pleiotropie. Da die Rezeptoren auf unterschiedlichen Zielzellen

exprimiert werden, kann ein Zytokin für verschiedene biologische Effekte verantwortlich sein. Zytokine zeigen auch Redundanz: Ähnlichkeiten in der cytosolischen Domäne der Rezeptoruntereinheiten führen zu überlappenden oder weitgehend identischen Aktivitäten verschiedener Zytokine (s.u.). In vitro weisen die sehr potenten Moleküle selbst in kleinen Konzentrationsbereichen (1Nanomol-1Femtomol) biologische Wirkungen auf. Grund hierfür ist die außerordentlich hohe Affinität der Zytokin-Rezeptoren zu ihren Liganden.

Eine klare Einteilung der Zytokine hat sich in der Vergangenheit immer wieder als problematisch erwiesen. Die Zytokin-Nomenklatur zeigt wenig bis gar keine systematische Beziehung zwischen den Molekülen. Dies ist auf verschiedene historische Versuche zurückzuführen, neu entdeckte Zytokine zu benennen. Die Terminologie richtete sich entweder nach dem Typ der sezernierenden Zelle und Zielzelle oder dem initial definierenden Bioassay, sprich der beobachteten Funktion des Zytokins. Zahlreiche Akronyme und verschiedene Oberbegriffe wurden in der Vergangenheit auf diese Weise geprägt. Fortschritte in der Technik zur Charakterisierung von biologischen und biochemischen Eigenschaften von bereits bekannten und einer immer größer werdenden Anzahl neuer Zytokine demonstrierten wiederholt die Fehlerhaftigkeit dieser Systeme: Sei es, dass die beschriebene Funktion nicht zutreffend ist oder beispielsweise viele Aktivitäten letztendlich auf ein Zytokin zurückzuführen waren. Die sogenannte Interleukin-Nomenklatur stellt dabei den Versuch dar, die Problematik rational anzugehen und eine standardisierte Terminologie einzuführen. Neue wie länger bekannte Zytokine werden lediglich durchnummeriert : Interleukin (IL) -1,-2,... . Obwohl der Begriff Interleukine ursprünglich für Mediatoren definiert wurde, die zwischen Leukozyten agieren, und später für viele Interleukine gezeigt werden konnte, dass sie auch auf andere Zellen wirken, hat sich diese Nomenklatur bis heute durchgesetzt. Dennoch wurden nicht alle bekannten Zytokine neu benannt und auch nicht alle neu entdeckten Zytokine fallen in diese Nomenklatur. Das Ziel bleibt daher die Entwicklung einer Terminologie, die sich an der Zytokin-Struktur orientiert.

Basierend auf der strukturellen Homologie ihrer Rezeptoren erfolgt heute die Einteilung der Zytokine in verschiedene Rezeptorfamilien. In einer relativ

kleinen Anzahl von nur sechs Hauptfamilien lassen sich die meisten Zytokine zusammenfassen. Es sind dies die Hämatopoietin-, Interferon-, TNF-, IL-1/Toll-like-, Tyrosinkinase- sowie die Chemokin-Rezeptorfamilie. Jede Familie ist über ähnliche Sequenzen in der cytosolischen Domäne der Rezeptoruntereinheit definiert und vermittelt somit auch ähnliche funktionelle Aktivitäten (Fitzgerald et al., 2001; Oppenheim, 2001).

Für die Mitglieder der Chemokin-Rezeptorfamilie wurde weit vor dieser Einteilung der Begriff der Chemokine geprägt. Es handelt sich um eine große Superfamilie strukturell verwandter Zytokine, die vor allem für ihre chemotaktischen Wirkungen auf phagozytierende Zellen bekannt sind. Darüber hinaus nehmen sie jedoch auch Einfluß auf verschiedene andere Prozesse wie der Regulation der Hämatopoese oder Angiogenese (Yoshie et al., 2001; DeVries et al., 1999).

Aus gegenwärtiger Sicht werden Zytokine nicht allein produziert sondern stets zusammen mit anderen Zytokinen in einem für einen bestimmten Stimulus charakteristischen Muster. Sie agieren dabei als Teil eines Netzwerks oder einer Kaskade von synergistischen und antagonistischen Zytokinen, Zytokin-Induktoren und -Inhibitoren. Dieses komplexe Zusammenspiel der Zytokine und ihren Zielzellen resultiert dann in einer physiologischen oder pathophysiologischen Antwort.

1.1.2 Klinische Bedeutung der Zytokine in der Immunologie

1.1.2.1 Grundlagen

In der physiologischen Abwehr infektiöser Erreger sind Zytokine über lokale wie systemische Effekte wesentlich an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt (Janeway et al., 2001).

Eine Störung in der Zytokinkaskade oder ein Ungleichgewicht im Zytokin-Netzwerk kann dabei zum Versagen der Immunantwort führen oder resultiert in unangemessenen Immunreaktionen, und wird darüber hinaus als wichtiger

Faktor in der Pathogenese zahlreicher immun-vermittelter Krankheitsbilder angesehen (Hibbert und Johnston, 2001).

Es existieren verschiedene Modelle, die Zytokin-Profile unter diesen Bedingungen näher beschreiben und Einblick in die Zusammenhänge des Zytokin-Netzwerks geben:

Pro-und antiinflammatorische Zytokine

Die Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch ein Wechselspiel von Zytokinen, die diese Reaktion agonisieren und antagonisieren. Zytokine werden dabei entweder als proinflammatorisch oder als antiinflammatorisch klassifiziert. Interleukin-1, Tumornekrosefaktor-α, Interferon-γ, IL-12 oder IL-18 sind Beispiele gut charakterisierter proinflammatorischer Zytokine, wohingegen Interleukin-4, Interleukin-10, Interleukin-13, Interferon-α oder TGF-β als antiinflammatorische Zytokine angesehen werden.

Diese Einteilung gewinnt beispielsweise an Bedeutung in der Betrachtung von Autoimmunerkrankungen, bei denen eine definierte Dysregulation in der Zytokin-Produktion als ätiologischer Faktor eine entscheidende Rolle spielt: So wird angenommen, dass proinflammatorische Zytokine Autoimmunkrankheiten fördern, und regulatorische Zytokine das Krankheitsbild unterdrücken. Letztendlich zeigt sich diese Klassifizierung jedoch als eine sehr vereinfachte und auch oft kontroverse Darstellung der Zusammenhänge, da zahlreiche Beispiele demonstrieren, dass bestimmte Zytokine unter verschiedenen Bedingungen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung aufweisen (Cavaillon, 2001; O'Shea et al., 2002).

TH1/TH2-Polarisierung

Besonders informativ in Bezug auf das Zytokin-Netzwerk zeigt sich das sogenannte TH1/TH2-Paradigma und soll daher an dieser Stelle ausführlich zur Darstellung kommen:

Bei der funktionellen Differenzierung von $CD4^+$-T-Lymphozyten in der adaptiven Immunantwort entstehen zwei verschiedene Subpopulationen von T-Helfer-

(TH-) Zellen: die TH1- und die TH2-Zellen. Sie unterscheiden sich im Muster der von ihnen produzierten Zytokine, und ihr Phänotyp lässt sich retrospektiv über diese polarisierten Zytokin-Gruppen (TH1- und TH2-Zytokine) identifizieren (Mosmann et al., 1986). Mit den unterschiedlichen Zytokin-Mustern sind auch verschiedene Eigenschaften der beiden T-Zell-Subpopulationen gegeben: TH1-Zytokine, wie Interferon-γ, IL-2 und TNF-β, führen zur Aktivierung von Makrophagen, zeigen Effekte auf die Vermittlung der zytotoxischen T-Zell-Aktivität und begünstigen die Induktion der Zell-vermittelten Immunität. Damit spielen sie eine entscheidende Rolle in der Elimination intrazellulärer Erreger. TH2-Zytokine, darunter IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, favorisieren dagegen über Aktivierung von B-Zellen eine Antikörper-vermittelte humorale Immunität. Die beiden Zytokin-Gruppen sind außerdem in der Lage Funktionen der jeweils anderen Gruppe zu antagonisieren oder auch die Aktivierung der anderen TH-Subpopulation zu inhibieren: IFN-γ supprimiert beispielsweise die TH2-Zytokin-Produktion, wohingegen IL-4, IL-10 und IL-13 TH1-Aktivitäten beeinträchtigen (Romagnani, 1997; Abbas et al., 1996; Mosmann und Coffman, 1989).

Im Hinblick auf dieses Modell der TH1-oder TH2-Polarisierung ist eine erfolgreiche Immunantwort auf infektiöse Erreger von der Aktivierung der angemessenen Effektorfunktion der T-Zell-Subpopulationen abhängig (Powrie und Coffman, 1993). Abgesehen von ihrer Bedeutung in der Infektabwehr tragen polarisierte TH1-und TH2-Antworten auch zur Entstehung von immun-vermittelten Krankheiten bei: TH1-Antworten sind an der Pathogenese von organ-spezifischen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Typ 1 Diabetes Mellitus oder Morbus Crohn beteiligt. TH1-abhängige Mechanismen wie zelluläre Immunität und zytotoxische T-Zell-Aktivität vermitteln außerdem die Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (TypIV) und spielen damit eine zentrale Rolle in der akuten Transplantatabstoßung. Eine TH2- dominierte Antwort hingegen wird bei allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp (TypI) beobachtet und ist mit atopischen Störungen wie exogen-allergischem Asthma bronchiale oder atopischem Ekzem assoziiert (Romagnani, 2000).

Die initiierenden Faktoren, die zu einer TH1- oder TH2 Antwort prädisponieren sind nur teilweise verstanden. Im Kontext eines genetischen Hintergrunds liefern eine Reihe von Umweltfaktoren die Bedingungen, die zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation zur naiven T-Zelle deren Differenzierung in eine der beiden Subpopulationen determinieren (O'Garra und Arai, 2000). Bekannte Umweltfaktoren sind dabei der Weg der Invasion des Antigens, die physikalische Form und Dosis des Immunogens, sowie die Natur der pathogen-abgeleiteteten Moleküle (Constant und Bottomly, 1997). Die Art der Antigenverarbeitung und Antigenpräsentation durch die unspezifische angeborene Immunabwehr beeinflusst dann die TH1/TH2-Differenzierung im wesentlichen über zwei Wege: zum einen moduliert sie eine Gruppe von kontaktabhängigen Faktoren, wie die Signale des T-Zell-Rezeptors oder die Signale durch costimulierende Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen. Zum anderen schafft sie ein bestimmtes Zytokinmilieu in der Umgebung der naiven T-Zelle, das je nach Prädominanz eines gegebenen Zytokins eine TH1-oder TH2-Antwort begünstigt (Glimcher und Murphy, 2000): Eine frühe Produktion von IL-4 im Rahmen der Immunantwort ist entscheidend für die Entwicklung von TH2-Zellen. Nach initialer Aktivierung über entsprechende T-Zell-Rezeptorsignale sind T-Zellen dabei selbst in der Lage geringe Mengen an IL-4 zu produzieren (Romagnani, 2000). Eine andere IL-4-Quelle stellt auch eine spezialisierte Subpopulation von Natürlichen Killerzellen dar, die $CD4^+NK1.1^+$-Zellen (Bendelac et al., 1996).

IL-12 hingegen, das vor allem von dendritischen Zellen produziert wird, ist der potenteste Induktor von TH1-Antworten (Romagnani, 2000; Magram et al.,1996). IL-4 und IL-12 inhibieren darüber hinaus die Differenzierung der jeweils anderen Subpopulation (Manetti et al., 1993; Seder et al., 1993).

Zwei weitere Zytokine, die neben IL-12 die Entwicklung von TH1-Zellen beeinflussen sind IFN-γ und IL-18. IFN-γ wird von T-Zellen selbst oder auch von NK-Zellen produziert und favorisiert eine TH1-Antwort (Maggi et al., 1992).

IL-18, ein Produkt aktivierter Makrophagen, Monozyten, dendritischer Zellen und zahlreicher anderer Zellen, ist allein nicht in der Lage eine Differenzierung in TH1-Zellen zu induzieren. IL-18 erhöht vielmehr in Synergismus mit IL-12 die IFN-γ-Produktion in TH1-differenzierten T-Zellen (Robinson et al., 1997). In

Abwesenheit von IL-12 ist IL-18 auch in der Lage in T-Zellen die Produktion von IL-4 und IL-13 zu induzieren. IL-18 reguliert damit sowohl die Entwicklung von TH1-wie auch TH2-Antworten (Nakanishi et al., 2001).
Über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen in den T-Zellen durch die oben genannten Zytokine erfolgt dann eine weitere Kontrolle durch bestimmte Transkriptionsfaktoren, die entweder eine TH1-oder eine TH2-Antwort vermitteln (Glimcher und Murphy, 2000).
Im Gegensatz zu diesen Mechanismen, bei denen im wesentlichen Zytokin-Signale die TH1/TH2-Polarisierung determinieren, zeigt sich auch eine Zell-Zyklus-abhängige Regulation der T-Zell-Differenzierung (Bird et al., 1998).

Ferner beeinflussen andere Faktoren das Zytokin-Netzwerk: Es wird angenommen, dass Polymorphismen in Zytokin-Genen zu einer Dysregulation in der Zytokin-Produktion und einem Ungleichgewicht im Netzwerk führen und damit an der Pathogenese vieler multifaktorieller Krankheitsbilder beteiligt sind (Vandenbroeck und Goris, 2003; Fitzgerald et al., 2001).
Auch verschiedene Viren sind in der Lage Einfluss auf das Zytokin-Netzwerk zu nehmen und es zu manipiulieren. Über Sezernieren von Zytokin-Homologen, sogenannten Virokinen, oder durch Sezernieren von löslichen Zytokin-Bindungsproteinen und -Rezeptoren sowie einer Reihe von anderen Proteinen, inhibieren sie antivirale Zytokin-Signalwege, um so der Elimination durch das Immunsystem zu entgehen (Fitzgerald et al., 2001;Tortorella et al., 2000; Kalvakolanu, 1999).

In Bezug auf die hier beschriebenen Grundlagen des derzeitigen Verständnisses der Zytokine in der Immunologie und ihrer wesentlichen Funktionen im Zytokin-Netzwerk wird im Folgenden ihre Rolle in bestimmten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation dargestellt.

1.1.2.2 Zytokin-Dysregulation und Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) ist Mittel der Wahl zur Behandlung von zahlreichen malignen und nicht-malignen hämatologischen Erkrankungen, soliden Tumoren oder auch Autoimmun-erkrankungen. Der Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation ist jedoch in vielen Fällen durch eine Reihe von Komplikationen limitiert. Neben der akuten und chronischen Graft-versus-host-disease (GVHD) und schweren Infektionen durch Bakterien, Viren oder Pilze stellen auch die Transplantatabstoßung sowie das Auftreten von Tumorrezidiven Hauptkomplikationen der allogenen Stammzelltransplantation dar (Tabbara et al., 2002).
Als Immunmediatoren sind Zytokine wesentlich an diesen Prozessen beteiligt.
Die akute GVHD, die Infektion durch das humane Zytomegalievirus (HCMV) wie auch opportunistische Pilzinfektionen nach allogener SZT, insbesondere durch Candida oder Aspergillus spp., sind Gegenstand der Forschungen im molekular-und zellbiologischen Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen. Die Darstellung der Rolle der Zytokine beschränkt sich daher auf diese Probleme der allogenen SZT:

Akute GVHD nach allogener SZT

Bei der akuten GVHD richten sich immunkompetente Zellen des Spenders gegen Körperzellen des Empfängers. Dabei werden vor allem die drei Organe Haut, Leber und Gastro-Intestinaltrakt geschädigt. Ursächlich erkennen Donor-T-Zellen HLA-Antigene des Empfängers als fremd.
Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass es unter den Bedingungen der allogenen SZT zu einer Dysregulation von inflammatorischen Zytokinkaskaden kommt. Diese Zytokin-Dysregulation liefert ein Konzept für die komplexen Mechanismen, die der akuten GVHD zugrunde liegen, und erlaubt die Erklärung vieler klinischer Beobachtungen. Die Pathophysiologie der akuten GVHD lässt sich in diesem Zusammenhang in drei Phasen einteilen:

Phase 1 wird durch die Konditionierungstherapie (Ganzkörperbestrahlung, Hochdosischemotherapie oder beides in Kombination) des Empfängers im Rahmen der allogenen SZT eingeleitet. Sie führt zur Schädigung und Aktivierung von Empfängergewebe, das inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1 und IL-6 freisetzt. Insbesondere die Schädigung der intestinalen Mukosa erlaubt bakteriellen Bestandteilen wie LPS (Endotoxin) die Translokation aus dem intestinalen Lumen in die systemische Zirkulation. LPS wiederum stimuliert die Sezernierung von TNF-α, IL-1 und IL-12 vor allem durch Makrophagen. TNF-α und IL-1 steigern die Expression von MHC Antigenen und Adhäsionsmolekülen im Empfängergewebe und erleichtern damit die Aktivierung von Donor-T-Zellen, die Unterschiede in Haupt- oder Nebenhistokompatibilitätskomplex-Antigenen erkennen.

Die Donor-T-Zell-Aktivierung in Phase 2 ist charakterisiert durch die Induktion einer TH1-Antwort in Anwesenheit von IL-12.

In Phase 3, der folgenden Effektorphase vermitteln verschiedene Mechanismen die Schädigung von Empfängergeweben: TH1-Zytokine, wie IFN-γ und IL-2, aktivieren Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und Natürliche Killerzellen, die das Gewebe über ihre cytolytischen Mechanismen schädigen. Gleichzeitig aktivieren die TH1-Zytokine auch unspezifische Effektorzellen wie Makrophagen zur Zytokinproduktion. Diese erhalten wiederum ein zweites Signal über LPS und andere Immunogene, die vermehrt die Barriere der intestinalen Mukosa überwinden, die nicht nur durch die Konditionierungstherapie geschädigt wird sondern auch Ziel der zytotoxischen T-Zellantwort ist. Aus diesen Signalen resultiert aufs neue die Sezernierung der inflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1, die an lokalen Gewebeschädigungen direkt beteiligt sind. LPS triggert sowohl in Darm-assoziierten Makrophagen als auch in Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und Makrophagen der Haut die Produktion der inflammatorischen Zytokine. Vor allem die weitere Schädigung des Intestinaltrakts durch die unspezifischen Effektorzellen und ihre Mediatoren fördert und verstärkt dann die stattfindenden Entzündungsreaktionen in den GVHD Ziel-Geweben über massive Freisetzung von LPS und folgender inflammatorischer Zytokinproduktion (Holler, 2002; Hill und Ferrara, 2000; Krenger et al., 1997).

In Bezug auf dieses pathophysiologische Konzept korreliert die Produktion von TH1-Zytokinen (IFN-γ, IL-2) mit der akuten GVHD. Eine experimentelle Verschiebung zu TH2-Antworten (IL-4, IL10) ist in diesem Zusammenhang in einigen Mausmodellen mit einer reduzierten GVHD-Letalität assoziiert (Williamson et al., 1997; Krenger et al., 1996; Fowler et al., 1994). Trotzdem zeigt sich die Rolle der TH1/TH2-Polarisierung hinsichtlich der akuten GVHD als kontrovers und komplexer als zunächst angenommen:

Verschiedene Studien versagen bei dem Versuch, vorteilhafte Effekte einer TH2-Polarisierung zu zeigen (Blazar et al., 1995; Krenger et al., 1994). Vielmehr ist in anderen Modellen eine Beteiligung von sowohl TH1-als auch TH2-Zytokinen an der akuten GVHD-Pathologie nachgewiesen, was gegen eine Trennung von TH1-und TH2-Antworten im Rahmen der akuten GVHD spricht (Liu et al., 2001, Nicolic et al., 2000)

Weitere Funktionen, die sich nicht durch das dargestellte pathophysiologische Konzept der akuten GVHD erklären lassen, sind auch für TH1-Zytokine beschrieben: Experimentelle Modelle demonstrieren, dass eine frühe Gabe von TH1-Zytokinen (INF-γ, IL-2) und TH1-induzierenden Zytokinen (IL-12) paradoxerweise die Schwere der akuten GVHD vermindert (Sykes et al., 1995; Sykes et al.,1993; Brok et al., 1993). Die Abwesenheit von Donor-abgeleitetem IFN-γ ist darüber hinaus mit schweren Verläufen der akuten GVHD verbunden (Murphy et al., 1998). Auch die Blockade von IL-18, dessen Serum-Level im Verlauf der akuten GVHD erhöht sind und das als IFN-γ induzierendes Zytokin mit TH1-Antworten assoziiert ist, verstärkt überraschenderweise die akute GVHD. Für die frühe Gabe von IL-18 zum Empfänger ist hingegen ein protektiver Effekt des Zytokins durch Kontrolle der Donor-T-Zell-Expansion nachgewiesen: IL-18 induziert eine erhöhte Fas-vermittelte Apoptose von Donor-T-Zellen, wobei dieser Effekt von Donor-abgeleitetem IFN-γ abhängig ist. (Fujimori et al., 2000; Reddy et al., 2001). In ähnlicher Weise ist eine Inhibition der akuten GVHD auch für IL-12 beschrieben (Dey et al., 1998; Yang et al., 1998). Es wird daher eine duale Rolle von TH1-induzierenden und TH1-assoziierten Zytokinen in der Pathophysiologie der akuten GVHD angenommen: abhängig vom Zeitpunkt ihrer systemischen Produktion oder

exogenen Gabe und dem experimentellen Modell tragen sie zum einen zur Schädigung von GVHD-Ziel-Geweben durch Aktivierung von Effektorzellen und Induktion inflammatorischer Zytokinproduktion wesentlich bei. Zum anderen vermitteln sie einen protektiven Effekt , indem sie die Expansion von alloreaktiven Donor-T-Zellen kontrollieren (Reddy et al., 2001; Holler, 2002).

