

Aus der Medizinischen Klinik II

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele

**Etablierung und Evaluierung von quantitativen RT-PCR- und ELISA-
Verfahren zur Bestimmung muriner Zytokinspiegel bei der
Immunantwort gegenüber *Aspergillus fumigatus***

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marlene Butters

aus Stuttgart

Würzburg, Dezember 2008

Refent: Prof. Dr. med. H. Einsele

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. O. Kurzai

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. August 2009

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die invasive Aspergillose	1
1.2	A. fumigatus	3
1.3	Immunantwort auf invasive Aspergillose	4
1.3.1	Unspezifische Immunantwort	4
1.3.2	Spezifische Immunantwort	7
1.4	Mausmodell	9
2.	Material und Methoden	12
2.1	Geräte und Material	12
2.1.1	Materialien und Bezugsquellen	12
2.2	Methoden	15
2.2.1	PCR	15
2.2.1.1	Das LightCycler RTPCR System	15
2.2.1.2	Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA	19
2.2.1.2.1	RNA Extraktion	19
2.2.1.2.2	cDNA-Produktion mit herkömmlicher reverser Transkriptase PCR	21
2.2.1.2.3	Gelelektrophorese	22
2.2.1.2.4	Aufreinigung	24
2.2.1.2.5	Vermessung	24
2.2.1.2.6	Berechnung der Kopienzahl	25
2.2.1.2.7	Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR:	25
2.2.1.2.8	Validierung der Testläufe	28
2.2.1.2.9	Reproduzierbarkeit	29
2.2.2	ELISA	29
3.	Ergebnisse	31
3.1	Spezifität der Primer	31

3.2	Linearität	35
3.3	Sensitivität	37
3.4	Reproduzierbarkeit	37
3.4.1	Inter-Assay Reproduzierbarkeit	38
3.4.2	Intra-Assay Reproduzierbarkeit	40
3.5	Expression von TNF α , IL-10, IL-12p40 in murinem Probenmaterial	42
3.6	Quantität von TNF α im ELISA	43
4.	Diskussion	45
4.1	Vorzüge der RT-PCR im Vergleich zu anderen quantitativen spezifischen Nachweisverfahren	45
4.2	RT-PCR zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-mRNA- Expression	46
4.2.1	Spezifität	47
4.2.2	Sensitivität	47
4.2.3	Reproduzierbarkeit	48
4.3	Im ELISA ermittelte TNF α -Titer verglichen mit der aktuellen Studienlage	49
4.4	Die verschiedenen Möglichkeiten der in-vivo Studie anhand des Mausmodells	51
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	55
	Literaturverzeichnis	56
	Tabellenverzeichnis	63
	Abbildungsverzeichnis	63
	Abkürzungsverzeichnis	64
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Die invasive Aspergillose

Invasive Pilzinfektionen zählen zu den gefürchtetsten Komplikationen mit hoher Mortalität bei Patienten mit hämatologischen oder soliden Neoplasien.

Gerade die invasive Aspergillose gehört heute zu den Haupttodesursachen nach Leukämietherapie, hämatopoetischer Stammzell- und Organtransplantation. Aber auch Patienten mit einer angeborenen oder einer erworbenen Immunschwäche haben ein erhöhtes Risiko an einer invasiven Aspergillose zu erkranken.

Mit Zunahme der immunsuprimierten Patienten hat auch die invasive Aspergillose in den letzten zehn Jahren enorm an Bedeutung zugenommen (Clark und Hajjeh, 2002, [1]; Shao et al. 2006, [2], McNeil et al., 2001, [3]). Zusätzlich begünstigt die Verdrängung von Bakterien durch potentere Antibiotika und die Azol-Prophylaxe gegen *Candida* die Veränderung des Keimspektrums, so dass Schimmelpilzinfektionen immer mehr an Bedeutung gewinnen (Maertens, 2007, [4]).

A. fumigatus ist gemeinsam mit *C. albicans* insgesamt der häufigste Erreger invasiver Pilzkrankungen, jedoch sind von den Aspergillen auch *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. nidulans* in der Lage eine invasive Aspergillose zu verursachen. Genaue Zahlen über das Verhältnis der einzelnen Aspergillusspezies fehlen. Es ist jedoch unbestritten, dass *A. fumigatus* an deren Spitze steht (Muller, 1994, [5]; Cornet et al., 2002, [6]).

Durch Inhalation gelangen die Sporen in die Lunge, wo sie bei geschwächter Abwehrfunktion auskeimen und in das umliegende Gewebe vordringen können. Im Grunde können die Sporen jedes geschädigte Gewebe befallen, die Lunge ist aber meist Hauptmanifestationsort.

Von der lokal ausgelösten Entzündung können die Aspergillen auch in Gefäße einsprossen und sich dadurch zum einen hämatogen den Weg in den Organismus bahnen, zum anderen durch Thrombosierung und Verletzung des

Endothels Nekrosen und Hämorrhagien verursachen. Auf diesem Wege kann es zu massiven Hämoptysen kommen (Tomee und van der Werf, 2001, [7]).

Durch das invasive Wachstum ist es dem Pilz möglich, alle bindegewebigen Grenzen zu überwinden. So kann er durch das Zwerchfell in Leber, Magen und Milz einwachsen und in seltenen Fällen durch Penetration des Perikards eine Infektion des Herzens verursachen (Walsh und Bulkeley, 1982, [8]).

Epidemiologisch werden invasive Aspergillosen am häufigsten bei granulozytopenen Patienten nach der Behandlung einer AML oder nach Knochenmarktransplantation beobachtet, gefolgt von Patienten nach Organtransplantationen (Mittermayer und Allerberger, 2006, [9]; Tomee und van der Werf, 2001, [7]).

Die Angaben über die Letalität dieser Erkrankung schwanken und werden zwischen 50 und 90 % angegeben (Lin et al., 2001, [10]). Das Patientenkollektiv ist schwer zusammenzustellen, da die Letalität je nach Grunderkrankung und Manifestationsort schwankt. Am höchsten ist die Letalität der invasiven Aspergillose nach Knochenmarktransplantation (Groll et al., 1996, [11]).

Entsprechend stellen Patienten mit myeloablativer Chemotherapie und anschließender Knochenmarktransplantation ein besonders gefährdetes Patientenkollektiv dar. Die Häufigkeit der Aspergillose beträgt hier ca. 20% und zeigt im wesentlichen zwei Gipfel: den ersten in der neutropenischen Phase, den zweiten nach ca. 3 Monaten im Rahmen der Therapie einer etwaigen GvHD (Brodoefel et al., 2005, [12]).

Leider liegen nicht viele Veröffentlichungen zur Epidemiologie der invasiven Aspergillose vor. Die Angaben schwanken des weiteren je nach untersuchter Gruppe sowie Spezifität und Sensitivität der Methoden. Die veröffentlichte Prävalenz von Aspergillusinfektionen beispielsweise bei Intensivpatienten wird zwischen 2 und 7% angegeben (Garnacho-Montero, 2005, [13]; Meerssemann et al., 2004, [14]).

1.2 *A. fumigatus*

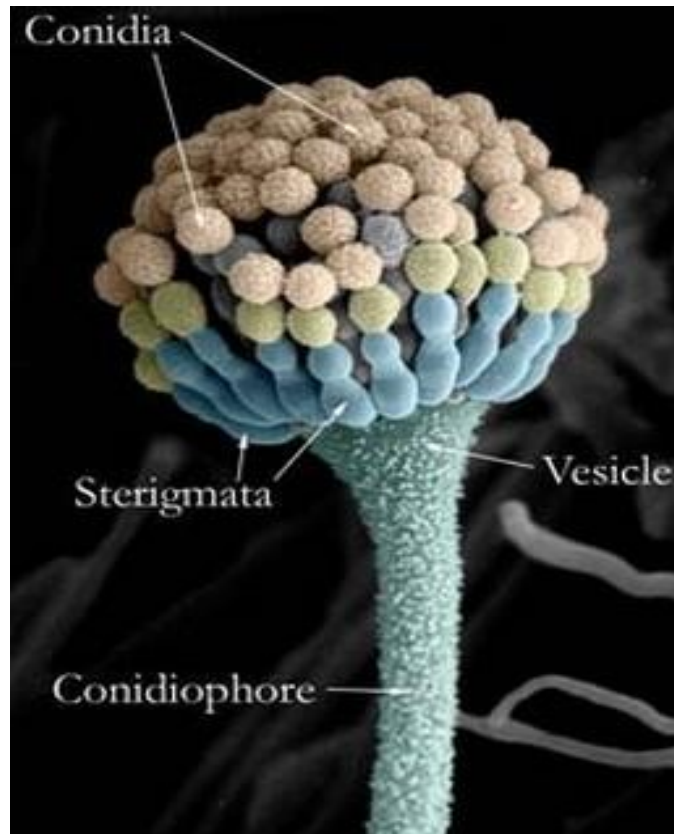


Abb. 1: mikroskopisches Bild von *Aspergillus*

A. fumigatus ist ein Schimmelpilz der Gattung *Aspergillus*. Der Name stammt ab von dem lateinischen Wort *fumus*, der Rauch, und spielt auf die rauchgrüne Farbe des Pilzes an, die von einem Pigment in den Sporen verursacht wird. Weil die Form des nur unter bestimmten Umweltbedingungen entstehenden Fruchtkörpers einer Gießkanne nur allzu ähnlich sieht, wird er *Aspergillus* genannt (lat. *aspergillum*: Gefäß zum Besprengen, Gießkanne).

A. fumigatus gehört zu den verbreitetsten Spezies auf der Erde überhaupt. Der Pilz findet sich von der Antarktis bis zur Sahara praktisch überall. Im

Durchschnitt atmet ein Mensch jeden Tag ca. 100 Sporen ein. Diese Sporen können aufgrund ihrer sehr geringen Größe bei einem Durchmesser von nur ca. 3 µm sehr tief in die Lunge eindringen, wodurch sich der Hauptmanifestationsort der invasiven Aspergillose erklärt (Latgé, 1999, [15]).

A. fumigatus ist ein so genannter saprophytischer Pilz, der mit seinem versatilen Metabolismus eine Vielzahl von Stoffen zersetzt. Er ist sogar in der Lage, auf Glas zu wachsen. Zudem ist die Art sehr thermotolerant und kann bei Temperaturen zwischen 12–56 °C leben (Reiß J, 1998, [16]).

Das Leben eines Aspergillus beginnt als Exospore oder Konidie, aus der zunächst eine einzelne Hyphe auskeimt. Das Auskeimen, auch Germination genannt, kann durch unterschiedliche Umweltreize, z.B. das Vorhandensein von Nährstoffen, ausgelöst werden (Carlile und Watkinson 1994, [17]).

Ist die Germination ausgelöst, kommt es zunächst zum Anschwellen, dem sogenannten isotropen Wachstum, der ruhenden Konidie. Dabei wird die Zellwand umorganisiert und eine Veränderung der Oberflächenstruktur tritt ein.

Im nächsten Schritt verzweigt sich die Hyphe immer weiter zu einer Masse von Hyphen, dem Mycel. Daraufhin bildet das Mycel eine Conidiophore aus, eine gießkannenförmige Zelle, an der die Exosporen reifen und dann abgeschnürt werden. Diese unzähligen Sporen werden bereits durch leichte Luftbewegungen abgelöst und können über sehr große Strecken hinweg transportiert werden (Reiß J, 1998, [16]).

1.3 Immunantwort auf invasive Aspergillose

1.3.1 Unspezifische Immunantwort

Die unspezifische Immunität spielt eine Hauptrolle im Kampf gegen *A. fumigatus* bei immunkompetenten Personen.

Anatomische Barrieren: Die meisten Konidien von *A. fumigatus* werden vom Zilienschlag der Mucosazellen aus der Lunge transportiert. Allerdings ist dies weniger effizient als bei anderen Mikroorganismen, da *A. fumigatus* durch die

Produktion von Toxinen die Bewegung der Zellen hemmt (Amitani et al., 1995, [18]). Zusätzlich schädigen Proteasen das Epithel.

Es konnte gezeigt werden, dass Surfactant schützende Wirkung hat, da die Surfactant Proteine A und D (SP-A und SP-D) die Agglutination, Phagozytose und die Zerstörung der Konidien durch Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten unterstützten (Madan, Eggleton, Kishore, 1997, [19]).

Humorale Komponenten: Sowohl Fibrinogen, als auch CRP steigen im Serum bei Infektion mit *A. fumigatus*. Fibrinogen kann den Pilz im Serum binden, doch seine Funktion bei der invasiven Infektion ist ungeklärt. Das CRP bindet an die Hyphen und löst die Komplementkaskade aus (Jensen et al., 1986, [20]).

Die Bindung von C3 an *A. fumigatus* und die Wirkung des alternativen Weges der Komplementkaskade wurden im Detail untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass je nach Zustand des Pilzes (Konidie oder Hyphe) Unterschiede bestehen. Scheinbar löst die Oberflächenveränderung des Keims beim Anschwellen und Auskeimen eine Bindung von C3 aus (Kozel et al., 1989, [21]).

Phagozyten: Die Rolle der Phagozyten ist ein weites Forschungsfeld. Die Ergebnisse sind aufgrund unterschiedlichen Versuchsaufbaus und Methoden sehr verschieden. Grundsätzlich ist man sich aber bei einer Tatsache einig: Phagozyten sind unvergleichlich wichtig für den Schutz gegen *A. fumigatus*. Alveolarmakrophagen sind zusammen mit eingewanderten neutrophilen Granulozyten die wichtigsten Zellen für die Elimination von *A. fumigatus*.

Makrophagen: Über die genauen Vorgänge der Erkennung, Bindung und Aufnahme der Alveolarmakrophagen wird derzeit viel publiziert. Beispielsweise spielen die Oberflächenantigene β 1–3 glucan und der toll-like receptor 2 eine entscheidende Rolle bei der Phagozytose (Luther et al., 2005, [22]). Diese Gruppe bewies auch, dass auf geschwollenen Konidien die Zahl der Antigene auf der Oberfläche zunimmt, was die Tatsache erklärt, dass der Organismus aggressiver auf germinierte Sporen reagiert.

Nach der Aufnahme der Konidien resultiert eine typische Phagozytenreaktion (Robertson, 1991, [23]). Im Zuge dessen werden mit einer Verzögerung von einigen Stunden die Konidien abgetötet, nach 24 h sind 90% eliminiert.

Das für die Tötung der Konidien verantwortliche System der Fresszellen konnte noch nicht aufgefunden gemacht werden. Es gibt allerdings Daten, die sichern, dass die Sauerstoffradikale der Makrophagen nicht alleine dafür zuständig sein können. Ähnliches wurde für die Stickoxide gezeigt. Das Verhalten der Makrophagen ändert sich auch unter Anwesenheit von N-monomethyl-L-Arginin, einem kompetitiven Inhibitor der Stickoxide, nicht (Michaliszyn et al., 1995, [24]). Allerdings steigert die Anwesenheit von *A. fumigatus* die proteolytische Aktivität der Makrophagen signifikant. Deren kationische Proteine und antipilz-spezifischen Enzyme besitzen eine starke Wirkung gegen *A. fumigatus* (Diamond, 1982, [25] und 1983, [26]).

Außerdem spielt der anatomische Sitz der Makrophagen eine Rolle: So sind peritoneale Makrophagen im Vergleich zu Alveolarmakrophagen viel schlechter in der Lage, Konidien zu eliminieren. Der Grund für die Tatsache ist bislang ungeklärt.

Da nicht 100% der von den Makrophagen phagozytierten Konidien abgetötet werden können, diese sogar in der Lage sind auszukeimen, kommen weitere phagozytierenden Zellen zum Einsatz: die neutrophilen Granulozyten.

Neutrophile Granulozyten: Eigentlich ging man davon aus, dass neutrophile Granulozyten ausschließlich Einfluss auf Hyphen hätten. Doch eine Reihe von Studien zeigte, dass sie wohl auch in der Lage sind, geschwollene Konidien, die nicht von Makrophagen beseitigt werden konnten, zu phagozytieren und zu eliminieren (Sturtevant und Latgé, 1992, [27]; Levitz und Farrell, 1990, [28]). Trotzdem bleiben die neutrophilen Granulozyten vorrangig verantwortlich für die Beseitigung von Hyphen, nicht von Konidien.

