

3 Material und Methoden

3.1 Probanden und Untersuchungsmaterial

3.1.1 AD-Patienten und Kontrollprobanden

Patienten mit der Diagnose einer leichten bis schweren atopischen Dermatitis (AD) wurden im Rahmen der Atopie-Sprechstunde der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, rekrutiert. Die Kontrollgruppe der hautgesunden Probanden wurde entsprechend der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patientengruppe mit AD ausgewählt. Alle Probanden wurden über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Untersuchung der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, 4 und 9. Hierzu wurden den Patienten jeweils 30 - 40 ml Vollblut entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Charité lag vor Beginn der Untersuchung vor.

Einschlusskriterium für die Gruppe der AD-Patienten war das Vorliegen einer atopischen Dermatitis. Die Diagnose wurde entsprechend der überarbeiteten, diagnostischen Kriterien nach Hanifin [72] gestellt. Der klinische Schweregrad der atopischen Dermatitis wurde mittels eines Scores, dem SCORAD (s.u.), bestimmt [73]. Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren eine bestehende atopische Dermatitis oder eine andere Erkrankung des atopischen Formenkreis sowie das Vorliegen einer Typ-I-Sensibilisierung. Probanden mit positiver Anamnese und sIgE-Werten $>3,5$ kU/l (getestet gegen acht der am häufigsten vorkommenden inhalativen Allergene) wurden aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen. Ausschlusskriterium sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe war das Bestehen einer akuten Infektion zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder das Vorliegen einer schweren systemischen Erkrankung.

3.1.2 SCORAD

Der SCORAD wurde von der *European Task Force on Atopic Dermatitis* zur Bestimmung des klinischen Schweregrades einer atopischen Dermatitis entwickelt [73]. Dieser Score erfasst die Intensität von sechs verschiedenen klinisch-dermatologischen Symptomen (Erythem, Ödem/Papelbildung, Nässen/Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Trockenheit), die flächenhafte Ausdehnung der Erkrankung mit Hilfe der sogenannten *Neuner-Regel* sowie anhand einer visuellen Analogskala die subjektiven Symptome Pruritus und Schlaflosigkeit. Ein SCORAD-Index von 1 bis 25 Punkten wird als leichte Dermatitis, ein SCORAD-Index von 26 bis 50 Punkten als mittelschwere Dermatitis und ein SCORAD-Index > 50 als schwere Dermatitis bewertet [74].

3.2 Labormethoden

3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) aus heparinisiertem Vollblut der Probanden erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser Art der Gradientenzentrifugation wird die zu trennende Suspension über eine geeignete Trennlösung geschichtet und anschließend bis zum Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts zentrifugiert, so dass sich die unterschiedlichen Zellfraktionen entsprechend ihrer Dichte auftrennen. Nach Abschluss der Zentrifugation befinden sich die mononukleären Zellen (vor allem Lymphozyten und Monozyten) in der als weißlicher Ring erkennbaren Interphase. Hierzu wurde das Blut 1:1,5 mit Phosphatpuffer (PBS) ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (Raumtemperatur) verdünnt und jeweils 35 ml über 15 ml einer Ficoll-Trennlösung (Dichte = 1,077 g/ml) geschichtet. Im anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min/ 400 x g/ Raumtemperatur/ ohne Bremse) reichern sich die PBMC in der Interphase an und können nun von einem Großteil der Thrombozyten, Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten getrennt werden. Die Zellen der Interphase wurden mit Hilfe einer Transferpipette vorsichtig abgezogen und anschließend zur Entfernung von verbliebenen Thrombozyten und Ficollresten mehrfach mit PBS (4°C) durch Zentrifugation gewaschen. Die Ausbeute pro 30 ml heparinisiertem Vollblut lag in der Regel bei $2 - 5 \times 10^7$ PBMC. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Polymerasekettenreaktionen wurde eine Positivkontrolle aus den PBMC eines *buffy coat* angefertigt. Da eine hohe Zellzahl erforderlich war, um zu gewährleisten, dass in allen PCR-Läufen ein Aliquot der selben Positivkontrolle eingesetzt werden kann, wurde ein *buffy coat* (Blutspendematerial, das nach Entzug der Erythrozyten und eines Großteils des Plasmas anfällt und die mononukleären Zellen des peripheren Blutes enthält) verwendet. Nachdem das Blut mit PBS (37°C) aus dem Beutelsystem der Blutbank gespült worden war, erfolgte die Isolierung entsprechend des Protokolls für heparinisieretes Vollblut.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellzähler *CASY[®]ITT* (Schärfe-System GmbH, Reutlingen) verwendet. Das Gerät verfügt über einen Messbereich von 0,7 - 120 μ m und bestimmt die Zellzahl und Größenverteilung einer Probe aufgrund der Messung des Widerstandes der angesaugten Zellsuspension mittels elektronischer Pulsflächenanalyse. Der Widerstand am Messpunkt ist vom Volumen und dem physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Der Messbereich wurde so gewählt, dass Verfälschungen durch Fremdpartikel weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 μ l der Zellsuspension (PBMC, B-Lymphozyten oder Monozyten) in 10 ml PBS verdünnt und gemessen.