Opportunistische Pilzinfektionen durch Candida albicans oder Aspergillus fumigatus nach allogener SZT

Verschiedene Maus-Modelle zeigen, dass Zytokine sowohl in der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort die erfolgreiche Abwehr invasiver Pilzinfektionen vermitteln, die durch Candida albicans oder Aspergillus fumigatus verursacht werden:
Makrophagen sezernieren in der frühen Phase der Infektion nach Antigen-kontakt TNF-α und IL-8. Sie sind entscheidend an der Induktion einer unspezifischen Immunität beteiligt: Direkt über das Chemokin IL-8 und indirekt über TNF-α werden neutrophile Granulozyten rekrutiert und deren anti-mykotische Effektoraktivität erhöht (Mencacci et al., 2000; Mehrad et al., 1999).
Neutrophile, aber auch Makrophagen und dendritische Zellen sezernieren in Antwort auf die Pilzpathogene IL-12, das im weiteren die Induktion einer protektiven TH1-Antwort vermittelt (Mencacci et al., 2000; Einsele und Hebart, 2002). Die Determinierung der TH-Reaktivität unterliegt auch im Rahmen der Infektion durch Pilze den in Kapitel 1.1.2.1 dargestellten Mechanismen (Mencacci et al., 2000). Insbesondere sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass dendritische Zellen zwischen den verschiedenen Zustandsformen von Candida albicans und Aspergillus fumigatus unterscheiden, und abhängig davon IL-12 oder IL-4 sezernieren, was entweder eine TH1- oder TH2-Antwort induziert (D'Ostiani et al., 2000; Bozza et al., 2002).
TH1-Zytokine, vor allem IFN-γ, aktivieren in Makrophagen und Neutrophilen antimykotischen Effektorfunktionen. Die Produktion von TH1-Zytokinen korreliert sowohl in Tiermodellen wie auch in klinischen Studien mit der Resistenz zur Infektion. Die prädominante Produktion von TH2-Zytokinen (IL-4,

IL-10) hingegen ist mit Suszeptibilität und Krankheitsprogression assoziiert, da sie zum einen die Entwicklung von TH1-Antworten inhibieren (IL-4) und zum anderen phagozytäre Effektorzellen deaktivieren (IL-10) (Hebart et al., 2002a; Romani, 1999; Cenci et al., 1997).
Im Rahmen der allogenen SZT wird angenommen, dass eine defekte TH-abhängige Immunität die Suszeptibilität für opportunistische Pilzinfektionen entscheidend beeinflusst. Verschiedene klinische und experimentelle Untersuchungen zeigen, dass unter den besonderen Bedingungen der allogenen SZT protektive TH1-Antworten supprimiert sein können (Hebart et al., 2002a) und eine dysregulierte Zytokinproduktion die Entwicklung von TH1-Antworten beeinträchtigt (Mencacci et al., 2001).

HCMV nach allogener SZT

TH1-Zytokine vermitteln die Zytotoxische-T-Zellaktivität und sind damit an der Abwehr des HCMV beteiligt. Eine Dysregulation im Zytokin-Netzwerk im Rahmen der allogenen SZT mit einer prädominanten TH2-Zytokinproduktion und minimaler oder fehlender TH1-Antwort kann bei interstitieller Pneumonie durch CMV beobachtet werden. Eine der möglichen Ursachen ist die immunsuppressive Therapie zur Prophylaxe der GVHD und der Transplantatabstoßung. Einige Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Methotrexat oder Steroide beeinträchtigen selektiv die Produktion von TH1-Zytokinen (Sparrelid et al., 1997).
Eine besondere Rolle kommt den Zytokinen in der Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion zu:
Die Aktivierung des sogenannten major immediate early (MIE) Gens ist notwendig für die Einleitung des Replikationszyklus und die Reaktivierung von HCMV. TNF-α, IL1-β, IL-6 und IL-10 regulieren den MIE-Promotor hoch. Die Zytokine sind Produkte aktivierter Makrophagen. Allogene, jedoch keine syngene Transplantation in Mausmodellen induziert die Expression von MIE und die Expression inflammatorischer Zytokine, einschliesslich TNF-α.

Es wird daher angenommen, dass akute Entzündungsreaktionen die Reaktivierung einer latenten HCMV-Infektion stimulieren, und dass in allogenen Transplantationen ein analoger Prozess stattfindet (Hummel und Abecassis, 2002; Humar et al., 1999; Kline et al., 1998).
Außerdem ist HCMV selbst in der Lage über MIE-Genprodukte und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6 oder IL-8 zu induzieren. Diese Zytokine sind an der CMV-assoziierten Entzündungsreaktion beteiligt (Compton et al., 2003; Murayama et al., 2000; Geist et al., 1997; Iwamoto und Konicek, 1997). Chemokine, wie IL-8, die von HCMV-infizierten Endothelzellen produziert werden, spielen dabei über die Rekrutierung von Neutrophilen und folgender Endothel-Neutrophilen-Interaktion eine mögliche Rolle in der Virus-Dissemination (Grundy et al., 1998).

1.2 Verfahren zum Nachweis der Zytokin-Produktion

1.2.1 Überblick

Die Aufklärung der komplexen Zytokin-Interaktionen und ihrer Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder liefert die Basis zur Entwicklung therapeutischer Strategien. Das Ziel vergangener und gegenwärtiger Forschungen ist daher ein detailliertes Verständnis der Zytokin-Biologie. Zahlreiche Verfahren zum Nachweis von Zytokinen und ihrer Funktion stehen heute zur Verfügung (Whiteside, 2002).
Verschiedene ex vivo Untersuchungen messen Zytokin-Level in einer Vielzahl biologischer Proben. Über den Nachweis der Zytokin-Produktion in Körperflüssigkeiten, Geweben und Zellen lassen sich Zytokin-Profile erstellen und so qualitative und quantitative Informationen über die stattfindenden Immunprozesse gewinnen.

Der Nachweis der Zytokin-Produktion kann auf Protein- oder mRNA-Ebene erfolgen:

Protein-basierte Nachweisverfahren

In Bioassays lassen sich über Zytokin-sensitive Zelllinien nicht nur Zytokine identifizieren und quantifizieren sondern auch deren biologische Effekte bestimmen (Mire-Sluis und Thorpe, 1998).
Immunoassays weisen Zytokine über spezifische Antikörper nach.
Der Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) hat dabei Radio-immunoassays (RIA) weitgehend ersetzt. Zum quantitativen Nachweis sezernierter Zytokine ist der sogenannte sandwich oder capture ELISA der derzeit am häufigsten zur Anwendung kommende Immunoassay (Nemzek et al., 2001, Borg et al., 2002).
Die Detektion von Zytokinen auf Einzel-Zell-Ebene gibt Auskunft über Typ und Häufigkeit Zytokin-sezernierender Zellen:
Außer dem Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT), einer Modifikation des sandwich ELISA, kommen dabei Techniken der Durchflusszytometrie wie intrazelluläre Zytokinfärbung und FACS-Analysen (fluorescence-activated cell sorter) zum Einsatz (Mashishi und Gray, 2002; Meierhoff et al., 2002; Hebart et al., 2002b; Pala et al., 2000).

mRNA-basierte Nachweisverfahren

Da die Gen-Expression von Zytokinen im wesentlichen mit der Menge an produzierten Zytokinen korreliert, stellt die Quantifizierung von Zytokin-mRNA eine Alternative zu Protein-basierten Nachweisverfahren dar.
Dabei werden neben In-situ-Hybrididisierungsmethoden (ISH), Northern Blot, RNase Protection Assays (RPA) und DNA Chips oder Microarrays vorzugsweise RT-PCR-Techniken eingesetzt. Insbesondere bei kleiner Probengröße sind RT-PCR Techniken die Methode der Wahl, um mRNA-Expression

von Zytokinen zu quantifizieren, die oft nur in geringen Mengen exprimiert werden (Benveniste et al., 1998; Giuletti et al., 2001) .
Seit der Entdeckung der Reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988), wurden eine Vielzahl von Anwendungen etabliert, die Zytokin-mRNA-Expressionslevel bestimmen, darunter semi-quantitative und quantitativ kompetitive RT-PCR-Methoden (Benveniste et al., 1998; O'Garra und Viera, 1992; Gilliland et al., 1990).
Ein neuer Ansatz stellt die sogenannte real-time oder kinetische RT-PCR dar.

1.2.2 Real-time RT- PCR zum quantitativen Nachweis von Zytokin-mRNA

Mit der Real-time RT-PCR wurde ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA-Expressionsleveln entwickelt. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Higuchi et al., 1993; Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996). Die Technik hat bereits in vielen klinischen Bereichen Anwendung gefunden (Bustin, 2000) und wird nun zunehmend zur Bestimmung von Zytokin-mRNA Expressionsleveln eingesetzt (Giulietti et al., 2001; Overbergh et al., 2003).
Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Diese binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden.
Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden können zum Einsatz kommen: SYBR Green I ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und bindet generell an jede dsDNA (Morrison et al., 1998). Bei den Molecular Beacons (Tyagi und Kramer, 1996), TaqMan-Sonden (Holland et al., 1991) und Hybridisierungs-Sonden (Wittwer et al., 1997b) handelt es sich hingegen um für die Ziel-DNA

sequenz-spezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind.

Eine wachsende Anzahl von Real-time PCR Systemen steht zur Verfügung. Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch das Probenformat, die maximal einsetzbare Anzahl von Proben, die Lichtquelle und Fluoreszenzwellenlängen-Detektion sowie die für den PCR-Prozess benötigte Zeit.

Absolute Quantifizierung

Real-time PCR erlaubt neben verschiedenen relativen Quantifizierungs-strategien auch die absolute Quantifizierung von Ziel-mRNA über sogenannte externe Standards. Der Standard kann generell jede cDNA-Probe sein, die die Sequenz des Ziel-Gens enthält und deren Konzentration bekannt ist. Über eine Verdünnungsreihe dieser Probe, die in der PCR mitgeführt wird, lässt sich eine Standardkurve konstruieren und so absolute Werte (z.B. Kopienzahlen) für die Ausgangskonzentrationen unbekannter Proben ermitteln.

Normalisierung

Die Ergebnisse jeder quantitativen RT-PCR Methode, so auch der Real-time PCR, werden durch RT-PCR spezifische Störfaktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA sowie Unterschiede in der Reversen Transkription oder den PCR-Effizienzen entscheidend beeinflusst und führen zu einer Missinterpretation der ermittelten Expressionsprofile. Für eine reliable Quantifizierung ist daher eine Korrektur dieser Faktoren notwendig.

Die derzeit am meisten akzeptierte Methode ist dabei die Normalisierung der Expression des Ziel-Gens zur Expression eines Referenzgens. Das heisst, in derselben Probe wird die Expression des Ziel-Gens und des Referenzgens parallel erfasst und die ermittelten Werte des Ziel-Gens relativ zu dieser internen Kontrolle angegeben. Der Expressionslevel eines idealen Referenzgens sollte daher in unterschiedlichen Zelltypen konstant sein. Er sollte nicht aktiv reguliert werden und unter den experimentellen Bedingungen nicht variieren. Darüber hinaus sollte das Referenzgen in einem ähnlichen Level exprimiert sein wie das Ziel-Gen. Neben ribosomaler RNA dienen vorzugsweise

sogenannte Housekeeping-Gene als interne Kontrollen. Housekeeping-Gene gehören zu einer großen Gen-Gruppe, die für Proteinen kodieren, deren Aktivitäten zur Erhaltung der Zellfunktion lebensnotwendig sind. Zahlreiche Housekeeping -Gene stehen zur Verfügung. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass die Expression von Housekeeping-Genen aktiv reguliert wird und in unterschiedlichen Zelltypen variieren kann. Für die Auswahl eines geeigneten Housekeeping-Gens muss seine Expression daher unter den jeweiligen individuellen experimentellen Bedingungen geprüft werden (Giulietti et al., 2001).

1.3 Ziel der Arbeit

Als Immunmediatoren spielen Zytokine eine entscheidende Rolle in Komplikationen nach allogener SZT. Die GVHD, virale Infektionen durch HCMV und opportunistische Pilzinfektionen durch Candida albicans oder Aspergillus ssp. sind Forschungsschwerpunkte in unserem Labor. Wie in Kapitel 1.1.2.2 dargestellt sind neben anderen Zytokinen insbesondere IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN-γ und TNF-α wesentlich an der Pathophysiologie dieser Komplikationen beteiligt.

Ziel der Arbeit war es vorrangig für die genannte Auswahl an Zytokinen im LightCycler Instrument (Roche Diagnostics), einem der kommerziell erhältlichen Real-time PCR Systeme, einen Assay zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden zu etablieren. Die externen Standards für jedes nachzuweisende Zytokin sollten im Labor selbst generiert werden, um nicht auf kommerzielle Standards angewiesen zu sein. Letztendlich war beabsichtigt für das breite Spektrum an Zytokinen nach Möglichkeit ein einziges PCR-Protokoll im LightCycler Instrument zu entwickeln, um im weiteren ein ökonomisches und effizientes Arbeiten mit diesem Assay zu ermöglichen.

Desweiteren wurde die Möglichkeit der Normalisierung über ein Housekeeping-Gen demonstriert. Hierfür musste ein geeignetes Housekeeping-Gen ausgewählt und geprüft werden.

Der LightCycler-Assay soll dann für Forschungen auf dem Gebiet der allogenen SZT im Labor zum Einsatz kommen, und in diesem Zusammenhang auch zur Bestätigung von Gen-Expressionsanalysen durch DNA-Chip Experimente im Rahmen des Nationalen Genom Forschungsnetzes zur Verfügung stehen.

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	Roche Diagnostics, Mannheim
	LightCycler Carousel Centrifuge	
	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Drei Eich
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	Heraeus, Hanau
	Biogard B40-112	Baker Company,Sanford, Maine, USA
Vortex	Top-Mix 94323	Heidolph Instruments
Pipettierhilfe	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten	Variopipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

LightCycler Capillaries	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Einwegpipetten	25 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäße	0,2 ml MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, USA
	1,5 ml, 2,0 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	1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT PCR	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR	PCR Core Kit	
	LightCycler • FastStart DNA Master SYBR Green I • FastStart DNA Master Hybridization Probes • RNA Master Hybridization Probes • h-β2M Housekeeping Gene Set	

2.2 Methoden

2.2.1 Real-time PCR im LightCycler, Grundlagen

2.2.1.1 Das LightCycler Instrument

Das LightCycler Instrument besteht im Wesentlichen aus einem Thermocycler (Wittwer et al., 1990; Wittwer und Garling,1991) und einer optischen Einheit. Im Thermocycler wird die Temperatur während der einzelnen Schritte der PCR reguliert. Im Gegensatz zum Heizblock der konventionellen PCR wird hier Raumluft durch einen kleinen Ventilator in das Instrument und dort über eine Heizspirale geleitet und erwärmt. Aufgrund der geringen Wärmekapazität der Luft ermöglicht dies eine sehr schnelle Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20°C/Sekunde sowie eine Genauigkeit von ±0,3°C. Außerdem befindet sich in dieser Einheit das Probenkarusell, in dem 32 Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Probenvolumen von je 20 µl Platz finden. Das große Verhältnis Oberfläche zu Volumen der Glaskapillaren begünstigt dabei ebenfalls die kurze Zyklendauer durch rasches Aufheizen und Abkühlen der Proben in den Kapillaren. Ein Motor im Probenkarusell bringt die einzelnen Kapillaren in die korrekte Position zur optischen Einheit. Dort findet die Detektion der PCR Produkte statt: die Einheit misst über Photodioden die Fluoreszenz, die von der Spitze der Kapillare ausgeht. Damit kann die Amplifikation in Echtzeit am Monitor simultan dargestellt und verfolgt werden. Die Messzeit pro Kapillare liegt bei annähernd 20 Millisekunden. Die Analyse der Daten erfolgt durch die LightCycler Software (Version 3.5). Mit dem LightCycler Instrument lässt sich eine komplette PCR in weniger als einer Stunde durchführen (Wittwer et al., 1997a).

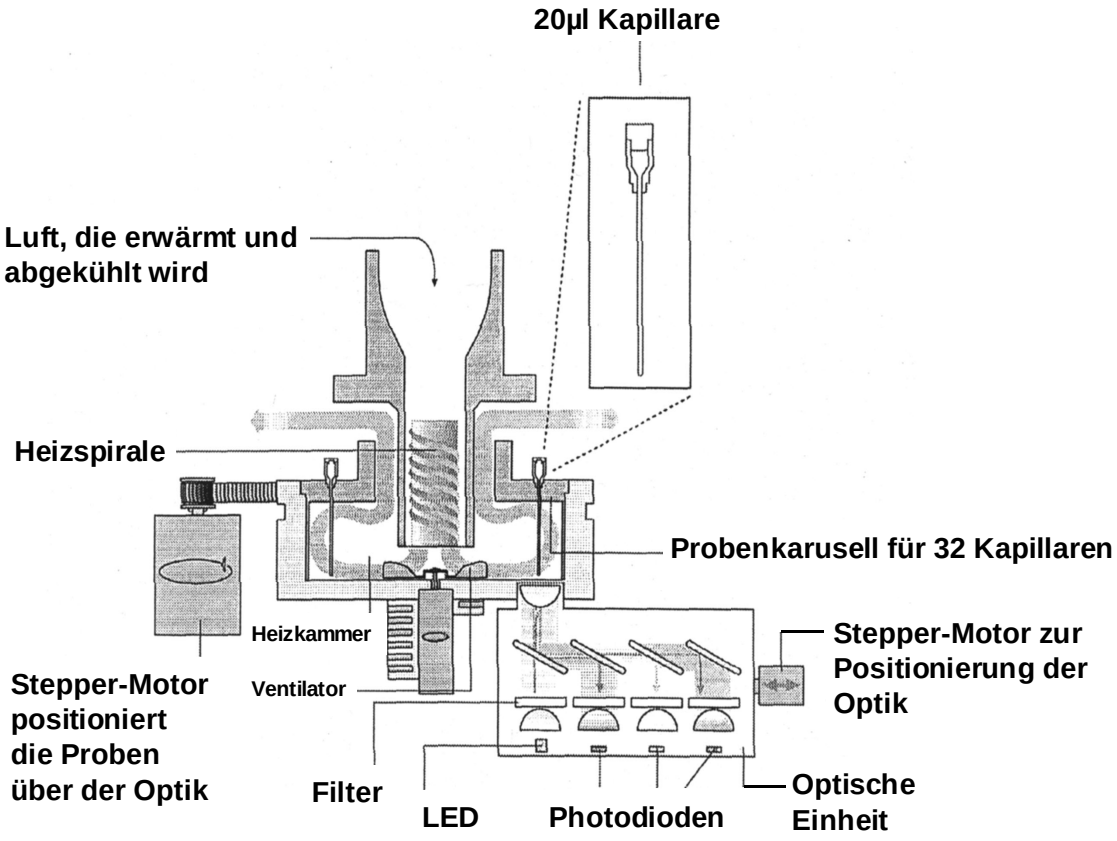


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des LightCycler Instruments
(mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics)

2.2.1.2 Detektion der PCR-Produkte über Hybridisierungs-Sonden

Die Detektion der PCR Produkte im LightCycler erfolgte in dieser Arbeit über Hybridisierung-Sonden. Es handelt sich um zwei für die Ziel-DNA sequenz-spezifische Oligonukleotide, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Sonde 1 trägt an ihrem 3`-Ende das sogenannte *Fluorescein*, Sonde 2 den Farbstoff *LightCycler Red 640* an ihrem 5`-Ende. Die Sequenz der Sonden wird so gewählt, dass sie in kleinstmöglichem Abstand (1-5 Nukleotide) zueinander mit der Ziel-DNA hybridisieren. Dies geschieht nur während der Annealing-Phase: hier liegt die DNA einzelsträngig vor und die Sonden können binden. Zum Messzeitpunkt am Ende jeder Annealing-Phase wird das *Fluorescein* durch blaues Licht (470 nm) der LED angeregt und strahlt

wiederum grünes Licht ab (530 nm). Durch die abgestrahlte Energie wird schließlich der an die 2. Sonde gekoppelte Farbstoff *LC Red 640* angeregt. Das von ihm emittierte Licht der Wellenlänge 640 nm kann dann in Kanal F2 der LightCycler-Optik registriert werden. Es empfiehlt sich die Fluoreszenz über das Verhältnis des Messkanals F2 (in dem das Signal mit steigendem PCR Produkt ansteigt) zum Kanal F1 (dessen Signal mit steigendem Produkt fällt) darzustellen (Rasmussen, 2001).

Entscheidend für die Energie-Übertragung ist der minimale Abstand zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen. Der gesamte Vorgang ist bekannt unter der Bezeichnung FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) und wurde schon mehrfach beschrieben (Wittwer et al., 1997b; Clegg, 1995).

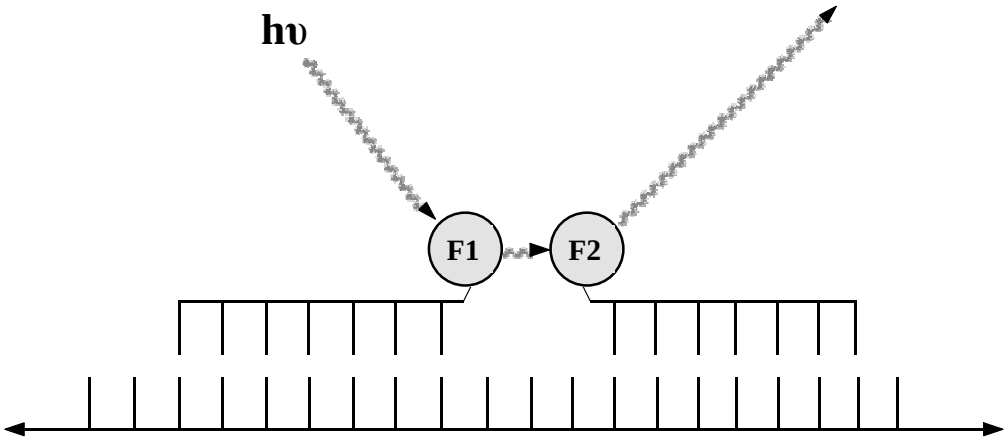


Abbildung 2: Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) in der Annealing-Phase. F1= Fluorescein; F2= LC red 640; hυ= Energie der Lichtquanten (h= Planck-Wirkungsquantum, υ= Frequenz)

2.2.1.3 Quantitative PCR im LightCycler

Im folgenden soll das Prinzip der quantitativen real-time PCR nochmals ausführlich zur Darstellung kommen, damit der Hintergrund der für die Methode speziellen Begriffe verstanden ist:

Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenz mit jedem neuen PCR-Zyklus steht in direktem Verhältnis zur PCR-Produkt-Akkumulation. Über die Software wird

die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt. Der Verlauf der PCR lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase) und eine Plateau-Phase (Abbildung 3). In der frühen Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. Abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert, und der sogenannte Crossing Point (Cp) ist definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet. Über die Crossing Points lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen.