Die Bindung an deren Oberfläche löst die Degranulation und Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen aus (Diamond und Clark, 1982, [25]; Levitz und Farrell, 1990, [28]).

Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Hyphen mit AK oder mit Komplementfaktoren opsoniert sind, oder nicht (Sturtevant und Latgé, 1992, [27]).

Der gesamte Tötungsmechanismus der Phagozyten ist noch nicht aufgeklärt, es scheint mehr als einen oxidativen Weg zu geben, das zeigen Experimente mit Zellen von Patienten mit chronischer Granulomatose oder Myeloperoxidase Defizit (Diamond und Clark. 1982, [25]; Diamond und Huber 1983, [26]; Rex, Bennett, 1991, [29]; Rex et al. 1990, [30]).

Beispielsweise spielen Lactoferrin (Peptid 2) oder GM-CSF eine Rolle zur Verbesserung der Tötungsmechanismen der Neutrophilen. So stimulieren die beiden Peptide in Kombination die neutrophile Produktion von Superoxid (O_2^-) (Okamoto et al., 2004, [31]).

Blutplättchen: Sie scheinen einige Funktionen der Neutrophilen zu unterstützen. So haben thrombozytopen Patienten ein erhöhtes Risiko an invasiver Aspergillose zu erkranken (El-Gedaily et al., 2004, [32], Christin et al., 1998, [33]).

Toll-like Rezeptoren: Die Funktion des toll-like receptor 2 (TLR 2) konnte von Balloy et al. gezeigt werden. Seine Gruppe verglich intratracheale Zytokinspiegel von Mäusen des Wildtyps (TLR2 +/+) mit denen von Knockout Mäusen (TLR2 -/-). Dabei hatte TLR2 +/+ eine deutlich höhere Überlebensrate sowie höhere Spiegel an $TNF\alpha$ und IL-12 (Balloy et al., 2005, [34]).

1.3.2 Spezifische Immunantwort

Da die Regulation der T_H1 - und T_H2 -Antwort große Auswirkung auf die Sterblichkeit der invasiven Aspergillose hat, kommt auch der zellvermittelten Immunantwort eine große Rolle bei der Erforschung dieser Erkrankung zu. Bekanntlich begünstigt die T_H1 -Antwort eine stark zellvermittelte Reaktion, die T_H2 -Antwort drosselt diese und fördert die Produktion von Antikörpern (AK) (Stevens, 2006, [35]).

Nun hat man herausgefunden, dass hohe Spiegel von INF- γ , TNF α und IL12 eine Resistenz gegen invasive Aspergillose bewirken. Diese Zytokine sind mit einer T_H1-Antwort assoziiert. IL-10, ein die T_H1-Antwort inhibierendes Zytokin, ist mit einer signifikant höheren Sterblichkeit bei Mensch und Tier assoziiert. Unabhängig vom Versuchsaufbau ergab sich stets dieses Muster der protektiven zellulären Abwehr. Im Gegensatz dazu steht die mit fulminanterem Krankheitsverlauf oder Tod assoziierte humorale Abwehr. Dies zeigte sich z.B. im Vergleich von IL-10 $-/-$ mit IL-10 $+/+$ Mäusen, bei dem die Knockout Mäuse dem Wildtyp gegenüber sehr viel besser abschnitten (Del Sero et al., 1999, [36]; Clemons et al., 2000, [37]). Weiterhin bei Mäusen nach Gabe von Anti-TNF α /INF- γ , die mit solchen verglichen wurden, die INF- γ , und TNF α zusätzlich bekamen. Hierbei gab es keine Toten auf Seiten der INF- γ , und TNF α Fraktion, unabhängig davon, ob die Mäuse vorher mit Cortison behandelt wurden, oder nicht (Nagai et al., 1995, [38]).

Die Tatsache, dass die T-Helferzellreaktion eine Schlüsselposition in der Immunantwort auf invasive Aspergillose darstellt, lässt auch die professionell Antigen präsentierenden Zelle in den Vordergrund rücken. Auch hier wurde ein nachteiliger Effekt des IL-10 auf die Antipilzwirkung der mononukleären Zellen gezeigt. Die Produktion der Makrophagen von O₂⁻ wurde gedrosselt und damit die schädigende Wirkung auf Hyphen stark reduziert. Überraschenderweise konnte die Eliminierung der Konidien durch Phagozytose und intrazelluläres Abtöten durch IL-10 Behandlung der Makrophagen verbessert werden (Roilides et al., 1997, [39]).

Allerdings scheint der negative Effekt des IL-10 auf die Gesamtabwehr de facto zu überwiegen. Cenci et al. stellte bei HIV Patienten, ohne zusätzliche Neutropenie oder Cortisontherapie eine defekte Leistung der Neutrophilen fest. Auch hier wurde ein Zusammenhang mit den erhöhten Spiegeln von IL-10 durch Dysregulation der T-Helferzellen aufgrund der HIV Erkrankung postuliert. (Cenci et al., 1998, [40])

Makrophagen scheinen zwischen abgetöteten und lebenden Konidien unterscheiden zu können. Während die Geschwindigkeit der Phagozytose

identisch war, zeigte sich ein Unterschied in der T-Helferzellreaktion. Bei lebenden Konidien überwog die Antwort nach T_H1 , die abgetöteten Coniden jedoch lösten eine T_H2 -Antwort aus. (Rivera et al., 2005, [41])

Um mehr über die Vorgänge der zellvermittelten Abwehr zu erfahren, ist es wichtig, die Zytokinspiegel möglichst genau messen zu können. Mit dieser Absicht etablierten wir die drei wichtigsten Zytokine: $\mu TNF\alpha$, $\mu IL12$ und $\mu IL-10$, um weitergehende Aussagen über T_H1/T_H2 Vorgänge bei Mäusen treffen zu können.

1.4 Mausmodell

Zu Zwecken der Grundlagenforschung ist das Tiermodell den Patientenstudien auf verschiedenen Ebenen überlegen.

Zum einen stellt sich eine so komplexe Erkrankung wie die invasive Aspergillose bei immunsupprimierten Patienten sehr selten isoliert dar, zum anderen entsprechen die Ergebnisse von Patienten-Proben nicht denen unter festgelegten Laborbedingung.

Äußere Einflüsse, wie beispielsweise weitere Infektionen, können bei einem Patientenkollektiv nicht ausgeschaltet werden. So wurden in dieser Arbeit nur Proben von Mäusen verwendet, deren Grad der Immunsuppression, die Zahl der nasal applizierten Konidien, der Tag der Infektion und weitere äußere Bedingungen wie Raumtemperatur und Ernährung identisch waren.

Nicht vergessen werden darf, dass bei Patienten abgesehen vom unterschiedlichen Schweregrad der Grunderkrankung und Pilzlast auch individuelle Unterschiede in der Konstitution des Immunsystems zu beachten wären. Bei Tieren mit identischer genetischer Ausstattung sind nur geringe Schwankungen zu erwarten.

Mäuse sind in der Erforschung der invasiven Aspergillose sehr beliebt, da man mit ihnen die meisten Erfahrungen hat. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass mit Steroiden behandelte Mäuse an einer invasiven Aspergillose erkranken und sterben, während gesunde Mäuse selbst auf enorme Pilzbelastung hin keine Symptome zeigen, oder zumindest eine Invasivität verhindern können (Brummer et al., 2001; [42]). Nicht nur Corticosteroide wie Cortisonacetat und Dexametasone finden Anwendung in der Modulation des murinen Immunsystems, auch alkylierende Zytostatika wie Cyclophosphamid macht man sich zu Nutze (Quezada et al., 2008; [43]). Von einem Unterschied in der Art der Immunreaktion, je nach Medikamentenart und Dosierung ist auszugehen, die Lymphozyten reagieren entsprechend in unterschiedlicher Weise (Balloy et al., 2005; [44]).

Über die Gabe von Medikamenten hinaus reicht das Modell von Cenci und Menacci. In ihrem Mausmodell werden die Tiere mit einer tödlichen Dosis bestrahlt und anschließend allogene Stammzelltransplantiert. Das Stammzellpräparat wurde von T-Zellen gereinigt, so dass ein ansonsten unbeeinflusstes, T-Zell freies Immunmodell entsteht (Mencacci et al., 2001; [45], Cenci et al., 2002; [46]). Auch die Idee der Genmodulation ist, z.B. anhand der septischen Granulomatose, erfolgreich erprobt. Durch Ausschalten des für den NADPH-Oxidase-Komplex verantwortlichen Gens sind die Makrophagen nicht mehr in der Lage die Pilzsporen zu beseitigen. Auf diese Weise ist weniger Sporenlast nötig, um die Tiere zu infizieren (Morgenstern et al., 1997; [47]).

Das Ausschalten einzelner Gene macht es möglich, die Relevanz einzelner Rezeptoren und Signalwege genauestens zu untersuchen. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass der über Toll-like und β -Glukan-Rezeptoren vermittelte MyD88-abhängige Signalweg eine zentrale Rolle in der Entzündungsreaktion und Aktivierung der Alveolarmakrophagen hat (Bretz et al., 2008; [48]).

Angepasst an das jeweilige Organ des Interesses ist es ebenfalls entscheidend, auf welche Art die Sporen appliziert werden. So unterscheidet man intranasale Applikation von intravenöser (über die Schwanzvene) oder intraperitonealer

Gabe. Man erhält dementsprechend unterschiedliche Verteilungsmuster innerhalb des Organismus (Latgé, 1999; [15]). Noch kurz erwähnt werden soll die Methode intratracheal applizierter, mit *Aspergillus* beschichteter Agaroseketten (Nawada, 1996; [49]).

Nicht nur die Art der Immunsuppression ist entscheidend, auch gibt es Unterschiede in der Pathogenität der eingesetzten *A. fumigatus* Stämme (Sarfati und Diaquin, 2002; [50]). Ebenfalls sollte das Alter der Mäuse berücksichtigt werden, da auch dies nach Corbel und Eades eine Rolle spielt. In ihrer Studie benötigten die älteren Mäuse im Vergleich mit ihren jüngeren Artgenossen eine höhere Anzahl an intranasalen Konidien um zu erkranken (Corbel und Eades, 1977; [51]).

Die TNF α Konzentration von 19 mit Cortikosteroiden vorbehandelten und mit *Aspergillus*konidien infizierten Mäusen soll in dieser Arbeit gemessen und mit aktuellen Daten verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Material

2.1.1 Materialien und Bezugsquellen

Tab. 1: **Geräte**

PCR-Systeme	LightCycler 1,5 Mastercycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Computer Software	hp compaq	Hp
Software	LightCycler Software 3,5	Roche Diagnostik, Mannheim
Drucker	Epson stylus C86	Epson, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera-Safe	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Lamin Air HLB 2472	Heraeus, Hanau
Spectrometer	Nano Drop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge	Galaxie Mini	VWR, München
Pipetten	Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Gelkammer	40-0911	Peqlab, Erlangen
Spannungsinduktor	Standard Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Photometer	Alphamager	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Mikrowelle		Micromaxx
ELISA-Platten Schüttler	MS1 Minishaker	IKA, Staufen
ELISA Auslesegerät	GENios	Tecan, Crailsheim

Tab. 2: Verbrauchsgegenstände

LightCycler Kapillaren	20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	A.Hartenstein, Würzburg

Tab. 3: Kits

cDNA Produktion	quantiTect rev- Transkriptase	Qiagen, Hilden
konventionelle PCR	Sawdy Taq	PeqLab, Erlangen
Aufreinigung	Mini Elute PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden
LightCycler PCR	Fast Start DNA Master	Roche Diagnostics, Mannheim
ELISA	Quantikine Immunoassay TNFa murin	R+D Systems, Minneapolis, USA

Tab. 4: Primer und Sonden

Primer	mIL-10 F, mIL-10 R, muIL-12p40 R, muIL-12p40 F, TNFa R, TNFa ex3,4 F	Tib Molbiol, Berlin
Sonden	mIL-10 FL, mIL-10 LC, muIL-12p40 LC, muIL-12p40 FL, mu TNFa FLU, muTNFa LCR	Tib Molbiol, Berlin

Tab. 5: Chemikalien

Chloroform		
Agarose	NEED Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TAE Puffer	ultra PURE 10 x TAE	invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid		Fluka (Sigma- Aldrich) Buchs, CH
Gel-Ladepuffer	Blue Juice Gel Loading Buffer	invitrogen, Karlsruhe
Gel-Marker	READY-LOAD 100 bp DNA Ladder	invitrogen, Karlsruhe

Mausblut

Die Mausblut-Proben entstammen dem Labor von Elaine Bignell, das uns freundlicherweise die verwendeten Proben aus London zusandte.

Alle Mäuse wurden mit 10^7 Sporen *A. fumigatus* intranasal beimpft und das Blut 12-16 Stunden danach gewonnen. Die Mäuse waren aufgrund der Cortisonbehandlung neutropenisch. Genauere Angaben zur Dosierung und Zeitpunkt der Cortisongabe liegen uns leider nicht vor.

Die Milliliteranzahl der Proben schwankte zwischen ca. 60 μ l und 130 μ l. Das Blut wurde nach dem Schlachten der Mäuse gefroren und in tiefgekühltem Zustand in unser Labor übermittelt. Das genaue Datum der Probengewinnung und damit das Alter der Proben war uns ebenfalls unbekannt.

Die Tubes waren bis 19 nummeriert, in Nummer vier, fünf, sechs, 12, 13, 14 und 15 reichte die Menge nur für einen einzigen Einsatz von 50 μ l, so dass für diese Proben kein Mittelwert berechnet werden konnte.

2.2 Methoden

2.2.1 PCR

2.2.1.1 Das LightCycler RTPCR System

In dieser Arbeit fand das LightCycler-System von Roche Anwendung. Der Aufbau des Gerätes ist aus der Abbildung ersichtlich.

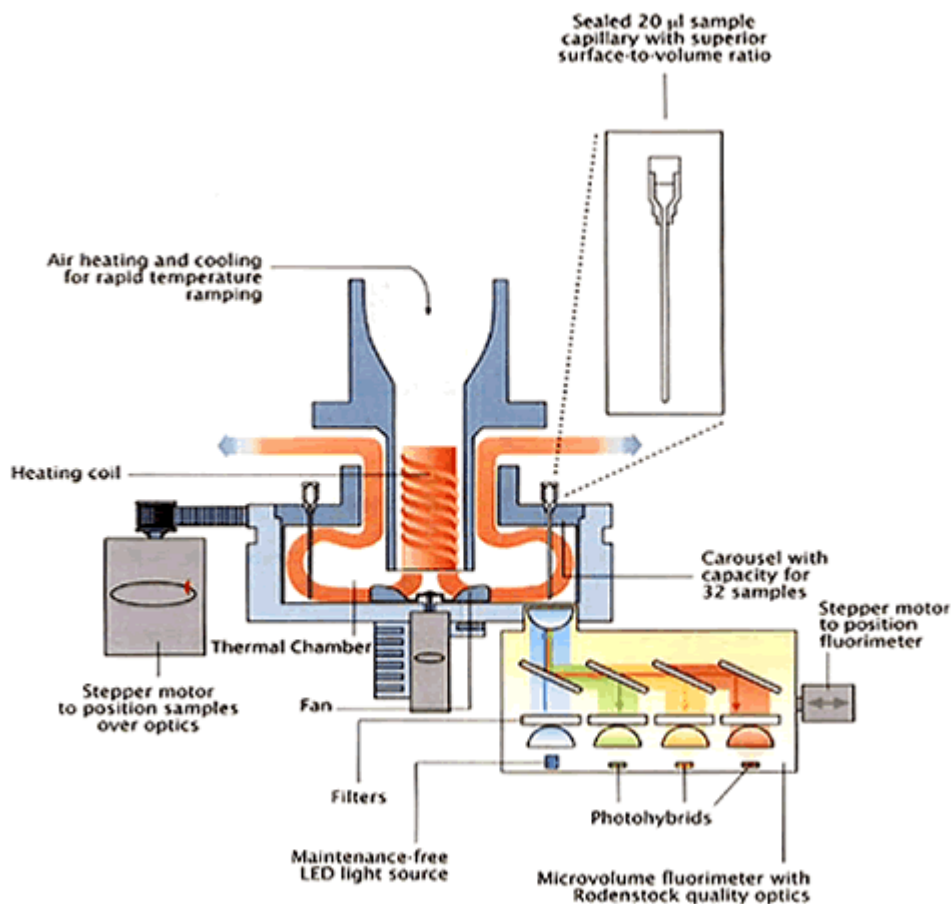


Abb. 2: schematischer Aufbau des LightCycler 1,5 Systems

Das optische System besteht aus drei Detektionskanälen für die Fluoreszenzmessung bei 530, 640, und 710 nm Wellenlänge. Hier wird die Fluoreszenz aller im Karussell angeordneten Proben mittels Photodioden während einer PCR gemessen. Die Amplifikation kann simultan auf dem Monitor verfolgt werden, wobei die LightCycler Software zur Analyse dient.

