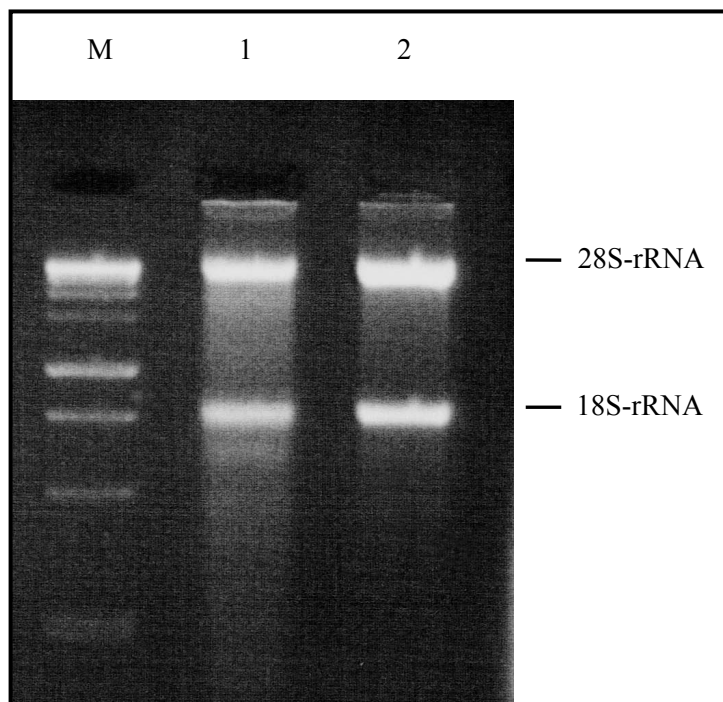


## 4. Ergebnisse

### 4.1. RNA-Isolierung

Intakte Gesamt-RNA von eukaryoten Proben zeigte auf dem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel abgrenzbare 28S- und 18S-rRNA-Banden (Abbildung 01, Seite 21). Das Verhältnis von 28S zu 18S lag bei 2:1. Bei Intaktheit der isolierten RNA sollte die 28S-rRNA-Bande durchschnittlich doppelt so intensiv sein wie die 18S-rRNA-Bande (Abbildung 09).



**Abb. 09:** Auftrennung von Gesamt-RNA durch Gel-elektrophorese neben einem Basenpaarmarker (M) und zwei Proben (1 und 2) mit einem 2%-igen Agarosegel

Die Ausbeute an isolierter Gesamt-RNA aus den Darmbiopsien lag zwischen 0,17 und 7,21  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA/mg Gewebe (Tabelle 12, Seite 54).

Hochreine RNA-Präparationen zeigen Ratios von 1,8 bis 2. Unsere Präparationen hatten Ratios zwischen 1,5 und 1,9 (Tabelle 12, Seite 54).

**Tab. 08: Ergebnisse der RNA-Isolierung**

Biopsie-nummer	Biopsie [mg]	$\mu\text{g RNA} / \mu\text{l Lösungsmittel}$	$\mu\text{g RNA} / \text{mg Biopsie}$	Reinheit (A268/A280)
K125	12,0	0,409	1,02	1,7
125II	7,7	0,736	2,87	1,5
127II	3,0	0,721	7,21	1,5
2177	*	0,211		1,6
K129	5,5	0,735	4,01	1,6
K128	3,6	0,083	0,69	1,9
128II	12,8	0,411	0,96	1,5
129II	7,8	0,043	0,17	1,8
2076	3,7	0,489	3,97	1,5
K130	15,9	0,450	0,85	1,5

\* Das Gewicht war zu gering, um es mit der Feinwaage zu ermitteln.

Nach der Etablierungsphase wurde wegen der begrenzten Materialmenge auf die Erhebung dieser Parameter verzichtet.

#### 4.2. Wiederfindung

RNA bekannter Konzentration aus einer Sigmabiopsie wurde erneut mit der Trizol-Methode, aber in diesem Fall ohne Gewebe, aufgearbeitet. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt und erbrachte eine Wiederfindungsquote von im Median  $96 \pm 12 \%$  (Tabelle 13, Seite 56).

Eine Sigmabiopsie wurde in Trizol homogenisiert und dann in drei gleiche Teile aliquotiert. Für das erste Aliquot wurde nach üblichem Protokoll die Ausgangs-RNA-Menge bestimmt. Den anderen beiden Aliquots wurden definierte RNA-Mengen zugesetzt und dann alle Isolationsschritte wie üblich durchgeführt. Die Ergebnisse der RNA-Quantifizierung wurden mit den zu erwartenden Mengen verglichen und zeigten im Mittel eine Wiederfindung von  $98 \pm 7 \%$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 09 dargestellt.

**Tab. 09: Wiederfindung von RNA ohne Gewebehintergrund**

Probe	zugegebene RNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	gemessene RNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	Wiederfindung [%]
1	8,8	10,2	116
	8,8	8,4	96
	8,8	8,4	96
2	17,6	15,6	89
	17,6	19,8	113
	17,6	15,0	85
3	35,2	33,0	94
	35,2	30,6	87
	35,2	30,0	85

**Tab.10: Wiederfindung von RNA mit Trizol unter Probenbedingungen**

Probe	Ausgangsmenge der Probe [ $\mu\text{g}$ ]	zugegebene RNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	erwartete RNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	gemessene RNA-Menge [ $\mu\text{g}$ ]	Wiederfindung [%]
A	21,0	3,25 in 10 $\mu\text{l}$	24,3	24,5	101
	21,0	6,50 in 20 $\mu\text{l}$	27,5	26,0	95
B	14,5	2,65 in 10 $\mu\text{l}$	17,2	18,0	105
	14,5	5,30 in 20 $\mu\text{l}$	19,8	17,8	90

### 4.3. PCR-Etablierung

Wie im Methodenteil ausführlich dargestellt, wurden Primer- und PCR-Bedingungen etabliert, die eine spezifische Amplifikation der jeweiligen Ziel-DNA gestatten.