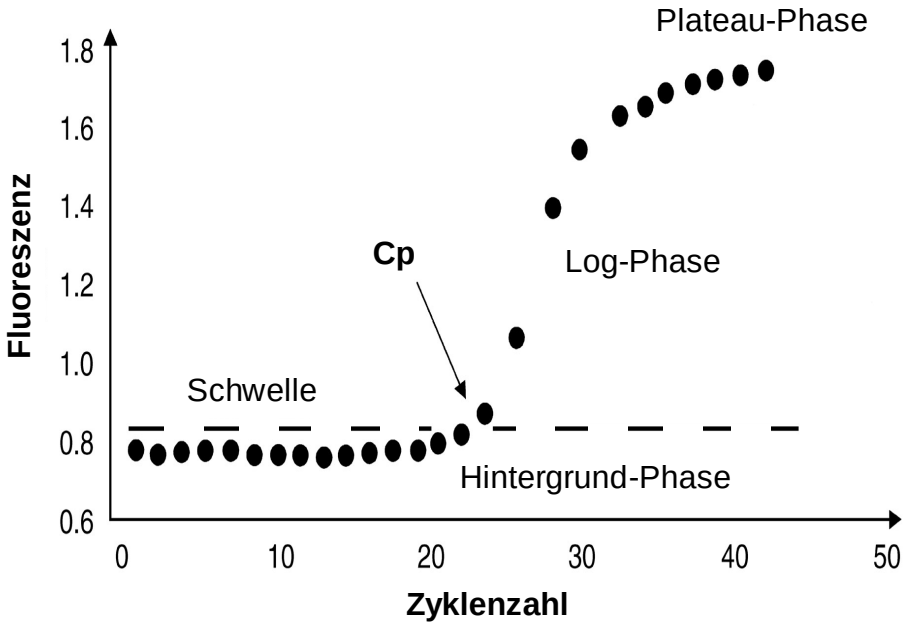


Abbildung 3: Phasen der PCR-Produktakkumulation: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl.
Cp=Crossing Point.

Eine absolute Quantifizierung über externe Standards ist dabei nach folgenden Überlegungen möglich (Rasmussen, 2001):

Die exponentielle Wachstumsphase oder log-lineare Phase der PCR ist mathematisch zu erfassen. Die Crossing Points verhalten sich dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der initial eingesetzten Kopienzahlen. Wird ein externer Standard als Verdünnungsreihe mit bekannten Ausgangs-konzentrationen in die PCR eingesetzt, bestimmt die Software ebenfalls die Crossing Points der einzelnen Verdünnungen (Abbildung 4). Über die Darstellung der ermittelten Crossing Points (**Cp**) gegen die Kopienzahlen ($\mathbf{T_0}$) der Verdünnungen erhält man eine Regressionsgerade (Standardkurve) mit der folgenden Gleichung:

$$\mathbf{Cp = -(1/\log E) * \log T_0 + (\log K/\log E)}$$

(**K** beschreibt die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist. Die Amplifikationseffizienz (**E**) kann Werte zwischen größergleich 1 und kleinergleich 2 annehmen. Ein Wert von 2 entspricht der Verdopplung der DNA pro PCR-Zyklus und damit der theoretisch besten Effizienz; ein Wert von 1 hingegen ist gleichbedeutend mit keiner Amplifikation. Die Effizienz ist unter anderem von der Ziel-DNA abhängig. Da das Ausgangsmaterial dasselbe ist, liegen in den Verdünnungsreihen auch gleiche Amplifikationseffizienzen vor.)

Die Quantifizierung von unbekannten Proben erfolgt nun durch messen der Crossing Points (**Cp**). Diese werden dann über die Gleichung der Standardkurve von der Software in Ausgangangskonzentrationen ($\mathbf{T_0}$) umgerechnet. Unter Anwendung dieser Gleichung ist entscheidend, dass die Amplifikations-Effizienz der Standards und die der Proben zumindest ähnlich sein muß.

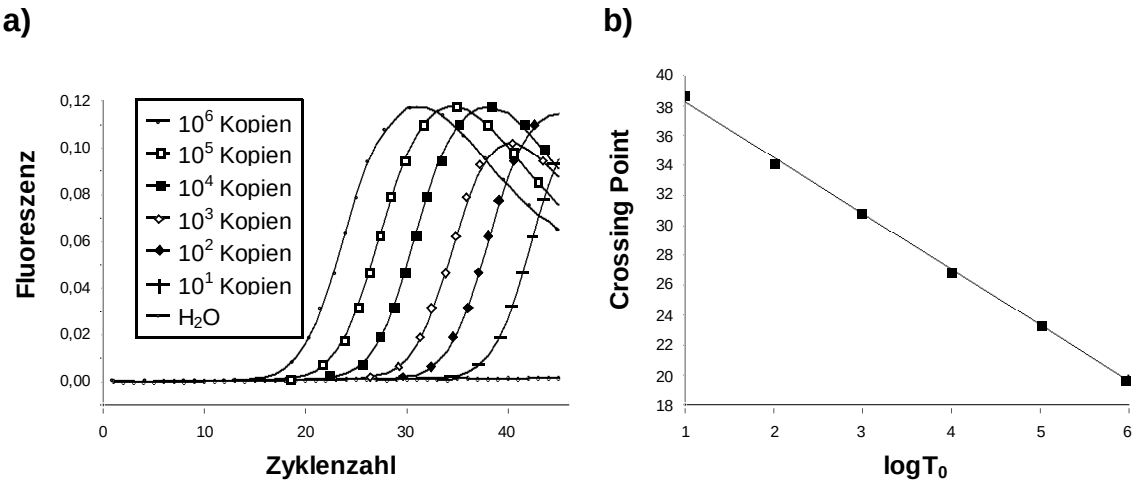


Abbildung 4: a) Verdünnungsreihe (10^6-10^1 Kopien) eines externen Standards. **b)** Entsprechende Standardkurve (Regressionsgerade), die man durch Darstellung der in a) erhaltenen Crossing Points der einzelnen Verdünnungen gegen die initial eingesetzte Kopienzahl T_0 in halblogarithmischer Form erhält.

2.2.2 Etablierung einer LightCycler RT-PCR zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA über externe Standards und Hybridisierungs-Sonden

Von Tib Molbiol (Berlin) wurden Primer und Sonden für folgende Zytokine bezogen: IL-4, IL-8, IL-10, IL-18, TNF-α, INF-γ und für das Heterodimer IL-12 Sonden und Primer für dessen Untereinheit IL-12p40. Diese wurden zusammen mit Proben zunächst über den Einsatz in einer LightCycler PCR getestet (Kap. 2.2.2.2). Der Einsatz der Primer und derselben Proben in einer konventionellen PCR diente der Herstellung eines spezifischen Amplifikats, das nach Aufreinigung und Vermessung als externer Standard im LightCycler eingesetzt werden konnte (Kap. 2.2.2.3).

2.2.2.1 Probenmaterial

Die Gewinnung der Proben erfolgte im Labor von PD Dr. Hebart der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen durch Frau Manuela Bauer.

Dort wurden PBMC aus 50 ml frischen heparinisierten venösen Blutes von gesunden Spendern gewonnen. Die PBMCs wurden über Ficoll (Biochrom AG, Berlin) durch Zentrifugation abgetrennt und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Konzentration der PBMC wurde abgestimmt auf 1 x 10^6 / ml RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kalbserum (Life Technologies, Karlsruhe). Die Inkubation erfolgte bei 37℃ und 5% CO_2 für 8 Stunden und gleichzeitiger Stimulierung durch 1% Phytohämagglutinin (PHA), 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml PMA (Phorbol-Myristat-Acetat)+Ionomycin (Sigma, Deissenhofen), 5µg/ml CAT (rekombinante Katalase) oder 5µg/ml SOD (rekombinante Mangan-Superoxiddismutase). Bei CAT und SOD handelt es sich um im Labor zur in vitro Stimulation angewendete Aspergillus fumigatus-Extrakte.

Ohne Zwischenlagerung der Proben schloss sich die RNA-Extraktion an.

- ***RNA Extraktion***

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den PBMCs wurde mittels des *RNeasy Mini Kit* auf die vom Hersteller beschriebene Art und Weise durchgeführt. Über ein System aus Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und mehren Zentrifugationsschritten wird die RNA isoliert. Zentrifugationsschritte wurden in einer Standard-Mikrozentrifuge durchgeführt. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt; schnelles Arbeiten war daher erforderlich:

Lyse

Zunächst wurden die Zellen bei 2200 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand durch Aspiration entfernt und verworfen, und das Pellet entsprechend der Zellzahl (1x10^6) in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Dieser

Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, das für die Denaturierung verantwortlich ist sowie die Inaktivierung von RNase gewährleistet. Damit ist die Isolierung von noch intakter RNA gesichert.

Homogenisierung

Das Zelllysat wurde nun direkt auf eine *QIAshredder*-Säule pipettiert, die in ein 2 ml Sammel-Tube eingebracht wird. Die nun folgende Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 min diente der Homogenisierung des Materials. Anschließend wurde 1 Volumen 70%iges Ethanol zum jetzt homogenisierten Lysat gegeben und gut gemischt.

Binden der RNA

Im nächsten Schritt wurde das gesamte Lysat (maximal 700 µl) auf die *RNeasy mini*-Säule gegeben, eingebracht in ein 2 ml Sammel-Tube, und bei 14000 rpm für 15 sec zentrifugiert. Die *RNeasy mini*-Säule adsorbiert selektiv RNA mit einer Länge > 200 Basen an einer Silikatgel-Membran. Das beigemischte Ethanol schafft hierfür optimale Bedingungen.

Waschen

Die jetzt notwendigen Waschschritte dienten der Entfernung von möglicherweise vorhandenem kontaminierendem Material. Hierfür wurden in einem ersten Schritt 700 µl Puffer RW1 auf die *RNeasy*-Säule pipettiert und bei 14000 rpm für 15 sec zentrifugiert. In ähnlicher Weise wurde in einem zweiten Schritt 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der bei jedem Waschschritt anfallende Durchfluss wurde verworfen.

Elution

Eingebracht in ein 1,5 ml Sammel-Tube wurden abschließend 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silikatgel-Membran pipettiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 min.

War die reverse Transkription nicht direkt diesem Arbeitsschritt folgend, musste die RNA bei –70℃ tiefgefroren werden. Ansonsten wurde anschließend auf Eis (4℃) weitergearbeitet, um einen Abbau der RNA in kurzer Zeit zu verhindern.

- ***Reverse Transkription***

Mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT PCR* wurde die reverse Transkription durchgeführt und dabei die Anweisungen des Herstellers ebenfalls eingehalten.

Ein Oligo-$(dT)_{15}$ –Primer bindet an die am 3`-Ende der RNA positionierte, aus bis zu 200 Adenylresten bestehende Sequenz (Poly-A-Schwanz). Dies ermöglicht der RNA-abhängigen Polymerase (AMV Reverse Transkriptase= avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) an diesem Punkt anzusetzen und von dort die RNA in DNA umzuschreiben. Hierzu stehen dem Enzym die im Reaktionsansatz vorhandenen Trinukleotide (dNTPs) zur Verfügung. Das Enzym benötigt außerdem $MgCl_2$.

Zunächst wurden je 8,2 µl RNA-Probe sowie 2 µl des Oligo-$p(dT)_{15}$-Primers in ein Eppendorfgefäß vorpipettiert. Während der anschließenden Inkubation bei 65℃ für 10 min im Wasserbad kam es zum sogenannten Anne aling, der Anlagerung des Primers an die RNA. Nach Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt und der Master-Mix wie folgt angesetzt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x Reaktions Puffer	2,0 µl	1x
25 mM $MgCl_2$	4,0 µl	5 mM
dNTP-Mix	2,0 µl	1 mM
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 U
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	>20 U
Gesamtvolumen	9,8 µl	

(Lagerung bei –20℃)

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugation des Master-Mix, wurde er der RNA und dem Primer hinzupipettiert. Die Extension fand in der nun folgenden zweiten Inkubation für 60 min bei 42℃ statt. Es schloss si ch eine letzte Inkubation für 5 min bei 96℃ an, um die AMV Reverse T ranskriptase zu

denaturieren. Damit soll eine weitere Interaktion des Enzyms mit in der PCR zugegebenen Reagenzien verhindert werden (Kawasaki, 1990).
Die nun vorliegende einzelsträngige cDNA wurde sowohl als Probe für die Durchführung einer konventionellen als auch der PCR im LightCycler Instrument eingesetzt. Eine Zwischenlagerung der cDNA in einem Volumen von 20 µl war bei 4℃ für maximal 2 Stunden oder bei –20℃ über einen längeren Zeitraum möglich.

2.2.2.2 LightCycler PCR

Zunächst erfolgten die Testläufe der von TibMolbiol bezogenen Primer und Sonden im LightCycler:

- ***Primer und Sonden Design***

Die Primer sind in Exons lokalisiert, um Co-Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Die Amplifikatlängen liegen zwischen 178bp und 518bp,
was der von Roche geforderten idealen Länge entspricht (<700bp). Da nach Anlagerung der Primer sofort die DNA-Neusynthese erfolgt und so die Ziel-Sequenz für die Sonden maskiert wird, liegen die Schmelzpunkte der Sonden im Durchschnitt um 15℃ höher als die der Primer, was die Hybridisierung der Sonden vor den Primern gewährleistet.
Die Länge der Primer liegt zwischen 18bp und 24 bp, und die der Sonden zwischen 18bp und 30bp, mit einem durchschnittlichen G/C-Anteil von 53% (Primer) und 54% (Sonden). Damit sind für Primer und Sonden die für Real-time PCR optimalen Bedingungen erfüllt (Bustin, 2000).
Für IL-4 mRNA ist der Einsatz der Sonden und Primer im LightCycler bereits beschrieben (Giehse, 2001), jedoch unter Anwendung eines anderen PCR Protokolls. Tabelle 1 gibt einen Überblick:

Tabelle 1: Primer und Sonden.
[a] F steht für Vorwärts-(forward-)primer, R für Rückwärts-(reverse-)primer;
FL=Fluorescein markierte Sonde, LC= LC red 640 markiert;
Die Zahlen kennzeichnen den Ansatz auf der Sequenz der Ziel-mRNA;
[b] Sonden in 3`→ 5` Richtung
A=Amplifikatlänge in Basenpaaren; Tm= Schmelztemperatur in ℃ (nach „2+4 - Regel“: A/T=2℃, G/C=4℃)

mRNA-Target	Oligonukleotide (5` → 3`)[a]	A (bp)	Tm (℃)
IL-4	F194: AGAAGACTCTGTGCACCGAGTTGA	305	72,0
	R499:CTCTCATGATCGTCTTTAGCCTTT		68,0
	FL356: ACAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCCT-fluorescein		86,0
	LC385: LCred 640-AAACGGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCC-p		92,0
IL-8	F26: TCTTGGCAGCCTTCCTGATT	210	60,0
	R236: TCCAGACAGAGCTCTCTTCCATC		70,0
	FL103[b]: GACATCTAAGTTCTTTAGCACTCCTTGGCA-fluorescein		86,0
	LC72[b]: LCred 640-AACTGCACCTTCACACAGAGCTGC-p		74,0
IL-10	F321: AGCTGAGAACCAAGACCCAGA	336	64,0
	R657: GGGCTGGGTCAGCTATCC		60,0
	FL400: CGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCT-fluorescein		78,0
	LC426: LCred 640-TGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGC-p		80,0
IL-12p40	F64: CTCGTGGCCATATGGGAAC	202	60,0
	R266: TGGCCAGCATCTCCAAACT		58,0
	FL144: GGTCCTCACCTGTGACACCCCTGA-fluorescein		78,0
	LC170: LCred 640-AAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACC-p		82,0
IL-18	F354: GTATGTATAAAGATAGCCGGCCTA	178	68,0
	R532: ATGTCCTGGGACACTTCTCTG		64,0
	FL439[b]: GTTCTCACAGGAGAGAGTTGAAATTTTCTC-fluorescein		84,0
	LC408[b]:LCred640-CACTTCACAGAGATAGTTACAGCCATAACCT-p		86,0
TNF-α	F367: CTCTGGCCCAGGCAGTCAGA	518	66,0
	R885: GGCGTTTGGGAAGGTTGGAT		62,0
	FL484[b]:GCATTGGCCCGGCGGTTC-fluorescein		62,0
	LC464[b]:LCred 640-CCACTGGAGCTGCCCCTCAGCT-p		74,0
INF-γ	F371: GCATCCAAAAGAGTGTGGAG	254	60,0
	R625: GCAGGCAGGACAACCATTAC		62,0
	FL491: TCCAACGCAAAGCAATACATGAACTC-fluorescein		74,0
	LC518:LCred 640-TCCAAGTGATGGCTGAACTGTCG-p		70,0

- ***LightCycler PCR Protokoll***

Für die PCR wurde ein Protokoll übernommen, das im Labor bereits im Rahmen einer quantitativen Pilz-Diagnostik etabliert worden war (Löffler et al., 2000). Lediglich Denaturierungszeit und Annealing-Temperatur wurden neu definiert:

Initialdenaturierung:	10 min bei 95℃	(20℃/s)
Amplifikation:		
Denaturierung:	3 s bei 95℃	(20℃/s)
Annealing:	15 s bei 54℃	(20℃/s)
Extension:	25 s bei 72℃	(20℃/s)
Cooling:	3 min bei 40℃	(20℃/s)

Bei einer Zahl von 45 Zyklen betrug die Dauer der kompletten PCR 48 Minuten.
Die PCR im LightCycler wurde unter Verwendung des *FastStart DNA Master Hybridzation Probes Kit* durchgeführt. Die enthaltene FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot Start"-Technologie und minimiert die Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten (Kellogg et al., 1994; Birch, 1996).

Es wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsvolumen gesamt: 20 µl (=1Kapillare)

- Proben: 2µl cDNA, ergänzt mit 8ml H_2O
- Master-Mix: 10µl

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H_2O	2,6 µl	-
$MgCl_2$	2,4 µl	3 mM
Primer 1	0,5 µl	0,125 µM
Primer 2	0,5 µl	0,125 µM
Sonde 1	1,0 µl	0,15 µM
Sonde 2	1,0 µl	0,15 µM
FastStartTaq Polymerase+PCR-Puffer+dNTP-Mix (10xconc.)	2,0 µl	1 x

Eine Negativkontrolle (H_2O, 10µl) wurde stets mitgeführt.
Die Lagerung einmal angesetzter Taq Polymerase, Primer und Sonden war bei 4℃ für einen Monat möglich. Zu häufiges Kühlen und w ieder Erwärmen sollte vermieden werden. Alle anderen Reaktionskomponenten können zwischen –15 und –20℃ für 1 Jahr gelagert werden.
Die Validierung dieser Testläufe geschah nach folgendem Kriterium:
Die LightCycler Software stellt den Verlauf der PCR über die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dar. Es sollte sich dabei für die Testläufe eine über einen weiten Bereich regelmäßige Log-Phase zeigen.

2.2.2.3 Generierung der externen Standards

Vorraussetzung für die absolute Quantifizierung über externe Standards ist, dass der Standard die Sequenz der Ziel-DNA in bekannter Konzentration enthält. Zur Generierung eines Standards werden vorzugsweise Ziel-cDNA-Fragmente mit einem Plasmid-Vektor kloniert, aber auch in vitro transkribierte RNA-Standards kommen zum Einsatz (Giulietti et al., 2001; Overbergh et al., 2003; Stordeur et al., 2002). Als Alternative kann auch eine aufgereinigte spezifische Ziel-dsDNA , die in einer konventionellen PCR gewonnen wird, als Standard dienen (Yin et al. 2001; Rasmussen, 2001; Giulietti et al., 2001).
Letztere Methode wurde angewandt, um für die einzelnen Zytokine einen externen Standard zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA im LightCycler zu generieren.
Zunächst wurden über konventionelle PCR spezifische Amplifikate gewonnen, ein Amplifikat aufgereinigt und photometrisch vermessen, dann die Kopienzahl in der Stammlösung berechnet und eine Verdünnungsreihe angesetzt.
Anschließend folgte der Einsatz der Standard-Verdünnungsreihen im LightCycler.

- ***Gewinnung der spezifischen Amplifikate über konventionelle PCR***

Die konventionelle PCR wurde im GeneAmp 2400 unter Verwendung des *PCR Core Kit* durchgeführt. Dieselben Primer des entsprechenden Zytokins, die zuvor im LightCycler getestet wurden, kamen zum Einsatz. Es wurden außerdem dieselben Proben, die im vorangegangenen LightCycler Lauf eingesetzt worden waren, jetzt in der konventionellen PCR verwendet. Es handelte sich dabei um einige ausgewählte Proben, bei denen durch den LightCycler Testlauf über die Crossing Points auf eine - im Vergleich zu den anderen Proben - höhere Ausgangskonzentration an Zytokin-mRNA geschlossen werden konnte. Nach der PCR wurden die Amplifikationsprodukte in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Für alle Zytokine mit Ausnahme von IL-12p40 (s.u.) konnte nach mehreren Versuchen ein PCR Protokoll eingesetzt werden, in dem lediglich die Zyklenzahl variiert werden musste.

mRNA-Target	Initialde-naturierung	Zyklus			Extension	Zyklen-zahl
		Denatu-rierung	Annealing	Extension		
IL-4	95℃, 5min	95℃, 45s	55℃, 45s	72℃, 60s	72℃, 10min	31
IL-8						23
IL-10						33
IL-18						40
TNF-α						28
INF-γ						24

Es wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsvolumen gesamt: 50 µl

- Proben: 2µl cDNA
- Master-Mix: 48µl

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H_2O	40,7 µl	-
PCR Puffer,10xkonz. ($MgCl_2$, KCl)	5,0 µl	1,5 mM $MgCl_2$
dNTP	1,0 µl	0,2 mM
Primer 1	0,5 µl	0,05 µM
Primer 2	0,5 µl	0,05 µM
Taq Polymerase	0,3 µl	1,5 U/50µl

Es wurden zunächst die Proben in ein 0,2 ml PCR Tube pipettiert, anschließend der Master-Mix angesetzt und hinzupipettiert. Eine Negativkontrolle (H_2O, 2 µl) wurde mitgeführt.
Die *PCR Core Kit* Komponenten wurden bei –20℃ gelagert.