Dies geschieht während der Annealingphase (siehe Abb. 4-6). Die beiden Sonden lagern sich in unmittelbarer Nähe (höchstens 5 Nucleotide voneinander getrennt) an, wobei die Sonde 1 an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein gekoppelt ist. Die LED des LightCycler, regt mit ihrem blauen Licht der Wellenlänge 470 nm das Fluorescein dazu an, grünes Licht (530 nm) abzustrahlen, was vom ersten Messkanal des LightCycler registriert wird. Diese freiwerdende Energie regt die

mit LC Red 640 gekoppelte Sonde 2 zur Emittierung von rotem Licht (640 nm) an, welches vom zweiten Kanal gemessen wird. Im dritten Kanal kann das Licht der Wellenlänge 710 nm gemessen werden, welches von der Sonde LC Red 705 emittiert wird, was allerdings in dieser Arbeit nicht zur Anwendung kam.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer

	Oligonukleotide (von 5'-in 3'-Richtung)	Temp.
TNF α	F: CTGTAGCCCACGTCGTAGCA	64
	R: CGGCAGAGAGGAGGTTGACT	64
	A: CTTGGGCAGATTGACCTCAG	62
IL-10	F: AGCTGGACAACATACTGCTAAC	64
	R: CTCTTATTTTCACAGGGGAGAA	62
IL-12p40	F: ATGCCCTGGAGAAACAG	56
	R: GTGAACCGTCCGGAGTAA	56
	S: AGACATGGAGTCATAGGCTCTG	66
	A: TGGTGCTTCACACTTCAGGA	60

Vorwärtsprimer: F= Forward / S= Sense; Rückwärtsprimer: R= Reverse/ A= Antisense

Temp.= Schmelztemperatur in °C (nach „2+4-Regel“: A/T-Paar= 2°C, G/C-Paar=4°C)

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Sonden

	Oligonukleotide (von 5'-in 3'-Richtung)	Temp.
TNF α	FL: CCCGACTACGTGCTCCTCACCCA—FL	76
	LC: R640-CCGTCAGCCGATTTGCTATCTCATACC—PH	82
IL-10	FL: GGATCATTTCGATAAGGCTTGGCA—FL	74
	LC: R640-CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTGCATT—PH	78
IL-12p40	FL: TGCCACAAAGGAGGCGAGACTC—FL	70
	LC: R640-AGCCACTCACATCTGCTGCTCCA—PH	72

FL= Fluorescein markierte Sonde, LC= LC Red 640 markierte Sonde

Temp.= Schmelztemperatur in °C (nach „2+4-Regel“: A/T-Paar= 2°C, G/C-Paar=4°C)

Der Verlauf einer PCR lässt sich in drei Phasen einteilen: eine frühe Phase (Hintergrundphase), eine Phase mit im Programm ermitteltem exponentiellem Wachstum (log-Phase) und eine Plateau-Phase.

Anfangs übertreffen Hintergrundsignale diejenigen der PCR-Produkte, doch abhängig von der initial eingesetzten DNA-Menge übersteigt die Fluoreszenz des PCR-Produkts die Störfaktoren an einem bestimmten Punkt. Dieser Punkt ist definiert als crossing point und lässt die Software die anfängliche Konzentration ermitteln.

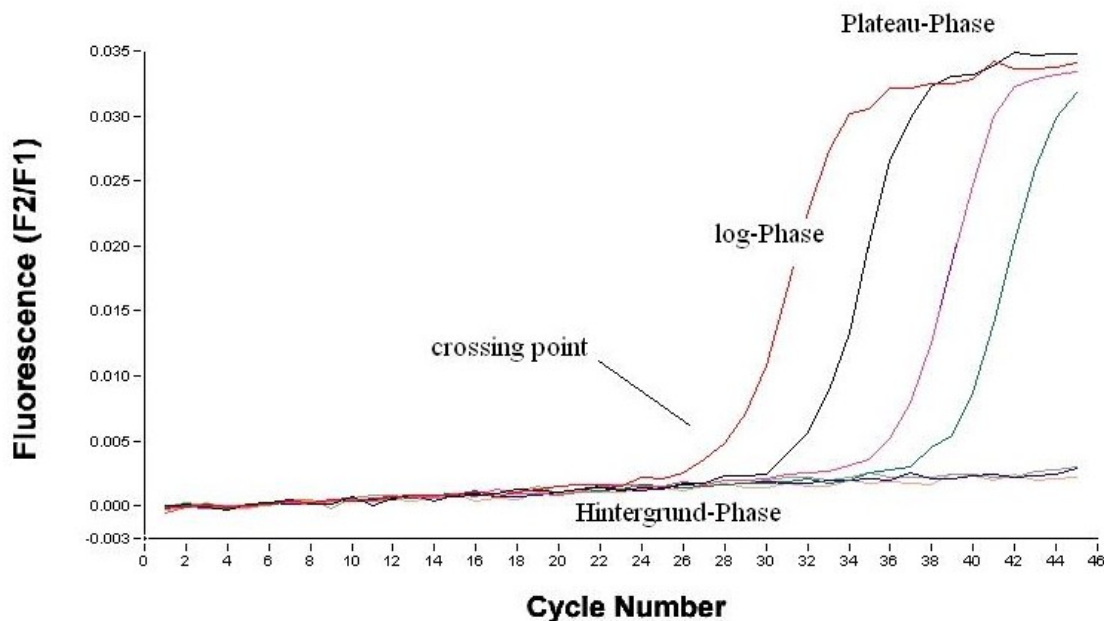


Abb. 3: PCR-Phasen (murines IL-10; $10e5-10e0+H_2O$)

2.2.1.2 Etablierung von externen Standards zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA

2.2.1.2.1 RNA Extraktion

Es kamen zwei verschiedene Möglichkeiten der RNA-Gewinnung zur Anwendung, einmal das RNAqueous-Micro Kit von Ambion, welches mit Filtern arbeitet und zum anderen die Technik mit Chloroform (TRIzol). Diese Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion, die die Tatsache ausnutzt, dass RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während z.B. Proteine besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden. Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer inhibieren RNAsen und verhindern damit einen Abbau der RNA (Chomczynski, 1993; [52]).

RNAqueous-Micro

Homogenisierung: Die Proben wurden bei fullspeed zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysis Solution durch kräftiges Vortexen gelöst. Das Guanidinium Thiocyanat lysiert die Zellen und sorgt für eine schnelle Inaktivierung der Ribonukleasen.

Es wurden 125 µl anstatt 50 µl 100% Ethanol in der Absicht zugefügt, auch die verhältnismäßig kleine mRNA zu erwischen.

Beladen der Filter: Die Filter wurden in 150 µl Schritten beladen und jeweils bei fullspeed 10 Sekunden zentrifugiert. Da das Tube eine Kapazität von 700 µl hat, war eine Entleerung erst anschließend nötig.

Waschen: Der Filter wurde nun mit 180 µl Waschlösung 1 beladen und bei fullspeed 10 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Dieser Vorgang wurde noch ein 2. und 3. Mal mit Waschlösung 2 und 3 wiederholt.

Daraufhin wurden die Filter nochmals für eine Minute bei fullspeed zentrifugiert, um auch möglichst viel Waschlösung aus dem Filter wieder zu entfernen.

Auswaschen der RNA: Um die RNA aufzufangen, transferierten wir die Filter in eine 1,5 ml Tube und gaben je 10 µl auf 75 °C vorgeheizte Auswaschlösung in die Mitte des Filters. Die Filter wurden eine Minute bei Raumluft inkubiert, um anschließend 30 Sekunden zentrifugiert zu werden. Um möglichst viel aus dem Filter zu gewinnen, wiederholten wir diesen Schritt noch einmal.

TRIZOL

Homogenisierung: Durch Zentrifugation bei fullspeed der Proben und Abpipettieren der Überstände erhielten wir Pellets, die wir durch Auf- und Abpipettieren mit 1 ml TRIZOL-Reagenz lösten.

Separation: Die homogenisierten samples wurden 5 Minuten bei Raumluft inkubiert, woraufhin 0,2 ml Chloroform pro Sample hinzugegeben wurde. Die Gefäße wurden vorsichtig verschlossen und von Hand für mindestens 15 Sekunden geschüttelt. Eine weitere Inkubationsphase von 2,5 Minuten folgte. Nach der daraufhin folgenden 15 minütigen Zentrifugation von 12 000 rpm bei 3° C zeigte sich eine deutliche Drei-Phasenbildung: unten die rote Phenol-Chloroform-, in der Mitte eine Interphase und oben eine farblose Wasserphase, in welcher die gelöste RNA zu vermuten war.

RNA Präzipitation: Diese Wasserphase wurde vorsichtig in ein neues Tube transferiert und der Rest für einen ELISA verwahrt. Die Flüssigkeit wurde nun zur RNA-Fällung mit 0,5 ml Isopropylalkohol gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Nach erneuter 15 minütiger Zentrifugierung in der 3°C kalten Zentrifuge bei 12 000 rpm, wurde der Überstand verworfen.

RNA-Waschen: Das verbliebene Pellet wurde mit 1ml 75% Ethanol versetzt und gevortext, um darauf bei 3°C für 5 Minuten bei 7 500 rpm zentrifugiert zu werden.

Dies wurde für 15 Minuten unter der Sterilbank getrocknet, wobei darauf geachtet wurde, dass das Pellet nicht komplett austrocknete.

Lösen der RNA: Um die RNA nun in RNase freiem Wasser zu lösen, wurde mit 15 ml RNase freiem Wasser einige Male auf- und abpipettiert, bevor im 55°C warmen Wasserbad für 10 Minuten inkubiert wurde.

Anschließend wurden die Proben wie in Kapitel 2.2.1.2.4. beschrieben, vermessen.

2.2.1.2.2 cDNA-Produktion mit herkömmlicher reverser Transkriptase PCR

Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion: (die Abkürzung RT-PCR soll der Real Time PCR vorbehalten bleiben) zuerst wird eine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, mit deren Hilfe RNA in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden kann. Wir benutzten hierbei das Kit von Qiagen: QuantiTect reverse Transkription, um die Maus-TotalRNA in cDNA umzuschreiben.

Ein μg RNA (in 8 μg PCR grade water) wurde bei 65°C zehn Minuten denaturiert und anschließend mit dem auf Eis pipettierten MasterMix vermischt.

Tab. 8: cDNA-Synthese MMX

Reagenz	Volumen in μl
10x Reaktionspuffer	2
25 mMol MgCl_2	4
Oligo dt-Primer	2,2
Desoxynucleotide Mix	2
AMV Reverse Transkriptase	0,8
RNAse Inhibitor	1
Gesamtvolumen:	12

Daraufhin wurde der reversen Transkriptase für 60 Minuten die cDNA-Synthese im Thermocycler bei 60°C ermöglicht, um direkt im Anschluss bei 95°C fünf Minuten lang denaturiert zu werden.

Erst im zweiten Schritt wurde mit einer herkömmliche PCR mit Hilfe der spezifischen Primer auch der gewünschte DNA-Abschnitt produziert. Hierfür benutzten wir ein KIT von Peqlab und folgenden Mix:

Tab. 9: Standard-Herstellung

Reagenz	Volumen in μl
H ₂ O	28,5
10x Reaktionspuffer	5
MgCl ₂	3
Primer F	1
Primer R	1
dNTPs	1
Polymerase	0,5
Gesamtvolumen:	40

zuzüglich 10 μl cDNA unverdünnt. Wieder eingesetzt im herkömmlichen PCR-Gerät nach folgendem Protokoll:

Tab. 10: Protokoll Standardherstellung

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
94°C	2 Min.	1
94°C	15 Sek.	45
60°C	30 Sek.	
72°C	30 Sek.	
72°C	5 Min.	1
4°C	Unendlich	1

2.2.1.2.3 Gelelektrophorese

Nach der Synthese des spezifischen Produkts können die DNA-Segmente auf ein Agarosegel auftragen und mit Ethidiumbromid in UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die elektrische Spannung, hier 120 Volt, trennt die durch das TAE (Tris-Acetat-EDTA) elektrisch maskierten Segmente nach ihrer Größe auf. Ein Marker, auch DNA-Leiter genannt, bildet Markierungen nach jeweils 100 Basenpaaren (bp) und macht dadurch die Länge abschätzbar. Es sind einfach DNA-Fragmente der festgelegten Längen zwischen 100 und 1000 in allen Hunderterlängen vorhanden, wodurch die Banden in Leiterform entstehen.

Zur Vorbereitung kocht man 1 g Agarose in 50 ml TAE mehrmals auf, lässt es 1-2 Minuten abkühlen und gießt es, vermischt mit 2 μl Ethidiumbromid in die

Gelform. Verschiedene Kämme vermögen die gebrauchte Anzahl an Taschen beim Erkalten der Agarose frei zu halten.

Zehn µl des Amplifikationsprodukts wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in die Taschen des vollkommen ausgehärteten Gels pipettiert. Die Pufferung der Gelkammer erfolgte mit einfach konzentriertem TAE-Puffer.

Die diskreten Zonen (Banden) konnten nach ca. einer Stunde mit Hilfe von UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden, da die Bindung des Ethidiumbromids an Nukleinsäuren dessen Absorptionsspektrum verändert. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen den Basen der DNA (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA/RNA-Konzentration sowie zur Länge der Nukleinsäure.

Die diskreten Zonen der Proben konnte man jetzt mit denen der "DNA-Leiter" vergleichen und so die Amplifikatlänge in Basenpaaren abschätzen.

Die Spezifität eines Amplifikats war bestätigt, wenn die abgelesene Länge mit der berechneten Länge übereinstimmte (siehe Abb. 8). Berechnet wurden die Längen über ein Internetprogramm des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

TNFα mit F/R-Primerpaar:	251 bp
IL-10 mit F/R-Primerpaar:	228 bp
IL-12p40 mit F/R-Primerpaar:	295 bp

2.2.1.2.4 Aufreinigung

Die nach der Gelelektrophorese verbliebenen 40 µl wurden im Anschluss aufgereinigt. Dies geschah anhand des Mini Elute PCR Purification Kits von Qiagen nach dem vorgeschriebenen Protokoll.

Das Aufreinigen wird benötigt, um PCR-Beiprodukte zu entfernen und damit die reine cDNA zu erhalten.

1. Binden der DNA: Zu den 40 µl des PCR-Produkts wurden (5 mal 40µl) 200µl PB-Puffer hinzupipettiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine Trennsäule gegeben und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss wurde verworfen, und die Trennsäule danach wieder in das Sammel-Tube eingebracht.

2. Waschen: Das Waschen erfolgte durch die Zugabe von 750 µl PE+Ethanol Puffer auf die Trennsäule, welche daraufhin für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde mit 13200 rpm ein weiteres Mal wiederholt. Nach jedem Zentrifugationsvorgang wurde auch hier der Durchfluss verworfen.

3. Elution der DNA: Zunächst musste die Trennsäule in ein neues Sammel-Tube gegeben werden und 30 µl EB Puffer mittig auf die Säule pipettiert werden. Daraufhin wurde eine Minute abgewartet, bevor erneut mit 8000 rpm zentrifugiert wurde.

2.2.1.2.5 Vermessung

Die Vermessung der aufgereinigten Amplifikate erfolgte mittels Photometer. Dabei ließ sich die Konzentration von DNA im EB Puffer ermitteln.

Bei jedem Messvorgang wurden jeweils 2 µl vermessen. Obgleich der Alphamager auch mit 1 µl zurechtkommt, verwendeten wir immer 2 µl, um an dieser Stelle die Wahrscheinlichkeit eines Messfehler so gering wie möglich zu halten.

Vorab wurde der Leerwert (2 µl PE Puffer) eingesetzt und das Gerät daraufhin eingestellt.