3.2.3 Magnetische Zellseparation von CD14⁺ und CD19⁺ Zellen

Die Expression charakteristischer Oberflächenantigene kann zur Isolierung von einzelnen Zellpopulationen genutzt werden. Bei der magnetischen Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting; MACS*) werden spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene, die an magnetische Partikel gekoppelt sind, eingesetzt. Die Zellsuspensionen werden auf eine Trennsäule pipettiert, die eine Matrix aus plastikumhüllten, magnetischen Fasern enthält und im Feld eines Magneten platziert wird. Die Zellen, an die zuvor die Magnetpartikel-gekoppelten Antikörper gebunden haben, werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen passieren. Durch Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld können anschließend die Zellen von Interesse eluiert und für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

Um CD19⁺ Zellen zu isolieren, wurden PBMC zweimal mit MACS-Puffer (PBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA) gewaschen und anschließend mit 70 µl MACS-Puffer und 10 µl Plasma des Probanden pro 1x10⁷ Zellen für 2 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden CD19 *MicroBeads* (20 µl pro 1x10⁷ Zellen) hinzu pipettiert und der Ansatz weitere 15 min bei 4°C lichtgeschützt und unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (10 min, 1200 rpm, 4°C) wurde die Zellsuspension im *autoMACS* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) im Programm *possel d* (doppelte positive Selektion) in CD19⁺ und CD19⁻ Zellen separiert.

Nach anschließender Bestimmung der Zellzahl, wurden beide Fraktionen einmal mit MACS-Puffer gewaschen (10 min, 1200 rpm, 4°C). Der CD19⁻ Fraktion wurden nun pro 1×10^7 Zellen 80 µl MACS-Puffer und 20 µl CD14 *MicroBeads* zur Isolation von Monozyten zugesetzt und 15 min bei 4°C, lichtgeschützt unter leichtem Schütteln inkubiert. Das weitere Procedere entsprach dem der Separation von B-Lymphozyten. Die Überprüfung der Reinheit der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 3). Exemplarisch wurden außerdem bei einigen Proben mit Hilfe von CD3 *MicroBeads*, entsprechend der Herstellerangaben, T-Lymphozyten separiert und anschließend die TLR-Expression mittels *real-time* PCR untersucht.

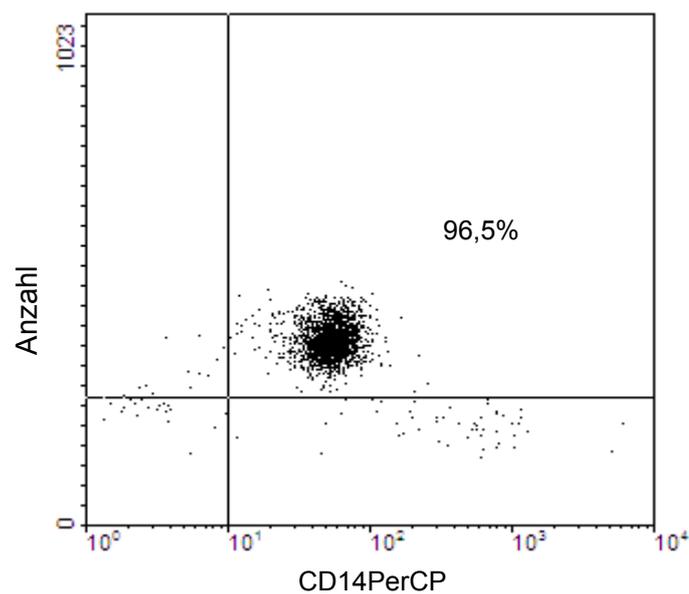


Abbildung 3: Reinheitsbestimmung von Monozyten

Nach Positiv-Selektion mit CD14 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde die Reinheit der gewonnenen Monozyten mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Population im rechten, oberen Quadranten entspricht den CD14⁺ Monozyten in einer Reinheit von >95%. Die Färbung erfolgte entsprechend dem beschriebenen Protokoll mit einem PerCP-gekoppelten anti-CD14-Antikörper. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis einer *MACS*-Sortierung.

3.2.4 Durchflusszytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Monozyten

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch den Einsatz fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Fluorochrome sind Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Lage sind, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge mit weniger Energie zu emittieren. Durch Kopplung dieser Fluorochrome an spezifische Antikörper können Zelloberflächenantigene mit Hilfe des Prinzips der Antigen-Antikörper-Reaktion, markiert und quantitativ erfasst werden. Die Zellen der zu untersuchenden Zellsuspension werden mit Überdruck und einer geeigneten Trägerflüssigkeit (*hydrodynamische Fokussierung*) vereinzelt und am Laserstrahl eines 488 nm Argonlasers vorbeigeleitet. Hierbei kommt es zur Anregung der Elektronen des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes, die nach dem Laserpuls die zuvor absorbierte Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge wieder abgegeben. Verwendet man verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die bei der gleichen Wellenlänge aktiviert werden, aber Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, so können mehrere verschiedene Oberflächenantigene gleichzeitig markiert werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emmissionsmaximum
FITC (Fluoresceinisothiozyanat)	495 nm	519 nm
PerCP (Peridiniumchlorophyll-Protein)	490 nm	675 nm
PI (Propidiumjodid)	488 nm	620 nm

Neben der Anregung der Fluorochrome wird das auftreffende Licht durch die Einzelzellen gestreut. Der größte Anteil des Lichts wird in geringem Winkel vorwärts gestreut (*forward light scatter, FSC*) und korreliert mit der Größe der Zellen, während das im 90°-Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter, SSC*) ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Je Einzelzelle werden simultan fünf verschiedene Parameter erfasst: das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3).