- ***Gel-Elektrophorese***

Die Amplifikate wurden anschließend zusammen mit einem Größenmarker (100bp; *READY LOAD 100bp DNA Ladder*) elektrophoretisch bei 100 V für 1 Stunde in 2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Pufferung der Gelkammer erfolgte durch 1 x TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat ; ph 7,5 ; 2mM Na-EDTA). Durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (*Gel Star*) konnten die Amplifikationsprodukte unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis fotografisch festgehalten werden.
Ein Vergleich der Bande der Amplifikate mit dem mitgeführten Größenmarker ermöglichte eine ungefähre Angabe der Amplifikatlänge in Basenpaaren (bp). Die Spezifität der Amplifikate war gegeben, wenn sich im Gel nur eine einzige Bande zeigte, und diese einer Amplifikatlänge entsprach, die mit der für die jeweiligen Primer und Zytokin-mRNA berechneten Länge übereinstimmte (siehe Tabelle 1). Die Berechnung der Amplifikatlängen erfolgte über ein Programm auf der Homepage des *National Center of Biotchnology Information* im Internet (*www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/*).
Zeigte also die Gel-Elektrophorese eine spezifische Bande, und entsprach diese der über NCBI berechneten Amplifikatlänge, konnte das Amplifikat aufgereinigt werden.

- ***Aufreinigung***

IL-4, IL-8, IL-10, IL-18, INF-γ, TNF-α
In Abhängigkeit von der Intensität der Bande im Gel wurde anschließend die dsDNA der Amplifikate mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.
Es handelte sich dabei um die Amplifikate, die im Gel die Bande mit der

stärksten Intensität zeigten.

Es wurden je 40 µl PCR-Produkt über eine DNA-Trennsäule aufgereinigt:

- *Binden der DNA* Zunächst wurden 200 µl Puffer PB zugegeben; das Gemisch dann in die *QIAquick*-Trennsäule pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 1min.
- *Waschen* Um die PCR-Beiprodukte zu entfernen, wurden 0,75 ml Puffer PE zur Trennsäule hinzugegeben und bei 13000rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dann wiederholt. Der bei jedem Zentrifugationsschritt anfallende Durchfluss wurde verworfen.
- *Elution* Den Anweisungen des Herstellers folgend wurden 30 µl Elutions-Puffer direkt auf die Säule pipettiert, 1 min gewartet und dann bei 13000rpm für 1 min zentrifugiert, um eine größtmögliche Konzentration an dsDNA im Eluat zu gewinnen.

IL-12p40

Das Ergebnis der konventionellen PCR für IL-12p40 war nicht erfolgreich, da sich in der Gel-Elektrophorese immer wieder unspezifische Banden zeigten. Die spezifische Bande war jedoch stets vorhanden. Über den *QIAquick Gel Extraction Kit* war es möglich diese Bande aus dem Gel zu isolieren und auf diese Weise ein spezifisches Amplifikat zu gewinnen:

Zunächst wurde mit 2 Proben eine konventionelle PCR durchgeführt unter den Bedingungen, die bis dahin für die spezifische Bande bei 202bp das beste Ergebnis geliefert hatten:

Initialdeanturierung:	95℃,10 min
Zyklus:	
Denaturierung:	95℃, 45s
Annealing:	56℃, 45s
Extension:	72℃, 60s
Extension:	72℃, 10min
40 Zyklen	

Pipettiert wurde nach dem oben beschriebenen Schema.

Die 2 Amplifikate wurden anschließend über den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt, und nochmals in der konventionellen PCR eingesetzt, um ausreichende Mengen an Amplifikat zu gewinnen; die Zyklenzahl wurde auf 15 Zyklen reduziert. Die Gel-Elektrophorese dieser Amplifikate machte die Isolierung der für IL-12p40 spezifischen Bande über *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel möglich:

Hierfür wurde von beiden Amplifikaten je 50µl PCR-Produkt in das Gel gebracht und bei 80V für 90min aufgetrennt. Eine Negativkontrolle wurde immer mitgeführt. Die Gel-Elektrophorese zeigte folgendes Bild:

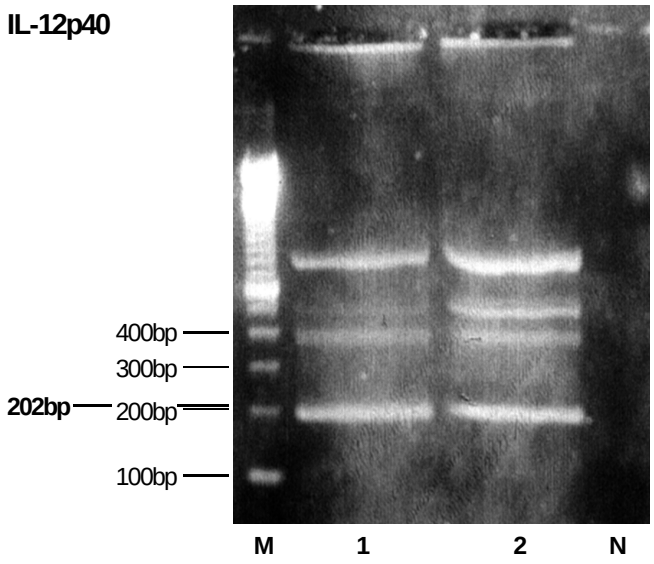


Abbildung 5:
M: DNA-Größenmarker (100bp)
N: Negativkontrolle (H_2O)
Die spezifische Bande liegt für IL-12p40 bei 202bp.

Der *QIAquick Gel Extraction Kit* ermöglicht die Aufreinigung von DNA (mit einer Länge von 70bp-109kbp) aus dem mit TAE gepufferten Agarose-Gel. Bis zu 400 mg Agarose-Gel können pro Säule bearbeitet werden.

Unter UV-Sicht wurde die spezifische Bande (siehe Abbildung 5) der Amplifikate 1 und 2 identifiziert und mit einem sterilen Skalpell herausgetrennt, wobei versucht wurde den Gel-Anteil minimal zu halten. Das isolierte Gel-Fragment wurde in ein 2 ml Tube eingebracht und die Masse bestimmt (Amplifikat1: 300 mg; Amplifikat 2: 250mg). Der Puffer QG wurde entsprechend der Masse der Fragmente zugegeben (300 µl Puffer zu 100 mg Gel). Um die Gel-Fraktion in Lösung zu bringen, folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 50℃ für 10 min, alle 2 min wurde gevortext. Die Inkubation sollte solange

fortgesetzt werden bis sich das Material homogen in Lösung befand. Außerdem sollte der Puffer QG mit der Farbe gelb einen pH Wert der Lösung < 7,5 anzeigen, da die Adsorption der DNA an der Säule nur in diesem Bereich effizient verläuft.

- *Binden der DNA* Die Zugabe von 100 µl Isopropanol (100%) je 100 mg Gel-Fragment erhöhte die Ausbeute an DNA mit der Länge von <500bp oder >4kbp (IL-12p40-Amplifikat: 202bp). Anschließend wurde die Lösung in die *QIAquick*-Trennsäule pipettiert. Das Volumen durfte dabei 800 µl nicht überschreiten; die Lösungen der 2 Amplifikate wurden daher auf 4 Trennsäulen verteilt (1a: 800 µl; 1b: 700 µl; 2a: 800 µl; 2b: 450 µl). Es folgte eine Zentrifugation bei 13000rpm für 1min, der Durchfluss wurde verworfen.
- *Waschen* Durch Zugabe von 0,75 ml Puffer PE und zweimaliges Zentrifugieren bei 13000rpm für je 1 min wurden PCR-Nebenprodukte entfernt. Der Durchfluss wurde verworfen.
- *Elution* Um wiederum ein Optimum an DNA-Ausbeute im Eluat zu erreichen wurden 30 µl Elutionspuffer direkt auf die Säule pipettiert, 1 min gewartet, und abschließend bei 13000rpm für 1 min zentrifugiert.

Eine abschließende Kontrolle der isolierten und aufgereinigten Amplifikate erfolgte über eine weitere Gel-Elektrophorese, um eine Kontamination bei der Präparation der Bande im Gel auszuschliessen.

- ***Vermessung***

Um die Konzentration an dsDNA im Eluatpuffer zu bestimmen wurden die aufgereinigten Amplifikate photometrisch vermessen. Bei 260 nm wurde die Extinktion für dsDNA , bei 280 nm die Extinktion für Proteine bestimmt. Der Quotient aus der Extinktion bei 260nm zu 280nm wurde als Maßstab für die Reinheit der DNA betrachtet, wobei ein Quotient von 1,7 bis 1,9 als ideal angenommen wurde. Es wurden je 7 µl vermessen; zunächst wurde ein Leerwert eingesetzt (H_2O), dann die Proben.

- ***Berechnung der Kopienzahl***

Nach photometrischer Vermessung war die Konzentration (C) an dsDNA des jeweiligen aufgereinigten Amplifikats im Eluatpuffer gegeben (C [µg/ml]).
Die entsprechende Kopienzahl wurde nach folgender Formel berechnet (Giulietti et al., 2001; Overbergh et al., 2003):

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

Am Beispiel des IL-8 Standards seien die Rechenschritte zur Bestimmung der Kopienzahl in der Stammlösung des Standards im Detail aufgeführt:

Die Amplifikatlänge über *NCBI* berechnet beträgt für IL-8: 210bp
Nach obiger Formel erhält man:

$$210bp\ dsDNA = 4{,}76 * 9{,}1 * 10^{11}\ Kopien/\mu g$$
$$X = \underline{43{,}3 * 10^{11}\ Kopien/\mu g}$$

Die im Photometer ermittelte **Konzentration (C)** an dsDNA lag für Amplifikat 1 bei:

$$C = \underline{12{,}2\ \mu g/ml}$$

Die **Kopienzahl (K)** berechnete sich dann aus:

$$K = C\ \mu g/ml * X\ Kopien/\mu g$$
$$= 12{,}2\ \mu g/ml * 43{,}3 * 10^{11}\ Kopien/\mu g$$
$$= 528{,}26 * 10^{11}\ Kopien/ml$$
$$= 5{,}2826 * 10^{13}\ Kopien/ml$$
$$= \underline{5{,}28 * 10^{10}\ Kopien/\mu l}$$

Damit stand für jedes Zytokin ein aufgereinigtes spezifisches Amplifikat mit bekannter Konzentration an spezifischer Zytokin-dsDNA zur Verfügung, das nunmehr als externer Standard im LightCycler eingesetzt werden konnte.

2.2.2.4 Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR

Nach Ansetzen von Verdünnungsreihen der Amplifikate folgte die Durchführung der LightCycler PCR mit den Standardverdünnungsreihen aller Zytokine nach dem in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen LightCycler Protokoll. Die Verdünnungen der Standards wurden zu je 10 µl eingesetzt. Der eingesetzte Verdünnungsbereich lag zunächst zwischen 10^{10} -10^{1} bzw.10^{9}– 10^{1} Kopien (Verdünnung jeweils 1:10). Um das Risiko von Kreuz-Kontaminationen während des Pipettiervorgangs zu minimieren wurde der Konzentrationsbereich in weiteren Läufen auf 10^{6}-10^{1} Kopien reduziert. Eine Negativkontrolle (H_2O) wurde stets mitgeführt.
Die Stammlösungen der Zytokin-Standards wurden bei –20℃ gelagert.

Eine Kontrolle der Spezifität der Sonden und Primer erfolgte exemplarisch für den Il-12p40-Standard auch nach Einsatz der Standardverdünnungsreihe und unbekannten Proben in die LightCycler PCR über die Gel-Elektrophorese.
Der mehrmalige Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR diente dann der Überprüfung der Linearität der Standardkurven, der Amplifikationseffizienzen, der Sensitivität sowie der Reproduzierbarkeit des Assays. Dabei wurde die LightCycler PCR mit den Standardverdünnungsreihen für IL-4, IL-10, sowie IL-18 n=3 mal wiederholt, für IL-12p40 n=4 mal, für IL-8 n=5 mal, für TNF-α n=6 mal und für IFN-γ n=16 mal.
Auch ein Vergleich der Amplifikationseffizienzen von Standards und Proben wurde durchgeführt.

2.2.3 Exemplarische Darstellung der Normalisierung absoluter Werte der Zytokin-Genexpression gegen die Expression des Housekeeping-Gens h-β2M

Roche bietet eine Reihe von Kits an, die unterschiedliche Housekeeping-Gene zur Normalisierung von mRNA-Expressionsleveln im LightCycler Instrument enthalten. Die Wahl fiel auf ein Housekeeping Gen, das für das humane β2-Mikroglobulin (h-β2M) kodiert. H-β2M gehört zum MHC I-Komplex. Das Housekeeping-Gen wird nach Angaben von Roche in den meisten Geweben stabil exprimiert, Pseudogene sind bisher nicht bekannt (Pallisgaard et al., 1999; Degan et al., 2000; Waha et al., 1998). H-β2M besitzt einen mittleren Expressionslevel (Bishop et al., 1974).

Für einen quantitativen Assay zur Bestimmung der β2M-Expression in PBMCs wurden zwei kommerzielle Kits von Roche kombiniert. Mit diesem Assay wurde geprüft, ob sich das Housekeeping-Gen zur Normalisierung von Werten des Zytokin-Assays in PBMCs für bestimmte Stimuli eignet. Daraufhin wurde eine normalisierte Quantifizierung von Zytokin-Expressionsleveln in PBMCs über das Housekeeping-Gen h-β2M exemplarisch dargestellt.

2.2.3.1 Absolute Quantifizierung von h-β2M-mRNA als Ein-Schritt-RT-PCR

Zur Quantifizierung der h-β2M-Expressionslevel kamen die folgenden zwei Kits zur Anwendung:

h-β2M Housekeeping Gene Set

Es enthält einen RNA-Standard, der für ein Fragment des h-β2M kodiert und in der Verdünnung von $5x10^2$ Kopien/5ml bis $5x10^6$ Kopien/5µl vorliegt. Ein Detektions-Mix enthält neben $MgCl_2$ die spezifischen Primer und Sonden für die h-β2M-mRNA. Die Primer und Sonden sind laut Angaben des Herstellers so konzipiert, dass keine Co-Amplifikation von kontamininierender DNA detektiert wird.

RNA Master Hybridization Probes Kit

Der Kit enthält die sogenannte Tth-Polymerase. Sie wird von dem Eubakterium *Thermus thermophilus spec.* isoliert und aufgereinigt. Das thermostabile Enzym besitzt in Anwesenheit von Mn^{2+}-Ionen sowohl RNA-abhängige reverse Transkriptions- als auch DNA-abhängige Polymerase-Aktivität (Chioccia und Smith 1997; Myers und Gelfand 1991). Über sogenannte Aptamere-Oligonukleotide, die durch binden an das aktive Zentrum des Enzyms dessen Bindung an die Zielmoleküle bei nicht optimalen Temperaturen verhindern-kommt auch hier die „Hot Start"-Technik zum Einsatz. Die Tth-Polymerase schreibt generell jegliche RNA in cDNA um; die über die Primer definierte Amplifikatlänge sollte dabei 750bp jedoch nicht überschreiten, was für alle Zytokin-Amplifikate der Fall ist. Die Tth-Polymerase, ein Reaktions-Puffer sowie ein dNTP-Mix (mit dUTP anstatt dTTP) liegen in einem Ansatz vor (=*RNA Master Hybridization Probes*). Der Kit enthält außerdem eine $Mn(OAc)_2$-Stammlösung(50mM).

Durch Kombination des *h-β2M Housekeeping Gene Set* und des *RNA Master Hybridization Probes Kit* resultierte eine Ein-Schritt (Onestep) RT-PCR, das heißt, die reverse Transkription wie auch die anschließende DNA-Amplifikation fanden im LightCycler statt.

Für diese Onestep-RT-PCR durch Kombination der beiden Kits wurde ein von Roche empfohlenes Protokoll übernommen. Wesentliche Änderungen mussten nicht vorgenommen werden:

Reverse Transkription:	20 min bei 61℃	(20℃/s)
Initialdenaturierung:	30 sec bei 95℃	(20℃/s)
Amplifikation:		
Denaturierung:	1 s bei 95℃	(20℃/s)
Annealing:	15 s bei 54℃	(20℃/s)
Elongation:	13 s bei 72℃	(2℃/s)
Cooling:	30 s bei 40℃	(20℃/s)

Zyklenzahl: 45

Die Ein-Schritt RT-PCR ließ sich in 45 min durchführen.

Es wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionsvolumen gesamt: 20 µl (=1Kapillare)

- Proben: 5 µl RNA
- Standards: 5 µl
- Master-Mix: 15µl

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H_2O	4,2 µl	-
$Mn(OAc)_2$	1,3 µl	3,25 mM
h-β2M-Detektions-Mix (10 x conc.)	2,0 µl	1 x
RNA-Master Hybridization Probes (2,7 x conc.)	7,5 µl	1 x

Eine Negativkontrolle (H_2O, 5µl) wurde mitgeführt.
Der RNA-Standard musste bei –80℃, alle anderen Reagenzien konnten bei –20℃ gelagert werden.

Für den Assay wurde zunächst festgestellt, ob sich für den Housekeeping-Standard und die Proben ähnliche Amplifikationseffizienzen ergeben.

Für den Einsatz als Referenzgen in PBMCs sollte die Expression von h-β2M-mRNA auf Stimulation hin nicht aktiv reguliert sein, was mit diesem Assay für eine Auswahl an Stimuli (LPS, PHA, PMA+Ionomycin, CAT und SOD) geprüft wurde.

2.2.3.2 Normalisierung der Zytokin-Expressionslevel in stimulierten und unstimulierten PBMCs über das Housekeeping Gen h-β2M

Für die exemplarische Darstellung der normalisierten Quantifizierung absoluter Werte der Zytokin-Genexpression gegen die des Housekeeping-Gens β2M wurden folgende 2 Target-Gene ausgewählt: IL-12p40 und INF-γ.
Als Proben diente RNA bzw. cDNA von unstimulierten, LPS- sowie PHA-stimulierten PBMCs. Zunächst wurden die RNA-Proben in die Onestep-PCR eingesetzt und die absoluten Werte der β2M-Expression in den Proben ermittelt. Es folgte eine manuelle Umschreibung der extrahierten RNA und Bestimmung der absoluten Kopienzahlen von IL-12p40 und IFN-γ über die generierten externen Standards.
Die normalisierten Kopienzahlen für die Expression von IL-12p40 und IFN-γ-mRNA in stimulierten PBMCs im Vergleich zu unstimulierten PBMCs wurden nach dem folgenden Schema berechnet (Stordeur et al., 2002):

Normalisierung gegen β2M

Die Berechnung des Verhältnisses der absoluten Kopienzahlen von β2M-mRNA in unstimulierten Proben zu β2M-mRNA in stimulierten (LPS oder PHA) Proben resultierte in einem Korrekturfaktor F für die jeweils stimulierte Probe (F=1 für die unstimulierten Proben, da Verhältnis unstimulierte Probe zu unstimulierter Probe). Damit werden geringe Unterschiede in der Housekeeping-Gen-Expression unter den PCR-Bedingungen korrigiert (Giulietti et al., 2001). Die normalisierte Kopienzahl $K_{norm.}$ für die Zytokin-mRNA Expression folgte dann aus:

$K_{norm.}$ = absolute Kopienzahl Zytokin-mRNA (unstimuliert oder stimulierte Probe) x F

Verhältnis von Zytokin-mRNA in stimulierten zu unstimulierten Proben

Die relative Kopienzahl $K_{rel.}$ ergab sich schließlich aus:

$$K_{rel.} = \frac{K_{norm.} \text{ stimulierte Proben}}{K \text{ unstimulierte Proben}}$$

Die Auswertung erfolgte manuell über Microsoft Excel.

3. Ergebnisse

3.1 LightCycler Assay zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-Genexpression

3.1.1 Spezifität

Die Spezifität der Primer und Sonden war zunächst nach Einsatz in die LightCycler PCR getestet worden: Bei der Darstellung der Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl zeigte sich in allen Läufen eine regelmäßige Log-Phase.
Die folgenden Abbildungen zeigen die Kontrolle der Spezifität der externen Standards über die Gel-Elektrophorese:
Einmal bei der Generierung der Standards nach konventioneller PCR (Abb. 6 und 7) sowie exemplarisch nach Einsatz der Standardverdünnungsreihe von IL-12p40 mit unbekannten Proben in die LightCycler PCR (Abb. 8).

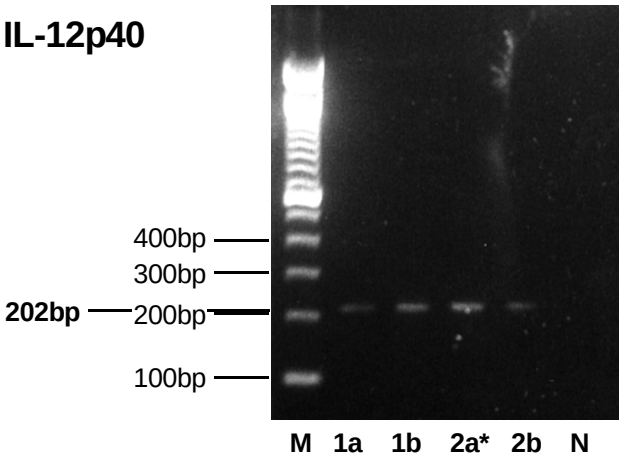


Abbildung 6:
Kontrolle der Amplifikate 1a, 1b, 2a, 2b im Gel nach konventioneller PCR und Extraktion der spezifischen Bande für IL-12p40.
M:DNA-Größenmarker(100bp)
N: Negativkontrolle (H_2O)
Das mit * gekennzeichnete Amplifikat wurde aufgereinigt und vermessen und diente dann als externer Standard.