Der Reinheitsquotient war dabei stets im Optimalbereich, wodurch anzunehmen war, dass es sich um relativ reine cDNA handelte.

2.2.1.2.6 Berechnung der Kopienzahl

Durch das Vermessen erhielt man die genaue Information über die Konzentration der DNA. Mittels dieser Information und der Kenntnis über die exakte Länge des Amplifikates war es möglich, die genaue Kopienzahl mit der folgenden Formel zu berechnen. Ein μg entspricht bei einem 1000 bp langem Amplifikat $9,1 \cdot 10^{11}$ Kopien.

Daraus folgt:

$$\text{Kopienzahl/ml} = \text{Konzentration C/Länge des Amplifikats} \cdot 9,1 \cdot 10^{11}$$

für Kopie/ μl muss allerdings noch mit 10^{-3} multipliziert werden:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \text{Konzentration C/Länge des Amplifikats} \cdot 9,1 \cdot 10^8$$

Auf diese Weise konnte die genaue Konzentration eines jeden spezifischen und aufgereinigten Amplifikates ermittelt und dadurch ein definitiver externer Standard im LightCycler eingesetzt werden. Es erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe bis 10^0 , die anschließend im LightCycler getestet wurde. Dadurch war eine absolute Quantifizierung von unbekanntem Proben anhand der Standardkurve der Verdünnungsreihe im LightCycler möglich.

2.2.1.2.7 Einsatz der Standardverdünnungsreihen in die LightCycler PCR:

Nach der Herstellung von Verdünnungsreihen der Amplifikate folgte die Durchführung der LightCycler PCR mit den Standardverdünnungsreihen aller Zytokine vorerst in Testläufen, um die jeweiligen Protokolle und die optimale Zusammensetzung des MasterMixes zu erstellen.

In diesen Testläufen wurden die Mindestkonzentration der Primer, die optimale Magnesiumkonzentration, als auch die richtige Annealingtemperatur ermittelt.

Es wurden die Verdünnungen des Standards zu je $5 \mu\text{l}$ eingesetzt. Dabei lag der eingesetzte Verdünnungsbereich zwischen 10^6 und 10^0 , eine Negativkontrolle (H_2O) wurde stets mitgeführt.

Die Primer des oben genannten Kits wurden in 1000 μl H_2O gelöst, dies entspricht einer Konzentration von 5 μM . Die Sonden wurden in je 100 μl H_2O gelöst, was einer Konzentration von 3 μM entspricht. Die Sonden wurden nach dem Lösen in Wasser eine halbe Stunde im Kühlschrank inkubiert, bevor sie benutzt wurden.

Das MgCl_2 des oben genannten Kits hatte eine Konzentration von 25 mM, dabei wurde die zusätzliche Molkonzentration von 1 μM in den Primern außer Acht gelassen, da dies nur eine zusätzliche Konzentration von 0,05 mM im MMX bedeutete.

Tab. 11: Verhältnis MMX zu Probe

Reaktionsvolumen pro Kapillare gesamt	20 μl
Master-Mix	15 μl
Proben (Standardverdünnungsreihe)	5 μl

Tab. 12: MMX $\text{TNF}\alpha$

Reagenz	Volumen in μl pro x	Molkonzentration
H_2O	10,2	
MgCl_2	1,2	1,5(05) mM
Primer A	0,5	0,125 μM
Primer B	0,5	0,125 μM
Sonde	0,3	0,045 μM
Sonde	0,3	0,045 μM
Enzym	2	
insgesamt:	15	

Tab. 13: MMX IL-12p40

Reagenz	Volumen in μl pro x	Molkonzentration
H_2O	6	
MgCl_2	2	2,5(05) mM
Primer A	2	0,5 μM
Primer B	2	0,5 μM
Sonde	0,5	0,075 μM
Sonde	0,5	0,075 μM
Enzym	2	
insgesamt:	15	

Tab. 14: **MMX IL-10**

Reagenz	Volumen in μl pro x	Molkonzentration
H ₂ O	9,4	
MgCl ₂	2	2,5(05) mM
Primer A	0,5	0,125 μM
Primer B	0,5	0,125 μM
Sonde	0,3	0,045 μM
Sonde	0,3	0,045 μM
Enzym	2	
insgesamt:	15	

Zunächst wurde der Mastermix (MMX) an einer Sterilbank pipettiert und in jeweils 15 μl auf die LightCycler-Kapillaren aufgeteilt, während der Standard zwischenzeitlich auftaute. Es wurde, außer bei sehr geringer Probenanzahl von $x < 4$, bei einer Probenzahl von x jeweils der MMX für $x+1$ angesetzt, um im Falle eines möglichen Pipettierfehlers, oder beim Bruch einer Kapillare, dem Zeitaufwand des erneuten Pipettierens zu entgehen. Für die LightCycler-Kapillaren stand ein passender Kühlblock zur Verfügung, in dem sie gelagert blieben, bis sie ins Probenkarussell gesetzt wurden. Aus diesem Block konnte jede Kapillare einzeln in ihrem Kühlelement zum Beispiel zum Zentrifugieren herausgenommen werden. So wurde der Mastermix, vom Eis der Sterilbank in den LightCycler-Kühlblock transferiert, und somit die Kühlkette nicht unterbrochen. Nachdem der MMX pipettiert war, wurden die bereits aufgetauten Proben in der Sterilbank gevortext und je 5 μl in die LightCycler-Kapillaren pipettiert. Eine Kapillare wurde als Negativkontrolle mit 5 μl sterilem Wasser gefüllt. Die Kapillaren wurden verschlossen, 30 Sekunden bei 2200 rpm zentrifugiert und in das LightCycler-Karussell versetzt.

Die Temperaturen und die Länge der einzelnen PCR-Phasen wurden an die verwendeten Primer, Sonden und die Polymerase angepasst und wurden nach mehreren Testläufen folgendermaßen festgelegt:

Tab. 15: Bedingungen TNF α und IL-10

		Temperatur in °C	Zeit
Aktivierung der Taq Polymerase		95	9 min.
Denaturierung	45 Cycles	95	9 s
Annealing		54	15 s
Elongation		72	25 s
Cooling		40	30 s

Tab. 16: Bedingungen IL-12p40

		Temperatur in °C	Zeit
Aktivierung der Taq Polymerase		95	9 min.
Denaturierung	50 Cycles	95	15 s
Annealing		54	15 s
Elongation		72	15 s
Cooling		40	30 s

2.2.1.2.8 Validierung der Testläufe

Der Verlauf der PCR wurde mit der LightCycler Software dokumentiert. Präsentierte sich die log-Phase (exponentielle Phase) gleichmäßig, war die Spezifität der jeweiligen Primer und Sonden erbracht. Trotzdem wurden auch diese Amplifikate unabhängig davon auf Gel aufgetragen, um die Validität auch auf diese Weise nochmals zu beweisen.

2.2.1.2.9 Reproduzierbarkeit

Die Standards wurden, nachdem sie absolut quantifizierbar waren, auch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit im LightCycler überprüft.

Dies geschah zum einen in voneinander unabhängigen PCR-Läufen (inter-assay) und zum anderen innerhalb eines Laufes durch dreimaligen Einsatz der Standards (intra-assay).

Davon wurde die Standardabweichung sowie die Spannweite (range) berechnet.

2.2.2 ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren (Assay), das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer AK zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. AK oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Wir verwendeten einen so genannten Sandwich-ELISA: zwei AK, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide AK an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste AK (coating-AK) wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird in die Vertiefungen gegeben und eine Zeit lang inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene AK das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (coating-) AK gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(detection)-AK zugegeben, an dessen Ende ein Enzym (Meerrettichperoxidase (HRP)) gebunden ist. Dieser zweite AK bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der AK-Antigen-AK-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite AK ausgewaschen und dann ein Chromogen (Wasserstoffperoxidase und Tetramethylbenzidin) zugegeben. Die aktivierte Meerrettichperoxidase

katalysiert die Reaktion der Farbstoffe zu einem blauen Farbton. Die Reaktion wird von HCl gestoppt und der blaue schlägt in einen gelben Farbton um. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen AK-Enzym Konjugat. Da grundsätzlich jedes aktivierte Enzym mehrere Substratmoleküle umsetzen kann, sind auch sehr kleine Mengen an Antigen nachweisbar, und mit Hilfe der mitgeführten Standardreihe quantifizierbar.

Wir benutzen eine Platte von R+D Systems: Quantikine, Mouse TNF α /TNFSF1A und richteten uns auch nach deren Protokoll:

1.Reaktion: Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur aufgewärmt, und insbesondere der Standard sowie die restlichen Reagenzien vorbereitet waren, wurde der Standard sowie die Proben in 50 μ l Portionen in die mit den polyklonalen AK beschichteten Kavitäten pipettiert. Die Platte kam 1 Minute auf den ELISA-Platten-Schüttler, so dass auch die Randbereiche der Vertiefungen mit der Flüssigkeit in Verbindung kommen konnten.

Nach dem Bedecken der Platte wurde sie für 2 h inkubiert.

2.Reaktion: Die Flüssigkeit wurde verworfen und 5 mal jede Vertiefung mit 100 μ l Waschpuffer gespült. Anschließend wurden 100 μ l Konjugat, also eine Lösung mit enzymvernetzten AK darauf gegeben und ebenfalls für 2 h inkubiert.

3.Reaktion: Nach einem erneuten Waschgang wurde die Substrat Solution in die Kavitäten pipettiert und diesmal lichtgeschützt für nur 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stop Solution (HCl) beendet und der blaue Farbstoff wandelte sich sichtbar in Gelb um.

Vermessen: Die Platte wurde bei 451 nm Wellenlänge vermessen, bei einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm.

3. Ergebnisse

Das Ziel unserer Versuchsreihe war es, die Sensitivität und Genauigkeit des LigthCyclers am Beispiel dreier muriner Zytokine zu ermitteln.

Diese Zytokine wurden deshalb gewählt, weil mit Hilfe der Quantität dieser Zytokine eine Aussage bezüglich der Immunantwort möglich ist. Zur abschließenden Erprobung des Verfahrens sollten die Zytokinspiegel von 19 mit *A. Fumigatus* infizierten Mäusen bestimmt werden. Dies mißlang auf Nukleinsäureebene. Zur direkten Bestimmung der Proteine setzten wir die Proben in einem ELISA ein.

3.1 Spezifität der Primer

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, die verwendet wird, um die Erbsubstanz DNA zu vervielfältigen, ohne einen lebenden Organismus zu benutzen. Mit der PCR können gezielt DNA-Abschnitte amplifiziert werden, deren Anfangsstücke bekannt sind, auch wenn DNA nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Jedoch ist die Kenntnis der genauen Startsequenz für die erste Bindung einer Nucleotidkette (Primer) essentiell. Diese benötigt die Polymerase, um mit der Bildung des komplementären Strangs beginnen zu können.

Der Beweis der Spezifität der Primer ergab sich aus der Tatsache, dass keine unspezifischen Produkte amplifiziert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hybridisierungssonden gearbeitet. Das Sondensystem besteht aus einem Paar terminal markierter Sonden, die an unmittelbar benachbarten Stellen auf der Zielsequenz hybridisieren, so dass der Donorfluorophor in einer räumlichen Nähe des Akzeptorfluorophors positioniert wird. Der Donor wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, Energie auf den Akzeptor zu übertragen, welcher diese als Fluoreszenzlicht abgibt.

Dieses wird von Detektoren gemessen. Die Software ermittelt im Vergleich mit den eingesetzten Standards die genaue Kopienzahl.

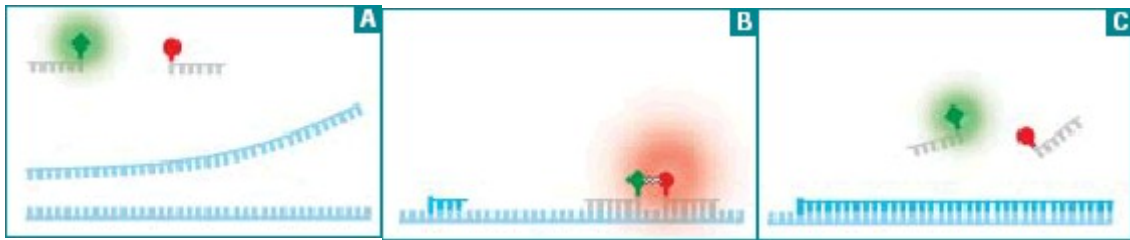


Abb. 4:
Denaturierungsphase

Abb. 5: Annealingphase,
das vom Akzeptor
emittierte Licht wird
gemessen.

Abb. 6: Sonden werden
von der Polymerase bei
der Elongation entfernt

Der LightCycler zeigte einen regelmäßigen Verlauf der exponentiellen/ log-Phasen (siehe Kapitel 2.2.1.1). Dies wäre bei unspezifischen Produkten bei spezifischer Sonden-Fluoreszenzmethode nicht möglich.

Die angewendeten Bedingungen sind aus den Tabellen 12 bis 16 zu entnehmen.

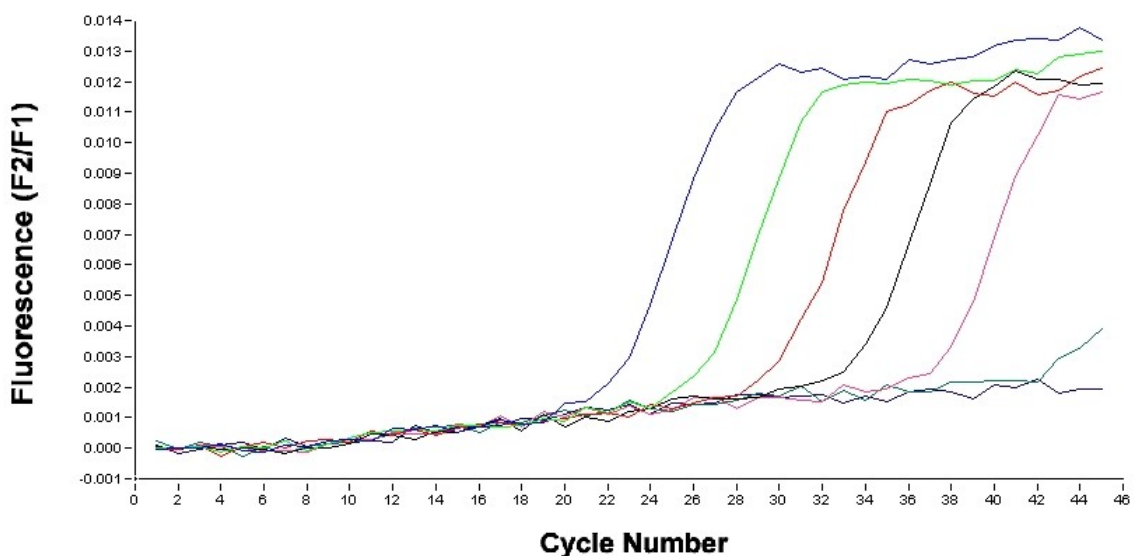


Abb. 7: TNF α - Verdünnungsreihe 10e5-10e0+ H₂O mit regelmäßigem exponentiellem Verlauf, H₂O bleibt negativ.

Die Auswahl der Annealing-Temperatur erfolgte auf Grund der Empfehlung der Primer-Herstellerfirmen. Da die Hybridisierungs-Temperatur der Sonden über derjenigen der Primer lag, spielte diese bei der Festlegung der Temperatur keine Rolle. Wir begannen einige Grade unter der empfohlenen Temperatur und arbeiteten uns in mehreren Versuchen sukzessive nach oben vor. Für alle drei Zytokine erhielten wir bei 54 Grad Celsius befriedigende Ergebnisse.

Die Annealing-Temperatur beschreibt hierbei die maximale Temperatur, bei der sich die Polynukleotidsequenz noch an den komplementären DNA-Strang bindet. Die gewählte Annealing-Temperatur ist während einer PCR entscheidend für die Spezifität der Bindung an die Zielsequenz. Bei einer zu niedrigen Temperatur kann es zu „lockeren“ unspezifischen Bindungen der Primer und in der Folge unter Umständen zu unerwünschten Produkten kommen. Bei zu hohen Temperaturen entsteht kein Produkt, da die Bindungsstärke der Primer nicht stark genug ist, um sich anlagern zu können.