#### 4.3.1. Methodische Nachweisgrenze

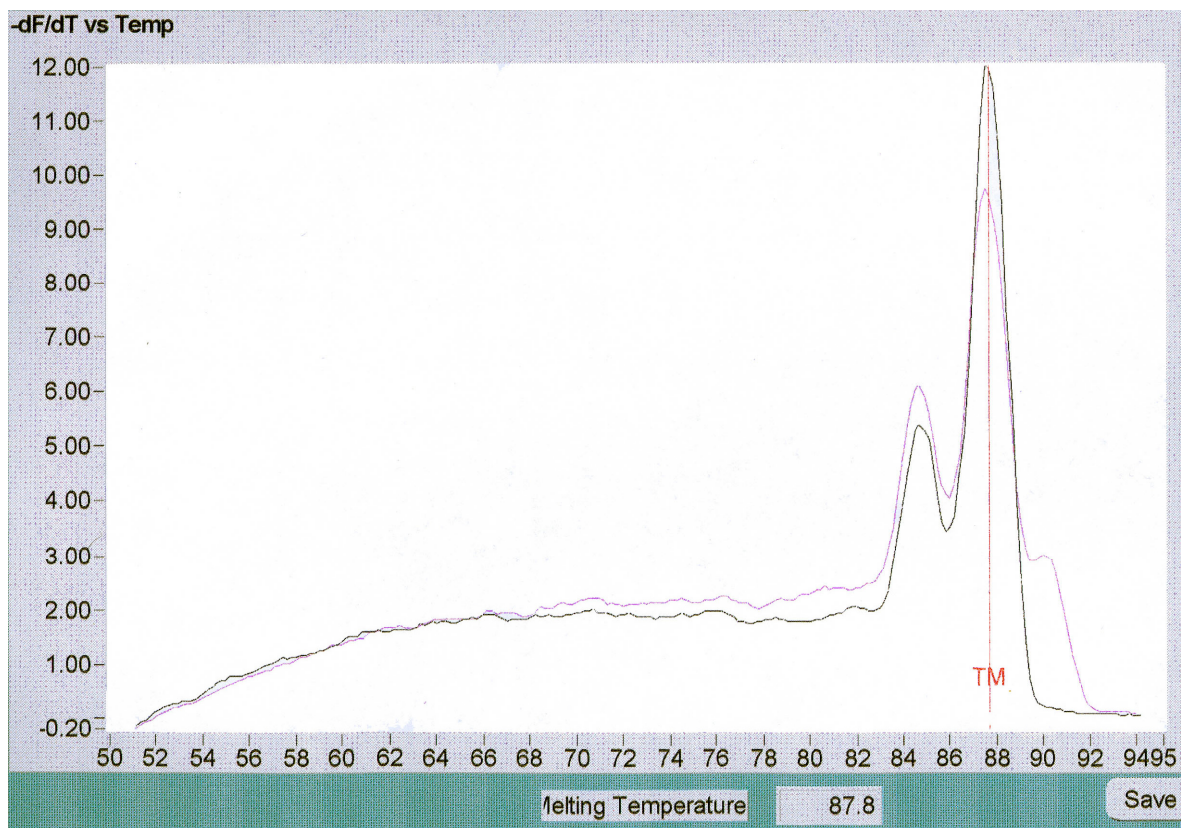
Für jedes der Zytokine und GAPDH ergab sich aus dem methodischen Vorgehen eine grundsätzliche Nachweisgrenze. Enthält eine Biopsie beispielsweise 10.000 mRNA-Kopien eines Zytokins, dann sollte das RNA-Sediment am Ende der RNA-Isolierung idealerweise alle 10.000 Kopien enthalten, die in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  gelöst werden. Von diesen 50  $\mu\text{l}$  werden zunächst 4 mal 8  $\mu\text{l}$  entnommen, die jeweils 1.600 Kopien enthalten. Nach Umschreiben in cDNA und dem erneuten Zusammenführen der vier Ansätze befinden sich diese 6.400 Kopien in einem Volumen von 80  $\mu\text{l}$ . Aus diesem Volumen werden 2  $\mu\text{l}$  für den Zytokinnachweis und 1  $\mu\text{l}$  für den Nachweis des Housekeeping-Gens GAPDH eingesetzt. Daher schrumpft die

nachweisbare Ausgangskopienzahl von 10.000 bei den Zytokinen auf 160 und bei GAPDH auf 80 im PCR-Ansatz.

Um eine Kopie in der PCR nachweisen zu können, müssen daher in der Biopsie 62,5 Kopien dieses Zytokins und 125 Kopien von GAPDH vorhanden gewesen sein.

#### 4.3.2. LightCycler-PCR: SYBR Green oder spezifische Hybridisierungssonden

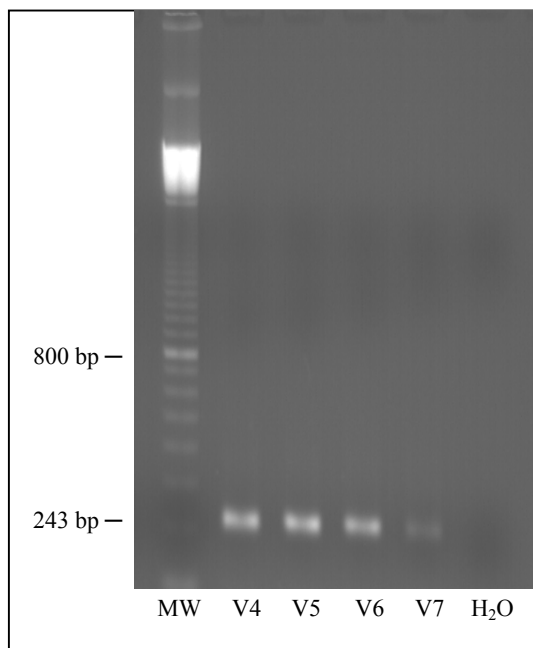
SYBR Green detektiert unspezifisch doppelsträngige DNA. Bei niedrig eingesetzten cDNA-Konzentrationen fiel bei der Schmelzkurvenanalyse ein zweiter Gipfel auf, der nicht die Schmelztemperatur des gesuchten Amplifikates hatte (Abbildung 10). Im Agarosegel zeigten sich die gewünschte Bande des Amplifikats sowie unspezifische Produkte im Bereich der Lauffront, die als Primerdimere gedeutet wurden. Bei hohen Konzentrationen eingesetzter cDNA verschwanden der zweite Schmelzkurvengipfel und die unspezifischen Produkte auf dem Gel. Bei geringen cDNA-Konzentrationen im PCR-Ansatz entstanden vermehrt Primerdimere, die durch SYBR Green mitdetektiert wurden. Für die quantitativen Untersuchungen stellte dies ein Problem dar. Deshalb wurden spezifische Hybridisierungssonden für den PCR-Produktnachweis eingesetzt.



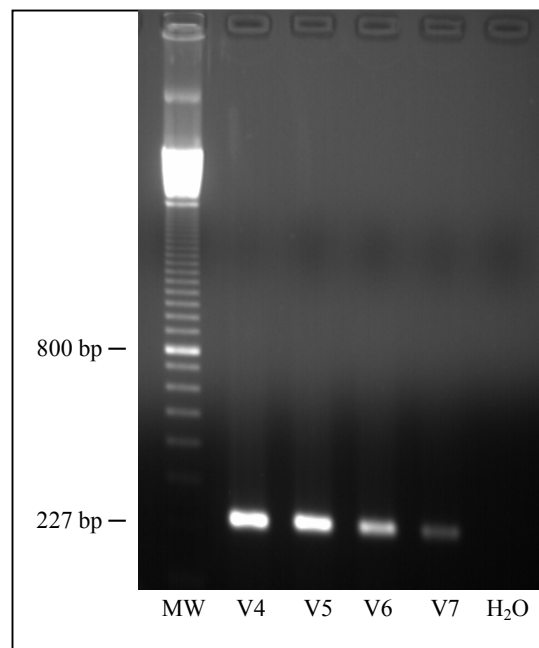
**Abb.10:** Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate nach PCR mit SYBR Green. Es zeigt sich bei 87,7°C ein Gipfel, welcher der Schmelztemperatur des gewünschten Amplifikats entspricht, sowie bei 85 °C ein weiterer, der das Vorliegen von störender doppelsträngiger DNA zeigt, die nicht der Zielsequenz entspricht und eine exakte Quantifizierung dieser unmöglich macht.

### 4.3.3. Amplifikation der quantitativen Standardreihen am LightCycler

Die nun folgenden Abbildungen 11 bis 20 zeigen die Ergebnisse der Amplifikationen der verschiedenen Standardreihen für alle Zytokine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-16, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL5) und das Housekeeping-Gen GAPDH. Für die PCRs wurden jeweils die angegebenen Kopienzahlen als initiale Matrizenanzahl hinzupipettiert. Zu sehen sind die Echtzeit PCR Produkte, die in der Agarose-Gelelektrophorese durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Alle Standards zeigten über das jeweilige Verdünnungsspektrum (Zytokine  $10^3$ - $10^0$  Kopien; Housekeeping-Gen GAPDH  $10^5$ - $10^2$  Kopien) deutliche Banden und wurden daher effektiv amplifiziert. Die Sensitivität in den Standardreihen lag für alle Zytokine und GAPDH unter zehn Kopien als Startmoleküle. Weiterhin war eine gute Abstufung in der Intensität der amplifizierten Produkte erkennbar.