Zur Analyse der Oberflächenexpression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 auf CD14⁺ Monozyten wurden pro Färbeansatz je 10⁶ PBMC eingesetzt. Diese wurden zunächst mit PBS gewaschen (250 x g/ 10 min), dann in einem Volumen von 100 µl FACS-Puffer (PBS/ 2% BSA/ 0,1% NaN₃) aufgenommen und 5 min mit 2 µl *Beriglobin*® (Chiron Behring, Marburg) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern und Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche zu blockieren. Zur Färbung der spezifischen Oberflächenantigene wurden anschließend die fluoreszenzgekoppelten Antikörper hinzu pipettiert und 30 min lichtgeschützt unter leichtem Schütteln inkubiert. Für die Detektion der humanen *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 wurden FITC-gekoppelte Maus-Antikörper (FL1) der Firma Biocarta, Hamburg,

eingesetzt. Der PerCP-markierte Maus-Antikörper (FL3) gegen humanes CD14 sowie die FITC-beziehungsweise PerCP-gekoppelten IgG_{2a}-Isotypenkontrollen wurden von der Firma BD Biosciences, Heidelberg, bezogen. Zusätzlich zur Färbung mit TLR2- beziehungsweise TLR4-FITC und CD14-PerCP wurden entsprechende Isotypkontrollen und ein Ansatz mit ungefärbten Zellen mitgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (250 x g/ 10 min), um ungebundene Antikörper auszuwaschen. Abschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung gelagert. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Direkt vor der Messung wurden 0,3 µg/ml Propidiumjodid (Sigma, Steinheim) in die zu messende Zellsuspension gegeben. Dieser orange-rote Farbstoff kann von toten Zellen nicht mehr ausgeschleust werden, so dass diese dann im FL2-Kanal gemessen und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Die Messung erfolgte an einem *FACScan*-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (BD Biosciences, Heidelberg). Die Daten wurden mit dem Programm *Cell Quest* (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet. Zur Auswertung erfolgte die Darstellung der gemessenen Daten als Histogramm, bei der das Signal eines Fluorochroms auf der X-Achse gegenüber der Zellzahl aufgetragen wurde, oder als zweidimensionale Punktwolke (*Dot Plot*), bei der auf der X-Achse das Signal eines Fluoreszenzkanals gegenüber dem Signal eines anderen Kanals auf der Y-Achse dargestellt wurde und jeder dargestellte Punkt einer gemessenen Zelle entspricht. Die Expressionsdichte des detektierten Oberflächenantigens wurde durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Sie beschreibt die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwert) einer untersuchten Population.

Da die Expression der *Toll-like* Rezeptoren auf der Zelloberfläche relativ gering ist, war es notwendig, einen Antikörper mit guter Sensitivität einzusetzen [25]. In Vorversuchen wurden drei verschiedene, kommerziell erhältliche anti-TLR Antikörper (Apotech, Biocarta, Santa Cruz) in Monozyten-Kulturen getestet. Nur die später auch in der Arbeit verwendeten Antikörper der Firma Biocarta wiesen eine ausreichende Sensitivität und Spezifität gegenüber den untersuchten *Toll-like* Rezeptoren auf. In Abbildung 4 sind exemplarisch die Messdaten eines Vorversuches mit den Antikörpern der Firma Biocarta an aufgereinigten Monozyten dargestellt.

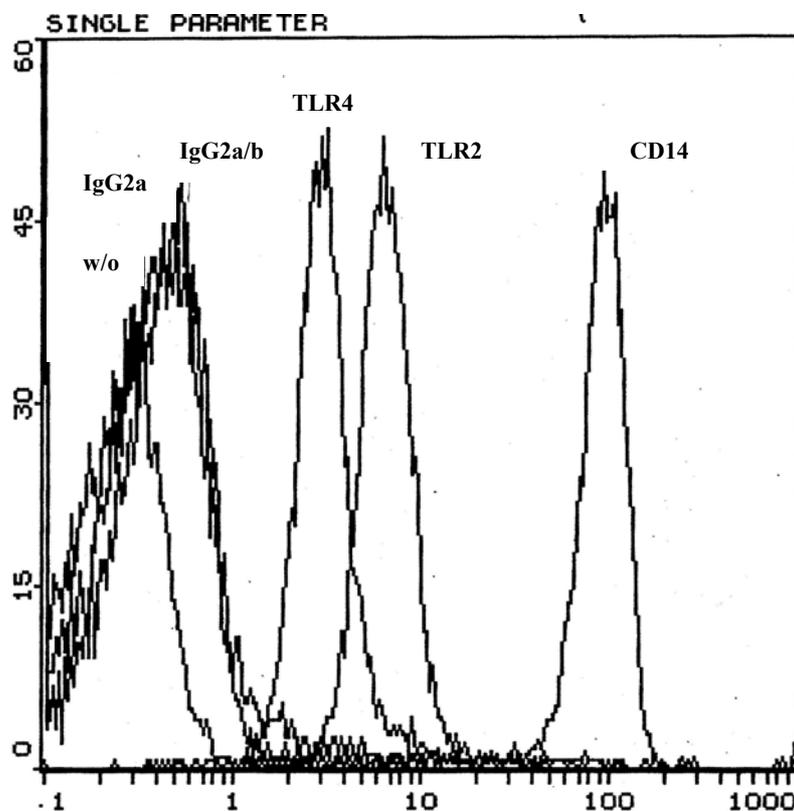


Abbildung 4: Durchflusszytometrie: Vorversuch an aufgereinigten Monozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse eines Vorversuchs mit den eingesetzten monoklonalen Antikörpern gegen TLR 2 und 4 (Biocarta) und CD14 (BD Biosciences). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression verschiedener Antigene auf Monozyten untersucht. Zusätzlich zu den Histogrammen, die die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 zeigen, sind die Daten einer ungefärbten Probe und zweier Isotypenkontrollen dargestellt. Für jede Messung wurden jeweils die Daten von 6000 Monozyten ausgewertet. *w/o*: ungefärbt; *IgG2a*, *IgG2a/b*: Isotypkontrollen.