Eine maximale Übereinstimmung der Basenpaarungen hat eine maximale Bindungsstärke und somit auch eine optimale Spezifität zur Folge. Unsere gewählte Annealing-Temperatur lag bei den Primern von TNF α und IL-12p40 sieben bis neun Grad unter der empfohlenen Temperatur. Da es bei höheren Temperaturen aber zu Komplikationen bezüglich der niedrigeren Konzentrationen im Standard kam, blieben wir bei einer relativ niedrigen Temperatur.

Als Primer kamen für alle drei Zytokine reverse und forward Primer zum Einsatz. Da es anfänglich bei IL-12p40 zu Problemen in der Amplifikation kam, wurden zusätzlich sense und antisense Primer benutzt, die aber nach Optimierung der Bedingungen in den weiteren Untersuchungen keine Rolle mehr spielten. Auch bei TNF α kam in der Vorbereitungsphase ein antisense Primer zum Einsatz, welcher jedoch nicht mit in die Auswertung einbezogen wurde.

Zur Überprüfung der Sequenz der bestellten Primer mit dem gewünschten Produkt und der Bestimmung der resultierenden Länge nutzten wir das Internetprogramm des National Center for Biotechnology Information.

Als zusätzlichen Beweis für die Spezifität setzten wir die Gelelektrophorese ein.

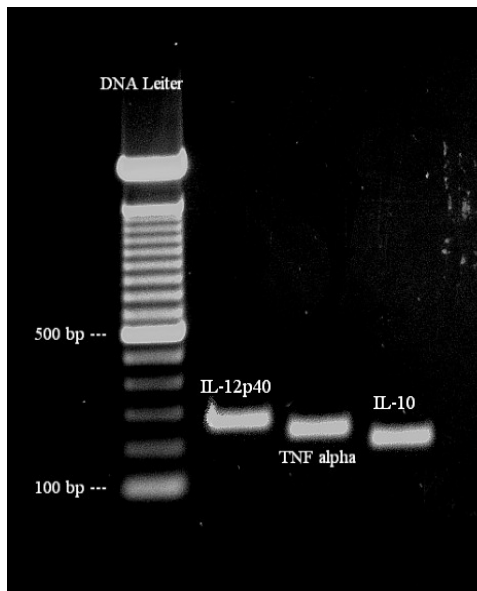


Abb. 8: Gel mit IL-12p40, TNF α und IL-10

Unter Berücksichtigung der Messungenauigkeiten der Gelelektrophorese war in jedem Gel die für das jeweilige Zytokin-Target errechnete diskrete Zone zu erkennen. Es ließ sich keine Coamplifikation unspezifischer DNA nachweisen.

- IL-12p40 mit F/R-Primerpaar: 295 bp
- TNF α mit F/R-Primerpaar: 251 bp
- IL-10 mit F/R-Primerpaar: 228 bp

Die Spezifität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der in einem Test ein negativer Sachverhalt auch als negatives Ergebnis erkannt wird.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig Negativ}}{\text{richtig Negativ} + \text{falsch Positiv}}$$

Nach dieser Formel erreichten alle Zytokine den Maximalwert von eins, da die Kontrolle stets negativ blieb.

3.2 Linearität

In unserer Versuchsreihe konnte ein klarer linearer Zusammenhang zwischen der Zyklenzahl und der eingesetzten Kopienanzahl hergestellt werden. Linearität bedeutet in diesem Fall, dass sich proportional zur Veränderung des einen Parameters der andere Parameter verändert.

Der LightCycler ermittelte für jede Standardkurve den linearen Korrelationskoeffizienten r . Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen. Er kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Für alle drei Zytokine wurde $r = -1$ ermittelt.

Die LightCycler Software bedient sich dafür einer komplexen Formel, in der die Kovarianz anhand der Erwartungswerte für X und Y berücksichtigt werden.

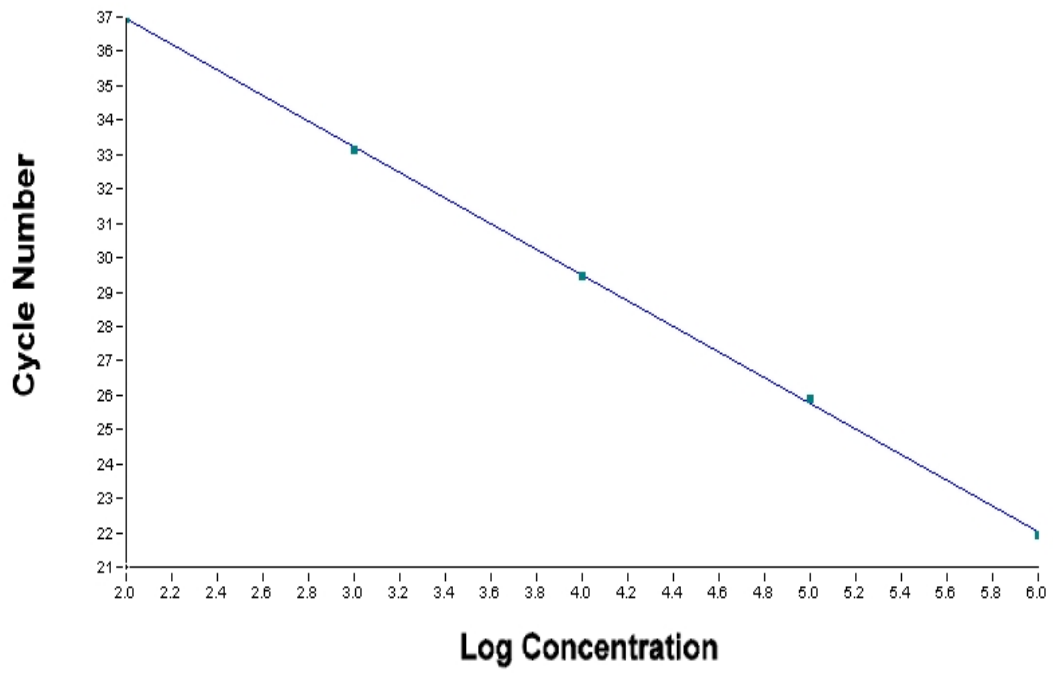


Abb. 9: TNF α crossing points 10e5-10e1, $r = -1$

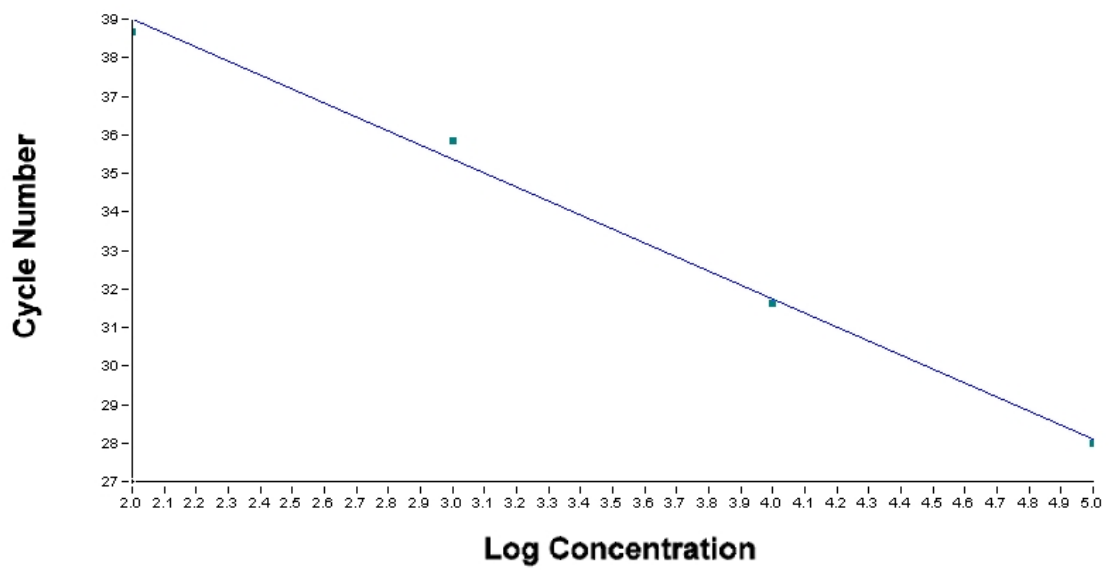


Abb. 10: IL10 crossing points 10e5-10e2, $r = -1$

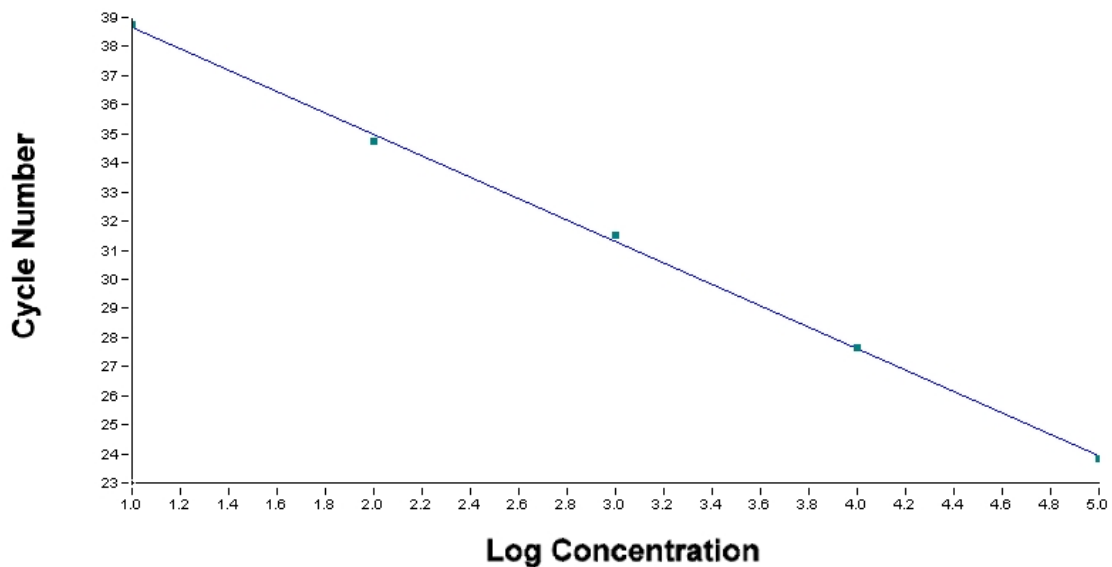


Abb. 11: IL12p40 crossing points 10e5-10e1, $r = -1$

3.3 Sensitivität

Die Sensitivität bezeichnet die Empfindlichkeit eines Tests, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch als positives Testergebnis zu erkennen. Sie ist der Anteil der richtigerweise als positiv erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Sachverhalte.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig Positiv}}{\text{richtig Positiv} + \text{falsch Negativ}}$$

Damit ist ein Wert von eins als Maximalwert zu betrachten.

Es macht jedoch keinen Sinn, die Formel in diesem Fall anzuwenden, da die Sensitivität hier mit jeder zusätzlich einbezogenen Potenz steigen würde. Der Anteil an nicht erkannten Kopien sinkt, wenn man die 10^5 eingesetzten Kopien alle als positiv erkannt betrachtet. Die Sensitivität wird darum hier mit der unteren Detektionsgrenze gleichgesetzt.

Diese ergab sich aus den jeweilig minimalsten Konzentrationen, die unter den gegebenen PCR-Bedingungen noch amplifizierbar waren. Bei TNF α und IL-12p40 lag sie bei 10^1 Kopien/ μ l, bei IL-10 bei 10^2 Kopien/ μ l.

3.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde zum einen zwischen drei unabhängigen Läufen (Inter-Assay), zum anderen innerhalb eines Laufes durch dreifachen Einsatz des Standards (Intra-Assay) validiert. Auf diese Weise sollte die Rolle der externen Störfaktoren ermittelt werden. Durch die Verwendung des selben Reaktionsansatzes und der Pipettierung zur gleichen Zeit im Intra-Assay Vergleich sind diese auf ein Minimum begrenzt. Bei unabhängig voneinander eingesetzten Läufen spielen diese bei einem so sensiblen Testverfahren eine größere Rolle.

Bei der real time PCR wird der Produktanstieg in Echtzeit verfolgt. Dies geschieht störungsfrei über die Messung von Fluoreszenzlicht, dessen Intensität proportional zur Produktmenge ist.

Um die ursprüngliche Quantität des Produktes zu ermitteln, macht man sich die Tatsache zunutze, dass die Amplifikationseffizienz in der exponentiellen Phase näherungsweise konstant ist. Die Anzahl an Zyklen bis zur exponentiellen Phase gibt Rückschluss auf die initiale Anzahl der Kopien. Dieser Umschlagpunkt in der Kurve wird, wie in Kapitel 2.2.1.1 und Abbildung 3 beschrieben, als Crossing Point bezeichnet.

Die anhand der Crossing Points errechneten absoluten Kopienzahlen der einzelnen Verdünnungen sowie die Crossing Points selbst wurden zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit herangezogen.

3.4.1 Inter-Assay Reproduzierbarkeit

Für die von der LightCycler-Software bestimmten Kopienzahlen der eingegebenen Standardverdünnungen wurde die Standardabweichung und der Mittelwert errechnet.

Daraus ließen sich die in der Tab.17 aufgeführten Variationskoeffizienten ableiten.

Der Variationskoeffizient VK ist die relative Standardabweichung, das bedeutet, man teilt die Standardabweichung durch den Mittelwert und multipliziert mit 100, um eine Prozentangabe zu erhalten.

$$\text{VK} = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert} \times 100$$

Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel der Varianz, diese wiederum beschreibt die Summe der quadrierten Abweichungen vom Mittelwert, geteilt durch die Summe der Messwerte.

$$\text{Standardabweichung} = \sqrt{\text{Varianz}}$$

$$\text{Varianz} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 : n$$

Aus der Tabelle ist die Abnahme der Reproduzierbarkeit im Bereich niedrigerer Konzentrationen ersichtlich. Je höher die Prozentangabe, desto höher die Wahrscheinlichkeit einer Abweichung vom Mittelwert.

Tab. 17: Variationkoeffizient der Kopienzahlen im Inter-Assay Vergleich

	TNF α ,	IL-10	IL-12p40
10 ⁵		10,67%	22,5%
10 ⁴	12,60%	10,50%	7,58%
10 ³	23,31%	18,47%	15,2%
10 ²	9,67%	90,41%	38,69%
10 ¹	36,09%		71,32%

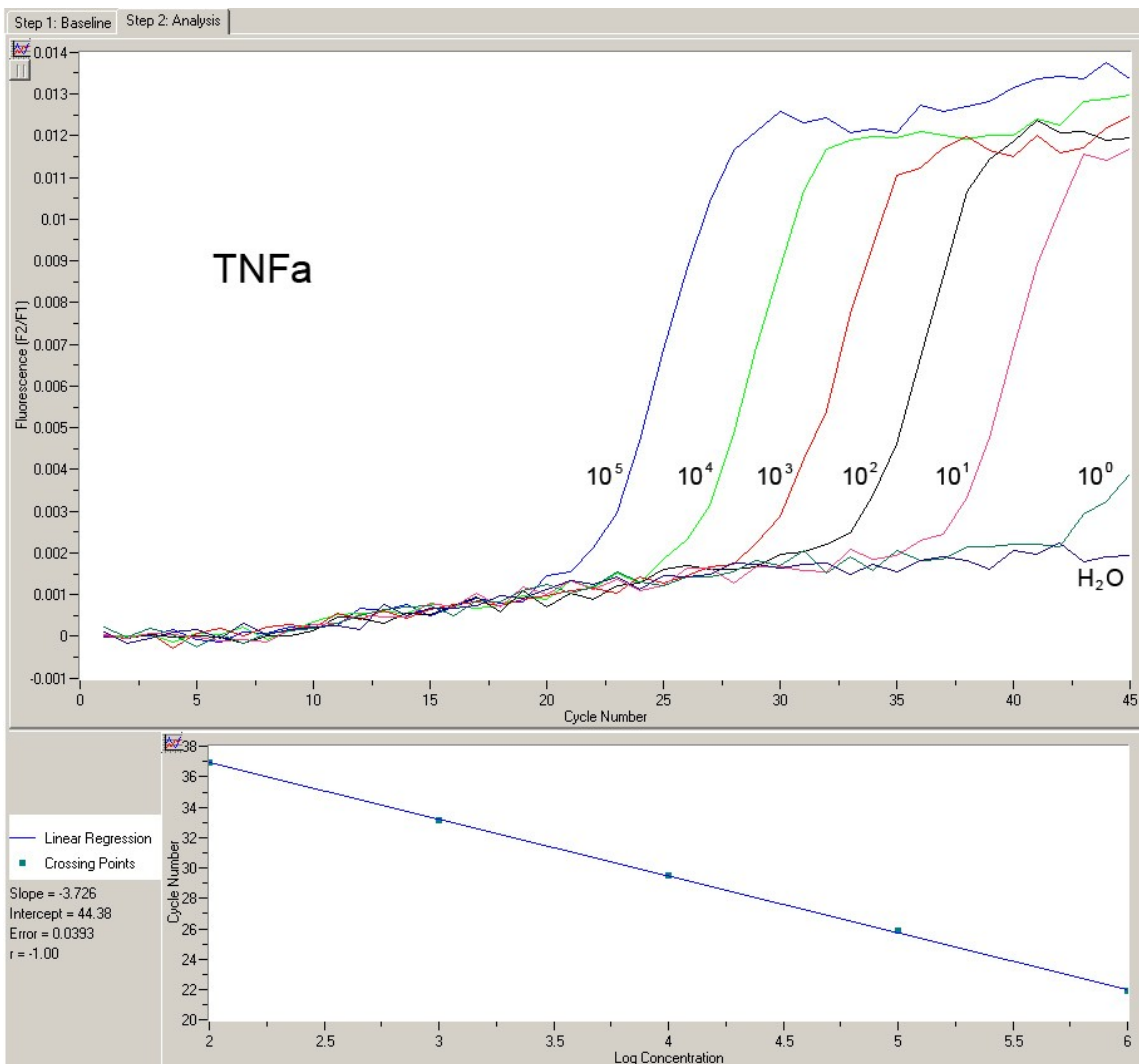


Abb. 11: einer von drei Einzelläufen im Inter-Assay Vergleich (TNFa), es ist sowohl die Regelmäßigkeit im exponentiellen Verlauf, als auch die Linearität der Verdünnungen ersichtlich. H_2O bleibt negativ.