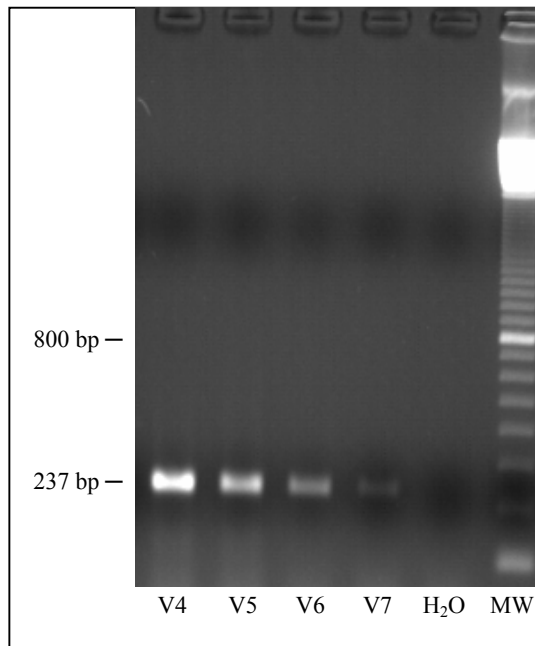


**Abb. 11:** IL-2 (243 bp)

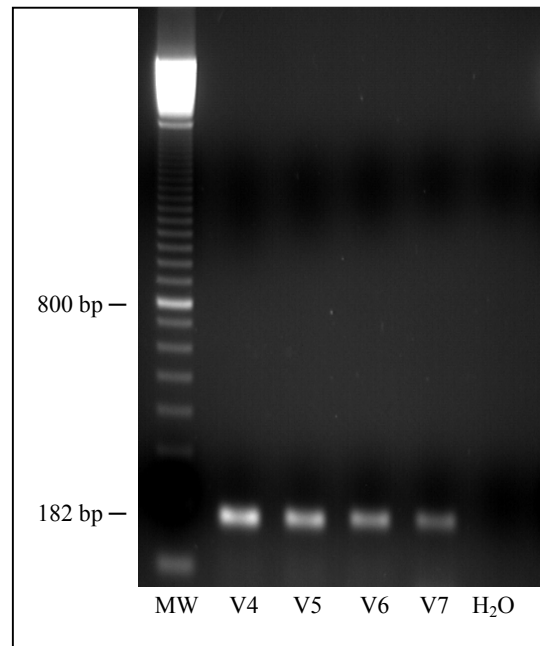


**Abb. 12:** IL-4 (227 bp)

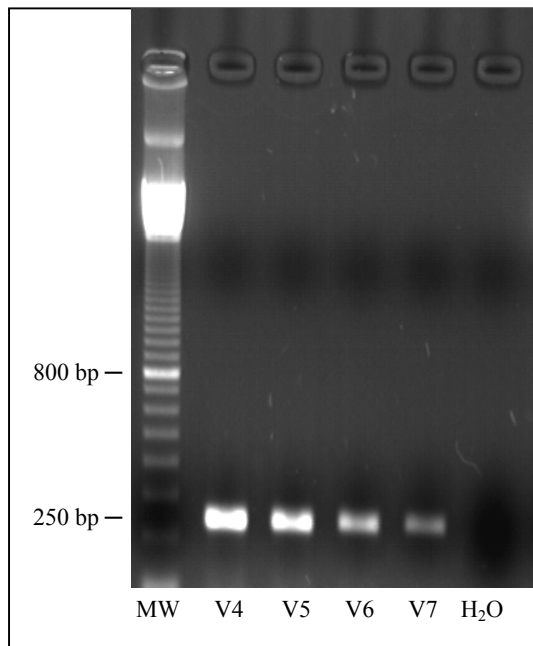
**Abb. 11-12:** V3:  $10^2$  Kopien; V4:  $10^3$  Kopien; V5:  $10^2$  Kopien; V6:  $10^1$  Kopien; V7:  $10^0$  Kopien; H<sub>2</sub>O: Negativ-Kontrolle; MW: Basenpaarleiter (Molekular Weight)



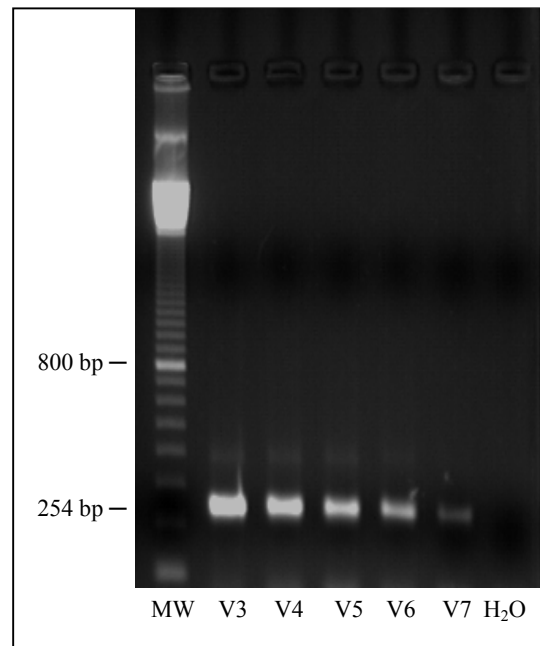
**Abb. 13:** IL-6 (237 bp)