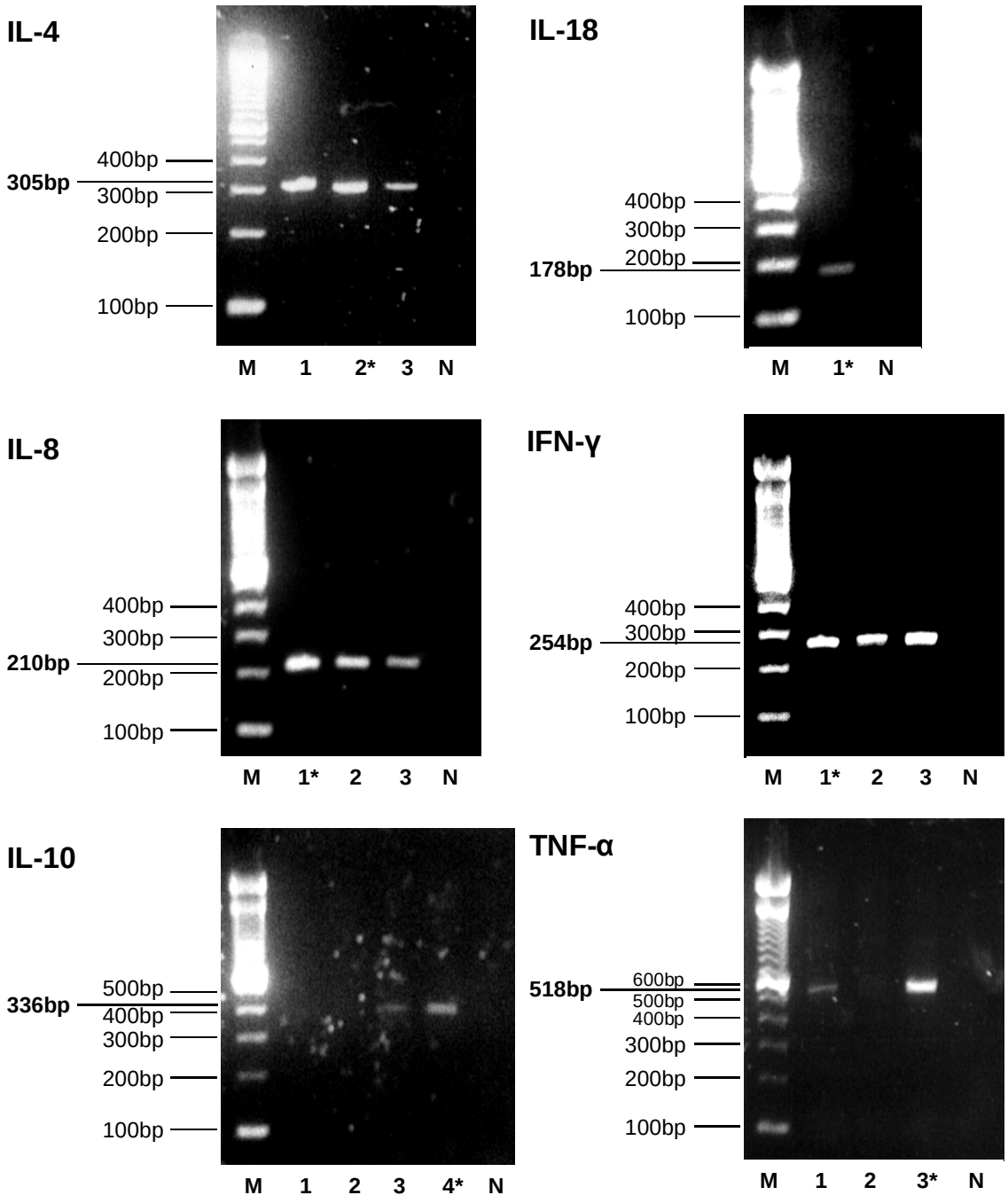


Abbildung 7: Gel-Elektrophorese der spezifischen Amplifikate für IL-4, IL-8, IL-10, IL-18, IFN-γ und TNF-α nach konventioneller PCR.
M: DNA-Größenmarker (100bp)
N: Negativkontrolle (H_2O)
Die Amplifikate sind durchnumeriert; das mit * gekennzeichnete Amplifikat wurde aufgereinigt und vermessen und diente dann als externer Standard.

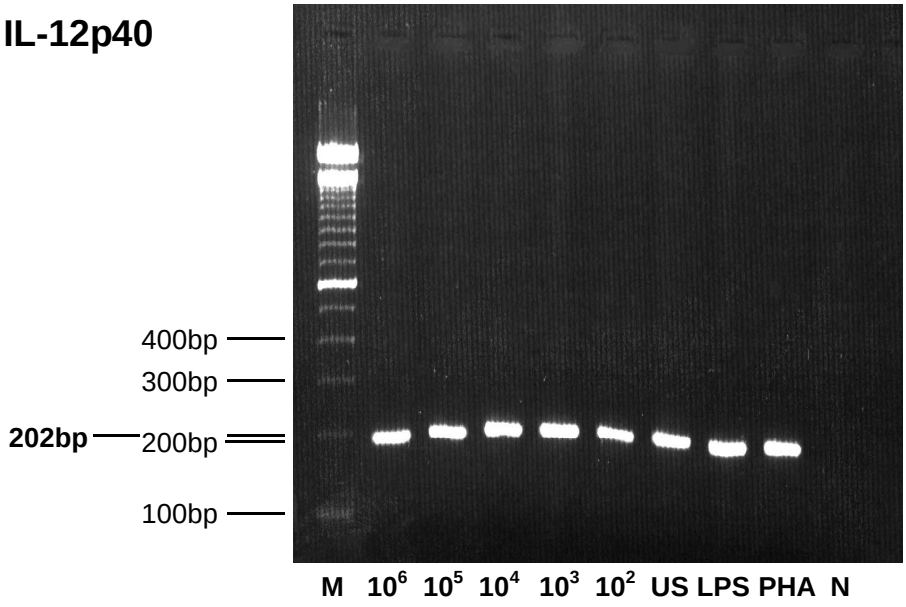


Abbildung 8: Gel-Elektrophorese nach dem LightCycler-Lauf am Beispiel der IL-12p40-Standardverdünnungsreihe (10^6-10^2 Kopien/10µl) und 3 Proben: cDNA aus unstimulierten (US), LPS-stimulierten (LPS) und PHA-stimulierten (PHA) PBMCs.
M: DNA-Größenmarker (100bp)
N: Negativkontrolle (H_2O)

Die berechneten Amplifikatlängen sind orientierend markiert. Im Rahmen der Meßungenauigkeit der Gel-Elektrophorese sind in jedem Gel die für das jeweilige Zytokin-Target spezifische Bande zu erkennen. Es findet keine Coamplifikation unspezifischer DNA statt.

3.1.2 Linearität

Für jede Standardkurve wurde von der LightCycler Software der lineare Korrelationskoeffizient r angegeben. Ein linearer Korrelationskoffizient von r=-1 wurde für alle Standardkurven in jedem PCR-Lauf ermittelt.
Die folgende Abbildung zeigt am Beispiel des IL-18-Standards den original LightCycler-Ausdruck nach Einsatz der Standardverdünnungsreihe in die LightCycler PCR.

IL-18

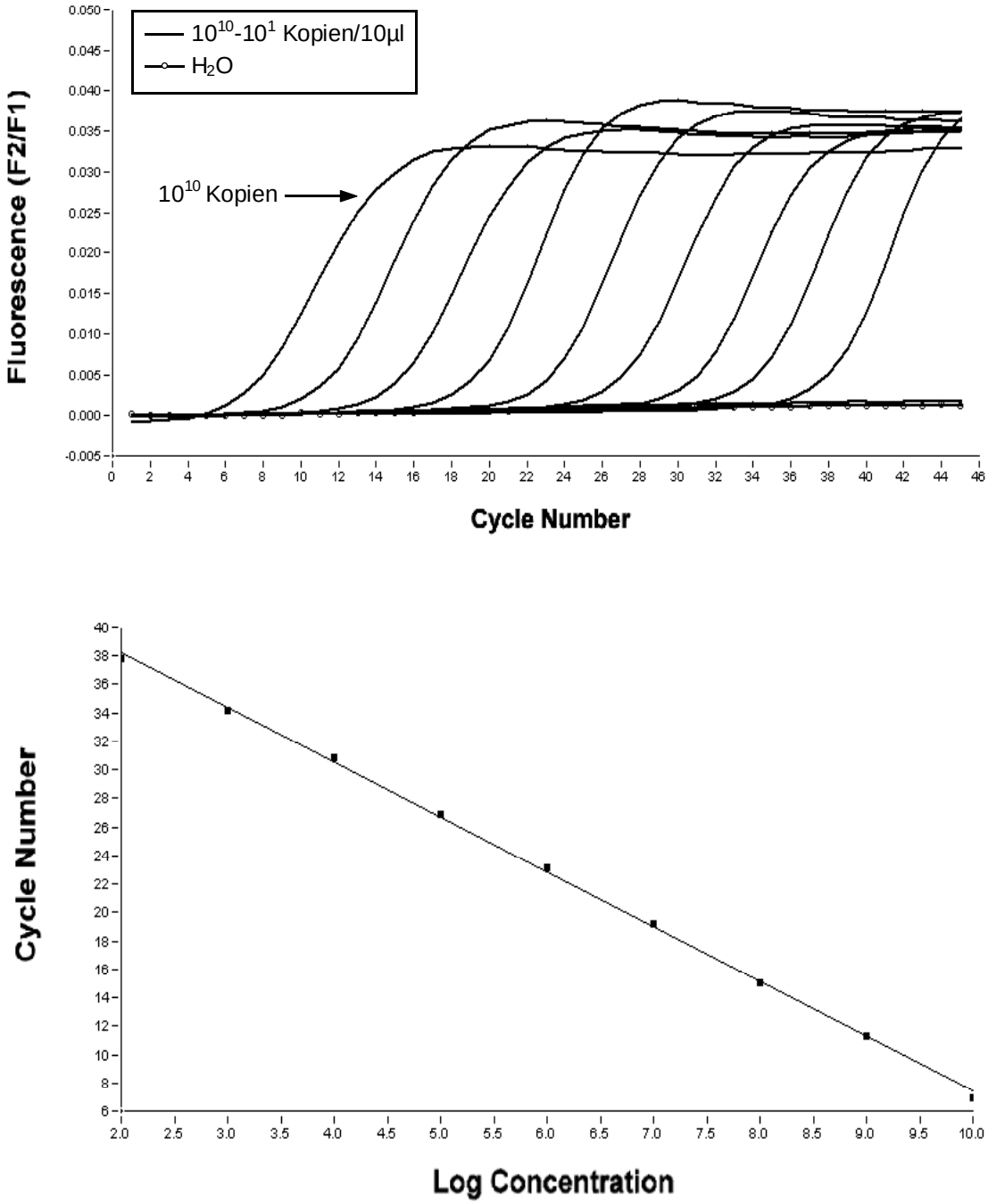


Abbildung 9: Verdünnungsreihe (10^{10}-10^{1} Kopien/10µl) und entsprechende Regressionsgerade des IL-18 Standards.
r = -1,00

3.1.3 Sensitivität

Als Indikator für die Sensitivität des Assays dient die kleinste Konzentration der Standardverdünnungsreihen, die unter den PCR-Bedingungen amplifiziert wird. Die untere Detektionsgrenze lag dabei zwischen 10^1 Kopien für den IL-4-, IL-8-, IL-10-, TNF-α-, und IFN-γ-cDNA Standard und 10^2 Kopien für den IL-12p40- und IL-18-cDNA Standard.

3.1.4 Amplifikationseffizienz

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

Amplifikationseffizienz der Standards:
Eine theoretisch optimale Amplifikationseffizienz ist E=2, was der Verdopplung der DNA mit jedem PCR-Zyklus entspricht. Folgende Amplifikationseffizienzen wurden für die Regressionsgeraden der Standardverdünnungsreihen ermittelt:

Tabelle 2: Mittelwerte E der Amplifikationseffizienzen der Standard-verdünnungsreihen für n LightCycler-PCRs.
M: Median der Effizienzen;
s : Standardabweichung vom Mittelwert

Standardverdünnungsreihe	**E**	M	s	n
IL-4	**1,87**	1,86	0,10	3
IL-8	**1,91**	1,90	0,17	5
IL-10	**1,80**	1,80	0,05	3
IL-12p40	**1,94**	1,92	0,12	4
IL-18	**1,83**	1,82	0,06	3
TNF-α	**1,92**	1,91	0,23	6
IFN-γ	**1,93**	1,91	0,19	16

Vergleich der Amplifikationseffizienz von Standard und Proben (PBMCs):

Die Amplifikationseffizienz E einer Probe wird durch Einsatz einer Verdünnungsreihe der Probe in die LightCycler PCR unter Angabe eines willkürlich gewählten Konzentrationsbereiches geprüft. Die Software ermittelt dann eine Regressionsgerade, über deren Steigung dann ebenfalls die Effizienz berechnet werden kann. Exemplarisch wurde dies für eine LPS stimulierte Probe (PBMCs) durchgeführt (eingegebene Verdünnung: 10^6-10^3). Die Probe wurde auf IFN-γ cDNA detektiert (Abb. 10)

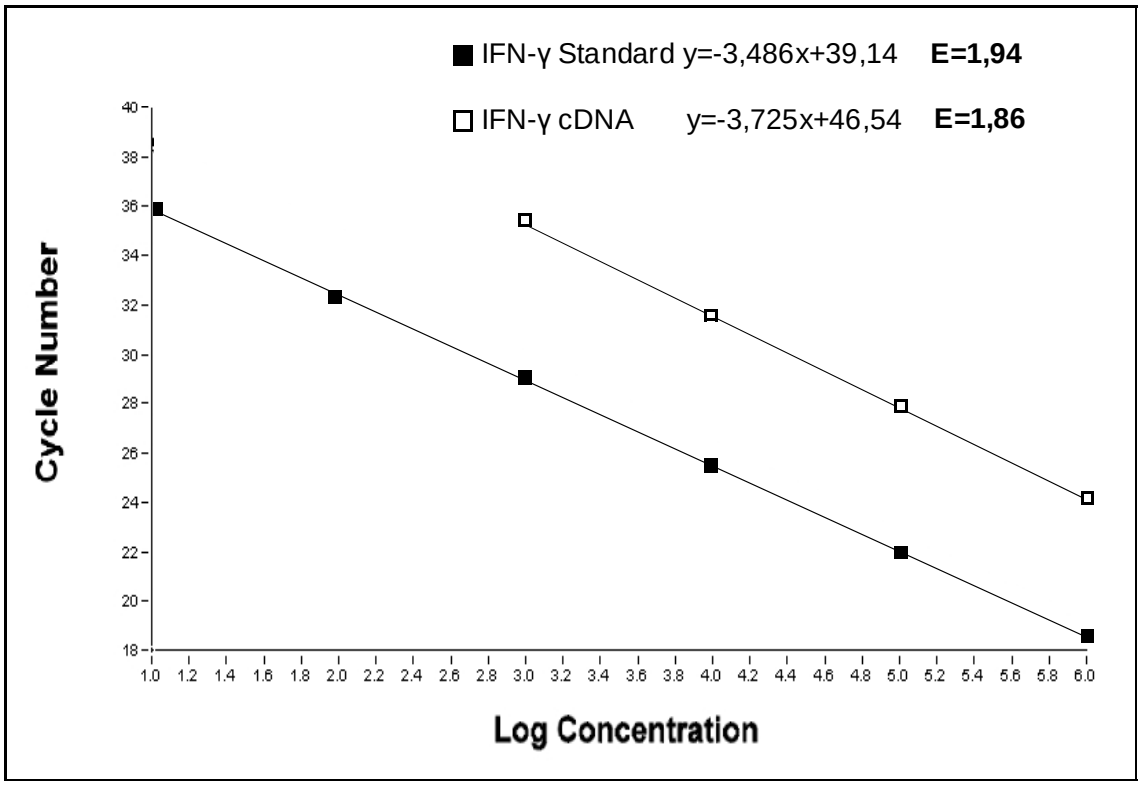


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der Amplifikationseffizienzen E eines Laufs mit der IFN-γ Standardverdünnungsreihe und eines Laufs mit der Verdünnungsreihe einer LPS-stimulierten Probe, detektiert auf IFN-γ cDNA. Angegeben sind die Geradengleichungen mit den entsprechenden Amplifikationseffizienzen E.

Die ermittelte Effizienz der Probe von E=1,86 liegt nahe an der Effizienz des IFN-γ Standards (vgl. Tabelle 2). Ähnliches gilt auch für den Vergleich mit den Effizienzen der anderen Zytokin-Standards. Da die PCR-Bedingungen für alle nachzuweisenden Zytokine gleich sind, wurden keine weiteren Proben auf ihre Effizienz hin getestet.

3.1.5 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Standards im LightCycler sowohl zwischen den n verschiedenen PCR-Läufen (Inter-Assay) als auch in einem PCR-Lauf durch 3 maligen Einsatz des Standards (Intra-Assay) wurde überprüft.
Nach Einsatz der Standardverdünnungsreihen determiniert die LightCycler Software über die gemessenen Crossing Points die „tatsächlichen“ absoluten Kopienzahlen der Verdünnungen. Diese Werte wurden zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit herangezogen.

3.1.5.1 Inter-Assay Reproduzierbarkeit

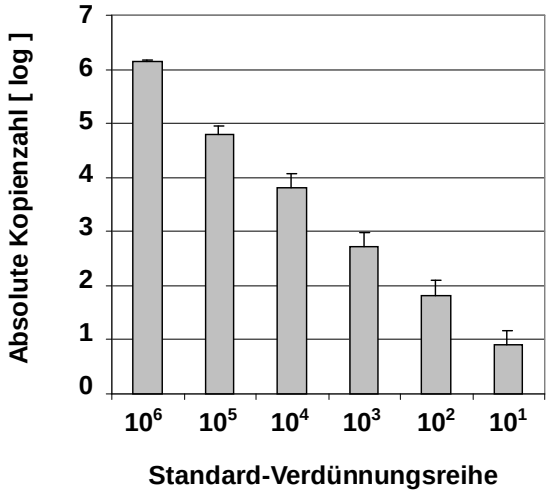
Für die von der LightCycler Software determinierten Kopienzahlen der eingegebenen Standardverdünnungen wurde der Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ der absoluten Kopienzahlen berechnet (Tabelle 3). Außerdem wurden die mittleren Kopienzahlen und die Standardabweichung für die jeweilige Verdünnung berechnet. Sie kommen in der Abbildung 11 zur Darstellung.
Abbildung 11 und Tabelle 3 zeigen, dass sich die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit hin zu den niedrigen Konzentrationen der Standardverdünnungen verschlechtert.

Tabelle 3: Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%) der von der Software determinierten absoluten Kopienzahlen für die einzelnen Verdünnungen (10^6-10^1 Kopien/10µl) der Zytokin-Standards in n LightCycler-Läufen.

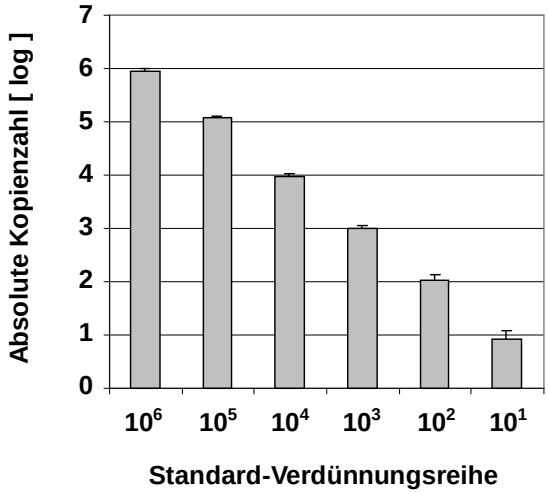
Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%)						
	Standardverdünnungsreihe					
	$1x10^6$	**$1x10^5$**	**$1x10^4$**	**$1x10^3$**	**$1x10^2$**	**$1x10^1$**
IL-4 *(n=3)*	12,34%	49,81%	80,21%	88,05%	87,84%	74,02%
IL-8 *(n=5)*	8,70%	7,81%	12,35%	16,62%	24,89%	42,40%
IL-10 *(n=3)*	4,79%	29,02%	22,08%	34,34%	21,49%	29,06%
IL-12p40 *(n=4)*	13,93%	15,95%	22,01%	11,00%	12,75%	-
IL-18 *(n=3)*	5,92%	11,98%	16,95%	4,10%	25,52%	-
TNF-α *(n=6)*	27,76%	22,18%	26,22%	32,90%	34,24%	54,81%
IFN-γ *(n=16)*	31,69%	18,22%	32,72%	24,60%	60,47%	38,26%

Abbildung 11: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit der Zytokin-Standards. Einsatz der Verdünnungsreihe (10^6-10^1 Kopien/10µl) in n LightCycler-Läufen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der von der LightCycler Software determinierten absoluten Kopienzahlen für die jeweilige Verdünnung.