3.4.2 Intra-Assay Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurde durch die Auswertung der Läufe ermittelt, in denen die Verdünnungsreihen des jeweiligen Zytokins dreifach mitgeführt wurden.

Auch hier wurde wieder der Variationkoeffizient aus Standardabweichung und Mittelwert errechnet und in Tab. 18 dargestellt.

Es zeigte sich auch hier, dass die Reproduzierbarkeit bei niedrigeren Konzentrationen abnahm.

Man erhielt ein deutlich besseres Ergebnis im direkten Vergleich zur Inter-Assay-Variabilität.

Tab 18: Variationkoeffizient der Kopienzahlen im Intra-Assay Vergleich

	TNF α ,	IL-10	IL-12p40
10 ⁵		5,63%	4,85%
10 ⁴	3,56%	5,17%	8,44%
10 ³	14,21%	27,55%	2,60%
10 ²	5,02%	55,43%	30,88%
10 ¹	28,63%		45,73%

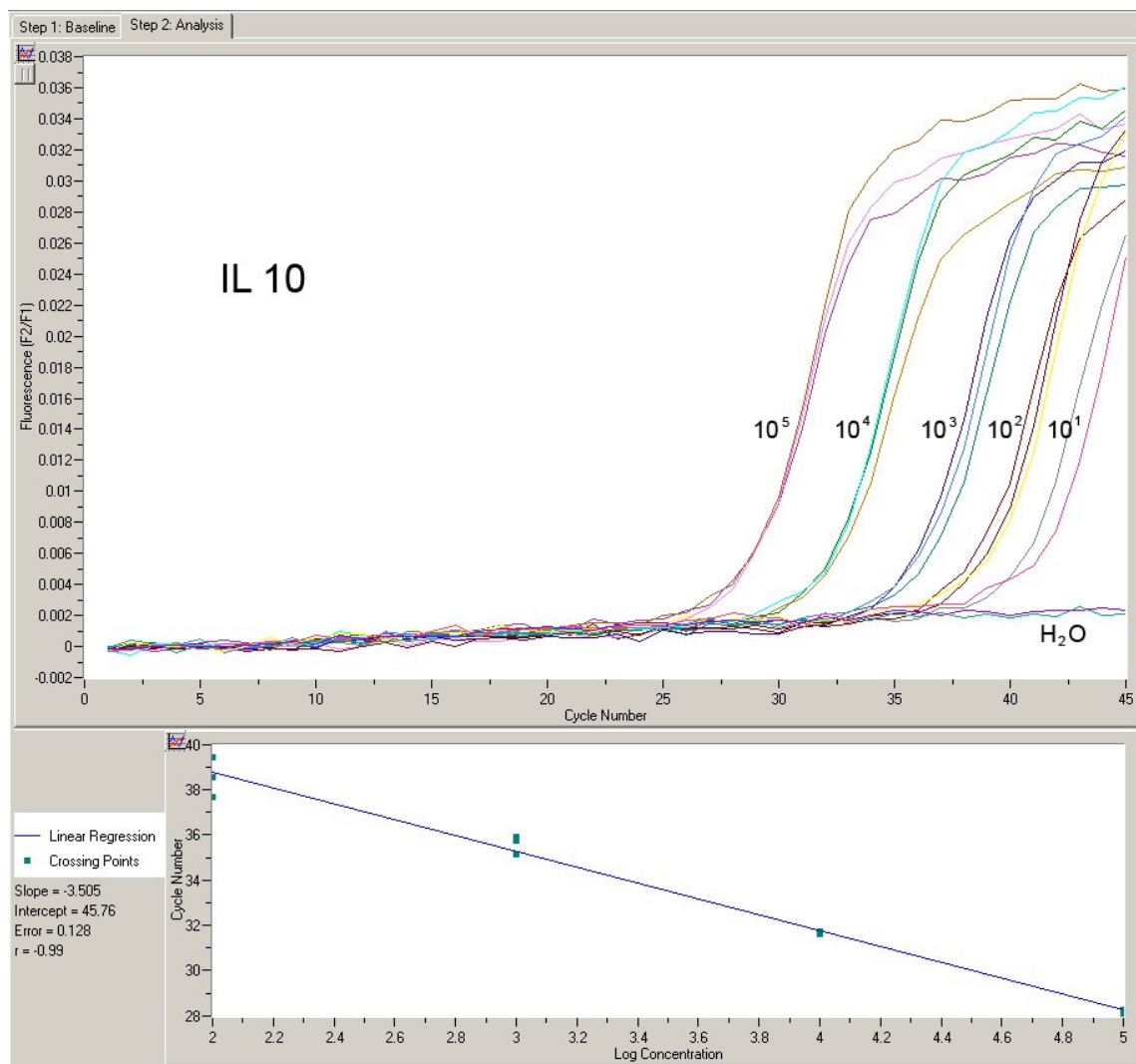


Abb. 12: IL 10 im Intra-Assay Vergleich, die zunehmende Abweichung bei abnehmender Konzentration ist sichtbar. H₂O bleibt negativ.

3.5 Expression von TNF α , IL-10, IL-12p40 in murinem Probenmaterial

Nach der Etablierung und Evaluierung der Verfahren sollten die Zytokinspiegel von 19 Proben murinen Blutes bestimmt werden. Die Proben stammten aus dem Labor von Elaine Bignell aus London. Dort waren die immunsupprimierten Mäuse mit lebenden Sporen von *A. Fumigatus* nasal infiziert worden. Aus den murinen Proben ließ sich keinerlei spezifisches Produkt in der PCR nachweisen.

Von Blut eins und zwei führten wir mehrere Läufe unter den für die drei Zytokine ermittelten Bedingungen durch. Dabei wurde jeweils nur die Standardreihe in der PCR amplifiziert. Die Proben blieben jedoch negativ.

Für die ersten Nachweisversuche hatten wir zur vorhergehenden RNA Gewinnung das System TRIzol verwendet (siehe Kapitel 2.2.1.2.1). In der anschließenden Vermessung mithilfe des Photometers, siehe Kapitel 2.2.1.2.6, war in beiden Proben RNA nachweisbar.

Maus 1: 8,4 ng/ μ l

Maus 2: 9,7 ng/ μ l

Anschließend wurde die gewonnene RNA (siehe Kapitel 2.2.1.2.2) unter Verwendung des Quanti-Tect-RT-Kits von Qiagen auf cDNA umgeschrieben.

Da die Proben im LightCycler negativ blieben, wiederholten wir den Versuch der RNA-Gewinnung mit dem Mikro-Filtersystem von Ambion. Die Proben drei und vier zeigten im Photometer folgende Massen:

Maus 3: 1,5 ng/ μ l

Maus 4: 1,9 ng/ μ l

Auch hier wurde nach dem gleichen Verfahren die RNA in cDNA umgeschrieben. Die Versuche im LightCycler waren erneut für alle drei Zytokine negativ.

Demnach war uns keinerlei Vergleich zwischen Genexpression und im ELISA nachgewiesenem Zytokin möglich.

3.6 Quantität von TNF α im ELISA

Zum direkten Proteinnachweis verwendeten wir einen "Sandwich"-ELISA. Dieser eignet sich insbesondere zum Nachweis von größeren Peptiden und Proteinen, da sie in diesem Fall mindestens zwei Epitope aufweisen müssen. Durch diesen zweiseitigen Nachweis der Zielproteine wird zum einen die Spezifität erhöht, zum anderen kann die Störanfälligkeit gegenüber Verunreinigungen verringert werden.

Durch einen im selben Versuch mitpipettierten Standard, war die Ermittlung der Konzentration in den Proben möglich. Der Ablauf wurde in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

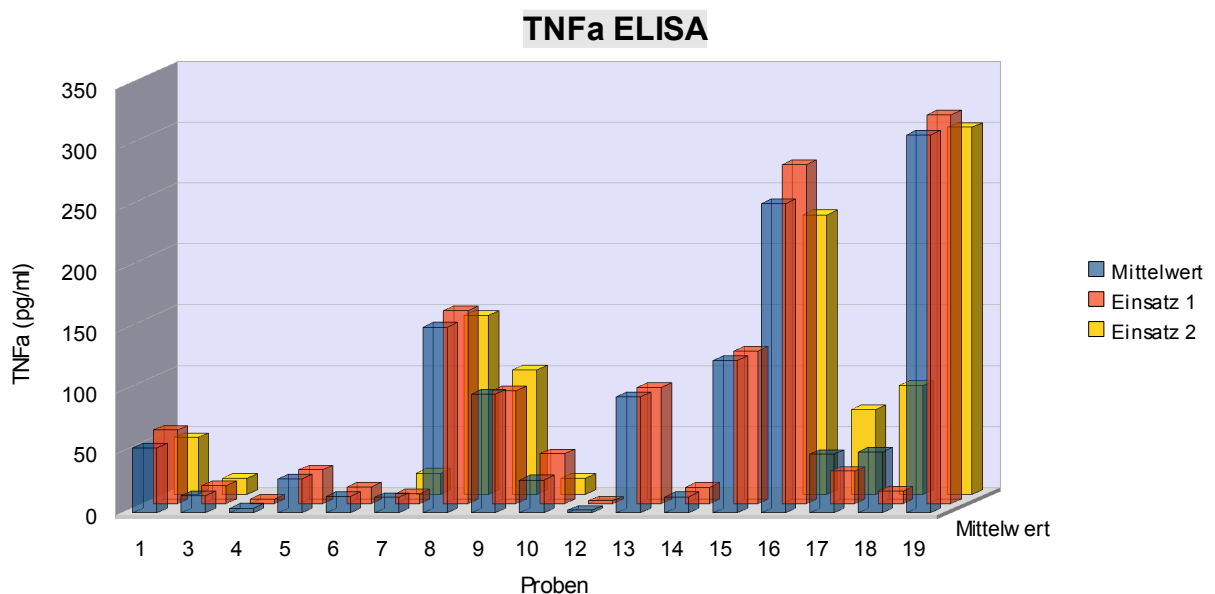


Abb. 13: Konzentration von TNF α

Im ELISA zeigten sich enorme Schwankungen der TNF α Konzentration. Die Mittelwerte der bei 451 nm gemessenen samples ergaben zwischen nicht messbar und 310,45 pg/ml.

Wie bereits oben erwähnt, war für die Proben Nummer vier, fünf, sechs, 12, 13, 14 und 15 nur ein einmaliger Probeneinsatz möglich, so dass hierfür nur ein

einziges Ergebnis zur Verfügung stand. Für Probe zwei und Probe 11 war kein Signal erkennbar.

Der Mittelwert aller samples lag dabei bei 69,77 pg/ml.

Es gibt keine Standardwerte für die Konzentration von TNF α bei Mäusen, doch geben sowohl Michel Duong (1998; [53]), als auch Badriyyah et al (2007; [54]) in ihren Studien bei den nicht immunsupprimierten Vergleichstieren Werte unter 30 pg/ml an. Demnach müsste der Wert bei mit Cortison vorbehandelten Tieren noch darunter liegen.

4. Diskussion

4.1 Vorzüge der RT-PCR im Vergleich zu anderen quantitativen spezifischen Nachweisverfahren

Erkenntnisse über immunologische Vorgänge bedürfen der Quantifizierung von Zyto- und Chemokinen. Hierzu stehen momentan hauptsächlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen kann man das Protein direkt quantifizieren, zum anderen die Genexpression über die Bestimmung der mRNA-Konzentration einschätzen.

Bei dieser Arbeit wurden beide Verfahren verwendet, da bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Genexpression nicht zwingend mit der Menge an tatsächlich vorhandenem Protein übereinstimmen muss (Benviste et al., 1998; [55]).

Es gilt schließlich zu berücksichtigen, dass vielerlei Faktoren auf post-translationeller wie auch auf post-transkriptioneller Ebene ein mögliches Missverhältnis zwischen gemessenem mRNA-Expressionslevel und der Konzentration des sezernierten Proteins verursachen können.

Hinsichtlich der Biologie der Zyto- und Chemokine ist der Nachweis der Genexpression gegenüber dem Proteinnachweis prinzipiell im Vorteil:

Erstens haben nahezu alle Zytokine eine nur sehr geringe Halbwertszeit, zweitens werden sie in nur sehr geringen Mengen gebildet, woraus folgt, dass ein vergleichsweise großes Probenvolumen gebraucht wird, was sich am Beispiel des ELISAs zeigt.

Speziell bei kleinen Probengrößen bietet sich aus diesem Grunde an, mRNA-basierte Techniken anzuwenden, wovon sich die Realtime-PCR als die sensitivste und in Kombination mit Sonden auch als die spezifischste Methode zeigt. Sie ist in der Lage auch geringfügige Mengen zu quantifizieren, die oft auf äußerst niedrigem Level exprimiert werden.

Im Vergleich mit semiquantitativen oder kompetitiven PCR-Verfahren ist die RT-PCR im LightCycler-System schneller, reproduzierbarer, genauer und bedarf keinerlei post-PCR-Schritte, die den Aufwand und das Kontaminationsrisiko erhöhen. Das sogenannte „close Tube“ System verknüpft Amplifikation, Produkt-Detektion und Produkt-Quantifizierung. Damit steht ein vollautomatisierter Arbeitsweg zur Verfügung, der ohne das Arbeiten mit riskanten Chemikalien oder hohem zeitlichen Aufwand auskommt.

Die eigens dafür erstellte Software ermittelt die crossing points, die am Start der log-linearen Phase liegen und der ursprünglichen Anzahl an Kopien proportional sind. Im Vergleich mit klassischen Endpunktanalysen der konventionellen PCR-Techniken erscheinen die Effizienzunterschiede dadurch nicht so drastisch und erreichen eine höhere Genauigkeit.

Durch den Einsatz externer Standards ergibt sich die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung. Durch die Überprüfung der Amplifikationseffizienz besteht die Kontrollmöglichkeit über mögliche Abweichungen zwischen Probe und Standard. Bei der kompetitiven PCR hingegen besteht diesbezüglich keine Kontrollmöglichkeit, was bei nicht detektierten Abweichungen dazu führen kann, dass falsche Daten in die Studien mit einfließen.

Davon abgesehen ist die Detektion mittels Fluoreszenzfarbstoff im Vergleich mit der herkömmlichen Gel-Elektrophorese mit Ethidium-Bromid-Färbung, sowohl deutlich sensitiver, als auch spezifischer.