**Abb. 14:** IL-10 (182 bp)

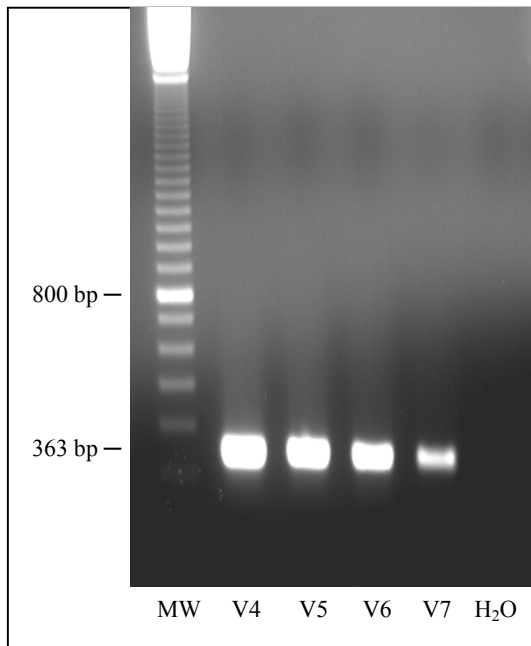


**Abb. 15:** IL-16 (250 bp)

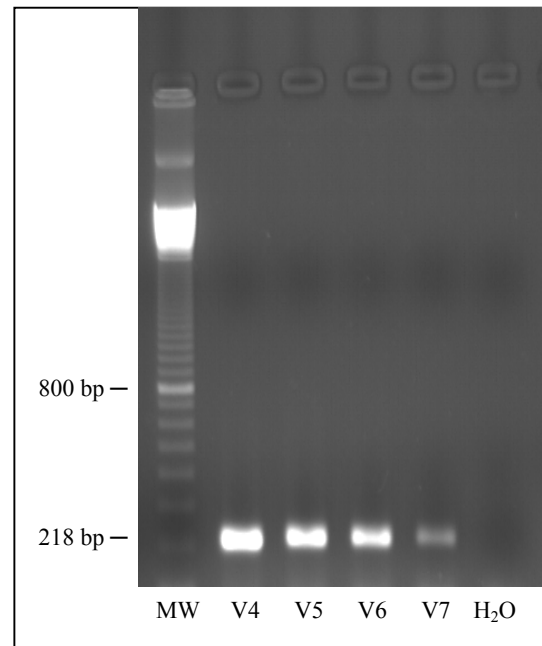


**Abb. 16:** IFN- $\gamma$  (254 bp)

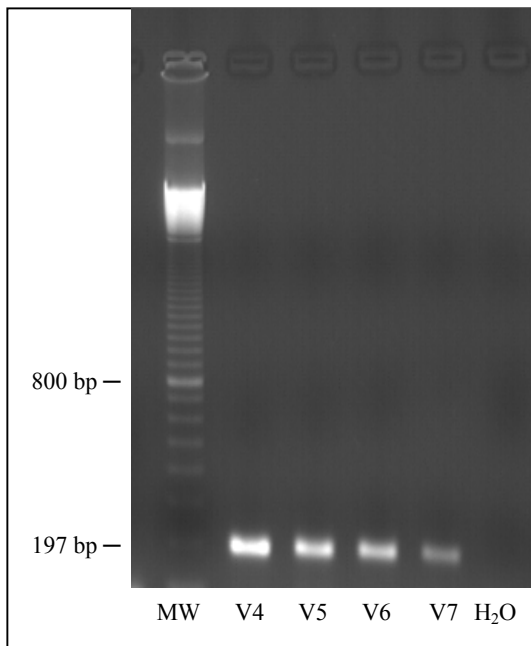
**Abb. 13-16:** V3:  $10^2$  Kopien; V4:  $10^3$  Kopien; V5:  $10^2$  Kopien; V6:  $10^1$  Kopien; V7:  $10^0$  Kopien;  
H<sub>2</sub>O: Negativ-Kontrolle; MW: Basenpaarleiter (Molekular Weight)



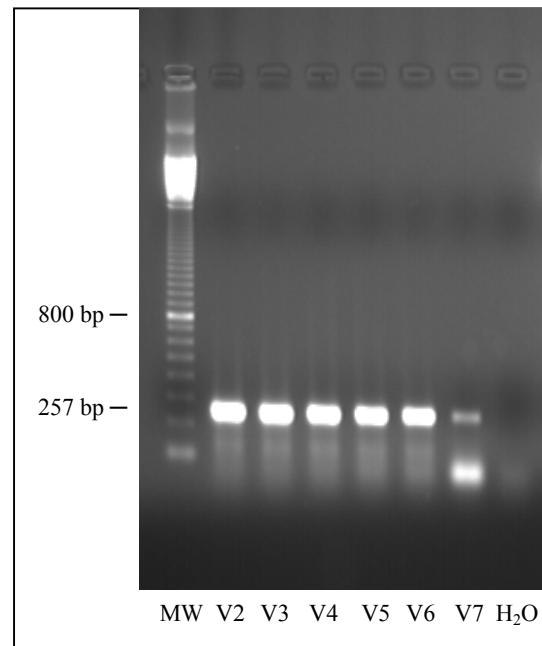
**Abb. 17:** TNF- $\alpha$  (363 bp)



**Abb. 18:** CCL3 (218 bp)



**Abb. 19:** CCL5 (197 bp)

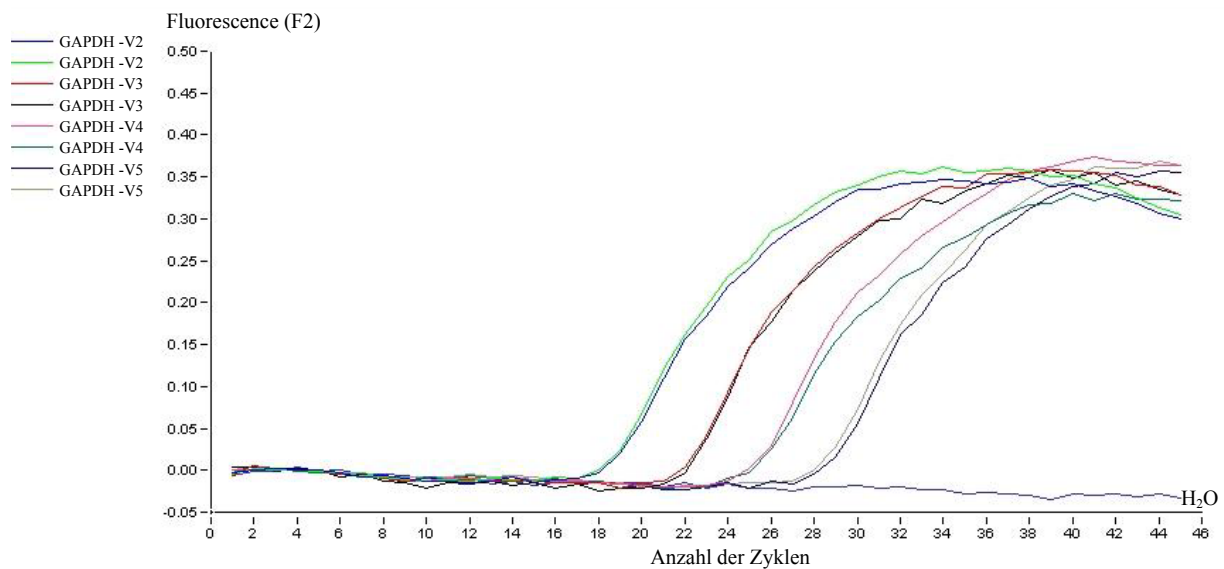


**Abb. 20:** GAPDH (257 bp)

**Abb. 17-20:** V3:  $10^4$  Kopien; V4:  $10^3$  Kopien; V5:  $10^2$  Kopien; V6:  $10^1$  Kopien; V7:  $10^0$  Kopien; H<sub>2</sub>O: Negativ-Kontrolle; MW: Basenpaarleiter (Molekular Weight)

#### 4.3.4. Detektion der PCR-Produkte am LightCycler

Am Beispiel der GAPDH-PCR sollen nun die Ergebnisse und Darstellungen mit dem LightCycler, die man für die Auswertung einer Fluoreszenz-Echtzeit-PCR benötigt, erläutert werden: Es wurden hierfür der Standard von GAPDH mit  $10^5$ - $10^2$  Kopien im PCR-Ansatz verwendet. Dies ist der Bereich, der bei der Analyse des Probenmaterials zur Anwendung kam. Da sich bei den Messungen zeigte, dass bei den Zytokinen erheblich weniger mRNA-Kopien in den Biopsien vorlagen als von GAPDH, wurden für deren Quantifizierung Standards im Konzentrationsbereich von  $10^3$ - $10^0$  Kopien eingesetzt.