3.2.5 RNA-Extraktion aus humanen PBMC

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus humanen PBMC erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit®* (Qiagen, Hilden). Hierbei werden unter Verwendung eines Puffers, der das Salz Guanidinisothiocyanat enthält, die Zellen zunächst lysiert, Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Anschließend wird die Probe auf ein Säulensystem mit einer Silicamembran pipettiert, an die enthaltene Nukleinsäuren binden. In einem Zwischenschritt wird ein DNA-verdauendes Enzym, Desoxyribonuklease, auf die Säule pipettiert, um die ebenfalls gebundene DNA zu verdauen. Nach mehreren Waschschrritten wird die gereinigte Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser eluiert und kann für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Zunächst wurden 600µl Lysispuffer (Ansatz: 1000 µl RLT-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) zu 6×10^6 PBMC pipettiert und die Probe anschließend geschüttelt. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das Lysat mit dem selben Volumen an 70%igem Ethanol gemischt, auf die *RNeasy Mini* Säule aufgetragen und anschließend 15 s bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und ein Waschschrtritt mit 350 µl RW1 Puffer durchgeführt. Zum Verdau der DNA wurden nun 80 µl einer DNase-I-Lösung (10 µl DNase I + 70 µl RDD-Puffer; *RNase-Free DNase Set*, Qiagen, Hilden) auf die Säule aufgetragen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend der Anweisungen des Herstellerprotokolls wurde die Probe zunächst mit RW1 Puffer, dann zweimal mit RPE-Puffer gewaschen und abschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.6 DNase Verdau

Um sicher Reste genomischer DNA aus den RNA-Proben zu entfernen, wurde vor der cDNA-Synthese ein zweiter DNase Verdau durchgeführt. Hierzu wurde eine Desoxyribonuklease I (DNase I) der Firma Invitrogen- Life Technologies, Mannheim, verwendet.

15 µl der eluierten Gesamt-RNA wurden mit 2 µl RNase-freiem Wasser, 2 µl 10x *DNase I Reaction Buffer* und 1 µl DNase I (1 U/µl) exakt 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65°C wurde die DNase inaktiviert.

3.2.7 Reverse Transkription

Die zuvor extrahierte Gesamt-RNA ist ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und nur zu 2% *messenger* RNA (mRNA). Um die RNA in Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) einsetzen zu können, muss sie zunächst in komplementäre DNA, sogenannte *complementary* DNA (cDNA), umgeschrieben werden. Da die cDNA in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial in einer PCR eingesetzt werden sollte und somit die anschließende Amplifikationsrate sehr hoch war, reichte Gesamt-RNA trotz ihres geringen Anteils an mRNA aus.

Um die cDNA-Synthese unter optimalen Bedingungen durchzuführen, wurden zunächst drei verschiedene Reverse Transkriptasen miteinander verglichen: *AMV Reverse Transkriptase* (Promega, Mannheim), *SuperScript™ II* (Invitrogen-Life Technologies, Mannheim) und *Omniscript™ Reverse Transcriptase* (Qiagen, Hilden). Im Gegensatz zur *SuperScript™* (*Moloney murine leukemia virus*, MMLV-RT) weisen die *AMV-RT* (*avian myoblastosis virus*) von Promega und die *Omniscript™* von Qiagen eine Ribonuklease-Aktivität (RNaseH) auf. Der Vorteil ist, dass jede in der Probe enthaltene mRNA nur einmal in cDNA umgeschrieben wird, da RNA in RNA:DNA-Hybriden degradiert wird. Dahingegen liefert die *SuperScript™*-RT längere cDNA-Transkripte. Folgende Primer wurden getestet: *Random* Primer (Promega, Mannheim), Oligo-dT-Primer (TibMolBiol, Berlin) und spezifische Primer (Biotex, Berlin). *Random* Primer sind zufällige Hexamerprimer, die irgendwo an der mRNA binden, so dass anschließend alle mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten sind. Oligo-dT-Primer (OdT-Primer) binden an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA, und von dort ausgehend wird die komplette cDNA synthetisiert. Die verwendeten OdT-Primer bestanden aus 15 Thymidinen. Die verwendeten spezifischen Primer entsprachen den *reverse*-Primern der nachfolgenden PCR für TLR2, -4, -9 und den Haushaltsgenen b2M und GAPDH. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgte entsprechend der Empfehlungen der Hersteller.

AMV-RT: 10 µl RNA wurden zunächst mit 5µM *Random* Primer bzw. 10µM OdT-Primer für 5 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe der weiteren Komponenten, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs (je 10 mM), 1 µl *RNasin* (40 Units), 2,5 µl Natriumdiphosphat (40 mM) und 30 units *AMV-RT*, erfolgte zur Reversen Transkription eine Inkubation von 60 min bei 42°C (OdT-Primer) bzw. 37°C (*Random* Primer).

SuperScript™: Um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, wurden 10 µl RNA mit 1 µl dNTPs (10 mM), 1µl OdT-Primer (10 µM) und 1µl H₂O für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1µl RNase-Inhibitors hinzugegeben. Nach 2 min bei 42°C wurden 0,5 µl *SuperScript™-RT* in den Ansatz pipettiert und dieser weitere 50 min bei 42°C inkubiert. In einem abschließenden 15minütigen Inkubationsschritt bei 75°C wurde die RT inaktiviert. Alle verwendeten Komponenten sind im *SuperScript™ II RT Kit* enthalten.