4.2 RT-PCR zur absoluten Quantifizierung der Zytokin-mRNA-Expression

Das Ziel dieser Arbeit bestand mitunter darin, mittels LightCycler-PCR eine absolute Quantifizierung der m-RNA der Zytokine IL-10 und IL-12p40, sowie des Tumornekrosefaktors α zu etablieren.

Man kann anhand der Zytokine auf die Art der T-Helferzellantwort schließen, die bekanntlich die Immunantwort in eine humorale oder zellvermittelte Richtung

lenken kann. Diese Zytokine haben eine große Bedeutung bezüglich der Letalität. Bei Mäusen wurde eine Korrelation zwischen der Konzentration dieser Zytokine und dem Outcome der Erkrankung bewiesen (Del Sero et al., 1999, [36], Cenci et al., 1998, [40], Roilides et al., 1997, [39], Nagai et al., 1995, [38]). Um eine Aussage über die Quantität treffen zu können, fand als erstes die Generierung externer Standards statt. Daraufhin wurden mehrere Läufe durchgeführt, um hinreichend Aussagen über Spezifität, Sensitivität sowie Reproduzierbarkeit treffen zu können.

4.2.1 Spezifität

Für alle Zytokine wurden spezifische Primerpaare benutzt und die Amplifikate nach erfolgreichem LightCycler-Lauf nochmals mittels Gel-Elektrophorese auf Spezifität und Verunreinigungen überprüft. In keinem der Fälle ließ sich ein unspezifisches PCR-Produkt nachweisen.

Der Einsatz sequenzspezifischer Sonden im LightCycler garantierte zudem eine sehr hohe Spezifität. Folgende Gründe bewogen uns dazu, nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green 1 zu arbeiten: Zum einen binden Fluoreszenzfarbstoffe prinzipiell an jede Doppelstrang DNA, was eine Schmelzkurvenanalyse oder einen anderen Spezifitätsnachweis zum Ausschluss einer Detektion unspezifischer Produkte unumgänglich macht. Zum anderen ist das Signal des Fluoreszenzfarbstoffs stets abhängig von der Amplifikatlänge. Bei den sequenzabhängigen Sonden wird ein Signal pro amplifizierter Sequenz unabhängig von der Länge gemessen. Mit dem Ziel eine möglichst genaue Quantifizierung bei höchstmöglicher Spezifität zu erreichen, fiel unsere Wahl auf die sequenzspezifischen Sonden.

4.2.2 Sensitivität

Anhand der Standards zeigte sich ein unteres Detektionslimit von 10 Kopien pro 5 µl für TNF α und IL-12p40, hingegen 100 Kopien pro 5 µl für IL-10.

Hieraus ergibt sich der breite Bereich, in dem man das Zytokinexpressionslevel messen kann. Allerdings war es trotz dieser niedrigen Nachweisschwelle nicht

möglich, spezifische Produkte aus den murinen Proben zu amplifizieren. Der lange Transport von London nach Würzburg und die uns nicht vollständig bekannte Genese des gewonnenen Materials ließen uns allerdings den Ursprung des Problems nicht bei der LightCycler-Methode vermuten. Nur eine sofortige und kontinuierliche Kühlung kann einen Abbau der RNA durch Ribonukleasen verhindern. Eine Unterbrechung der Kühlkette und das Auftauen der Proben führen zu RNA-Degradation.

Die Detektionsgrenze für den LightCycler findet sich auch in der Literatur wieder und unterscheidet sich nicht von unseren Ergebnissen (Pandori et al., 2006; [56], Akhawi-Araghi, 2005; [57]).

4.2.3 Reproduzierbarkeit

Es wurde die Inter-, sowie die Intra-Assay-Variabilität untersucht.

Um Aussagen über die Inter-Assay Reproduzierbarkeit treffen zu können, wurden Daten aus dem mehrmaligen Einsatz jeder einzelnen Standardverdünnungsreihe (10^5 - 10^1 Kopien pro 5 μ l) verwertet.

Durch das Errechnen des Variationskoeffizienten (CV), der vom LightCycler determinierten Kopienzahlen, ließ sich feststellen, dass die Reproduzierbarkeit in Richtung der niedrigeren Kopienzahlen deutlich abnahm.

Es gibt mehrere Erklärungsansätze für diesen Sachverhalt:

Zum einen bedarf es einer größeren Zyklenzahl, bis die samples mit niedrigeren Kopienzahlen in die exponentielle Phase der LightCycler-Dokumentation eintreten, und dadurch an sich schon das Potential für Schwankungen maximiert ist. Hier spielte auch die PCR-Effizienz eine Rolle, die zwischen einzelnen Läufen nicht immer identisch sein konnte. Zum anderen ist es durchaus vorstellbar, dass geringfügige Ungenauigkeiten beim Pipettieren bei kleinen Konzentrationen viel mehr zu Buche schlagen, als bei hohen Kopienzahlen. Aus diesem Grunde wurden die Daten der 10^0 Kopien pro 5 μ l nicht mitverwendet. Hier schwankten die Ergebnisse sehr stark, was sich durch die Zufallsverteilung bei einer Anzahl von 1 Kopie pro 5 μ l durchaus erklärt.

Die Ergebnisse sind mit denen in anderen Publikationen vergleichbar (Cheung et al., 2004; [58], Stordeur et al., 2002; [59], Akhawi-Araghi, 2005; [57]).

Im Intra-Assay Versuch zeigt sich das gleiche Phänomen in etwas abgeschwächter Form. Auch hier sank die Reproduzierbarkeit mit Abnahme der initial eingesetzten Kopienzahlen.

Es wurden die Standardverdünnungsreihen durch dreimaligen Einsatz innerhalb eines Laufes verglichen. Die besseren Ergebnisse lassen sich auf folgende Umstände zurückführen: Durch die Verwendung des selben Reaktionsansatzes und die gleichen äußeren Umstände waren die Störfaktoren auf ein Minimum reduziert, was sich auch im besseren Gesamtergebnis widerspiegelte.

4.3 Im ELISA ermittelte TNF α -Titer verglichen mit der aktuellen Studienlage

Beim ELISA werden die Proteine direkt durch eine enzymvermittelte Farbreaktion nachgewiesen. Dabei sind die für das nachzuweisende Protein spezifischen AK beim hier verwendeten Sandwich-ELISA auf dem Boden der Platten befestigt. Ein weiterer AK, verlinkt mit einem Enzym, kann nicht gewaschen werden, falls das gesuchte Epitop vorhanden ist. Nun werden Farbstoffe hinzugegeben, die durch eine von dem Enzym katalysierten Reaktion in einen Farbton umgewandelt werden. Die Intensität der Farbe ist proportional zu der Konzentration des entstandenen AK-Enzym-Konjugat, und dadurch eine Quantifizierung möglich.

Beim Einsatz unserer Proben in einen murinen TNF α -ELISA kam es in den nachgewiesenen Zytokinspiegeln zu sehr großen Schwankungen. Die Werte variierten zwischen mehrfach ermittelten Nullwerten und Werten bis zu 310 ng/ml.

Diese enormen Unterschiede sind unter Laborbedingungen nicht einfach zu erklären und lassen eine mögliche Verunreinigung auf dem langen Weg der Proben bis zu ihrer Bestimmung nicht ausschließen. Da es beim ELISA zu

starken unspezifischen Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen kommen kann, kann bereits das Vorhandensein geringer Mengen durch Hämolyse freigesetzter Proteine zu stark verfälschten Ergebnissen führen.

Trotzdem sollen die vorliegenden Ergebnisse mit denen in der aktuellen Literatur verglichen werden.

TNF α wird in erster Linie von mononukleären Zellen produziert, diese fördern damit eine Entzündungsreaktion. Einerseits geschieht dies durch die systemische Wirkung und damit beispielsweise die Erhöhung der Körpersolltemperatur, andererseits durch die Beeinflussung der Entzündungszellen an sich. So fördert TNF α die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1-Zellen mit der Konsequenz einer darauf folgenden T_H1-Immunantwort, was in dieser Arbeit von besonderem Interesse sein sollte.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeigten bereits verschiedene Gruppen die protektive Wirkung der T_H1-Antwort verglichen mit einer T_H2-Antwort. War das Augenmerk auf TNF α gerichtet, zeigte sich bei Patienten, wie auch in Tiermodellen das gute Outcome gemeinsam mit hohen Spiegeln dieses Zytokins. Wurden niedrige Spiegel gemessen, zeigte sich ein schwererer Krankheitsverlauf bis hin zum Tode.

Es ist bekannt, dass mit Corticosteroiden behandelte Mäuse im Vergleich mit immunkompetenten Mäusen viel weniger TNF α produzieren. Dem widersprechen die uns vorliegenden Ergebnisse des ELISAs. Die Gruppe um Michel Duong (1998; [53]) beispielsweise verglich durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnene Proben von mit Corticosteroiden vorbehandelten Mäusen mit immunkompetenten Mäusen. Vier, 12, 24, 48, 72, und 96 Stunden nach intranasaler Gabe von 10^7 *A. fumigatus* Konidien wurden die Proben gewonnen. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Konzentration von TNF α ermitteln. Besonders in der entscheidenden Anfangsphase war in der Gruppe der mit Steroiden behandelten Mäuse kaum TNF α nachweisbar. Im Blut konnte zu keinem Zeitpunkt bei keiner der Gruppen TNF α nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass die Regulation der Zytokin-Produktion einer der wichtigsten Mechanismen der Glukokortikoide ist, die Immunantwort zu modulieren. Dies vermögen sie sowohl auf der transkriptionellen, wie auch der posttranskriptionellen Ebene. Sie binden in den Zielzellen an zytoplasmatische Rezeptoren. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern, wo er die Transkription der Zytokin-Gene blockiert. Zielzellen können hier sowohl Leukozyten, als auch andere Körperzellen sein. Die Glukokortikoide hemmen die Zytokinproduktion auch auf indirektem Wege durch Induktion vermehrter Transkription von Anti-Transkriptionsfaktoren. Ebenfalls in der Veränderung der T_H-Linie, durch Unterdrückung der T_H1-Richtung und Förderung der T_H2-Richtung, nehmen sie Einfluss auf die Immunantwort. Die gesteigerte Produktion von TGFβ (transforming growth factor β), welcher als immunsuppressives Zytokin gilt und nach Gabe von Glukokortikoiden ansteigt, wirkt zusätzlich der Zytokinproduktion entgegen (Almawi et al., 2002; [60]).

All diese Überlegungen sprechen gegen die in unserer Versuchsreihe vorliegende hohe Konzentration von TNFα (69,77 pg/ml) in Blutproben von mit Glukokortikoiden behandelten Mäusen. Dies ließe sich, wie oben bereits erwähnt, durch die eventuelle Verunreinigung der Proben durch die uns nicht hundertprozentig bekannte Probengewinnung sowie den langen Transportweg erklären.

4.4 Die verschiedenen Möglichkeiten der in-vivo Studie anhand des Mausmodells

Es gibt verschiedene Modelle zur Erforschung der invasiven Aspergillose bei Mäusen. Je nachdem ob die Maus intranasal, intravenös oder intraperitoneal beimpft und welche Art der Immunsuppression gewählt wird, entwickelt sie ein anderes Muster der Immunantwort.

Wird sie intranasal beimpft, kommt das am ehesten dem Infektionsweg des Menschen gleich. Der Vorteil der i.v. Kontamination der Mäuse ist die geringere

Anzahl an Erregern, die für eine Infektion benötigt werden. Auch lassen sich die Ergebnisse homogener präsentieren. Allerdings spielen die Organe, die auf diesem Wege von einer Infektion betroffen werden (Niere, Milz), beim Menschen keine große Rolle, verglichen mit der pulmonalen Manifestation (Latgé, 1999; [15]).

Ein anderes Problem im Versuchsaufbau ist die hyperakute Reaktion bei der Maus auf eine große intranasale Anzahl von Konidien. Diese ist nicht mit dem langsamen Verlauf beim Menschen vergleichbar, da dieser konstant mit niedrigen Konidienzahlen konfrontiert ist.

Eine weitere Problematik ergibt sich in der Modulation der Immunantwort. Die Mäuse müssen immunsupprimiert sein, da sie sonst erst ab einer Anzahl von über 10^8 Konidien eine Infektion bekommen. Die Immunantwort ist der menschlichen umso ähnlicher, je weniger Konidien für eine Infektion gebraucht werden. Dafür bekommt die Maus stark immunmodulierende Medikamente, wie Cyclophosphamid verabreicht, wobei das Risiko einer Fremdinfection wächst. Die Mäuse müssen demnach noch strenger in steriler Umgebung gehalten werden. Außerdem modulieren die Medikamente, wie bereits erwähnt, die Aktivität der zu untersuchenden Zellen, was die Untersuchung der Zellaktivität im Grunde unmöglich macht (Brummer et al., 2003; [61]). Auf der anderen Seite kommt der Zustand, in dem sich die durch Corticosteroide beeinflussten Mäuse befinden, den Umständen durch myeloablativer Chemotherapie immunsupprimierter Körper sehr nahe, so dass eine Behandlung der zu untersuchenden Mäuse mit Steroiden wiederum doch sinnvoll erscheint. Für den Zweck einer Spiegelbestimmung pro- bzw antiinflammatorischer Zytokine, sollten jedoch andere Wege zur Immunsuppression beschritten werden.

Eine Idee, die Maus unter möglichst realitätsnahen Bedingungen zu infizieren, wurde von Nawada et al. (1996; [49]) verwirklicht. Diese Gruppe beschreibt den intratrachealen Einsatz von mit *A. fumigatus* beschichteten Agaroseketten bei gesunden Mäusen. Dies induzierte eine nichtinvasive Aspergillose, woraufhin nach 2 Wochen die Immunsuppression begonnen und damit der langsamen

Invasion der Aspergillen der Weg gebahnt wurde. Dies kommt dem Krankheitsbild bei einem Patienten in der Leukopenie sehr nahe.

Eine weitere Idee stellt die der Genmodulation dar. Morgenstern et al. [47] konnten durch die Veränderung des gp91^{phox} -Gens mit Inaktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes eine septische Granulomatose (CGD) bei den Mäusen induzieren. Durch die Unfähigkeit der Fresszellen, die Erreger zu töten, braucht es in diesem Fall nur eine geringe Keimlast. Außerdem verläuft die Infektion durch den isolierten Makrophagendefekt chronisch ab, da der Rest der Abwehr intakt bleibt. Auch dies ist mit dem Zustand vieler Patienten vergleichbar.

Die Mäuse, deren Blut in dieser Arbeit zur Datenerhebung diente, wurden zu anderen Zwecken von der Arbeitsgruppe E. Bignell mit *A. fumigatus* infiziert und mit Cortisonacetat vorbehandelt. Da unser Ziel nicht das Erheben neuer repräsentativer Daten war, sondern lediglich die Etablierung der Methoden, waren wir auf der Suche nach murinem Material, ohne zu diesem Zwecke selbst Versuchstiere opfern zu müssen. Die Widersprüchlichkeit in der Untersuchung auf die Konzentration pro- bzw antiinflammatorischer Zytokine und die Vorbehandlung der Tiere mit Corticosteroiden war der Grund, dass keine weiteren Aussagen bezüglich der Immunantwort gemacht werden.

Wie in der Einleitung geschildert, spielen viele Faktoren in der Immunantwort der Maus bei invasiver Aspergillose eine Rolle. Dies sind neben der Art der Immunsuppression auch der jeweilige *A. fumigatus* Stamm, sowie das Alter der Mäuse. Außerdem macht es einen Unterschied, welchem Stamm die Mäuse angehören, so sind DBA/2 Mäuse empfänglicher für eine IA als BALB/c, C57BL/6 oder CD2F1 Mäuse (Cenci et al., 1997; [62], Hector et al., 1990; [63]). Dies zeigt die Notwendigkeit auf, ein Standardmodell zu entwerfen, das erlaubt, Ergebnisse besser vergleichbar zu machen. So müsste man sich auf eine Art der Immunsuppression beispielsweise mit alkylierenden Substanzen wie Cyclophosphamid, genauso wie auf einen Stamm von *A. fumigatus* einigen. Für die Umsetzung dieses Ziels wäre eine identische Art der Beimpfung genauso

wichtig, wie das ungefähr gleiche Alter und die Zugehörigkeit zu einem gemeinsamen Mäusestamm.