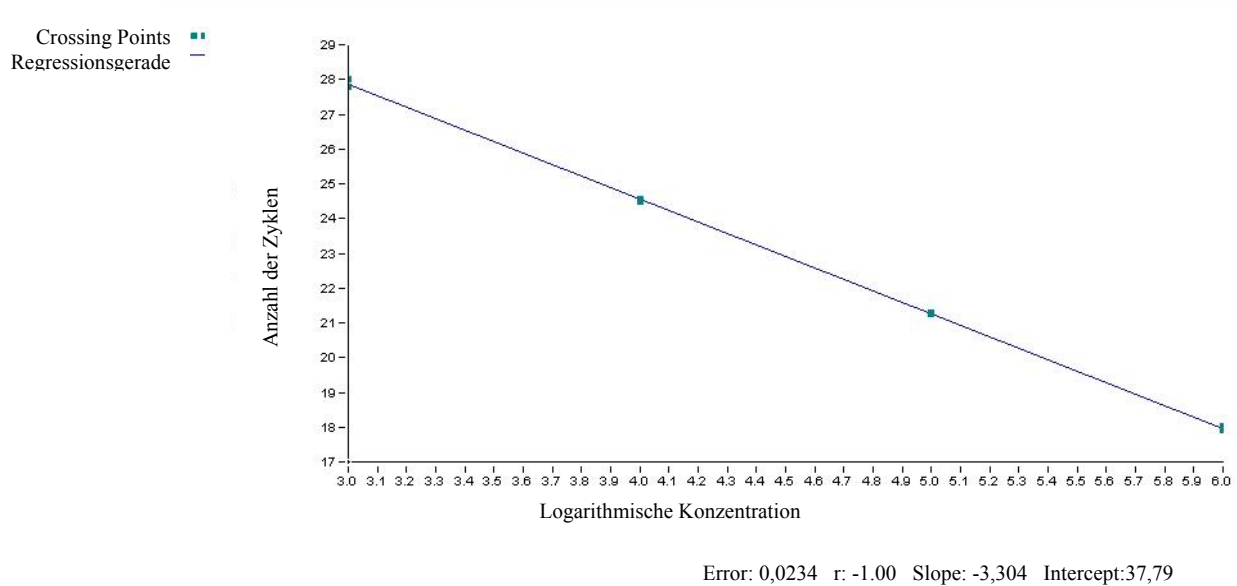


**Abb. 21:** Linearer Amplifikationsplot mit sigmoiden Verläufen der acht GAPDH-Standard-Kurven und einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

Die Abbildung 21 zeigt für jeden PCR-Ansatz einen sigmoiden Kurvenverlauf als Ausdruck der Fluoreszenzzunahme mit zunehmender Zyklenzahl. Die Kinetik der PCR ließ sich in Echtzeit von Zyklus zu Zyklus am Monitor verfolgen. Die Negativkontrolle zeigte keine Amplifikation, so dass eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Das Maximum der zweiten Ableitung dieser Amplifikationskurven ergibt ihren jeweiligen charakteristischen Crossing Point. Der Crossing Point steht in proportionalem Zusammenhang mit der Ausgangs-cDNA-Menge. Angegeben wird der Crossing Point in Zyklen. Die dargestellte Amplifikation der GAPDH-Standardreihe mit einer Startkopienzahl von  $10^5$ - $10^2$  und einer Negativkontrolle (Aqua destilata) zeigt deutlich abgestufte Crossing Points.





**Abb. 22:** Standardgerade

Aus diesen Informationen wurde eine Standardgerade (Abbildung 22) erstellt. Die Werte der Crossingpoints der Standardverdünnungen wurden gegen die bekannten Konzentrationen der Standards aufgetragen. Die daraus berechnete Regressionsgerade diente zur Quantifizierung der unbekanntenen Proben. Gleichzeitig konnte anhand der Eichgerade die Effizienz und die Exaktheit der Quantifizierung abgeschätzt werden. Im Idealfall läuft die Standardgerade durch alle Punkte der Standardverdünnungen, mit denen diese Gerade berechnet wurde. Die Richtigkeit der Quantifizierung, also die Abweichung der Einzelpunkte von der Standardgeraden ist durch ihren Korrelationskoeffizienten angegeben. Der Korrelationskoeffizient kann maximal den Wert -1,0 annehmen und ist als gut zu bewerten, wenn er zwischen -0,98 und -1 liegt. Die Korrelationskoeffizienten der Eichgeraden lagen ohne Ausnahme in diesem Bereich.

Ferner wird die Standardgerade durch die Steigung (slope) und den Schnittpunkt mit der y-Achse definiert (intercept). Rein rechnerisch werden für eine Verzehnfachung des Amplifikats 3,32 PCR-Zyklen benötigt, wenn die Effizienz (E) der PCR 100% (E=1,0) beträgt.

$$y = x (1 + E)^n$$

$$n = \log y - \log x / \log (1 + E)$$

$$n_{10x\text{Amplifikat}} = \log (10 x) - \log x / \log (1+E)$$

$$n_{10x\text{Amplifikat}} = \log 10 / \log (1 + E)$$

$$n_{10x\text{Amplifikat}} = 1 / \log (1 + E)$$

y: Menge der hergestellten Amplifikate

x: Startkopienzahl

E: Effizienz der PCR

n: Anzahl der PCR Zyklen

Die Effizienz der PCRs sind in der Tabelle 11 dargestellt.

**Tab. 11: PCR-Effizienz**

	Steigung der Standardkurve (Mittelwert $\pm$ SD)	Variationskoeffizient [%]
GAPDH	3,4 $\pm$ 0,08	2
IL-2	3,4 $\pm$ 0,15	4
IL-4	3,5 $\pm$ 0,16	5
IL-6	3,4 $\pm$ 0,17	5
IL-10	3,4 $\pm$ 0,10	3
IL-16	3,7 $\pm$ 0,09	2
IFN- $\gamma$	3,0 $\pm$ 0,43	14
TNF- $\alpha$	3,4 $\pm$ 0,31	10
CCL3	3,6 $\pm$ 0,48	13
CCL5	3,2 $\pm$ 0,13	4

In der Praxis wird eine PCR als ausreichend effizient bewertet, wenn ihre Steigung kleiner 4,0 ist. Die Mittelwerte der Effizienz lagen für jede etablierte PCR unter 4 und streuten nur gering (Tabelle 11).

Die etablierte Echtzeit-RT-PCR war bei allen Zytokinen und GAPDH bis zur methodischen Nachweisgrenze von einer Ausgangskopie hochsensitiv.

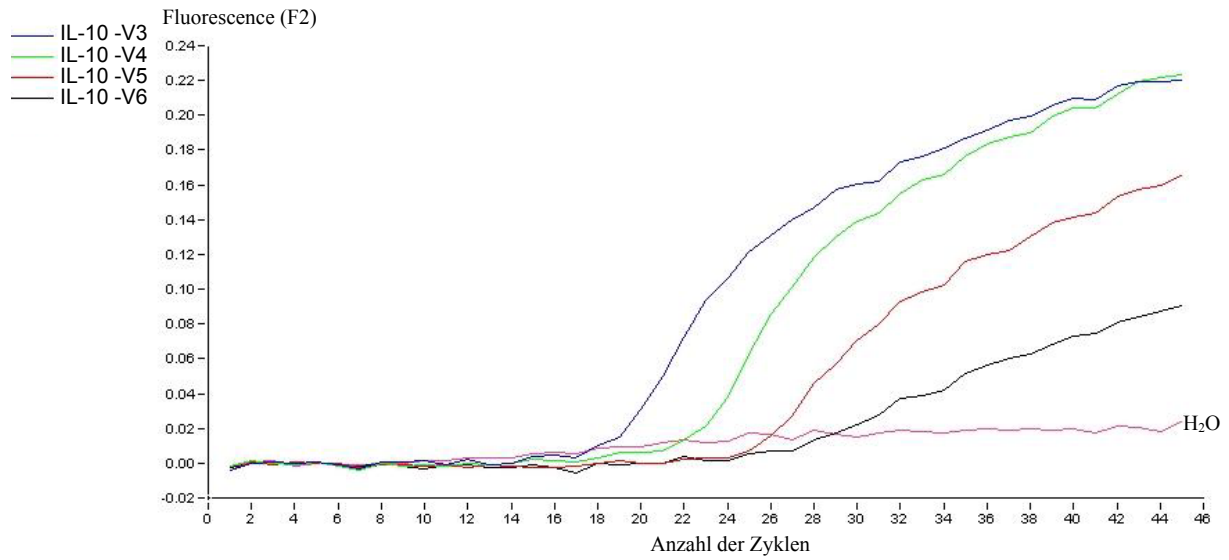
Die Transkription und quantitative Echtzeit-RT-PCR wurde durch serielle Verdünnungen von frisch gewonnener RNA auf systematische konzentrationsabhängige Abweichungen untersucht. Zu der DNase-Verdauung und anschließender Umschreibung in cDNA wurde unverdünnte, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnte RNA eingesetzt, die in der PCR folgende Ergebnisse lieferte (Tabelle 12): Die quantitative Echtzeit-PCR zeigte bei GAPDH, CCL3 und CCL5 eine mit jeder Verdünnungsstufe kontinuierliche Abnahme der Transkripte. Die Kopienzahl der GAPDH- und der Zytokin-Transkripte nahm in gleichgerichtetem Verhältnis durch die Verdünnung ab, und die Ratios aus Zytokin- / Housekeeping-Gen sollten wenig variieren. Durch Verdünnung, DNase-Verdauung, Umschreibung in DNA und anschließender PCR sind Unterschiede in den Ratios zu erwarten. Die ermittelten Ratios (Tabelle 12) zeigten keine gerichtete Ungenauigkeit.