Omniscript™: 10µl RNA wurden mit 2 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs (5 mM), 2 µl OdT-Primer (10 µM), 1 µl *RNasin* (40 Units), 2 µl RNase-freiem H₂O und 1 µl *Omniscript™-RT* 60 min bei 37°C inkubiert.

3.2.8 cDNA-Quantifizierung

Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA mit Hilfe des *OliGreen®ssDNA Quantitation Kit* quantifiziert, um in die anschließende PCR gleiche Mengen cDNA einzusetzen.

OliGreen® ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell für die Quantifizierung von geringen Mengen einzelsträngiger DNA (ssDNA) in Lösung geeignet ist. Der Farbstoff bindet spezifisch an ssDNA und emittiert nach Anregung (485 nm) Licht spezifischer Wellenlänge (530 nm). Ungebundenes *OliGreen®* zeigt keine Fluoreszenz, freie Nukleotide, kurze Oligonukleotide, doppelsträngige DNA (dsDNA) oder RNA werden nicht erfasst. Die Messung wurde in 96-Loch-Flachbodenplatten in einem Mikrotiterplatten-fluorometer (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur ssDNA-Konzentration der Lösung. Zur Bestimmung der cDNA-Konzentration der Proben wurde jeweils eine Standardkurve mitgeführt, für die der im Kit enthaltene Oligonukleotid-Standard verwendet wurde (Konzentrationsbereich: 50 ng/ml bis 1 µg/ml). Entsprechend der Empfehlungen des Herstellers wurden die Standardkurve und die cDNA-Proben mit dem *OliGreen®*-Reagenz 2 - 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Mikrotiterplatten-Fluorometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *KC 4, Kineticcalc for Windows*, Version 2.5 (Bio-Tek Instruments, St. Quentin en Y., Frankreich).

3.2.9 Real-time PCR mittels TaqMan™-PCR-Technologie

Mit der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) können kleinste Mengen DNA in kurzer Zeit *in-vitro* vervielfältigt werden. Zu einer zu untersuchenden DNA-Probe werden zwei Oligonukleotide mit definierter Sequenz (Primerpaar), Nukleotide, Puffer und eine thermostabile Polymerase gegeben. Polymerasen sind Enzyme, die aus einzelnen Nukleotiden DNA- oder RNA-Ketten bilden. Die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Region beruht auf einem mehrfach wiederholten Zyklus aus drei Einzelschritten: Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Elongation*). Unter optimalen Bedingungen würde sich die Anzahl an DNA-Molekülen pro Zyklus verdoppeln. Zusätzlich zur qualitativen Aussage, ob ein bestimmter DNA-Abschnitt in der Probe vorhanden ist oder nicht, könnte man so theoretisch die ursprünglich vorhandene Menge an DNA-Molekülen aus einer PCR-Reaktion errechnen. Zu Beginn der PCR begrenzen jedoch die geringe Menge an Proben-DNA und am Ende unter anderem die abnehmende Enzymaktivität und eine geringere Menge an verfügbaren Nukleotiden die Arbeit der Polymerase, so dass der Multiplikationsfaktor schwankt und somit mit dieser Methode keine präzise quantitative Aussage getroffen werden kann. Eine Methode, die ermöglicht, die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle schon während der Reaktion zu erfassen, stellt die sogenannte quantitative *real-time* PCR (Echtzeit-PCR) nach dem *TaqMan™*-Prinzip dar [75]. Das Prinzip beruht auf der Kombination eines PCR-Geräts mit Fluoreszenz-Detektion mit spezifischem Oligonukleotid und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Zusätzlich zu den beiden Primern einer klassischen PCR wird ein drittes, als Sonde bezeichnetes sequenzspezifisches Oligonukleotid verwendet (Abbildung 5). Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe blockiert ist, um zu verhindern, dass sie

selbst durch die Polymerase verlängert wird. Am 5'-Ende der Sonde ist ein Fluorochrom 1, der sogenannte *Reporter* (engl. *to report*; berichten), am 3'-Ende ein Fluorochrom 2, der sogenannte *Quencher* (engl. *to quench*; löschen) gekoppelt. In der vorliegenden Arbeit wurden 6-Carboxyfluorescein (FAM) (5'-Ende) und 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) (3'-Ende) als Fluorochrome gewählt.