Zur Entwicklung eines solchen Modells müssen zunächst vorhandene Studien verglichen werden, um die verschiedenen Möglichkeiten abzuwägen. Der Weg sollte beschränkt werden, der dem gesicherten Wissen über den menschlichen Körper am nächsten kommt und als repräsentativ gelten kann.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

In unserer Studie sollte die Genauigkeit der PCR zur Bestimmung von Zytokinspiegeln ermittelt werden. Mittels Blutproben von mit *A. Fumigatus* infizierten Mäusen, sollte eine Aussage bezüglich der Immunantwort getroffen werden. Wir griffen TNF α , IL-12p40 und IL-10 heraus, um einschätzen zu können, ob die Immunantwort eher humoral oder zellvermittelt abläuft.

Zur möglichen Bestimmung der Sensitivität und Genauigkeit, wurden die crossing points der Standardverdünnungsreihen jeweils einmal in einem Lauf dreifach, ausserdem jeweils in drei unabhängigen Läufen von einander einfach eingesetzt, und miteinander verglichen. Unsere Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen aktueller Literatur und Etablierungen anderer Zytokine.

Die Etablierung des ELISAs sollte dem Vergleich zwischen mRNA-Ebene und Proteinebene dienen. Zur richtigen Einordnung unserer Arbeiten mit dem Immunoassay müssen die Limitierungen der Ergebnisse beachtet werden. Die Versuche zur Quantifizierung der mRNA murinen TNF α s aus den Versuchsserien misslang. Auch die erzielten Ergebnisse mit Protein-basierten Nachweisverfahren konnten letztendlich nicht suffizient beurteilt werden. Die großen Schwankungen in der Konzentration und die Widersprüchlichkeit im Vergleich der Ergebnisse aktueller Literatur, machen eine Verfälschung durch Kontamination mit Proteinen aus lysierten Zellen sehr wahrscheinlich.

Die erzielten Ergebnisse der RT-PCR anhand der Inter- und Intra-Assay-Vergleiche jedoch können nachfolgenden Projekten dazu dienen, hauptsächlich das Instrument LightCycler in seiner Sensitivität und Genauigkeit einschätzen zu können, und so die ermittelten Daten besser verarbeiten zu können.

Literaturverzeichnis

- 1: Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycosis, 2002, *Current Opinion in Infection Diseases*, 15(6):569-74.
- 2: Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Invasive fungal infection--laboratory diagnosis and antifungal treatment, 2006, *Journal of Microbiologie, Immunologie and Infection*, 39(3):178-88.
- 3: McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 2001, *Clinical Infectious Diseases*, 33(5):641-7
- 4: Maertens J. Evaluating prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematologic malignancies, 2007, *European Journal of Haematology*, 78(4):275-82.
- 5: Muller J. Epidemiology of deep-seated, domestic mycoses, 1994, *Mycoses*, 37 (2):1-7.
- 6: Cornet M, Fleury L, Maslo C. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area, 2002, *The Journal of Hospital Infection*, 51(4):288-96.
- 7: Tomee JF, van der Werf TS. Pulmonary aspergillosis, 2001, *The Netherlands Journal of Medicin*, 59(5):244-58.
- 8: Walsh TJ, Bulkley BH. *Aspergillus pericarditis: clinical and pathologic features in the immunocompromised patient*, 1982, *Cancer*, 49(1):48-54.
- 9: Mittermayer H, Allerberger F. *Spektrum der Infektionskrankheiten*, 2006, Spitta Verlag GmbH & Ko. KG, Balingen, Band 1, 831-39.
- 10: Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature, 2001, *Clinical Infectious Diseases*, 1;32(3):358-66.
- 11: Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital, 1996, *The Journal of Infection*, 33(1):23-32.
- 12: Brodoefel H, Schimmel H, Horger M. Invasive pulmonary aspergillosis, 2005, *RöFo*, 177(9):1191-5.

- 13:** Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome, 2005, *Critical Care*, 9(3):R191-9.
- 14:** Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy, 2004, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(6):621-5.
- 15:** Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis, 1999, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2):310-50.
- 16:** Reiß J. *Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*, 1998, Springer-Verlag Berlin, 5-13, 20.
- 17:** Carlile, M. J., Watkinson, S. C. *The fungi*, 1994, Academic Press, London. 237-40.
- 18:** Amitani R, Murayama T, Nawada R. *Aspergillus* culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro, 1995, *European Respiratory Journal*, 8(10):1681-7.
- 19:** Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, Reid KB, Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages, 1997, *Infection and Immunity*, 65(8):3171-9.
- 20:** Jensen TD, Schonheyder H, Andersen P, Stenderup A. Binding of C-reactive protein to *Aspergillus fumigatus* fractions, 1986, *Journal of Medical Microbiology*, 21(2):173-7.
- 21:** Kozel TR, Wilson MA, Farrell TP, Levitz SM. Activation of C3 and binding to *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae, 1989, *Infection and Immunity*, 57(11):3412-7.
- 22:** Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F.; Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2, 2007, *Cellular Microbiology*; 9(2):368-81.

- 23:** Robertson MD. Suppression of phagocytic cell responses by conidia and conidial products of *Aspergillus fumigatus*, 1999, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2):310-350.
- 24:** Michaliszyn E, Senechal S, Martel P, de Repentigny L. Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages, 1995, *Infection and Immunity*, 63(5):2075-8.
- 25:** Diamond RD, Clark RA. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro, 1982, *Infection and Immunity*, 38(2):487-95.
- 26:** Diamond RD, Huber E, Haudenschild CC. Mechanisms of destruction of *Aspergillus fumigatus* hyphae mediated by human monocytes, 1983, *The Journal of Infectious Diseases*, 147(3):474-83.
- 27:** Sturtevant J, Latge JP. Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells, 1992, *Journal of infectious diseases*, 166(3):580-6.
- 28:** Levitz SM, Farrell TP. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*, 1990, *Journal of Leucocyte Biologie*, 47(2):170-5.
- 29:** Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, DeCarlo ES, Melnick DA. In vivo interferon- γ therapy augments the in vitro ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus* hyphae, 1991, *Journal of infectious diseases*, 163(4):849-52.
- 30:** Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, Melnick DA. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae, 1990, *Journal of infectious diseases*, 162(2):523-8.
- 31:** Okamoto T, Tanida T, Wei B, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T. Regulation of fungal infection by a combination of amphotericin B and peptide 2, a lactoferrin peptide that activates neutrophils, 2004, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*., 11(6):1111-9.
- 32:** El-Gedaily A, Schoedon G, Schneemann M, Schaffner A. Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes, 2004, *Journal of Leucocyte Biologie*, 75(3):495-503.

- 33:** Christin L, Wysong DR, Meshulam T, Hasteley R, Simons ER, Diamond RD. Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils, 1998, *Infection and Immunity*, 66(3):1181-9.
- 34:** Balloy V, Si-Tahar M, Takeuchi O, Philippe B, Nahori MA, Tanguy M, Huerre M, Akira S, Latge JP, Chignard M. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis, 2005, *Infection and Immunity*, 73(9):5420-5.
- 35:** Stevens DA. Th1/Th2 in aspergillosis, 2006, *Medical Mycology*, 44(6):229-35.
- 36:** Del Sero G, Mencacci A, Cenci E, d'Ostiani CF, Montagnoli C, Bacci A, Mosci P, Kopf M, Romani L. Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice, 1999, *Microbes and Infection*, 1(14):1169-80.
- 37:** Clemons KV, Grunig G, Sobel RA, Mirels LF, Rennick DM, Stevens DA. Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis., 2000, *Clinical and Experimental Immunology*, 122(2):186-91.
- 38:** Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup V. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α protect mice from invasive aspergillosis, 1995, *Journal of infectious diseases* 1995 Dec;172(6):1554-60.
- 39:** Roilides E, Dimitriadou A, Kadiltsoglou I, Sein T, Karpouzas J, Pizzo PA, Walsh TJ. IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*., 1997, *Journal of Immunology*. 1997 Jan 1;158(1):322-9.
- 40:** Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C, Del Sero G, Mosci P, Montagnoli C, Bacci A, Romani L. Cytokine- and T Helper-Dependent Lung Mucosal Immunity in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis, 1998, *Journal of infectious diseases*, 178(6):1750-60.
- 41:** Rivera A, Van Epps HL, Hohl TM, Rizzuto G, Pamer EG. Distinct CD4⁺-T-Cell Responses to Live and Heat-Inactivated *Aspergillus fumigatus* Conidia, 2005, *Infection and Immunity*, 73(11):7170-9.

- 42:** Brummer E, Maqbool A, Stevens DA. Protection of bronchoalveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) against dexamethasone suppression of fungicidal activity for *Aspergillus fumigatus* conidia, 2001, *Medical Mycology*, 39(6):509-15.
- 43:** Quezada G, Koshkina NV, Zweidler-McKay P, Zhou Z, Kontoyiannis DP, Kleinerman ES. Intranasal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces the *Aspergillus* burden in an immunosuppressed murine model of pulmonary aspergillosis, 2008, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2):716-8.
- 44:** Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M., Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis, 2005, *Infection and Immunity*, 73(1):494-503.
- 45:** Mencacci A, Perruccio K, Bacci A, Cenci E, Benedetti R, Martelli MF, Bistoni F, Coffman R, Velardi A, Romani L., Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation, 2001, *Blood*, 97(5):1483-90.
- 46:** Cenci E, Mencacci A, Spreca A, Montagnoli C, Bacci A, Perruccio K, Velardi A, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Romani L., Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation, 2002, *Infection and Immunity*. 70(5):2375-82.
- 47:** Morgenstern DE, Gifford MA, Li LL, Doerschuk CM, Dinauer MC. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*, 1997, *The Journal of experimental medicine*, 185(2):207-18.
- 48:** Bretz C, Gersuk G, Knoblaugh S, Chaudhary N, Randolph-Habecker J, Hackman RC, Staab J, Marr, MyD88 signaling contributes to early pulmonary responses to *Aspergillus fumigatus*, 2008, *Infection and Immunity*. 76(3):952-8.
- 49:** Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, Kuze F. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage,

noninvasive *Aspergillus* infection, 1996, *Journal of clinical microbiology*, 34(6):1433-9.

50: Sarfati J, Diaquin M. A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced virulence, 2002, *Japanese journal of medical mycology*, 43(4):203-13.

51: Corbel MJ, Eades SM. Examination of the effect of age and acquired immunity on the susceptibility of mice to infection with *Aspergillus fumigatus*, 1977, *Mycopathologia*. 60(2):79-85.

52: Chomczynski P. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples, 1993, *BioTechniques*, 15(3):532-4, 536-7.

53: Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice, 1998, *Journal of infectious diseases*, 178(5):1472-82.

54: Badriyyah M, Mazeh H, Brocke S, Osmanova V, Freund HR, Hanani M. Prevention of lipopolysaccharide-induced intussusception in mice by the COX2 inhibitor rofecoxib, 2008, *Pediatric Surgery International*, 24(3):333-6.

55: Benveniste O, Martin M, Villinger F, Dormont D. Techniques for quantification of cytokine mRNAs, 1998, *Cytokines, cellular & molecular therapy*, 4(3):207-14.

56: Pandori MW, Lei J, Wong EH, Klausner J, Liska S. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction, 2006, *BMC Infectious Diseases*, 6:104.

57: Akhawi-Araghi DM. Evaluierung eines eines quantitativen PCR-Nachweisverfahrens zur Bestimmung der Expression von Zyto- und Chemokinen, 2005, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

58: Cheung CY, Chen J, Chang TK. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the quantification of CYP1B1 gene expression in MCF-7

human breast carcinoma cells, 2004, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 49(2):97-104.

59: Stordeur P, Poulin LF, Craciun L, Zhou L, Schandene L, de Lavarelle A, Goriely S, Goldman M. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR, 2002, *Journal of immunological methods*, 259(1):55-64.

60: Almawi WY, Abou Jaoude MM, Li XC. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects, 2002, *Hematological oncology*, 20(1):17-32.

61: Brummer E, Kamberi M, Stevens DA. Regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and/or steroids given in vivo of proinflammatory cytokine and chemokine production by bronchoalveolar macrophages in response to *Aspergillus conidia*, 2003, *Journal of infectious diseases*, 187(4):705-9.

62: Cenci, E., S. Perito, K. H. Enssle, P. Mosci, J. P. Latgé, L. Romani, and F. Bistoni. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis, 1997, *Infection and Immunity*, 65(2):564-70.

63: Hector, R. F., E. Yee, and M. S. Collins. Use of DBA/2N mice in models of systemic candidiasis and pulmonary and systemic aspergillosis, 1990, *Infection and Immunity*, 58(5):1476-8.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte.....	12
Tab. 2: Verbrauchsgegenstände.....	13
Tab. 3: Kits.....	13
Tab. 4: Primer und Sonden.....	14
Tab. 5: Chemikalien.....	14
Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer.....	17
Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Sonden.....	17
Tab. 8: cDNA-Synthese MMX.....	21
Tab. 9: Standard-Herstellung.....	22
Tab. 10: Protokoll Standardherstellung.....	22
Tab. 11: Verhältnis MMX zu Probe.....	26
Tab. 12: MMX TNF α	26
Tab. 13: MMX IL-12p40.....	26
Tab. 14: MMX IL-10.....	27
Tab. 15: Bedingungen TNF α und IL-10.....	28
Tab. 16: Bedingungen IL-12p40.....	28
Tab. 17: Variationkoeffizient der Kopienzahlen im Inter-Assay Vergleich.....	39
Tab. 18: Variationkoeffizient der Kopienzahlen im Intra-Assay Vergleich.....	41

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: mikroskopisches Bild von Aspergillus	3
Abb. 2: schematischer Aufbau des LightCycler 1,5 Systems.....	16
Abb. 3: PCR-Phasen (murines IL-10; 10e5-10e0+H2O).....	18
Abb. 4: Denaturierungsphase.....	32
Abb. 5: Annealingphase, das vom Akzeptor emittierte Licht wird gemessen...32	
Abb. 6: Sonden werden von der Polymerase bei der Elongation entfernt.....	32

Abb. 7: TNF α - Verdünnungsreihe 10e5-10e0+ H2O mit regelmäßigem exponentiellem Verlauf, H2O bleibt negativ.....	32
Abb. 8: Gel mit IL-12p40, TNF α und IL-10.....	34
Abb. 9: TNF α crossing points 10e5-10e1, r= -1.....	35
Abb. 10: IL10 crossing points 10e5-10e2, r= -1.....	36
Abb. 11: IL12p40 crossing points 10e5-10e1, r= -1.....	36

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy-DNA
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxy-ribonucleic-Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease
IA	invasive Aspergillose
ICU	Intensiv Care Unit
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.v.	intravenös
MMX	Mastermix
MHC	Major Histocompatibility Complex

mRNA	Messenger-RNA
NK	natürliche Killerzelle
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rounds per Minute
RT-PCR	Realtime PCR / reverse Transkriptase PCR
SP	Surfactant Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TH-Zelle	T-Helferzelle
tRNA	Transfer-RNA

Danksagung

All denen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben sage ich herzlichen Dank.

An erster Stelle möchte ich hier meinem Doktorvater Prof. Dr. med H. Einsele für die Vergabe und Ermöglichung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, der die Untersuchung angeregt und begleitet hat. Mein Dank gilt auch den Doktoranden des biologischen Fachs Markus Mezger und Iwona Wozniok wie auch ganz besonders der medizinisch technischen Assistentin Melanie Beyer, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen. Ohne ihre Anleitung und Geduld wäre eine zeitnahe Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die mir zu jeder Zeit Ansprechpartner und Rückhalt waren. Ganz besonderen Dank schulde ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich immer unterstützten.

Lebenslauf

Marlene Butters

geboren am 23.10.1981 in Ulm

Schulischer, universitärer und beruflicher Werdegang:

1988/89	1. und 2. Klasse an der Grundschule Thalfingen in Neu-Ulm
1990/2001	3. und 4. Klasse an der Grundschule Stuttgart-Birkach Abitur am Heidehofgymnasium in Stuttgart
03/2002	Immatrikulation zur Medizinstudentin an der Julius- Maximilians Universität in Würzburg
03/2004	Physikum an der Universität Würzburg
11/2008	Examen an der Universität Würzburg
seit 03/2009	Assistenzarztstelle an der Wertachklinik Bobingen in der Inneren Medizin

Augsburg, den 27.06.2009