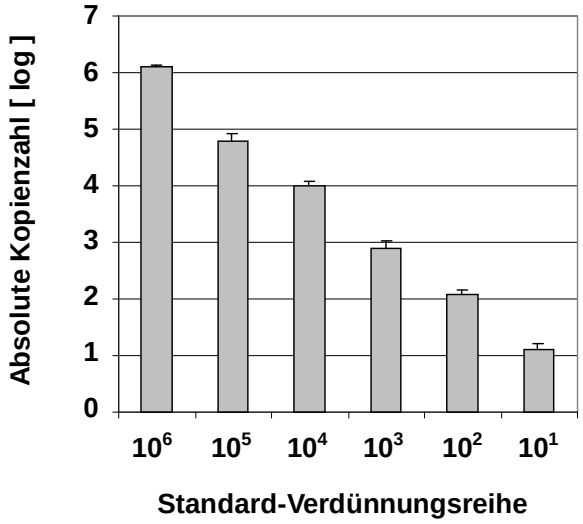
IL-4 *(n=3)*



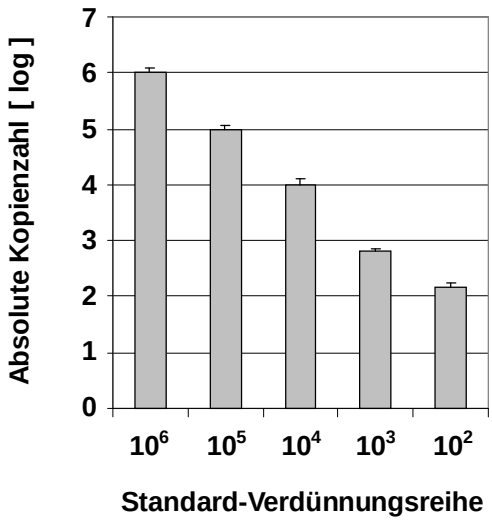
IL-8 *(n=5)*



IL-10 *(n=3)*

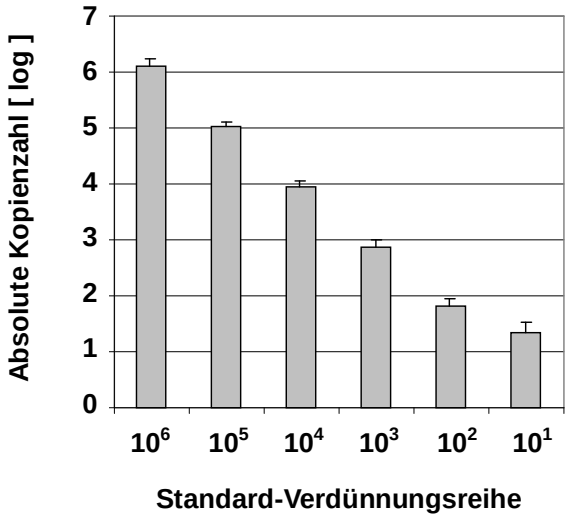


IL-12p40 *(n=4)*

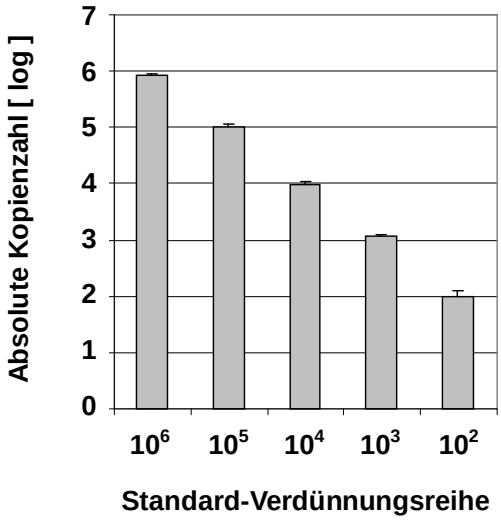


Fortsetzung Abbildung 11

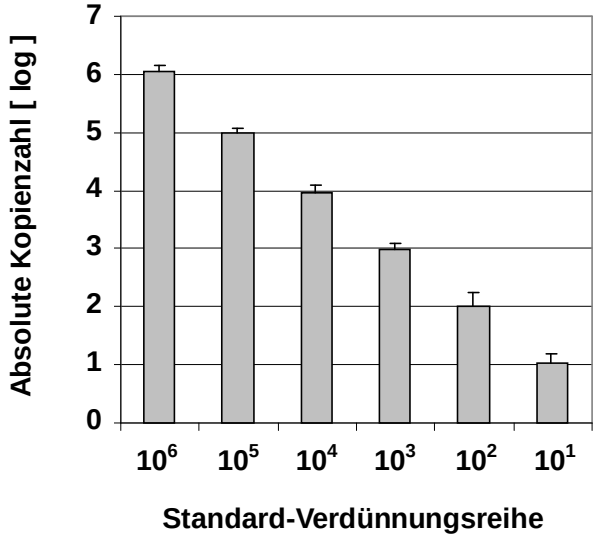
TNF-α *(n=6)*



IL-18 *(n=3)*



IFN-γ *(n=16)*



3.1.5.2 Intra-Assay Reproduzierbarkeit

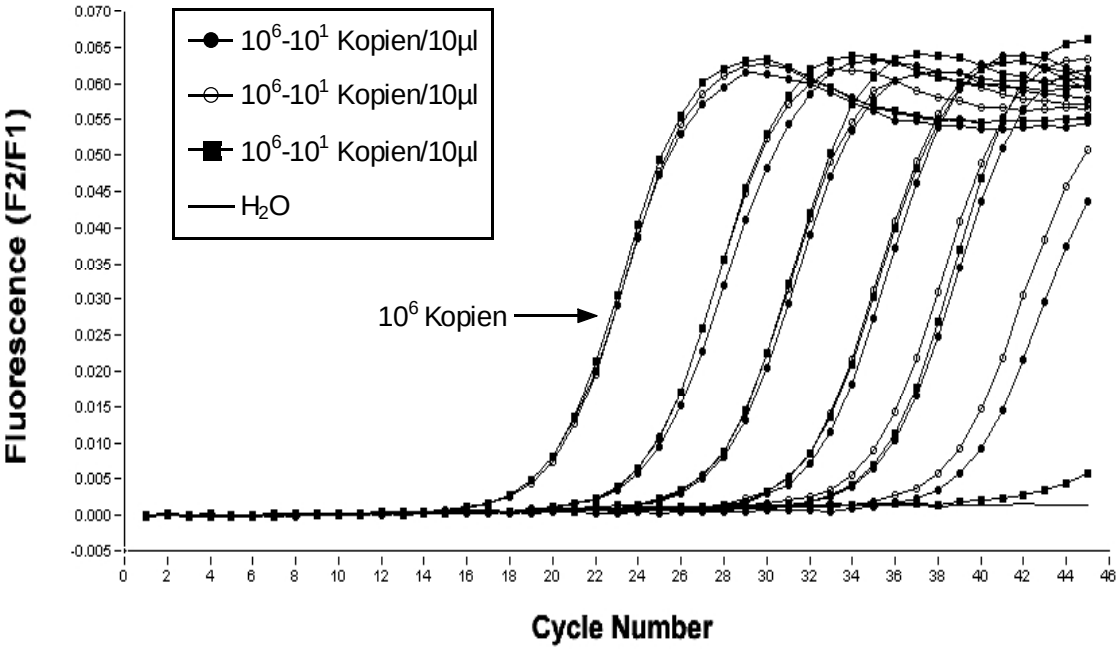
Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde exemplarisch über den Einsatz des IL-4 Standards und des IFN-γ-Standards geprüft. Hierfür wurden die Verdünnungsreihen über einen Konzentrationsbereich von 10^6-10^1 Kopien/10ml 3 mal im gleichen LightCycler-Lauf mitgeführt (Abb.12).

Der Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ der absoluten Kopienzahlen für die einzelnen Verdünnungen wurde berechnet. Auch für die Intra-Assay Reproduzierbarkeit ist dabei eine Verschlechterung hin zu den niedrigen Konzentrationen der Standardverdünnungen zu beobachten. Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit zeigt dagegen im Vergleich zur Inter-Assay Reproduzierbarkeit (Tabelle 3) ein besseres Ergebnis.

Tabelle 4: Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%) der von der Software determinierten absoluten Kopienzahlen für die Standardverdünnungsreihen (10^6-10^1 Kopien/10µl) von IL-4 und IFN-γ nach 3 maligem Einsatz der Verdünnungen in einen LightCycler Lauf.

Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ (%)						
	Standardverdünnungsreihe					
	$1x10^6$	**$1x10^5$**	**$1x10^4$**	**$1x10^3$**	**$1x10^2$**	**$1x10^1$**
IL-4 *(n=3)*	4,09%	9,80%	5,22%	13,30%	24,15%	62,01%
IFN-γ *(n=3)*	6,09%	17,13%	7,28%	12,30%	24,00%	81,26%

IL-4



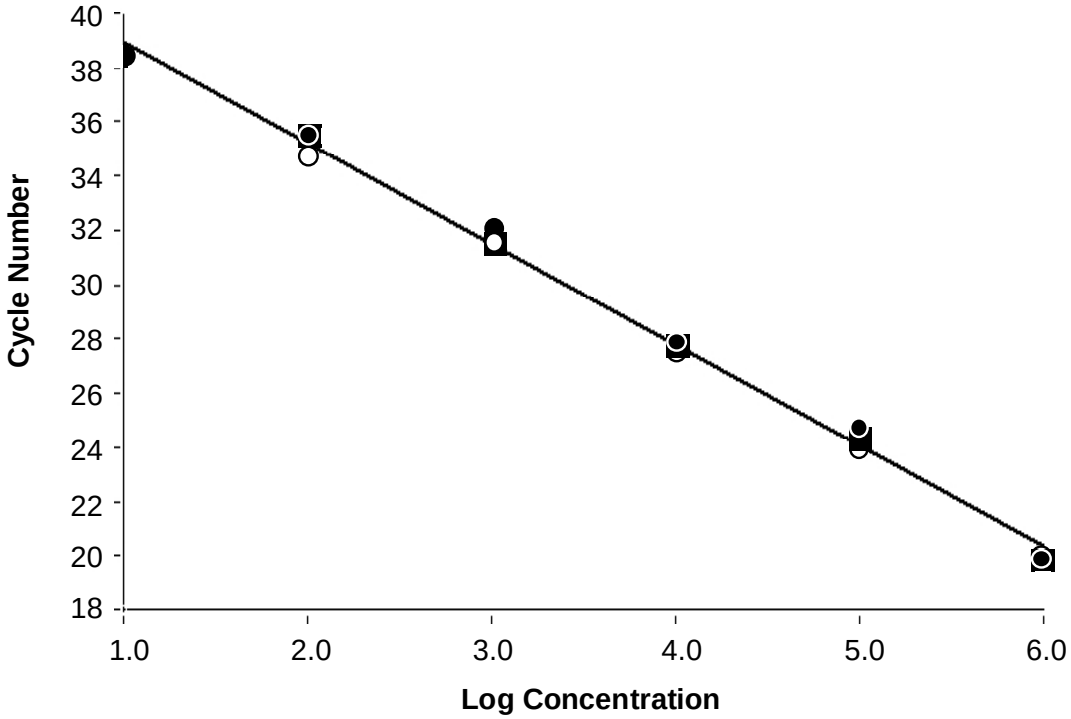


Abbildung 12: Prüfung der Intra-Assay-Reproduzierbarkeit am Beispiel des IL-4-Standards. Einsatz der Verdünnungsreihe (10^6-10^1 Kopien/10µl) n=3 mal im selben LightCycler-Lauf. Entsprechende Regressionsgerade für alle 3 Verdünnungsreihen mit r=-1,00.

3.2 Assay zur absoluten Quantifizierung der h-β2M-mRNA Expression

3.2.1 Überprüfung der Amplifikationseffizienzen von Standard und Proben

Die Amplifikationseffizienz des h-β2M-Standards und der Verdünnungsreihe einer LPS-stimulierten Probe (PBMCs) wurde geprüft (eingegebene Verdünnung der Probe: 10^6-10^1). Über die Steigung der Regressionsgeraden wurden die Amplifikationseffizienzen berechnet:

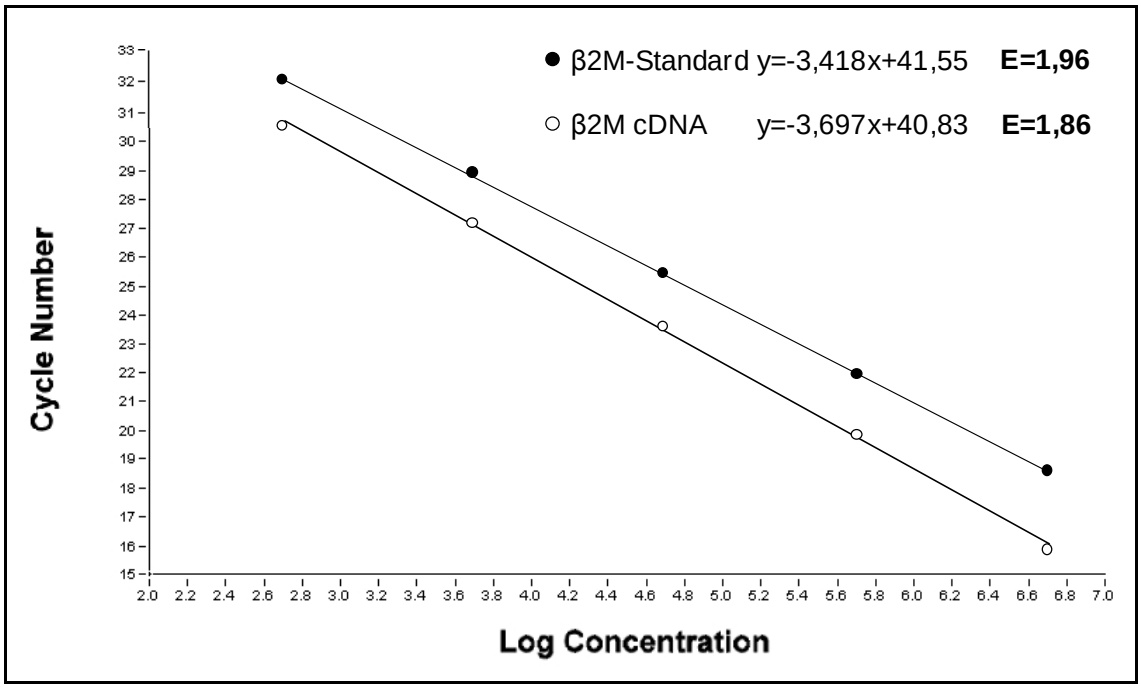


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der Amplifikationseffizienzen E des β2M–Standard und der Verdünnungsreihe einer LPS-stimulierten Probe, detektiert auf β2M cDNA. Angegeben sind die Geradengleichungen mit den entsprechenden Amplifikationseffizienzen E.

Es zeigen sich ähnliche Effizienzen für Standard und Probe (ΔE=0,1).

3.2.1 Überprüfung der Regulation der h-β2M mRNA-Expression in stimulierten und unstimulierten PBMCs

Der Vergleich der Expressionslevel von β2M in stimulierten Proben relativ zu einer unstimulierten Kontrollprobe wurde in 2 Versuchen durchgeführt (Abbildung 14 und Tabelle 5). Dabei konnte auf unterschiedliche Stimulation hin keine wesentliche Regulation des Expressionslevels des Housekeeping-Gens im Vergleich zu unstimulierten Proben ermittelt werden:

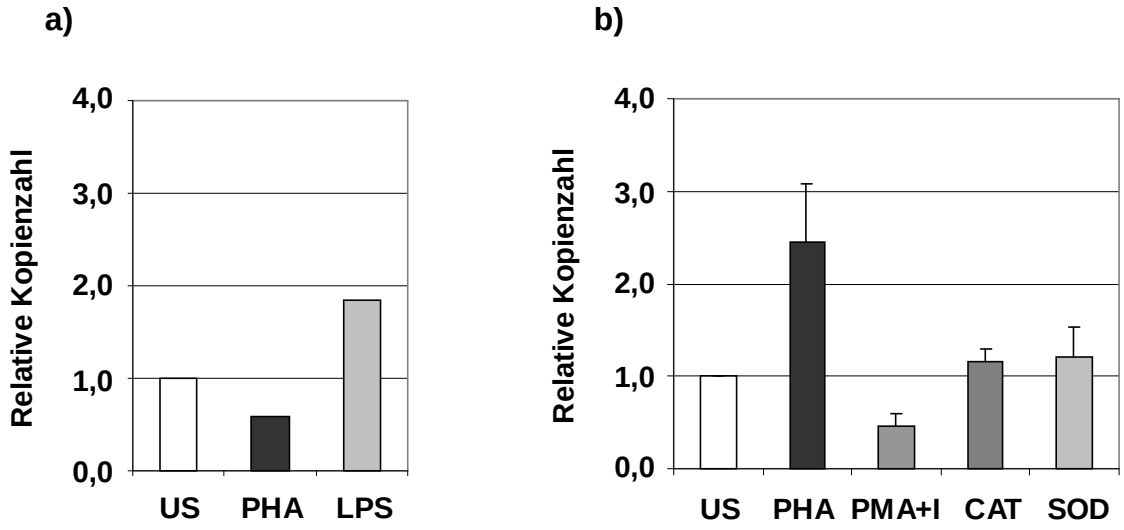


Abbildung 14: h-β2M mRNA Expressionslevel in stimulierten PBMCs relativ zu unstimulierten PBMCs (US).

- **a)** PHA und LPS stimulierte Proben relativ zur unstimulierten Kontrollprobe in n=2 Läufen.
- **b)** PHA, PMA+Ionomycin, CAT und SOD stimulierte Proben relativ zur unstimulierten Kontrollprobe in n=4 Läufen.

Tabelle 5: Mittelwerte x und Standardabweichung s der absoluten Kopienzahlen und Crossing Points (Cp) die in Versuch a) und b) ermittelt wurden.

a)

	Kopien	**Cp**
	x	**x**
unstimuliert	$1{,}7x10^8$	13,5
PHA	$1{,}0x10^8$	12,6
LPS	$3{,}2x10^8$	14,3

b)

	Kopien		**Cp**	
	x	**s**	**x**	**s**
unstimuliert	$3{,}5x10^8$	$3{,}1x10^7$	12,0	0,1
PHA	$8{,}4x10^8$	$1{,}4x10^8$	10,7	0,4
PMA+Ionomycin	$1{,}6x10^8$	$3{,}3x10^7$	13,2	0,5
CAT	$4{,}0x10^8$	$1{,}4x10^7$	11,8	0,2
SOD	$4{,}4x10^8$	$6{,}3x10^7$	11,6	0,3

3.3 Expression von IL-12- und IFN-γ-mRNA in stimulierten und unstimulierten PBMCs: Exemplarische Darstellung der Quantifizierung von Zytokin-mRNA und Normalisierung der Ergebnisse über das Housekeeping Gen h-β2M

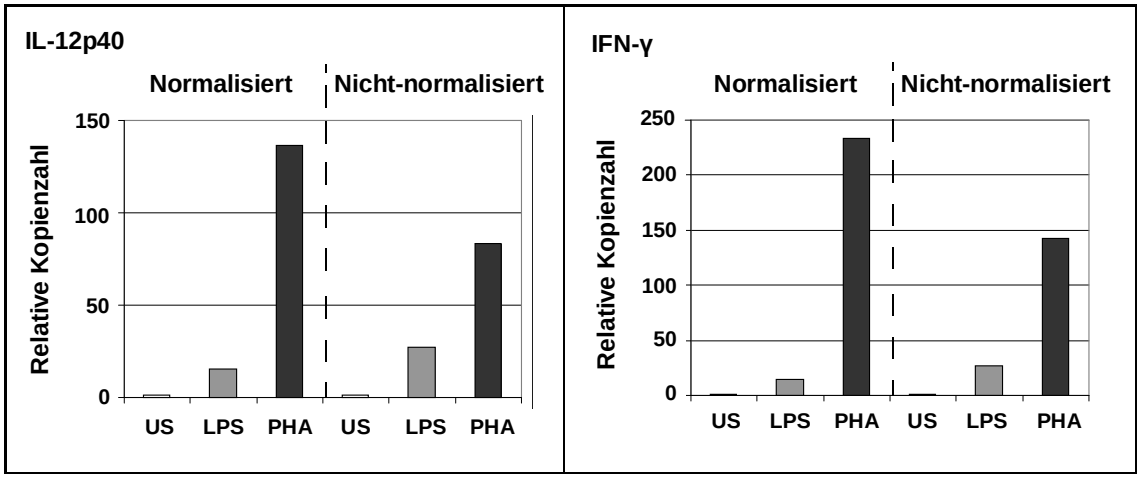
Nach absoluter Quantifizierung von IL-12 und IFN-γ mRNA über die entsprechenden Zytokin-Standards sowie von h-β2M mRNA über den Housekeeping-Standard in denselben Proben folgte die Berechnung der normalisierten relativen Zytokin-mRNA-Expressionslevel auf die in Kapitel 2.2.3.2 beschriebene Weise. Diese kommen hier im Vergleich zu den nicht-

normalisierten relativen Kopienzahlen der stimulierten Proben zur Darstellung, die lediglich über das Verhältnis stimuliert zu unstimuliert berechnet wurden (Abbildung 15). Dabei zeigen sich die entsprechenden Unterschiede nach Korrektur der relativen Expressionslevel durch Normalisierung gegen das Housekeeping Gen. Das qualitative Ergebnis unterscheidet sich in diesem Fall jedoch nicht.

Tabelle 6: Absolute Werte der Expression von β-2M, IL-12p40 und IFN-γ in stimulierten (LPS, PHA) und unstimulierten (US) PBMCs, ermittelt in je einem LightCycler-Lauf.

	absolute Kopienzahl		
	US	**LPS**	**PHA**
β-2M	$1{,}689 \times 10^{8}$	$2{,}972 \times 10^{8}$	$1{,}030 \times 10^{8}$
IL-12p40	$8{,}439 \times 10^{2}$	$2{,}293 \times 10^{4}$	$7{,}015 \times 10^{4}$
IFN-γ	$3{,}328 \times 10^{3}$	$8{,}774 \times 10^{4}$	$4{,}741 \times 10^{5}$

Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der normalisierten und der nicht-normalisierten Expressionslevel von IL-12 und IFN-γ nach Stimulation von PBMCs mit PHA oder LPS relativ zur unstimulierten Kontrollprobe (US).



4. Diskussion

4.1 Real-time RT-PCR im Vergleich zu anderen quantitativen Nachweisverfahren der Zytokin-Produktion

Der quantitative Nachweis der Zytokin-Produktion unter pathologischen Bedingungen ist wesentlich zur Beurteilung der stattfindenden Immunprozesse.
Die verschiedenen Methoden, die derzeit zur Quantifizierung der Zytokin-Produktion zur Verfügung stehen wurden eingangs (Kap. 1.2.1) vorgestellt. Es kann dabei zwischen mRNA-basierten und Protein-basierten Nachweisverfahren unterschieden werden.
Mit der Etablierung einer Real-time RT-PCR wurde in dieser Arbeit der quantitative Nachweis auf m-RNA-Ebene gewählt. Die Zytokin-mRNA-Expression korreliert jedoch nicht immer mit der Menge an Protein (Romagnani, 2000; Benveniste et al., 1998). Eine mögliche Diskrepanz zwischen gemessenen Zytokin-mRNA-Expressionsleveln und sezerniertem Protein kann durch verschiedene post-transkriptionelle und post-translationelle Faktoren beeinflusst sein und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (Overbergh et al., 2003). Verschiedene Publikationen haben jedoch eine gute Korrelation von Zytokin-mRNA Expressionsleveln, die über Real-time PCR quantifiziert wurden, und der Determinierung der Proteinsynthese über ELISA (Hein et al., 2001; Weghofer et al., 2001; Mena et al., 2002) oder ELISPOT (Mena et al., 2002), gezeigt.
In Bezug auf die Zytokin-Biologie kann der quantitative Nachweis der Zytokin-Genexpression im Gegensatz zum Nachweis des sezernierten Proteins aus den folgenden Gründen generell von Vorteil sein: Die meisten Zytokine werden nur in sehr geringen Mengen produziert, besitzen eine kurze Halbwertszeit und nach ihrer Freisetzung erfolgt eine schnelle Utilisation nach autokriner oder parkriner Übertragung bei Zell-zu-Zell-Kontakt. Es erweist sich daher als äußerst schwierig eine spontane Sekretion von Zytokinen in biologischen Geweben oder Zellsuspensionen zu messen (Romagnani, 2000; Whiteside, 2002; Benveniste et al., 1998). Insbesondere bei kleiner Probengröße, wie

Gewebebiopsien oder einer limitierten Anzahl von Zellen und Zell-Sub-populationen, lassen sich Zytokine nur schwer auf Protein-Ebene durch Techniken wie ELISA nachweisen, und es kommen daher vozugsweise mRNA-basierte Techniken zum Einsatz (Giulietti et al., 2001; Overbergh et al., 2003; Blaschke et al., 2000; Stordeur et al., 2002).