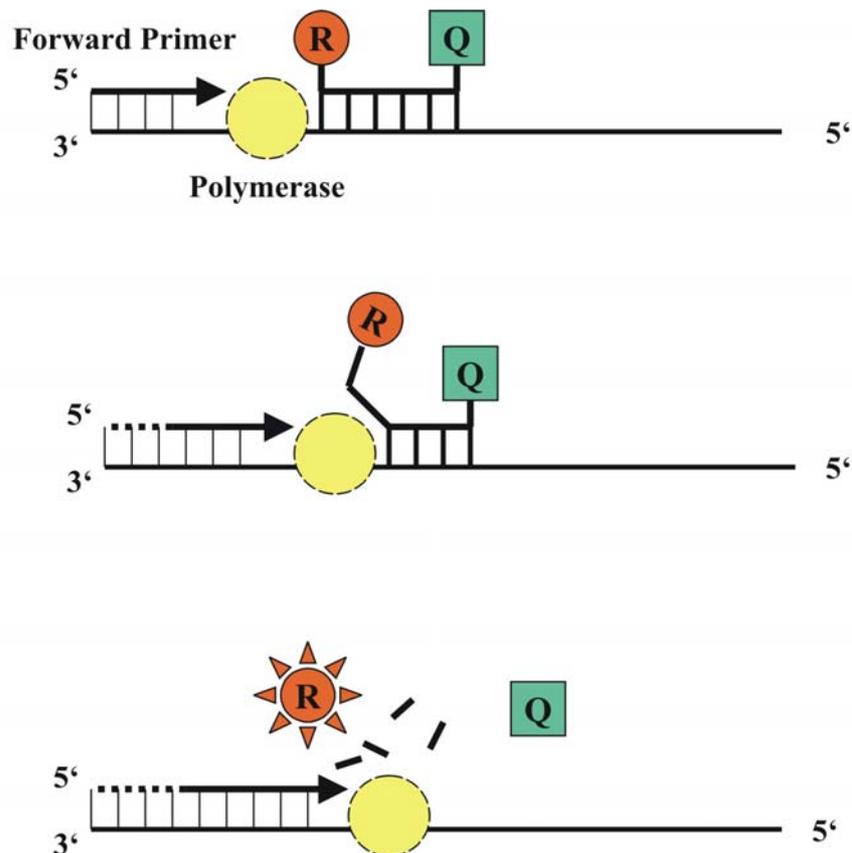


Abbildung 5: Prinzip der *Real-time* PCR mittels TaqMan™-PCR-Technologie

R: reporter, Q: quencher. Modifiziert nach S. A. Bustin (Journal of Molecular Endocrinology (2000) 25, 169-193)

Wird der Fluoreszenzfarbstoff 1 mit der Wellenlänge λ_1 angeregt, emittiert er Energie in Form von Licht der Wellenlänge λ_2 . Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome zueinander wird diese jedoch direkt an das zweite Fluorochrom weitergegeben, das, dadurch angeregt, seinerseits Licht der Wellenlänge λ_3 abstrahlt [76]. Befindet sich im PCR-Ansatz DNA der gesuchten Sequenz, so binden sowohl die spezifischen Primer als auch die Sonde, und die Polymerase beginnt die Primer zu verlängern. Hierbei stößt sie auf die ebenfalls gebundene fluoreszenzmarkierte Sonde. Da die *Taq*-Polymerase neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt, beginnt sie die Sonde

abzubauen, so dass das *Reporter*- und das *Quencher*-Molekül räumlich voneinander getrennt werden [77]. Nach Anregung durch Licht der Wellenlänge A1 wird nun durch den *Reporter* Licht der Wellenlänge E1 frei, welches durch die optische Detektionseinheit des PCR-Geräts gemessen wird (Abbildung 5). Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase ist doppelstrangspezifisch, so dass nur die sequenzspezifisch-gebundene Sonde und nicht die freie, ungebundene Sonde abgebaut wird. Die hohe Spezifität der Methode beruht darauf, dass nur spezifische PCR-Produkte nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzsignal steigt während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes an.

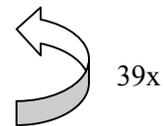
Für diese Arbeit wurde ein *LightCycler* der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim zur Durchführung der PCR benutzt. Der PCR-Ansatz wird in diesem Gerät in spezielle Borosilikat-Glaskapillaren pipettiert. Im Gegensatz zu anderen PCR-Geräten wird hier die Temperatur mittels Luft erhöht bzw. gesenkt. In Kombination mit den Kapillaren, die im Verhältnis eine hohe Oberfläche gegenüber ihres Volumens aufweisen, ist es möglich eine PCR, je nach PCR-Bedingungen, in 20 - 30 min durchzuführen. Die PCR wurde entsprechend der Angaben in Tabelle 3 und 4 in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Vor der ersten Benutzung wurden die Lyophilisate der Oligonukleotide in TE-Puffer (10 mM Tris HCl/ 1 mM EDTA) gelöst und dann auf eine Konzentration von 5 pmol/µl mit PCR-Wasser eingestellt. Als PCR-Wasser für das Lösen der Oligonukleotide und die PCR wurde UV-bestrahltes Aqua bidest verwendet. Das verwendete *SureMaster LightCycler Kit* (Congen Biotechnologie GmbH, Berlin) enthielt folgende Komponenten: 10x Reaktionspuffer, dNTP-Mix, MgCl₂, BSA und Platinum®*Taq* DNA-Polymerase. Die PCR wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt und eine Positivkontrolle (siehe unter 3.2.1) und eine Negativkontrolle (Aqua dest.) mitgeführt.

Tabelle 3: TaqMan™-PCR-Ansatz

Komponente	Menge
cDNA	50 ng
<i>forward</i> Primer (5 pmol/μl)	1,5 μl
<i>reverse</i> Primer (5 pmol/μl)	1,5 μl
Sonde (5 pmol/μl)	0,5 μl
SureMaster LightCycler Mix (dNTP-Mix, MgCl ₂)	10 μl
BSA (5μg/μl)	1 μl
Platinum®Taq DNA Polymerase	0,1 μl
PCR-Wasser	ad 20 μl

Tabelle 4: Parameter der PCR-Reaktion

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95°C	1 min
2. Annealing	62°C	10 s
3. Elongation	65°C	15 s
4. Denaturierung	95°C	5 s
5. Annealing	62°C	10 s
6. Elongation	65°C	15 s
7. Kühlen	40°C	1 min