**Tab. 12: Detektierte Zytokin- / Housekeeping-Gen-Ratios der RNA-Verdünnungsreihe**

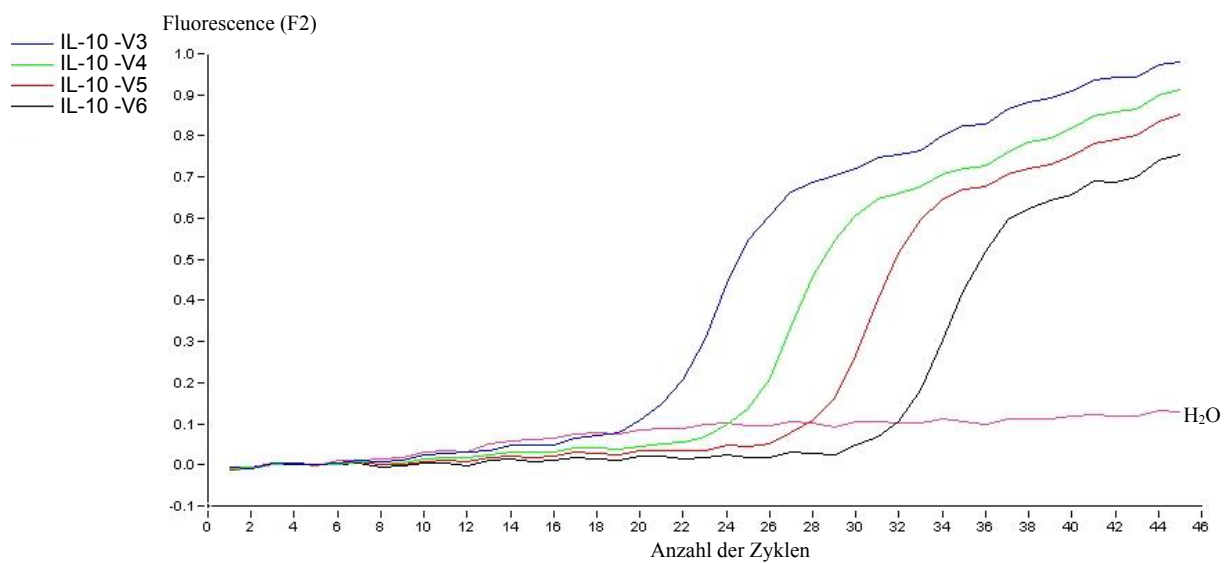
Probe	Verdünnung der cDNA	GAPDH /μl	CCL5 / μl	CCL3 / μl	CCL5 / GAPDHx1000	CCL3 / GAPDHx1000
1825	1:1	466.650	3.648	89	7,8	0,2
1825	1:10	46.600	1.001	47	21,5	1,0
1825	1:100	6.002	92	2,7	15,3	0,4
1825	1:1000	634	5	0	8,8	-

#### 4.3.5. Mit Antikörpern geblockte Taq- versus herkömmliche Taq-Polymerase

Der Vergleich der herkömmlichen Taq-Polymerase mit der mit hitzesensiblen Antikörpern geblockten Taq-Polymerase zeigte für die während der PCR-Vorbereitungsphase geblockten Taq-Polymerase eine um eine log-Stufe sensiblere Detektion. Die Abbildung 23 zeigt den linearen Amplifikationsplot und die Standardkurve eines IL-10 Testlaufes, bei der die nicht mit hitzesensiblen Antikörpern geblockte Taq-Polymerase zum Einsatz kam. Im Vergleichslauf (Abbildung 24) kann man die besseren Amplifikationskurven besonders bei den niedrigen Verdünnungen V5 und V6 sehen. Die sich generierende Standardgerade zeigte bei Einsatz der mit hitzesensiblen Antikörpern geblockten Taq-Polymerase gute Korrelationskoeffizienten im Bereich von -1 bis -0,98.



**Abb. 23:** PCR-Testlauf unter Verwendung der nicht mit hitzesensiblen Antikörpern geblockten Taq-Polymerase und einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)



**Abb. 24:** PCR-Testlauf unter Verwendung der mit hitzesensiblen Antikörpern geblockten Taq-Polymerase und einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

#### 4.3.6. Variation der LightCycler-Messungen bei verdünnten Proben von GAPDH

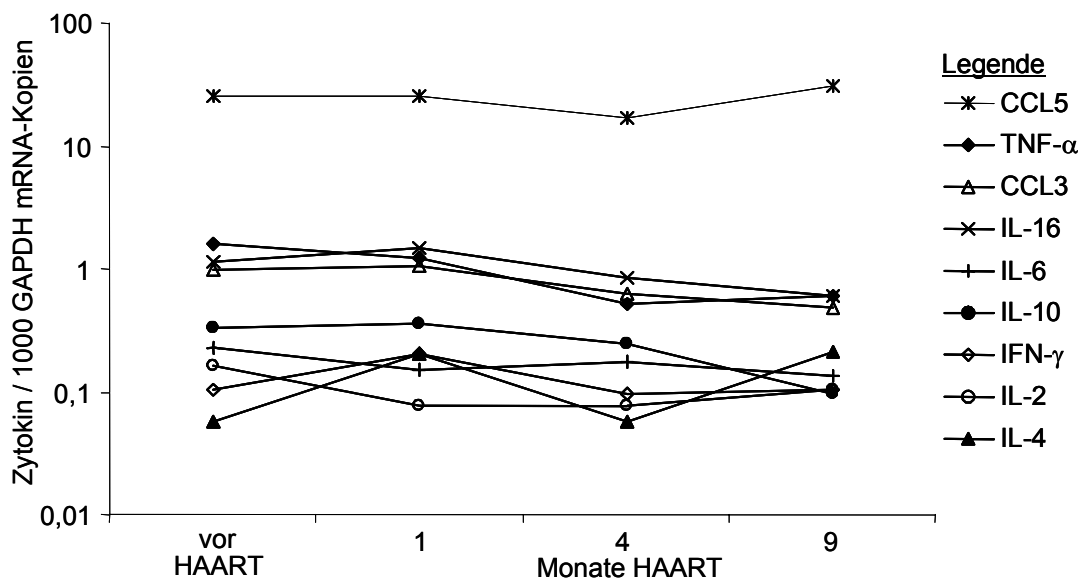
Die Ergebnisse von LightCycler-Messungen über ein Verdünnungsspektrum von 1:1 bis 1:5.000 zeigten eine geringe Variation (Tabelle 13). In der rechten Spalte in Tabelle 13 müssten theoretisch alle Werte gleich sein. Der Variationskoeffizient lag bei 0,09, und dies bedeutet, dass die Standardabweichung 9 % des Mittelwertes beträgt. Da die Messungen bei höheren Verdünnungen nicht stärker variieren, kann für die PCR bei allen eingesetzten Verdünnungen die gleiche Effizienz angenommen werden.