Northern Blot, RPA und ISH stellen dabei zwar spezifische Methoden zur Quantifizierung der Zytokin-mRNA-Expression dar, sind jedoch im Gegensatz zur RT-PCR arbeitsintensiv und oft schwer standardisierbar, was eine effiziente Analyse von vielen verschiedenen Zytokinen in einer großen Anzahl von Proben ausschließt (Benveniste et al., 1998; Whiteside, 2002). Die Anwendung von DNA-Chips oder Microarrays hingegen ermöglicht die simultane Analyse der Expression vieler tausend Gene von verschiedenen Geweben oder Zellen (Whiteside, 2002). Unter diesen mRNA-basierten Techniken ist letztendlich jedoch die RT-PCR die sensitivste Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Zytokinen, die oft nur in sehr geringen Leveln exprimiert werden (Giulietti et al., 2001).

Ein Hauptproblem für eine akkurate Quantifizierung von mRNA-Transkripten über die klassischen Endpunktanalysen konventioneller RT-PCR-Techniken stellt jedoch die exponentielle Produkt-Amplifikation dar, bei der geringe Unterschiede in den Amplifikationseffizienzen zwischen den Proben zu einem großen Unterschied der ermittelten Expressionslevel am Ende der Reaktion führen (Rasmussen, 2001). Mit dem Ziel einer präzisen Quantifizierung von Zytokin-mRNA-Leveln unter Vermeidung dieser Variationen wurden daher eine Reihe von konventionellen RT-PCR-Methoden entwickelt, darunter semi-quantitative und quantitativ kompetitive RT-PCR-Techniken (Benveniste et al., 1998; O'Garra und Viera, 1992; Gilliland et al., 1990). Diese Methoden haben zwar bei einem Vergleich eine gute Korrelation zur neueren Real-time PCR Technologie gezeigt (Hein et al., 2001; Blaschke et al., 2000), weisen aber verschiedene Probleme hinsichtlich einer akkuraten Quantifizierung auf (Benveniste et al., 1998; Giulietti et al., 2001):

In der semiquantitativen Methode wird die PCR-Produkt-Akkumulation während der exponentiellen Phase der Reaktion gemessen, indem die PCR nach einer

experimentell determinierten Anzahl von Zyklen unterbrochen wird. Nachteil dieses Ansatzes ist jedoch der relativ kleine log-lineare Bereich, der in aufwendiger Vorarbeit festgelegt werden muss, sowie die Tatsache, dass man letztendlich „semiquantitative“ Ergebnisse erhält.

Kompetitive PCR Methoden hingegen erlauben eine absolute Quantifizierung: über die Co-Amplifikation einer Proben-Verdünnungsreihe, die die Ziel-DNA enthält, und einer Verdünnungsreihe eines internen Kompetitors wird die Menge an Ziel-DNA ermittelt. Die Validation dieser Technik ist jedoch arbeits- und zeitintensiv, und obwohl sie eine Strategie für eine akkurate Quantifizierung darstellt, werden Effizienzunterschiede zwischen der Ziel-DNA und dem Standard nicht detektiert, was die Angabe absoluter Werte als fraglich erscheinen lässt (Bustin, 2000).

Ungeachtet der Amplifikationsmethoden und Quantifizierungsstrategien konventioneller PCR-Methoden kommen verschiedene Techniken zur PCR-Produkt-Detektion zum Einsatz wie Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidium-Bromid-Färbung, Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Analyse über Polyacrylamid-Gele, radioaktive Markierung und Southern Blot oder Detektion über Phosphorimaging. Neben der Anwendung von gefährlichen Chemikalien haben diese klassischen Detektionssysteme den Nachteil, dass sie äußerst arbeits- und zeitintensiv sind und darüber hinaus ein mögliches Risiko für Kontaminationen tragen (Overbergh et al., 1999; Giulietti et al., 2001).

Mit der Entwicklung der Real-time RT-PCR wurden die hier aufgeführten Probleme konventioneller PCR Techniken entscheidend verbessert: der gesamte Prozess ist vollautomatisiert und daher leicht durchführbar. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert. Damit ist die Methode um ein Vielfaches schneller als konventionelle PCR Techniken, und das Risiko von Kontaminationen durch post-PCR-Manipulationen wird vermieden.

Die Methode erlaubt eine software-gesteuerte direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Die Quantifizierung von PCR-Produkten basiert dabei auf den gemessenen Crossing Points. Diese werden von der Software determiniert

und befinden sich am Beginn der log-linearen Phase des PCR-Prozesses. Damit fallen Effizienzunterschiede zwischen den Proben weniger ins Gewicht als bei den klassischen Endpunktanalysen konventioneller RT-PCR-Techniken, und die über Real-time PCR ermittelten Werte weisen so eine höhere Reproduzierbarkeit auf (Yin et al., 2001; Bustin, 2000).

Der Einsatz von externen Standards ermöglicht eine absolute Quantifizierung.

Im Gegensatz zur kompetitiven PCR lassen sich bei der Real-time PCR jedoch die Amplifikationseffizienzen von Standards und Proben bestimmen. So kann überprüft werden, ob sich wesentliche Unterschiede zwischen den Effizienzen von Standards und Proben ergeben, was eine reliable Quantifizierung ausschliessen würde (Rasmussen, 2001).

Darüber hinaus hat die Detektion über Fluoreszenzfarbstoffe der Real-time PCR im Vergleich zur Gel-Elektrophorese und Ethidium-Bromid-Färbung eine höhere Sensitivität gezeigt (Hein et al., 2001).

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

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im LightCycler Instrument für die 7 immunorelevanten Zytokine IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α sowie IFN-γ eine absolute Quantifizierung der m-RNA-Expression zu etablieren. Hierfür mussten zunächst spezifische externe Standards generiert werden. Die Validation des Assays erfolgte dann im wesentlichen über den Einsatz der Standards in die LightCycler PCR und macht einen Vergleich zu anderen Real-time-PCR-Assays möglich. Dabei ist die Quantifizierung von Zytokin-mRNA in der Literatur vor allem im LightCycler Instrument und dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) evaluiert worden (Giulietti et al., 2001). Die Interpretation der Ergebnisse orientiert sich daher an diesen Publikationen.

4.2.1 Spezifität

Es wurden für alle 7 Zytokine spezifische Primer-Paare eingesetzt.
Die Kontrolle über die Gel-Elektrophorese hat keine Co-Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte gezeigt.
Indem die Detektion der PCR-Produkte über sequenz-spezifische Hybridisierungs-Sonden stattfindet, ist weiterhin eine hohe Spezifität gewährleistet. Hybridisierungs-Sonden weisen dabei eine weitaus höhere Spezifität auf als der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Wittwer et al., 1997b), der auch für die Detektion von Zytokinen über Real-time PCR in verschiedenen Publikationen zur Anwendung gekommen ist (Blaschke et al., 2000; Hein et al., 2001; Weghofer et al., 2001; Autschbach et al., 2002). SYBR Green I hat den Nachteil, dass es generell an jede dsDNA bindet und daher die zusätzliche Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse erfordert, um die Detektion des spezifischen PCR-Produkts zu verifizieren und die Detektion unspezifischer DNA auszuschließen (Ririe et al., 1997). Darüber hinaus ist das Signal von SYBR Green I abhängig von der Amplifikatlänge, während das Signal von sequenz-spezifischen Sonden jeweils einem amplifizierten Molekül entspricht (Bustin, 2000).

4.2.2 Sensitivität

Die Amplifikation war über einen weiten Bereich von bis zu 10 log-Einheiten linear (r=-1 für alle Standardverdünnungsreihen in allen LightCycler-Läufen). Über die Standards wurde ein unteres Detektionslimit von 10^1 Kopien für den Nachweis von IL-4, IL-8, IL-10-, TNF-α und IFN-γ, sowie 10^2 Kopien für die Detektion von IL-12 und IL-18, identifiziert.
Damit können Zytokin-Expression-Level über einen weiten Bereich vermessen werden, vor allem aber lässt sich auch eine basale Zytokin-Expression detektieren, wie für IFN-γ und IL-12 in unstimulierten PBMCs demonstriert wurde. Eine weniger sensitive Detektion von Maus- oder humanen Zytokinen wurde in verschiedenen Publikationen für die Anwendung von Hybridisierungs-

Sonden, TaqMan-Sonden und SYBR Green I im LightCycler (Stordeur et al., 2002; Hein et al., 2001; Weghofer et al., 2001) sowie TaqMan-Sonden im ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Overbergh et al., 1999; Härtel et al., 1999) beschrieben. Diese Assays weisen nur eine Sensitivität von größer oder gleich 10^3 Kopien auf.
Allerdings haben Kühne et al. (2002) mit dem Einsatz von Hybridisierungs-Sonden im LightCycler für die Quantifizierung von humanem IL-4, IL-4R, IFN-γ und IFN-β ein unteres Detektionslimit von 10^0 Kopien gezeigt. Diese hohe Sensitivität demonstrierten auch Yin et al. (2001) unter Verwendung von TaqMan-Sonden im ABI Prism 7700 zur Quantifizierung von humanem IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α und IFN-γ.

4.2.3 Amplifikationseffizienz

Die Reaktionsansätze des Assays unterscheiden sich lediglich durch die eingesetzten Primer- und Sonden-Paare des jeweiligen Zytokin-Targets. Die Amplifikationseffizenzen des Assays wurden daher über den Einsatz der entsprechenden Zytokin-Standards in die LightCycler PCR bestimmt. Die mittleren Amplifikationseffizienzen liegen dabei in einem Bereich von E=1,80 (IL-10) und E=1,94 (IL-12p40) und damit nahe an der theoretisch maximal erreichbaren Effizienz von E=2 (Standardabweichung: 0,05<s< 0,23). Mit den hohen Effizienzen ist dabei auch die hohe Sensitivität des Assays erklärt.

Für eine reliable Quantifizierung über die generierten Standards sollten zumindest ähnliche Amplifikationseffizienzen von Standards und Proben vorliegen. Die Amplifikationseffizienz ist unter anderem von der Ziel-DNA abhängig. Zwar liegt in den Standards und den Proben die gleiche Ziel-DNA vor, dennoch können Unterschiede in den PCR-Effizienzen auftreten, was auf die unterschiedliche Zusammensetzung des hochaufgereinigten Standards und Inhibitoren in der Probenlösung zurückzuführen ist (Kühne et al., 2002).
Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für die Quantifizierung der Zytokin-Expression in PBMCs überprüft. Die ermittelte Amplifikationseffizienz von einer

LPS-stimulierten Probe lag mit E=1,86 im Bereich der Amplifikationseffizienzen der Standards. Damit ist eine akkurate Quantifizierung von Zytokin-mRNA in PBMCs unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen zur Probengewinnung gewährleistet. Dabei muss der Vergleich der Amplifikationseffizienzen erneut durchgeführt werden, wenn in den vorliegenden Assay andere Probenmaterialien zur quantitativen Bestimmung der Zytokin-Genexpression zum Einsatz kommen.

4.2.4 Reproduzierbarkeit

Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde über mehrmaligen Einsatz der einzelnen Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR getestet (10^6-10^1 Kopien/10µl). Der Variationskoeffizient $CV_{conc.}$ der von der LightCycler Software determinierten Kopienzahlen zeigt, dass die Reproduzierbarkeit sich hin zu den niedrigen Konzentration der Standardverdünnungen verschlechtert ($CV_{conc.}$der 7 Zytokin-Standards im Bereich von 4,79% - 31,69% für 10^6 Kopien, und von 12,75% - 87,84% für 10^2 Kopien). Grund hierfür ist, dass niedrige Kopienzahlen länger dem exponentiellen Prozess unterliegen, bevor eine ausreichende Menge an detektierbarem PCR-Produkt vorliegt. Minimale Variationen in den PCR-Effizienzen von Lauf zu Lauf, wie sie für die einzelnen Zytokin-Standardverdünnungsreihen beobachtet wurden (s.o) , oder geringe Unterschiede in der initial eingesetzten Konzentration durch Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang, verursachen dann eine schlechte Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (Rasmussen, 2001). Tatsächlich wird bei einer Zahl von 1-2 Kopien die Zufallsverteilung in Abhängigkeit von Pipettierfehlern signifikant (Poisson´sches Gesetz) (Bustin, 2000; Rasmussen 2001). Damit ist die hohe Sensitivität von 1 Kopie in den Arbeiten von Kühne et al. (2002) und Yin et al. (2001) mit Sicherheit in Frage zu stellen (s.o).

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde exemplarisch jeweils für IL-4 und IFN-γ über den 3-maligen Einsatz der Standardverdünnungsreihen in einen LightCycler-Lauf demonstriert (10^6-10^1 Kopien/10µl). Auch hier wurde eine schlechtere Reproduzierbarkeit hin zu den niedrigen Konzentrationen ermittelt.

Die Anwendung des gleichen Reaktionsansatzes für alle 3 Verdünnungsreihen minimiert dabei jedoch Variationen durch äußere Störfaktoren und dementsprechend zeigte sich ein insgesamt besseres Ergebnis als die Inter-Assay Reproduzierbarkeit.

Nur wenige Arbeiten zur quantitativen Analyse der Zytokin-Expression über Real-time PCR und externe Standards machen genaue Angaben zur Reproduzierbarkeit ermittelter Kopienzahlen über einen größeren log-linearen Bereich. Dabei wurden in der vorliegenden Arbeit ähnliche Ergebnisse für die Intra-und Inter-Assay Reproduzierbarkeit ermittelt wie in der Gruppe von Stordeur et al., (2002). Diese zeigte für die Quantifizierung von Maus-IL-9 im LightCycler über Hybridisierungs-Sonden eine hohe Inter-Assay Reproduzierbarkeit (CV_{conc} absolute Kopienzahlen: 21,95% für 10^7; 12,91% für 10^5; 30,61% für 10^3) und ebenfalls eine bessere Intra-Assay Reprouzierbarkeit (CV_{conc} absolute Kopienzahlen: 8,81% für 10^7; 7,41% für 10^5; 8,78% für 10^3).

Kühne et al., (2002) demonstrierten hingegen eine noch höhere Inter-Assay (8,7% für 10^5; 13,7% für 10^4; 15,3% für 10^2) wie Intra-Assay Reproduzierbarkeit (13,5% für $2{,}65 \times 10^2$). Dort kamen sogenannte „importierten Standardkurven“ zum Einsatz, das heißt, eine evaluierte Standardkurve wurde von der LightCycler Software abgespeichert und zur Quantifizierung aufgerufen. Der Einsatz einer kompletten Standardverdünnungsreihe fällt auf diese Weise weg, und lediglich eine Kontroll-Probe mit bekannter Konzentration muss in der PCR mitgeführt werden. Von den gemessenen Crossing Points der Kontroll-Probe sind dann die absoluten Kopienzahlen der Standardkurve wie auch der Proben abhängig. Die Effizienz der Standardkurve bleibt jedoch konstant, was eine mögliche Erklärung für die bessere Reproduzierbarkeit sein könnte.

4.2.5 Normalisierung

In jeder quantitativen RT-PCR können spezifische Störfaktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA sowie Unterschiede in der reversen Transkription oder den PCR-Effizienzen über den exponentiellen Prozess zu wesentlichen Variationen der individuellen Ergebnisse und damit zu

einer Mißinterpretation der ermittelten Expressionsprofile führen. Obwohl bei der Real-time RT-PCR Unterschiede in den PCR-Effizienzen im Gegensatz zu konventionellen Endpunktanalysen minimiert sind (Kap. 4.1), erfordert auch diese Methode die Korrektur der genannten Störfaktoren, was sich insbesondere in der vergleichsweise schlechten Inter-Assay-Reproduzierbarkeit für kleine Kopienzahlen ($<10^3$) zeigt.

Verschiedene Strategien zur Korrektur dieser Variationen sind beschrieben:

Die ermittelte Kopienzahl des Ziel-Gens kann relativ zur Zellzahl oder zur Masse der Gesamt-RNA ausgedrückt werden. In beiden Methoden werden jedoch die Unterschiede in den PCR-und RT-Effizienzen nicht berücksichtigt (Vandesompele et al., 2002). Die Ergebnisse werden daher vorzugsweise relativ zu einem Referenzgen ausgedrückt, dessen Expression parallel zu der des Ziel-Gens in derselben Probe bestimmt wird. Die Expression des Referenzgens sollte unter den experimentellen Bedingungen möglichst konstant sein. Die Anwendung von ribosomaler RNA als Referenzgen hat dabei unter anderem den Nachteil, dass sie in besonders hohen Leveln exprimiert wird und damit nicht repräsentativ für die Fraktion der Ziel-mRNA ist (Overbergh et al., 2003). Die am meisten akzeptierte Methode ist die Normalisierung gegen ein Housekeeping-Gen (Giulietti et al., 2001). Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass die Expression der Housekeeping-Gene aktiv reguliert sein kann. Insbesondere häufig angewendete Housekeeping-Gene wie β-Actin oder GAPDH wurden in diesem Zusammenhang schwer kritisiert (Bustin, 2000; Schmittgen und Zakrajsek, 2000). Bei der Auswahl eines Housekeeping-Gens muss daher seine Expression unter den jeweiligen individuellen experimentellen Bedingungen getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich humanes β-2M als Housekeeping-Gen eignet, um absolute Werte der Zytokin-Expression in PBMCs nach in vitro Stimulation zu normalisieren. Dafür wurde unter Verwendung von kommerziellen Kits und einem von Roche empfohlenen Light-Cycler PCR-Protokoll absolute Kopienzahlen der β-2M-Expression in stimulierten und unstimulierten PBMCs bestimmt. Es konnten dabei keine wesentlichen Änderungen der Expression des Housekeeping-Gens nach

Stimulation von PBMCs über PHA, LPS, PMA+Ionomycin, CAT und SOD im Vergleich zu unstimulierten PBMCs beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass IFN-γ die Expression von β-2M hochreguliert (Keskinen et al., 1997; Breen et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch für einen LightCycler Lauf demonstriert werden, dass nach Stimulation von PBMCs mit LPS und PHA zwar die absoluten Kopienzahlen der IFN-γ Expression um eine Faktor >26 (LPS-stimuliert) und >140 (PHA-stimuliert) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe ansteigen, die β-2M-Expression dadurch aber nicht beeinflusst wurde (Faktor 1,78 für LPS; 0,61 für PHA im Vergleich zur unstimulierten Probe). Dies korreliert auch mit den Ergebnissen von Reddy und Wilkie (2000), die im Tiermodell zur Quantifizierung der Expression von IFN-γ, TNF-α/β sowie einer Reihe von Interleukinen in mononuklearen Blutzellen ihre PCR-Ergebnisse gegen β-2M normalisieren. Dabei demonstrierten sie, dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von β-2M nach Stimulation von Blutzellen mit LPS und PHA im Vergleich zu unstimulierten Zellen ergeben.

Schliesslich lassen sich geringe Variationen in der Expression des Housekeeping-Gens, wie auch in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, über einen Korrekturfaktor (Expression Housekeeping-Gen in unstimulierter Probe / Expression in stimulierter Probe) minimieren (Weghofer et al., 2001; Stordeur et al., 2002; Giulietti et al., 2001).

Für die Normalisierung der Ergebnisse des LightCycler-Assays zur Quantifizierung der Zytokin-Expression scheint β-2M für die genannten Stimuli in PBMCs geeignet zu sein. Erfolgt mit diesem Assay jedoch die Vermessung von Zytokin-Expressionslevel in anderen Proben-Materialien und kommen andere Stimuli zum Einsatz, muss erneut ein Housekeeping-Gen ausgewählt und geprüft werden. Die Auswahl eines geeigneten Housekeeping-Gens gestaltet sich jedoch generell als äußerst arbeitsintensiv. Vor allem wenn die Evaluation eines ersten Housekeeping-Gens nicht gleich zufriedenstellend sein sollte, muss für die erneute Prüfung eines anderen Referenzgens noch mehr Zeit investiert werden und weitere Kosten fallen an, ohne dass ein Erfolg garantiert ist.

Tatsächlich machen einige Arbeiten zur Bestimmung der Zytokin-Gen-expression über Real-time PCR Gebrauch von Housekeeping-Genen als interne Kontrolle, ohne geprüft zu haben, ob sich durch die experimentelle Behandlung der Proben Variationen in der Expression des Housekeeping-Gens ergeben (Stordeur et al., 2002 ; Overbergh et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass sich für starke Stimuli wie LPS oder PHA für die Expression von IFN-γ und IL-12 ohne Normalisierung keine qualitative Fehlinterpretation der Expressionslevel ergeben hätte. Damit sollte für die künftige Messung der Zytokin-Expression über den etablierten Assay die Überlegung angestellt werden, ob in Bezug auf die experimentellen Bedingungen nicht die alternative und weniger aufwendige Standardisierung der Ergebnisse über die Masse der Gesamt-RNA oder die Zellzahl ausreichend ist. Diesen Kompromiss halten auch andere Untersucher für annehmbar (Bustin, 2000).

4.2.6 Probenumsatz

Das LightCycler Instrument bietet Platz für 32 Proben. Mit dem vorliegenden LightCyler-Assay lässt sich nach Einsatz einer Standardverdünnungsreihe über einen Bereich von 10^6-10^1 Kopien sowie einer Negativkontrolle (H_2O) die Expression eines Zytokins in maximal 25 verschiedene Proben quantifizieren. Dies scheint ein Nachteil gegenüber der Anwendung des ABI Prism 7700 zu sein, das mit 96 Proben ein weitaus größeres Format besitzt. Allerdings erlaubt der vorliegende Assay im LightCycler eine schnellere Durchführung der kompletten PCR in 48 min im Vergleich zu 2-3h anderer Zytokin-Assays unter Verwendung des ABI Prism 7700, und kompensiert damit das relativ kleine Probenformat (Overbergh et al., 1999; Yin et al., 2001).