39x

3.2.10 Auswahl der Primer und Sonden

Für die Untersuchung der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 wurden mittels Literaturrecherche bereits beschriebene Primer und *TaqMan*TM Sonden für die *Toll-like* Rezeptoren und die Haushalts-Gene ausgewählt. Durch einen sogenannten *Blast* wurde ihre Basenfolge gegen die Sequenz des Humangenoms in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) überprüft. Hierbei wurde die Korrektheit der Basenfolge bestätigt und die Lage des Primer-Sonden-Systems im Gen bestimmt. Zusätzlich wurden die verwendeten Oligonukleotide mit Hilfe des Programms *Primer Premier* (Biosoft International, USA) auf ihre Eignung und mögliche Nachteile (z.B. Primerdimerbildung, Haarnadelbildung) überprüft. Das entsprechend veröffentlichter Daten ausgewählte Primer-Sonden-System für TLR 4 entsprach zunächst allen Anforderungen, wurde jedoch im Verlauf der Vorversuche durch ein anderes mit Hilfe von *Primer Premier* selbst konstruiertes Primerpaar ersetzt, nachdem sich kein spezifisches Produkt in der PCR amplifizieren ließ. Alle verwendeten Primer und *TaqMan*TM Sonden sind ausführlich im Abschnitt 8./Materialien beschrieben.

3.2.11 Auswahl der Referenzgene (*housekeeping genes*)

Als Referenzgene (*housekeeping genes*) bezeichnet man Gene, die ubiquitär synthetisiert werden, da sie zum Überleben der Zellen notwendig sind und konstant exprimiert werden. Für diese Arbeit wurden β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgene ausgewählt. β_2 -Mikroglobulin ist ein 12-kd-Polypeptid, das in Klasse-I-Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) vorkommt. GAPDH ist ein weit verbreitetes Enzym, das bei der Energiegewinnung durch Glykolyse eine wichtige Rolle spielt (Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Biphosphoglycerat). In der Literatur wird empfohlen, mindestens zwei Referenzgene zur internen Kontrolle zu verwenden. Die beiden hier ausgewählten Gene werden, neben anderen, als die in PBMC am stabilsten exprimierten beschrieben [78]. Um ein breites Expressionsspektrum abzudecken, wurde mit β_2 M ein in PBMC hoch exprimiertes und mit GAPDH ein niedriger exprimiertes Gen eingesetzt [79].

3.2.12 Relative Quantifizierung

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob ein quantitativer Unterschied in der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 zwischen beiden Gruppen festzustellen ist. Da hierfür nicht die Ermittlung der exakten Kopienzahlen der Proben, sondern nur das Verhältnis der Gruppen zueinander entscheidend ist, wurde entsprechend der Delta-Delta- C_T -Methode relativ quantifiziert. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (*housekeeping gene*) bezogen und aus den Delta- C_T -Werten beider Gruppen anschließend der Delta-Delta-

C_t -Wert gebildet. Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt (Abbildung 6) [80].

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Patienten} - \Delta C_t \text{ Kontrollen}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Abbildung 6: Delta-Delta- C_t -Methode zur relativen Quantifizierung

Der C_t -Wert (*Cycle of threshold*) entspricht dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je niedriger der C_t -Wert ist, also je eher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten. Um methodische Störfaktoren, wie z.B. Gewebe- und Matrixeffekte und unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen, die möglicherweise die Expressionsergebnisse beeinflussen könnten, zu reduzieren, wurden die zwei Referenzgene β_2 -M und GAPDH als interne Standards mitgeführt und die Transkriptmenge der Zielgene auf die Transkriptmenge des Referenzgens normiert.

3.2.13 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung können DNA-Fragmente von 0,3 bis 5 kB Länge in einem horizontalen Agarosegel aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung aufgetrennt werden. Die Siebstruktur der Agarose, deren Porengröße von der Konzentration des Gels abhängt, bietet kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand, so dass diese schneller durch das Gel wandern. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE verwendet, die angelegte Spannung betrug zwischen 60 und 110 V. Die Konzentration des Agarosegels variierte, abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente, zwischen 1-2% (w/v) in 1x TAE. Ethidiumbromid (EtBr), ein in die DNA interkalierender Farbstoff, wurde in der Menge von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ in die geschmolzene Agarose zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer (0,1% (w/v) Bromphenolblau, 40% Glycerin) versetzt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Fragmente durch das interkalierte EtBr, das bei einer Wellenlänge von 302 nm fluoresziert, sichtbar gemacht. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben 1 μg eines DNA-Größenstandards auf die Agarosegele aufgetragen. Der in dieser Arbeit verwendete Größenstandard, eine 50-Basenpaar-Leiter der Firma Roche, enthielt folgende DNA-Fragmente definierter Größe: 50,100, 150, 200, 250, 500, 750, 2642 bp.

3.2.14 Stimulationen von Monozyten

Entsprechend der oben beschriebenen Protokolle wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Vollblut aufgereinigt und die Monozyten anschließend mit Hilfe von CD14 *MicroBeads* aus den PBMC isoliert. Für die Stimulationsansätze wurden die aufgereinigten Monozyten in einer Konzentration von 3×10^4 /Vertiefung in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte für Suspensionskulturen ausgesetzt. Die Stimulation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 250 μ l in *RPMI 1640* Medium unter Zusatz von 2,5% autlogem Plasma. Nach der Inkubation wurden die 96-Loch-Mikrotiterplatten 15 min/1500 rpm/RT zentrifugiert und die zellfreien Überstände abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

3.2.14.1 Stimulation mit tri-acyliertem Lipopeptid (Pam-3-Cys)

Die Monozyten wurden für die Stimulation mit Pam-3-Cys vier Stunden mit 25 ng/ml beziehungsweise 100 ng/ml Pam-3-Cys oder einem entsprechenden Volumen Medium bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

3.2.14.2 Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) aus *Staphylococcus aureus*

Für die Stimulationen mit LTA wurden die Zellen vier Stunden mit oder ohne Zusatz von 10 ng/ml LTA bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Lipoteichonsäure aus *Staphylococcus aureus* wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin, zur Verfügung gestellt.

3.2.15 ELISA zur Bestimmung von humanem Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF- α)

Der in dieser Arbeit verwendete ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) zur Bestimmung der Konzentration des humanen Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF- α) beruht auf dem sogenannten Sandwichprinzip. Die Konzentration von hTNF- α wurde in den Zellüberständen nach vierstündiger Stimulation mit Pam-3-Cys oder LTA bestimmt. Der Antikörper gegen humanes TNF- α (hTNF- α) wurde in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS über Nacht bei Raumtemperatur in den verwendeten 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten inkubiert und dadurch an die Kunststoffoberfläche gekoppelt. In einem Waschschriff (dreimaliges Waschen jeder Vertiefung mit je 250 μ l PBS/ 0,05% Tween 20) wurde nicht gebundener anti-hTNF- α -Antikörper entfernt. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit PBS/ 1% BSA blockiert. Nach einem Waschschriff wurden die Standardreihe (in Konzentrationen von 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,6 pg/ml), der Leerwert und die Zellüberstände (in Verdünnungen von 1:1 bis 1:10) aufgetragen und unter leichtem Schütteln 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff wurde ein zweiter, biotinylierter anti-hTNF- α -Antikörper in einer Konzentration

von 75 ng/ml in PBS/ 1% BSA hinzugegeben und unter leichtem Schütteln 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden pro Vertiefung 100 µl an Streptavidin konjugierte Peroxidase hinzu pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur unter Abschluss von Licht inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde anschließend die frisch angesetzte Substratlösung (Lösung A und B im Verhältnis 1+1) hinzugegeben und weitere 20 min unter leichtem Schütteln lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2N H₂SO₄-Lösung abgestoppt und die Extinktion umgehend bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikrotiterplatten-Leser gemessen. Alle Proben wurden im Doppelansatz gemessen. Zur Berechnung der TNF- α -Konzentration wurde bei allen Proben der Leerwert abgezogen und die Konzentration entsprechend der mitgeführten Standarddeichkurve bestimmt.

3.2.16 Bestimmung des Gesamt Immunglobulin E

Die Bestimmung des Gesamt-Immunglobulin E (IgE) erfolgte mit Hilfe des *Phadia CAP System™ IgE FEIA* (Immunglobulin E Fluoroenzymimmunoassay), Phadia Diagnostics, Uppsala, SWE. Die unverdünnten Serumproben wurden dabei zunächst mit *Anti-IgE ImmunoCAP* inkubiert. *Anti-IgE ImmunoCAP* ist ein an einen Trägerstoff gekoppelter, monoklonaler Antikörper der Maus gegen humanes IgE. Das in der Serumprobe der Patienten vorliegende Gesamt-IgE reagiert mit dem kovalent an das *ImmunoCAP* gebundenen Anti-IgE. Nach einem anschließenden Waschgang wurden Enzym-markierte Antikörper gegen IgE (β -galactosidase Anti-IgE (monoklonale Antikörper der Maus) hinzugefügt, um einen Komplex zu bilden. Nach der Inkubationszeit wurde ungebundenes Enzym-Anti-IgE in einem Waschschrift ausgewaschen und der gebundene Komplex mit einer Entwicklerlösung (enthält 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactosidase) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit einer 4%igen Natriumkarbonatlösung wurde die Fluoreszenz des Eluats gemessen. Die Fluoreszenz ist der IgE-Konzentration der Serumprobe direkt proportional. Der Messbereich für unverdünnte Serumproben liegt zwischen 2 - 2000 kU/l. Der Referenzwertbereich (Normwerte) für Erwachsene liegt zwischen 25 – 94 kU/l.

3.2.17 Bestimmung des spezifischen IgE

Die Bestimmung des spezifischen IgE gegen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Katzenschuppen, Hundepithelien, Cladosporium herbarum und Dermatophagoides pteronyssinus wurde ebenfalls mittels *Phadia CAP™ System*, Phadia Diagnostics, Uppsala, Schweden, durchgeführt. Das Testprinzip ist identisch zum IgE FEIA (vgl. 3.2.17). Die Konzentration wird in kU/l des spezifischen IgE errechnet und in sogenannte CAP-Klassen eingeteilt (CAP 0: <0.35 kU/l; CAP 1: 0.35 – 0.7 kU/l; CAP 2: 0.7 – 3.5 kU/l; CAP 3: 3.5 – 17.5 kU/l; CAP 4: 17.5 – 50.0 kU/l; CAP 5: 50.0 – 100.0 kU/l; CAP 6: >100 kU/l).

3.3 Auswertung und Statistik

Die Bestimmung der Fallzahl erfolgte vor Beginn der Versuche in Absprache mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Humboldt-Universität zu Berlin. Die in dieser Arbeit verwendeten Statistischen Tests wurden in Bezug auf ihre Eignung durch das Institut für Medizinische Biometrie überprüft.

Zur Auswertung wurden das Programm *Excel 2000* von Microsoft und das Statistikprogramm *SPSS 10.1 for Windows* verwendet. Mit *SPSS 10.1* wurden der Whitney-Mann-U-Test (ordinal skalierte oder metrische nicht normalverteilte Daten; zwei unabhängige Stichproben), der Chi-Quadrat-Test (nominal skalierte Daten, zwei unabhängige Stichproben) und der Pearson'sche Korrelationskoeffizient (bivariate, metrisch skalierte Merkmale) zur Berechnung des statistischen Signifikanzniveaus angewendet.