**Tab. 13: Variation der PCR-Ergebnisse bei aufsteigenden Verdünnungen**

Verdünnung der cDNA	gemessene Kopienzahl	x Verdünnungsfaktor
1 zu 1	366700	366700
1 zu 1	362600	362600
1 zu 5	59540	297700
1 zu 5	61390	306950
1 zu 10	34720	347200
1 zu 10	39780	347200
1 zu 50	8386	419300
1 zu 50	7872	393600
1 zu 100	3923	392300
1 zu 100	4005	400500
1 zu 500	761	380350
1 zu 500	745	372550
1 zu 1000	362	361800
1 zu 1000	356	356100
1 zu 5000	86	430900
1 zu 5000	66	328400
1 zu 5000	76	379500
	Mittelwert:	367372
	Standardabweichung:	33750
	Variationskoeffizient:	0,09

#### 4.4. Veränderungen der mukosalen Zytokin-mRNA-Expression von HIV-infizierten Patienten unter HAART versus Kontrollpersonen

Quantitativ ließen sich in der intestinalen Mukosa drei Gruppen von Zytokinen unterscheiden. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IFN- $\gamma$  lagen unter 0,5, TNF- $\alpha$ , CCL3 und IL-16 zwischen 0,5 und 5 und CCL5 deutlich über 10 mRNA-Kopien pro 1000 GAPDH-mRNA-Kopien (Abbildung 25). Im Verlauf der Therapie zeigten IL-4 und IL-10 ein inverses Muster der mukosalen mRNA-Expression. IL-4 war zu Beginn im Median am niedrigsten exprimiert und stieg im Verlauf an. IL-10 zeigte einen Abfall und war nach neun Monaten Therapie das auf mRNA-Ebene am niedrigsten exprimierte Zytokin. Für die drei Zytokine TNF- $\alpha$ , CCL3 und IL-16 nahm die mediane mukosale Zytokin-mRNA-Expression im Verlauf der Therapie ab. Diese Veränderungen waren allerdings statistisch nicht signifikant.

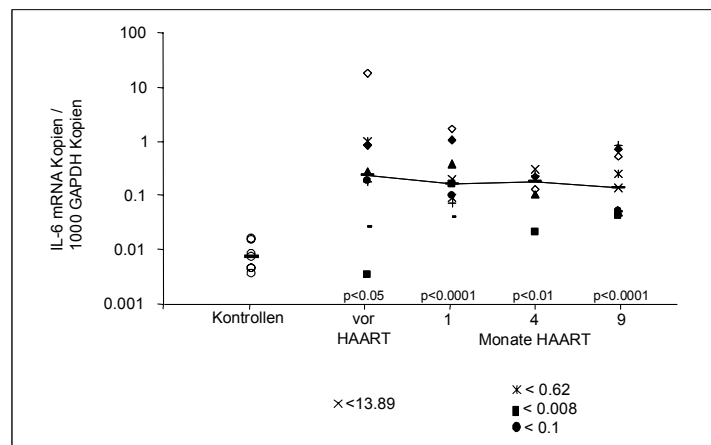
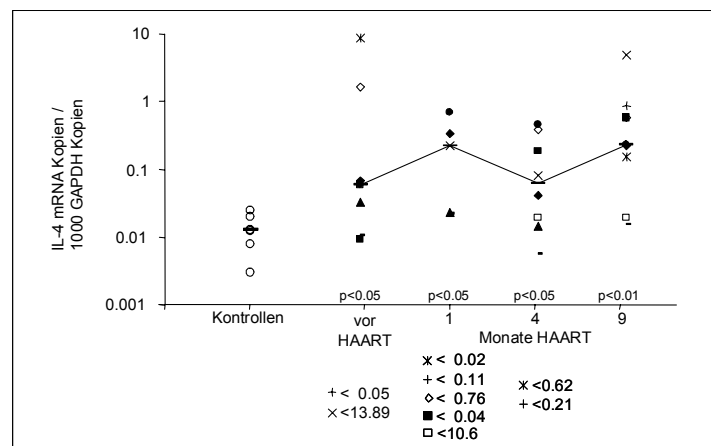
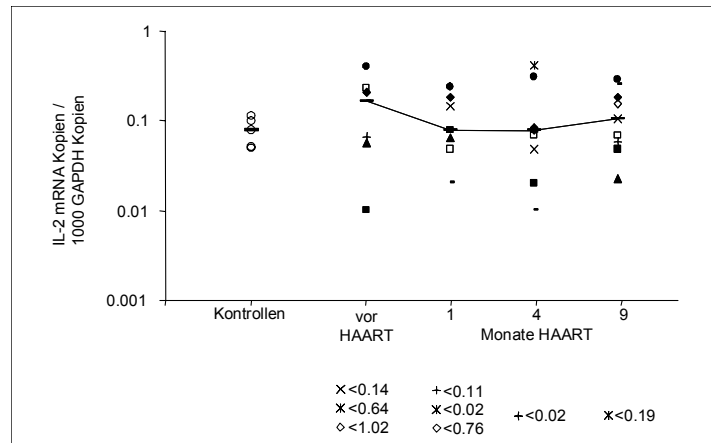


**Abb. 25:** Rangordnung der mukosalen Zytokin mRNA-Expression HIV-infizierter Patienten vor und unter HAART

Die mukosale IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression von HIV-infizierten Patienten war über den gesamten Beobachtungszeitraum höher als die der Kontrollpersonen (Abbildungen 26-34, Seiten 59 - 61).

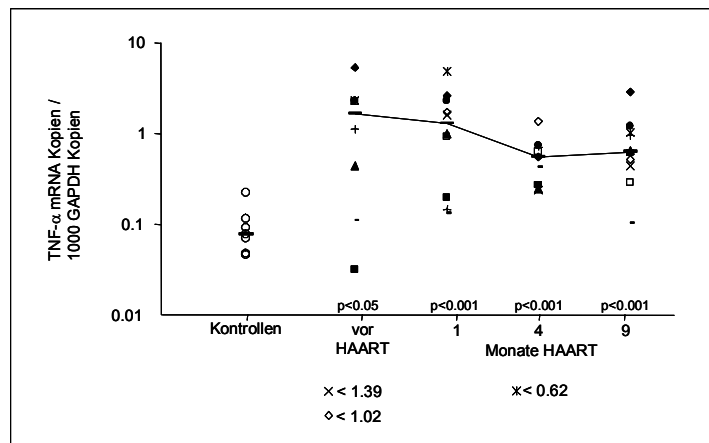
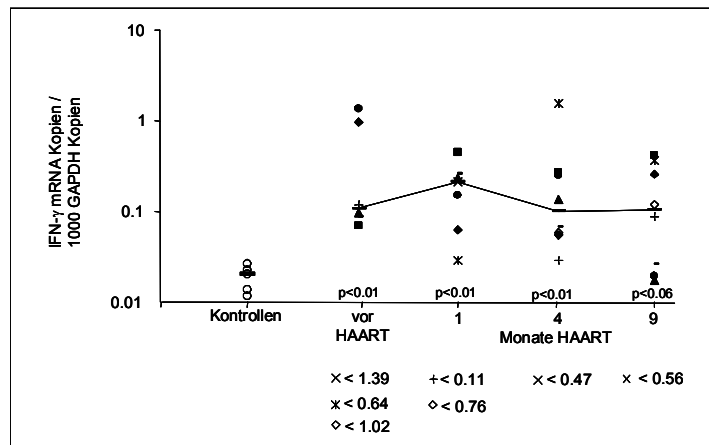
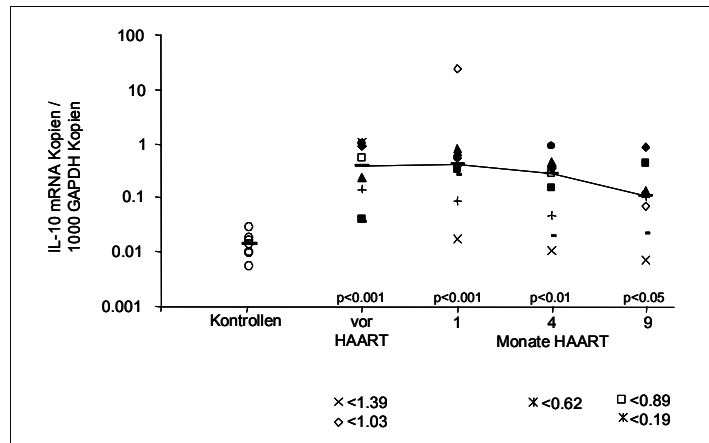
Zu keinem Zeitpunkt unterschied sich die mukosale IL-2 und IL-16-mRNA-Expression von HIV-infizierten Patienten von der von Kontrollpersonen. Die CCL5-mRNA-Expression war vor

Therapie und nach einem Monat HAART höher als die von Kontrollpersonen. Die Werte nach einem Monat Therapie wiesen eine breite Streuung auf. Der Unterschied zu Kontrollen fiel weniger deutlich als vor Therapie aus. Nach vier und neun Monaten HAART waren keine Unterschiede zu Kontrollen mehr detektierbar. Unter Therapie lag mindestens die Hälfte der HIV-infizierten Patienten mit ihrer CCL5-mRNA-Expression über der höchsten Expression der Kontrollpersonen. Die CCL3-mRNA-Expression vor und nach einem Monat HAART lag mindestens bei der Hälfte der HIV-infizierten Patienten über der höchsten Expression von Kontrollpatienten, und war vor HAART und nach einem Monat Therapie gegenüber der von Kontrollpersonen erhöht. Die mRNA-Expression der untersuchten Zytokine korrelierte nicht mit der mukosalen CD4<sup>+</sup>T-Zellzahl, der mukosalen Virusbeladung oder dem Krankheitsstadium der Patienten.

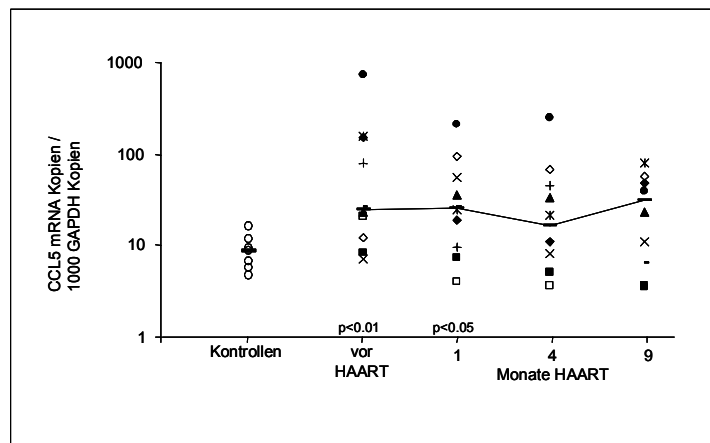
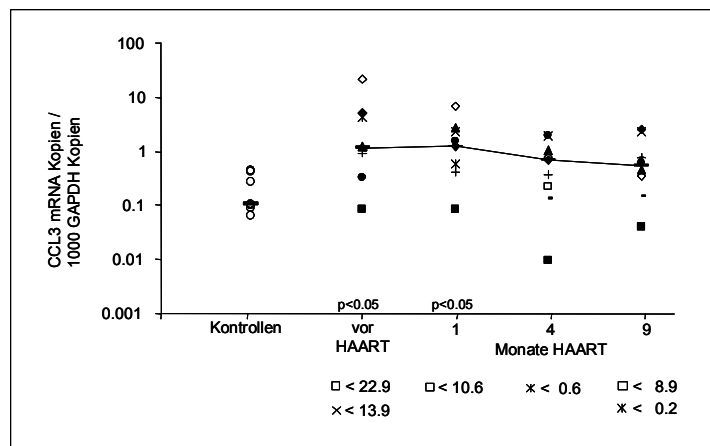
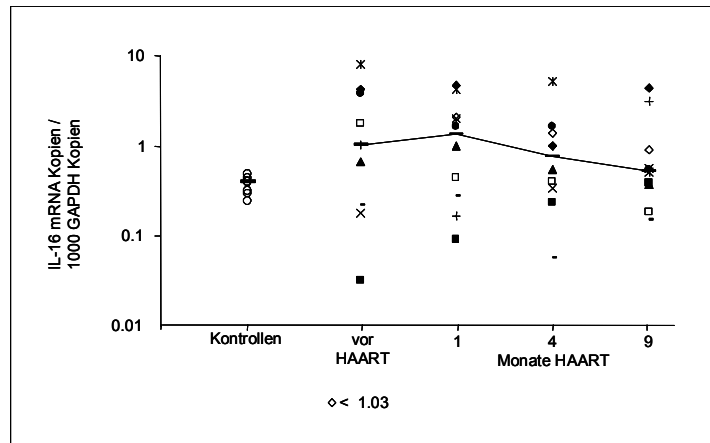


**Abb. 26-28:** Bei zehn HIV-Patienten wurden vor sowie nach einem, vier und neun Monaten HAART endoskopisch Sigmabiopsien gewonnen. Die mRNA-Expression von Zytokinen und dem Housekeeping-Gen GAPDH wurde mittels RT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Quotient aus: IL-16, CCL3 oder CCL5 mRNA-Expression zu gemessenem GAPDH-Wert im Vergleich zu sieben Kontrollen (p-Werte). Im Verlauf ist der Median dargestellt (durchgezogene Linie). War keine Zytokinbestimmung möglich, wurde die Nachweisgrenze des Zytokins zur Quotientenbildung mit dem für die betreffende Biopsie bestimmten GAPDH-Wert herangezogen. Diese Quotienten sind außerhalb des Koordinatensystems wie folgt dargestellt: Patientensymbol < errechneter Quotient





**Abb. 29-31:** Bei zehn HIV-Patienten wurden vor sowie nach einem, vier und neun Monaten HAART endoskopisch Sigmabiopsien gewonnen. Die mRNA-Expression von Zytokinen und dem Housekeeping-Gen GAPDH wurde mittels RT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Quotient aus: IL-16, CCL3 oder CCL5 mRNA-Expression zu gemessenem GAPDH-Wert im Vergleich zu sieben Kontrollen (p-Werte). Im Verlauf ist der Median dargestellt (durchgezogene Linie). War keine Zytokinbestimmung möglich, wurde die Nachweisgrenze des Zytokins zur Quotientenbildung mit dem für die betreffende Biopsie bestimmten GAPDH-Wert herangezogen. Diese Quotienten sind außerhalb des Koordinatensystems wie folgt dargestellt: Patientensymbol < errechneter Quotient



**Abb. 32-34:** Bei zehn HIV-Patienten wurden vor sowie nach einem, vier und neun Monaten HAART endoskopisch Sigmabiopsien gewonnen. Die mRNA-Expression von Zytokinen und dem Housekeeping-Gen GAPDH wurde mittels RT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Quotient aus: IL-16, CCL3 oder CCL5 mRNA-Expression zu gemessenem GAPDH-Wert im Vergleich zu sieben Kontrollen (p-Werte). Im Verlauf ist der Median dargestellt (durchgezogene Linie). War keine Zytokinbestimmung möglich, wurde die Nachweisgrenze des Zytokins zur Quotientenbildung mit dem für die betreffende Biopsie bestimmten GAPDH-Wert herangezogen. Diese Quotienten sind außerhalb des Koordinatensystems wie folgt dargestellt: Patientensymbol < errechneter Quotient