4.3 Schlussfolgerungen

Hinsichtlich der Zytokin-Biologie erfordert der quantitative Nachweis der Zytokin-Produktion ein möglichst sensitives Verfahren. Der Nachweis auf mRNA-Ebene über RT-PCR ist mit der höchsten Sensitivität daher die Methode der Wahl. Real-time RT-PCR stellt dabei ein leicht durchführbares, schnelleres, akkurateres und sensitiveres Verfahren im Vergleich zu konventionellen RT-PCR-Techniken dar.

Der vorliegende Real-time PCR-Assay erlaubt unter Verwendung eines konstanten Reaktionsansatzes und eines identischen PCR-Protokolls die absolute Quantifizierung der mRNA-Expression für das breite Spektrum von 7 verschiedenen Zytokin-Targets: IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α sowie IFN-γ. Wie eingangs dargestellt (Kapitel 1.1.2.2) spielen die ausgewählten Zytokine eine wesentliche Rolle in Komplikationen nach allogener SZT. Insbesondere liefert die TH1/TH2 Polarisierung auch in diesem Zusammenhang wie in vielen anderen Krankheitsbildern die Basis für das Konzept der Erstellung von Zytokin-Profilen. Mit der vorliegenden Auswahl an Zytokinen ist dabei die Phänotypisierung von TH1-und TH2-Antworten möglich. Mit dem breiten Spektrum an Zytokinen lassen sich Profile in verschiedenen Geweben und Zellpopulationen bestimmen: beispielsweise um ihre in vivo Aktivität unter den pathologischen Bedingungen zu erfassen, wie auch um therapeutische Effekte zu überwachen, oder um ihre Antwort auf anitgenwirksame Stimuli und therapeutische Applikationen in vitro zu messen.

Die Methode zeigt eine vergleichbar hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu anderen Real-time PCR-Assays. Der Einsatz von Hybridisierungs-Sonden macht eine hochspezifische Detektion des PCR-Produkts möglich. Die schnelle Durchführung der PCR im LightCycler in weniger als einer Stunde gewährleistet darüber hinaus einen hohen Probenumsatz.

Damit stellt der vorliegende Assay ein äußerst leistungsfähiges Verfahren zur quantitativen Analyse der Zytokin-Genexpression dar, das nunmehr für Forschungen auf dem Gebiet der allogenen SZT zur Verfügung steht. Ferner eignet sich die Methode in diesem Zusammenhang zur Bestätigung

ausgewählter Daten der Zytokin-Genexpression von DNA-Chip-Experimenten, die derzeit im Labor ausgewertet werden.

Zur Minimierung von Inter-und Intra-Assay-Variationen sollte eine Normalisierung der Ergebnisse erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Normalisierung absoluter Werte der Zytokin-Genexpression in PBMCs gegen ein Housekeeping-Gen nach in vitro Stimulation exemplarisch dargestellt.

Unter anderen experimentellen Bedingungen, sprich wenn andere Zellen und andere Stimuli zur Anwendung kommen, muss erneut ein Housekeeping-Gen ausgewählt und seine Expression unter diesen Bedingungen geprüft werden.

Dieses Vorgehen ist jedoch hinsichtlich der Arbeitszeit und des Kostenfaktors unbefriedigend und beeinträchtigt wesentlich die Flexibilität des etablierten Zytokin-Assays. Wenn daher die experimentellen Bedingungen eine minimale Einschränkung an Genauigkeit zulassen, sollte die weniger aufwendige Standardisierung der Ergebnisse über die Masse der Gesamt-RNA oder die Zellzahl erfolgen.

In Bezug auf die komplexen Zytokin-Interaktionen unter pathologischen Bedingungen ist die Analyse eines möglichst breiten Spektrums an Zytokinen sinnvoll und wünschenswert. In dieser Arbeit wird beschrieben, wie auf einfache Art und Weise externe Standards generiert werden können. Es kommen außerdem ein konstantes PCR-Protokoll sowie ein identischer Reaktionsansatz zur Anwendung. Einzige Variablen sind die spezifischen Primer und Sonden.

DIe vorliegende LightCycler RT-PCR lässt sich damit schnell und einfach für die quantitative Analyse der Expression einer breiten und immer weiter expandierenden Zahl neuer Zytokine, Zytokin-Rezeptoren oder anderen Mediatoren in der Signalkette des Zytokinnetzwerks, die künftig von Interesse sind, evaluieren und ausbauen.

5. Zusammenfassung

Über den quantitativen Nachweis der Zytokin-Produktion unter pathologischen Bedingungen lassen sich Informationen über die stattfindenden Immunprozesse gewinnen. Die relativ neue Technik der Real-time RT-PCR wird dabei wegen ihrer leichten Durchführbarkeit, hohen Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit zunehmend zur Quantifizierung der Zytokin-Genexpression eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde im LightCycler Instrument unter Anwendung eines identischen Reaktionsansatzes und eines konstanten PCR-Protokolls ein Real-time RT-PCR-Assay zur absoluten Quantifizierung der mRNA-Expression für die folgende Auswahl an Zytokinen etabliert: IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α sowie IFN-γ. Sie sind neben anderen Zytokinen wesentlich an der Pathophysiologie von Komplikationen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (SZT) beteiligt. Für die einzelnen Zytokine wurden externe Standards generiert, die eine absolute Quantifizierung ermöglichen. Über den Einsatz der Standards in die Light-Cycler RT-PCR wurde die Methode evaluiert. Es zeigte sich dabei zu anderen Real-time RT-PCR-Assays eine vergleichbare Reproduzierbarkeit sowie eine hohe Sensitivität für die verschiedenen Zytokine (Detektions-imit IL-4, IL-8, IL-10, TNF-α und IFN-γ: 10^1 Kopien; IL-12, IL-18: 10^2 Kopien). Hybridisierungs-Sonden gewährleisten außerdem eine hochspezifische PCR-Produkt-Detektion. Mit dem hohen Durchsatz (25 Proben/48min) sowie dem breiten Spektrum an Zytokinen stellt die vorliegende Methode ein effizientes Verfahren zur Erstellung von Zytokin-Profilen dar.

Ferner wurde die Normalisierung von Ergebnissen des Assays nach in vitro Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen gegen das Housekeeping-Gen h-β2M demonstriert. Für die Anwendung der Methode unter anderen experimentellen Bedingungen muss erneut ein Housekeeping-Gen ausgewählt und geprüft werden, oder zumindest die alternative Standardisierung der Ergebnisse über die Masse der Gesamt-RNA oder die Zellzahl erfolgen.

Das Verfahren kann nun im Labor für Forschungen auf dem Gebiet der allogenen SZT zum Einsatz kommen und eignet dabei auch zur Bestätigung ausgewählter Daten der Zytokin-Genexpression von DNA-Chip Experimenten. Die Methode lässt sich außerdem schnell und einfach für die quantitative Analyse der Expression weiterer Zytokine, Zytokin-Rezeptoren oder anderen Mediatoren im Zytokinnetzwerk, die künftig von Interesse sind, evaluieren und ausbauen.

6. Literaturverzeichnis

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

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

Bendelac, A., Hunziker, R.D., Lantz, O. (1996)
Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells.
J. Exp. Med. 184, 1285-1293

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

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

Bird, J.J., Brown, D.R., Mullen, A.C., Moskowitz, N.H., Mahowald, M.A., Sider, J.R., Gajewski, T.F., Wang, C.R., Reiner, S.L. (1998)
Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle.
Immunity 9, 229-237

Bishop, J.O., Morton, J.G., Rosbash, M., Richardson, M. (1974)
Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA.
Nature 250, 199-204

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

Blazar, B.R., Taylor, P.A., Smith, S., Vallera, D.A. (1995)
Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow cells.
Blood 85, 842-851

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

Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., Romani, L. (2002)
Dendritic cells transport conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus.
J. Immunol. 168, 1362-1371

Breen, E.C., Salazar-Gonzalez, J.F., Shen, L.P., Kolberg, J.A., Urdea, M.S., Martinez-Maza, O., Fahey, J.L. (1997)
Circulating CD8 T cells show increased interferon-gamma mRNA expression in HIV infection.
Cell. Immunol. 178, 91-98

Brok, H.P.M., Heidt, P.J., Van der Meide, P.H., Zurcher, C.,
Vossen, J.M. (1993)
Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice.
J. Immunol. 151, 6451-6459

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

Cavaillon, J.M. (2001)
Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality.
Cell. Mol. Biol. 47, 695-702

Cenci, E., Perito, S., Enssle, K.H., Mosci, P., Latge, J.P., Romani, L.,
Bistoni, F. (1997)
Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis.
Infect. Immun. 65, 564-570

Chioccia, G., Smith, K.A. (1997)
Highly sensitive method to detect mRNAs in individual cells by direct RT-PCR using Tth DNA polymerase.
Biotechniques 22, 312-318

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

Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., Finberg, R.W. (2003)
Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2.
J. Virol. 77, 4588-4596

Constant, S.L., Bottomly, K. (1997)
Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.
Annu. Rev. Immunol. 15, 297-322

Degan, M., Mazzocco, F.T., Di Francia, R., Rossi, F.M., Pinto, A., Gattei, V. (2000)
Normalizing complementary DNA by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of beta2-microglobulin: molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia.
Diagn. Mol. Pathol. 9, 98-109

DeVries, M.E., Ran, L., Kelvin, D.J. (1999)
On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological response.
Semin. Immunol. 11, 95-104

Dey, B.R., Yang, Y.G., Szot, G.L., Pearson, D.A., Sykes, M. (1998)
Interleukin-12 inhibits graft-versus-host-disease through an Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion.
Blood 91, 3315-3322

D'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Motagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Romani, L. (2000)
Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo.
J. Exp. Med. 15, 1661-1674

Einsele, H., Hebart, H., (2002)
Cellular immunity to viral and fungal antigens after stem cell transplantation.
Curr. Opin. Hematol. 9, 485-489

Fitzgerald, K.A., O`Neill, L.A.J., Gearing, A.J.H., Callard, R.E. (2001)
in: The Cytokine FactsBook
2. Aufl., Academic Press, New York, Boston, San Francisco, San Diego, London, Sidney, Tokyo

Fowler, D.H., Kurasawa, K., Husebekk, A., Cohen, P.A., Gress, R.E. (1994)
Cells of the Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during murine graft-versus-host reaction. Regulation of cytokines and CD8+ lymphoid engraftment.
J. Immunol. 152, 1004-1013

Fujimori, Y., Takatsuka, H., Takemoto, Y., Hara, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Kakishita, E. (2000)
Elevated interleukin (IL)-18 levels during acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation.
Br. J. Haematol. 109, 652-657

Geist, L.J., Hopkins, H.A., Dai, L.Y., He, B., Monick, M.M., Hunninghake, G.W. (1997)
Cytomegalovirus modulates transcription factors necessary for the activation of the tumor necrosis factor-alpha promotor.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 16, 31-37

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996)
A novel method for real-time quantitative RT-PCR.
Genome Res. 6, 995-1001

Giese, T. (2001)
Development of quantitative RT-PCR tests for expression of cytokine genes on the LightCycler, 251-261
in: Meuer,S. Wittwer, C. Nakagawara, K.: Rapid Cycle Real-Time PCR : Methods and Applications;
1. Aufl., Springer, Heidelberg

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H.F. (1990)
Analysis of cytokine mRNA and cDNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725-2729

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001)
An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.
Methods 25, 386-401

Glimcher, L.H., Murphy, K.M. (2000)
Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up.
Genes Dev. 14, 1693-1711

Grundy, J.E., Lawson, K.M., MacCormac, L.P., Fletcher, J.M., Yong, K.L. (1998)
Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit viruses by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration.
J. Infect. Dis. 177, 1465-1474

Härtel, C., Bein, G., Kirchner, H., Klueter, H. (1999)
A human whole-blood assay for analysis of T-cell function by quantification of cytokine mRNA.
Scand. J. Immunol. 49, 649-654

Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Löffler, J., Monod, M., Latge, J.P., Einsele, H. (2002a)
Analysis of T-cell responses to Aspergillus fumigatus antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies.
Blood 100, 4521-4528

Hebart, H., Daginik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U.,Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Löffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.G., Einsele, H. (2002b)
Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-γ-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation.
Blood 99, 3830-3837

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996)
Real-time quantitative PCR.
Genome Res. 6, 986-994

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

Hibbert, L., Johnston, J.A. (2001)
Cytokine signalling and disease.
Expert. Opin. Ther. Targets 5, 641-653

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993)
Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology 11, 1026-1030

Hill, G.R., Ferrara, J.L.M. (2000)
The primacy of the gastrointestinaltract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation.
Blood, 95, 2754-2759

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991)
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5`-3`exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276-7280

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

Humar, A., StLouis, P., Mazzulli, T., McGeer, A., Lipton, J., Messner, H., MacDonald, K.S. (1999)
Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients.
J. Infect. Dis. 179, 484-488

Hummel, M., Abecassis, M.M. (2002)
A model for reactivation of CMV latency.
J. Clin. Virol. 25, 123-136

Iwamoto, G.K., Konicek, S.A. (1997)
Cytomegalovirus immediate early genes upregulate interleukin-6 gene expression.
J. Investig. Med. 45, 175-182

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001)
in: Immunobiology: the immune system in health and disease;
5. Aufl., Garland Publishing, New York

Kalvakolanu, D.V. (1999)
Virus interception of cytokine-regulated pathways.
Trends Microbiol. 7, 166-171

Kawasaki, E.S. (1990)
Amplification of RNA, 23
in: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. White, T.J.: PCR Protocols:
A Guide to Methods and Applications ;
Academic Press, San Diego, CA

Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P.D., Chenchik, A. (1994)
TaqStart Antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing antibody directed against Taq DNA polymerase.
Biotechniques 16, 1134-1137

Keskinen, P., Ronni, T., Matikainen, S., Lehtonen, A., Julkunen, I. (1997)
Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells.
Immunology 91, 421-429

Kline, J.N., Hunninghake, G.M., He, B., Monick, M.M.,
Hunninghake, G.E. (1998)
Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines.
Exp. Lung Res. 24, 3-14

Krenger, W., Snyder, K., Smith, S., Ferrara, J.L.M. (1994)
Effects of exogenous interleukin-10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens.
Transplantation 58, 1251-1257

Krenger, W., Cooke, K.R., Crawford, J.M., Sonis, S.T., Simmons, R., Pan, L., Delmonte, J., Karandikar, M., Ferrara, J.L.M. (1996)
Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-versus-host disease.
Transplantation 62, 1278-1285

Krenger, W., Hill, G.R., Ferrara, J.L.M. (1997)
Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease.
Transplantation 64, 553-558

Kühne B.S., Oschmann P. (2002)
Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis.
Biotechniques 33, 1078-1089

Liu, J., Anderson, B.E., Robert, M.E., McNiff, J.M., Emerson, S.G., Shlomchik, W.D., Shlomchik, M.J. (2001)
Selective T-cell subset ablation demonstrates a role for T1 and T2 cells in ongoing acute-graft-versus-host disease.
Blood 98, 3367-3375

Löffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagmeyer, 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

Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccini, M.P., Rugiu, F.S., DeCarli, M., Ricci, M., Romagnani, S. (1992)
Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the development of human Th1 and TH2 clones.
J. Immunol. 148, 2142-2147

Magram, J., Connaughton, S.E., Warrier, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., Gately, M.K. (1996)
IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses.
Immunity 4, 471-481

Manetti, R., Parrochi, P., Giudizi, M.G., Maggi, E., Trinchieri, E., Romagnani, S. (1993)
Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [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

Mashishi, T., Gray, C.M. (2002)
The ELISPOT assay: an easyly transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes.
Clin. Chem. Lab. Med. 40, 903-910

Mehrad, B., Strieter, R.M., Standiford, T.J. (1999)
Role of TNF-α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis.
J. Immunol. 162, 1633-1640

Meierhoff, G., Ott, P.A., Lehmann, P.V., Schlott, N.C. (2002)
Cytokine detection by ELISPOT: relevance for immunological studies in type 1 diabetes.
Diabetes Metab. Res. Rev. 18, 367-380

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

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

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

Mire-Sluis, A.R., Thorpe, R. (1998)
Laboratory protocols for the quantification of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines.
J. Immunol. Methods 211, 199-210

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

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

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

Murayama, T., Mukaida, N., Sadanari, H., Yamaguchi, N., Khabar, K.S., Tanaka, J., Matsushima, K., Mori, S., Eizuru, Y. (2000)
The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 298-304

Murphy, W.J., Welniak, L.A., Taub, D.D., Wiltrout, R.H., Taylor, P.A., Vallera, D.A., Kopf, M., Young, H., Longo, D.L., Blazar, B.R. (1998)
Differential effects of the absence of interferon-γ and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice.
J. Clin. Invest. 102, 1742-1748

Myers, T.W., Gelfand, D.H. (1991)
Reverse transcription and DNA amplification by a Thermus thermuphilus DNA polymerase.
Biochemistry 30, 7661-7666

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. (2001)
Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.
Annu. Rev. Immunol. 19, 423-474

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

Nicolic, B., Lee, S., Bronson, R.T., Grusby, M.J., Sykes, M. (2000)
Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets.
J. Clin. Invest. 105, 1289-1298

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

O`Garra, A., Arai, N. (2000)
The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 differentiation.
Trends Cell Biol. 10, 542-550

Oppenheim, J.J. (2001)
Cytokines: past, present, and future.
Int. J. Hematol. 74, 3-8

O`Shea, J.J., Ma, A., Lipsky, P. (2002)
Cytokines and autoimmunity.
Nat. Rev. Immunol. 2, 37-45

Overbergh L., Valckx D., Waer M., Mathieu C. (1999)
Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR
Cytokine 11, 305-312

Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, R., Bouillon, R., Mathieu, C. (2003)
The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression.
J. Biomol. Tech. 14, 33-43

Pala, P., Hussel, T., Openshaw, P.J. (2000)
Flow cytometric measurement of intracellular cytokines.
J. Immunol. Methods 243, 107-124

Pallisgaard, N., Clausen, N., Schroder, H., Hokland, P. (1999)
Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript.
Genes Chromosomes Cancer 26, 355-365

Powrie, F., Coffman, R.L. (1993)
Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention.
Immunol. Today 14, 270-274

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

Reddy, N.R., Wilkie, B.N. (2000)
Quantitation of porcine cytokine and beta 2-microglobulin mRNA expression by reverse transcription polymerase chain reaction.
J. Immunol. Methods 233, 83-93

Reddy, P., Teshima, T., Kukuriga, M., Ordemann, R., Liu, C., Lowler, K., Ferrara, J.L.M. (2001)
Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis.
J. Exp. Med. 194, 1433-1440

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997)
Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.
Anal. Biochem. 245,154-160

Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., O'Garra, A. (1997)
IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB.
Immunity 7, 571-581

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

Romani, L. (1999)
Immunity to Candida albicans: Th1, Th2 cells and beyond.
Curr. Opin. Microbiol. 2, 363-367

Saiki, R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985)
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science 230, 1350-1354

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Soffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239, 487-491

Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A. (2000)
Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.
J. Biochem. Biophys. Methods 46, 69-81

Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993)
Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production an diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10188-10192

Sparrelid, E., Emanuel, D., Fehniger, T., Andersson, U., Andersson, J. (1997)
Interstitial pneumonitis in bone marrow transplant recipients is associated with local production of TH2-type cytokines and lack of T cell-mediated cytotoxicity.
Transplantation 63, 1782-1789

Stordeur P., Poulin L.F., 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

Sykes, M., Abraham, V.S., Harty, M.W., Pearson, D.A. (1993)
IL-2 reduces graft-versus-host disease and preserves a graft-versus-leukemia effect by selectively inhibiting $CD4^+$ T cell activity.
J. Immunol. 150, 197-205

Sykes, M., Szot, G.L., Nguyen, P.L., Pearson, D.A. (1995)
Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease.
Blood 86, 2429-2438

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

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

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

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

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, reasearch0034.1-0034.11

Waha, A., Sturne, C., Kessler, A., Koch, A., Kreyer, E., Fimmers, R., Wiestle, O.D., von Deimling, A., Krebs, D., Schmutzler, R.K. (1998)
Expression of the ATM gene is significantly reduced in sporadic breast carcinomas.
Int. J. Cancer 78, 306-309

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

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

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

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

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

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

Williamson, E., Garside, P., Bradley, J.A., More, I.A.R., and Mowat, A.M. (1997)
Neutralizing IL-12 during induction of murine acute graft-versus-host disease polarizes the cytokine profile toward a Th2-type alloimmune response and confers long term protection from disease.
J. Immunol. 159, 1208-1215

Yang, Y.G., Dey, B.R., Sergio, J.J., Pearson, D.A., Sykes, M. (1998)
Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acut graft-versus-host disease by interleukin 12.
J. Clin. Invest. 102, 2126-2135

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

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben, recht herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Überlassung des Themas.

Dr. rer. nat. Jürgen Löffler. Jürgen, ich danke Dir für die Aufmerksamkeit, die Du der Arbeit entgegengebracht hast, für Dein stets offenes Ohr und Deine Geduld, sowie für zahlreiche unersetzliche Ratschläge und die überaus angenehme Zusammenarbeit. Ich konnte viel von Dir lernen.

Marija Markulin auf gentechnischer und Friederike Frank auf molekularbiologischer Seite des Labors. Mein Dank steht nicht nur für Eure Hilfsbereitschaft und Unterstützung sondern auch für das immer freundliche und herzliche Arbeitsklima.

Meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir Rückhalt gibt.

Lebenslauf

Name:	Phillipp Christopher Swatoch
Geburtsdatum:	23.08.1978
Geburtsort:	Tübingen
Eltern:	Kurt Swatoch, selbständiger Kaufmann
	Gertrud Swatoch, geb. Bucher, Lehrerin
Geschwister:	Maike Swatoch, selbständige Kauffrau
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1985 - 1989	Grundschule Rottenburg a.N.
1989 - 1998	Eugen-Bolz-Gymnasium Rottenburg a.N.
23.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
14.07.2000	Ärztliche Vorprüfung
17.09.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.04.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.04.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung