

**Einfluss der Genkopiezahlvariation der beta-Defensine drei und vier
auf die Inzidenz der Sepsis**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Vorgelegt von
Andrea Monika Perne
aus Bonn**

2010

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Stüber**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Kalff**

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.6.2010

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. A. Hoeft**

Gewidmet

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Einführung	9
1.2 Die Sepsis	10
1.3 Grundlagen genetischer Variabilität	13
1.4 Kopiezahlvariationen	15
1.5 Defensine	17
1.6 Humane β -Defensine	18
1.7 Genetische Variationen der beta-Defensine.....	20
1.8 Methodische Aspekte.....	26
1.9 Fragestellung dieser Arbeit.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Patientenkollektiv	27
2.2 Schwere Sepsis	28
2.3 Allgemeines Prinzip der PCR.....	32
2.4 Prinzip der Fluoreszenzmessung	33
2.5 Aufbau des LightCyclers®	38
2.6 Prinzip der relativen Quantifizierung.....	40
2.7 Datenauswertung	45
2.8 Statistische Auswertung.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Datenauswertung	48
3.2 Intra- und Interassay Variabilität	49
3.3 Verteilungen der Genkopiezahlen im Gesamtkollektiv	51

3.4 Vergleich des Sepsis-Kollektivs mit dem Kontrollkollektiv	54
3.5 Intraindividuelle Wechselwirkung zwischen DEFB103 und DEFB104.....	57
4. Diskussion	61
4.1 Genkopievariationen der Defensine in Zusammenhang mit Sepsis.....	61
4.2 Vergleich der ermittelten Genotypverteilungen mit der Literatur	63
4.3 Intraindividuelle Konkordanz oder Variabilität der einzelnen beta-Defensine?.....	66
Zusammenfassung.....	70
Liste der Abbildungen und Tabellen.....	72
Literaturverzeichnis.....	74
Danksagung.....	81
Lebenslauf.....	82

|

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Abb.	Abbildung
ALB	Albumin
ALI	acute lung injury
BAC	bacterial artificial clone
BE	Base excess
CCR6	CC chemokine receptor 6
CGH	comparative genomic hybridization
cm	Zentimeter
CNP	copy number polymorphism (Genkopiepolymorphismus)
CNV	copy number variation (Genkopievariation)
Cp	crossing point
DEFB4	Gen des humanen β -Defensin zwei
DEFB103	Gen des humanen β -Defensin drei
DEFB104	Gen des humane β -Defensin vier
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminacetat
F _I O ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
h	Stunde
hBD-2 bis 6	humanes β -Defensin zwei bis sechs (Protein)
HG	Quecksilbersäule
HIV	human immune definciency virus
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-RN1	Interleukin-Rezeptorantagonist 1
INF- γ	Interferon-gamma
kgKG	kilogramm Körpergewicht
LED	lichtemittierende Diode
LPS	Lipoproteinpolysaccharid
MAPH	multiplex amplifiable probe hybridization
min	Minute
ml	Milliliter
MLPA	multiplex ligation-dependent probe hybridization
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol

m-RNA	messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
P _a CO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	polymerase chain reaction
pmol	Picomol
REPD	repeat distal
REPP	repeat proximal
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
SIRS	systemic infection response syndrome
SNP	single nucleotide polymorphism
TLR-4	toll like receptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehungen
UTR	untranslated region
VTR	variable tandem repeats

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen von Krankheiten ist eine der großen Herausforderungen unserer Zeit. Gerade multifaktorielle Krankheitsprozesse, deren genetischer Hintergrund nicht durch eine einzelne Variante erklärt werden kann, rücken zunehmend in das Interesse humangenetischer und epidemiologischer Forschung. Die entscheidenden Zusammenhänge im Rahmen dieser multifaktoriellen Prozesse zu identifizieren, ist komplex und erfordert große Patientenkollektive, um Ergebnisse mit adäquater Aussagekraft zu generieren (Stuber et al., 2005).

Die Sepsis ist ein solcher komplexer, multifaktorieller Krankheitsprozess. Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts ergaben sich erste Hinweise auf eine deutliche Assoziation zwischen dem genetischen Profil und der Anfälligkeit für Infektionen (Sorensen et al., 1988). In der letzten Dekade konnten einige genetische Variationen mit dem klinischen Phänotyp Sepsis bzw. schwere Sepsis in Verbindung gebracht werden (Chen et al., 2007). Diese Erkenntnisse führten zu der Überzeugung, dass künftig die auf den einzelnen Patienten und sein jeweiliges genetisches Profil individuell zugeschnittene Therapie von wachsender Bedeutung für die Behandlung der Sepsis sein wird (Arcaroli et al., 2005). Im Rahmen der internationalen Review-Konferenz zur Definition der Sepsis 2001 wurde ein neuartiges Konzept namens PIRO erarbeitet. Analog der TNM-Klassifikation in der onkologischen Praxis soll dieses neue diagnostische Instrument helfen, das heterogene septische Patientenkollektiv schärfer in Subgruppen aufzutrennen und somit von größerem prognostischen und therapeutischem Nutzen sein als bisherige Einteilungen. Hierbei erfolgt eine Bewertung des Patienten in jeder der vier Dimensionen von PIRO: P (=Predisposition) steht für die individuelle genetische Ausstattung sowie bestehende Vorerkrankungen. I (=Infection oder Injury) berücksichtigt u.a. den Ort und verantwortlichen Organismus der Infektion bzw. ein etwaiges Trauma, während R (=Response) die immunologische Antwort des Organismus charakterisiert. O (=Organ failure) beinhaltet den klinischen Schweregrad in Form von Organdysfunktionen. Mithilfe dieses Konzeptes soll eine zielgerichtete, individuelle Sepsistherapie ermöglicht werden, die als wichtiges Kriterium die jeweilige genetische Konstitution des Patienten berücksichtigt.

Antimikrobielle Peptide sind wichtige Komponenten der angeborenen Immunantwort. Beim Menschen zählen dazu beispielsweise Hecpidin, Cathelicidine und Defensine. Sie schädigen pa-

thogene Keime direkt, steuern und modulieren aber auch die Gesamtheit der Immunantwort (Pazgier et al., 2006). Die Gene einiger β -Defensine zeigen ein hohes Maß an Variabilität. Ex vivo Studien konnten Unterschiede in der Expression von humaner DEFB4-RNA in Abhängigkeit von der Genkopiezahl zeigen (Hollox et al., 2003). Inwieweit diese Tatsache klinische Relevanz besitzt, ist zurzeit noch unzureichend untersucht. Dies könnte theoretisch zu interindividuell unterschiedlicher Suszeptibilität, bzw. zu unterschiedlichen Verläufen komplexer Erkrankungen beitragen (Linzmeier und Ganz, 2005).

Inwiefern genetische Unterschiede der β -Defensine drei und vier im Rahmen der Sepsis von Bedeutung sind, soll in dieser Studie untersucht werden.

1.2 Die Sepsis

„Wenn der Körper innerlich heiß und außen kalt ist, dann verläuft die Krankheit tödlich.“ Mit diesem einfachen Bild beschrieb Hippokrates 400 Jahre vor Christus den Verlauf einer Sepsis. Die Definition von Schottmüller aus dem Jahr 1914 zeigt bereits ein genaueres Verständnis des pathophysiologischen Geschehens: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Obwohl unser heutiges Wissen der zugrunde liegenden Vorgänge deutlich komplexer geworden ist, stagniert die Letalität der Sepsis mit über 35% auf einem gleichbleibend hohen Niveau (Wood und Angus, 2004).

Neben der hohen Mortalität gewann jedoch in den letzten Jahren ein weiterer Aspekt zunehmend an Aufmerksamkeit. Die Sepsis ist eine sehr teure Krankheit, sowohl in der Akutphase als auch hinsichtlich der Folgekosten. Jeder an schwerer Sepsis erkrankte Patient verursacht direkte Kosten im Bereich von ca. 23.200 Euro, welche in erster Linie durch die aufwändige intensivmedizinische Behandlung zustande kommen (Moerer et al., 2002). Schätzungen bezüglich der Gesamtheit an Kosten sowohl in der Akutversorgung als auch hinsichtlich der Folgekosten in Form von Produktivitätsausfall, Rehabilitation und Wiedereingliederung veranschlagen 3,6 bis 7,7 Milliarden Euro pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland. Hinzu kommt, dass die Sepsis in der Bevölkerung relativ häufig auftritt. Moerer et al. postulierten für Deutschland 75.000 Fälle von schwerer Sepsis pro Jahr (Moerer und Burchardi, 2006). Burchardi et al. schätzen die Zahl an Neuerkrankungen pro Jahr in Europa auf ungefähr 54-116 pro 100.000 Einwohner, womit die

Inzidenz der Sepsis vergleichbar wäre mit der des Dickdarmkrebs (ca. 50 pro 100.000) oder Brustkrebs (ca. 110 pro 100.000) (Burchardi und Schneider, 2004; Danai und Martin, 2005). Zahlen aus den USA zeigen zusätzlich einen Trend zu steigender Inzidenz innerhalb der letzten Jahrzehnte und mit ca. 34.000 Todesopfern war eine Septikämie die zehnthäufigste Todesursache im Jahre 2005 (Kung et al., 2008; Martin et al., 2003).

2001 wurde die Deutsche Sepsis Gesellschaft gegründet. Diese interdisziplinäre Plattform erlaubt eine Zusammenführung der wissenschaftlichen und klinischen Kompetenzen über die Fachgrenzen hinaus. Das ein Jahr später aufgebaute Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) bündelt aktuelle Forschungsprojekte. Dadurch besteht heute ein sehr viel besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und Einflussfaktoren im Rahmen dieses komplexen und dynamischen Geschehens. Eine große Herausforderung stellt die heterogene Patientenstruktur dar, welche sich über alle Altersstufen erstreckt und jegliche Form von Unfällen, Operationen oder sonstigen Vorerkrankungen beinhalten kann. Die Sepsis bildet hier lediglich die gemeinsame pathophysiologische Endstrecke einer Vielzahl von auslösenden Krankheitsprozessen. Nicht zuletzt aus diesem Grund besteht ein besonderes Interesse an den interindividuellen Unterschieden im klinischen Verlauf, die wissenschaftlich von vielen Seiten untersucht werden.

Nach heutigem Verständnis stellt die Sepsis eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus auf einen infektiösen Reiz dar (Arcaroli et al., 2005). Dem Eindringen eines Erregers begegnet in einem ersten Schritt das angeborene Immunsystem in Form antimikrobieller Peptide, des Komplementsystems, der Granulozyten und einer Reihe universeller Abwehr- und Rezeptorproteine. Auch das Gerinnungssystem wird bereits in dieser frühen Phase aktiviert. Diese Vorgänge selbst führen zur Aktivierung und Rekrutierung zusätzlicher Immunzellen. Besonders wichtig im weiteren Verlauf ist die massive systemische Produktion proinflammatorischer Botenstoffe wie dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), wodurch es zur Ausbreitung der entzündlichen Reaktion sowie zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt. Um jedoch eine unkontrollierte und für den Organismus schädliche Entzündungsreaktion zu vermeiden, kommt es zunehmend zur Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren, wie dem Interleukin-10 (IL-10) oder auch dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RN). Entscheidend für eine erfolgreiche Elimination des Keimes mit einem akzeptablen Maß an Eigenschädigung ist dabei ein moderater Ablauf dieser beiden Mechanismen. Für den Verlauf einer Sepsis ist somit das Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren

von grundlegender Bedeutung. (Für eine detaillierte Erläuterung der septischen Pathomechanismen siehe Riedemann: "Aktuelle Aspekte zur Pathophysiologie der Sepsis" in „Kliniker“, 2004; 33 (6).)

Es ist weitgehend ungeklärt, weshalb die Sepsis von einem Individuum zum anderen einen so unterschiedlichen Verlauf aufweisen kann, also durch eine starke interindividuelle Variabilität gekennzeichnet ist (Winning et al., 2006). Einen ersten Hinweis darauf, dass auch genetische Faktoren eine Rolle spielen könnten, lieferten Sorensen et al. im Jahr 1988. In dieser Studie wurden Adoptivkinder mit ihren biologischen Eltern und Adoptiveltern verglichen in Bezug auf das Risiko, frühzeitig (vor dem 58. Lebensjahr) zu versterben. War ein biologisches Elternteil an einer Infektion verstorben, so ergab sich für seine genetischen Nachkommen ein relatives Risiko von 5,81 ebenfalls verfrüht aus diesem Grund zu sterben. Im Vergleich hierzu belief sich das relative Risiko für vaskuläre Ursachen auf 4,92 und jenes für maligne Todesursachen auf 1,19 (Sorensen et al., 1988). Diese Beobachtungen sprechen für einen starken Einfluss und eine wichtige Rolle des genetischen Profils hinsichtlich der Anfälligkeit für Infektionen.

Auf jeder Ebene der Entzündungskaskade wirken spezifische Proteine, durch die Signalkaskaden und Transkriptionsvorgänge initiiert oder gehemmt werden. Eine veränderte Funktion sowie ein Mehr oder Weniger an Produktion jedes dieser beteiligten Moleküle kann den Gesamtverlauf einer Entzündung beeinflussen. Somit ist jede Veränderung des Erbgutes in den zugrundeliegenden Genen oder im Bereich ihrer Regulationsgene interessant hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf den septischen Verlauf. Beispielsweise kann ein veränderter Rezeptor, welcher der Erkennung pathogener Strukturen dient, zu einer langsameren Reaktion auf den spezifischen Keim führen. Dies konnte für den sogenannten „Toll-like Rezeptor 4“ (TLR4) gezeigt werden. Die Gruppe der toll-like Rezeptoren dient generell der Erkennung körperfremder Oberflächenstrukturen, der TLR4 reagiert speziell auf die Proteine gramnegativer Bakterien. Agnese et al. fanden 2002, dass der Austausch je einer Base an den Positionen 299 und 399 innerhalb des TLR4-Gens zu einer erhöhten Rate an Infektionen mit gramnegativen Bakterien sowie einem Trend zu einer erhöhten 28-Tage Mortalität führte (Agnese et al., 2002). Andere Studien zeigten Assoziationen zwischen Genvarianten und Entzündungsreaktionen für den an der Gerinnungskaskade beteiligten „Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1“ (PAI-1), die antiinflammatorischen Moleküle IL-10 und IL-1RN sowie für die proinflammatorischen Mediatoren IL-6 und TNF (Lowe et al., 2003; Ma et

al., 2002; Menges et al., 2001; Mira et al., 1999; Schluter et al., 2002; Shu et al., 2003). Alle diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass genetische Faktoren für den septischen Verlauf von Bedeutung sind. Allerdings konnten die Ergebnisse zu TNF in einer weiteren Untersuchung von Stüber et al. 1995 nicht bestätigt werden (Stüber et al., 1995).

Dies weist auf ein grundlegendes Problem dieses Forschungsfeldes hin: Widersprüchliche Studienergebnisse hinsichtlich der Assoziation bestimmter Genvarianten mit dem Verlauf der Sepsis sind keine Seltenheit. Einen der Gründe hierfür vermutet man in der unzureichenden Anzahl untersuchter Patienten, die das Aufdecken geringer relativer Risikozuwächse durch einzelne Allele („genotype relative risk“) sehr schwer macht (Stüber et al., 2005). Somit sind große Studienkollektive eine notwendige Voraussetzung, um valide, statistisch belastbare Ergebnisse in Bezug auf die Assoziation genetischer Varianten mit dem septischen Verlauf zu erhalten. Weitere Probleme bei der Vergleichbarkeit von Studien entstehen aus der Heterogenität des Patientenguts, was zu einer Vielzahl an unkontrollierbaren Variablen und letztlich einer herabgesetzten Aussagekraft der Ergebnisse führt.

1.3 Grundlagen genetischer Variabilität

Interindividuelle Unterschiede im Aussehen, der Disposition für bestimmte Krankheiten und der Reaktion eines Organismus auf Umweltreize gründen auf Unterschiede im Erbgut, der DNA. Nachdem im Jahr 2001 die Sequenzierung des menschlichen Genoms vollendet war (Venter et al., 2001), konzentrierte sich die Aufmerksamkeit nicht mehr nur auf die Komposition des Erbgutes, sondern zunehmend auf die Frage, wie genetische Information die Struktur und Funktion von Proteinen, Geweben und Organismen beeinflusst. Es wurde zur neuen Herausforderung festzustellen, welche der Vielzahl genetischer Variationen tatsächlich von Bedeutung sind.

Unterschiede im Erbgut können vereinfachend nach ihrer Größe in mikroskopische oder submikroskopische Änderungen eingeteilt werden. Bei Ersteren handelt es sich um Veränderungen an den Chromosomen, sogenannten „Chromosomenaberrationen“, welche in numerische und strukturelle Aberrationen unterteilt werden können. Die wohl bekannteste numerische Aberration ist die Trisomie 21, daneben existieren jedoch weitere wie die Trisomie 13 oder 18. Monosomien der Autosomen sind nicht mit dem Leben vereinbar, während der Verlust eines Geschlechtschromosoms beispielsweise im Rahmen des Turner-Syndroms durchaus toleriert werden kann. Die strukturellen Chromosomenaberrationen umfassen Deletionen, Duplikationen, Inversionen

und Translokationen und können ohne phänotypische Auswirkung bleiben oder aber zu mehr oder minder ausgeprägten Entwicklungsstörungen führen.

Auf der submikroskopischen Ebene bilden Mini- und Mikrosatelliten einen großen Teil der Klasse der repetitiven DNA-Sequenzen. Diese repetitiven Sequenzen liegen in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten und bestehen aus sich tandemartig wiederholenden Sequenzmotiven, deren Funktion bisher weitgehend unbekannt ist. Die ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung „variable number of tandem repeats“ (VTR's) verdeutlicht, dass sich die Mini- und Mikrosatelliten in der Anzahl ihrer Wiederholungen von Mensch zu Mensch unterscheiden.

Minisatelliten liegen in euchromatischen Regionen und haben Grundmotive der Wiederholung von ungefähr 10 bis über 50 Basenpaaren Länge. Sie können unterteilt werden in telomerische und hypervariable Minisatelliten-DNA. Letztere zeigen zusammen mit den nachfolgend besprochenen Mikrosatelliten die größte interindividuelle Variabilität aller DNA-Sequenzen. Nachteilig für die systematische Untersuchung des Genoms ist ihre ungleichmäßige Verteilung; die größte Dichte an Minisatelliten beobachtet man in den telomerischen Bereichen, also an den Enden der Chromosomen.

Auch die Mikrosatelliten liegen in euchromatischen Regionen, haben aber kürzere Grundmotive (1 bis 5 Basenpaare). Ihre interindividuelle Variabilität ist wie die der Minisatelliten sehr groß, sie bieten jedoch den Vorteil, gleichmäßig und in großer Zahl über das Genom verteilt zu sein. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass sie zu Beginn der 90er Jahre zunehmend ins wissenschaftliche Interesse rückten.

Der Austausch einzelner Basen steht seit einiger Zeit im Fokus des wissenschaftlichen Arbeitens bezüglich genetischer Variabilität und deren funktioneller Bedeutung (Nguyen et al., 2006). Solch ein „single nucleotide polymorphism“ („SNP“) findet sich durchschnittlich alle 1200 Basenpaare, so dass die Gesamtheit aller SNP's auf insgesamt ungefähr 10 Millionen Nukleotide bzw. 0,3% des gesamten Genoms geschätzt wird. Die SNP's stellen somit die häufigste Form genetischer Variabilität dar (www.hapmap.org). Ein solcher Basenaustausch kann in kodierenden Regionen (Exons), nicht-kodierenden Bereichen (Introns, Promoter, UTR's) oder in Abschnitten zwischen Genen auftreten. In Abhängigkeit vom Ort und der Art des Basenaustausches kann ein SNP demnach belanglos oder „stumm“ bleiben, aber auch durch Veränderung der Transkription, der m-RNA oder der Proteinstruktur zu phänotypischen Auswirkungen führen. Da nur ca. 3% des menschlichen Genoms tatsächlich kodierende Bereiche enthalten und nicht jeder Basenaustausch zu einer veränderten Aminosäure führen muss, ist nur ein Teil der SNP's tatsächlich unmittelbar

phänotypisch relevant. Inwieweit jedoch auch Basenaustausche in nicht kodierenden Bereichen, also zwischen Genen, Relevanz besitzen, ist noch nicht ausreichend untersucht.

Durch die detaillierte Aufdeckung der einzelnen SNP's hoffte man, die Ursachen für einen Großteil der interindividuellen Unterschiede im Phänotyp, der Krankheitsdisposition und Medikamentenwirkung zu finden (Hegele, 2007). Aus diesem Grund verfügen wir heute über umfangreiche Kenntnisse in Bezug auf die Häufigkeit, Verteilung und Ausprägung der SNP's. Als Meilenstein wurde im Jahr 2002 mit dem HapMap-Projekt eine genomweite Kartierung der aussagekräftigsten SNP's initiiert (2003). Im Rahmen dieses Projektes wurden bis heute über 3,1 Millionen bekannter SNP's typisiert, um aus dieser Fülle die weitaus kleinere Menge spezieller „Markierungs-SNP's“ zu identifizieren, mit denen ein Großteil der genetischen Variationsmuster extrahiert werden kann. Grundlage dieses Vorhabens bildet die Tatsache, dass Teile des menschlichen Genoms in Form von „Blöcken“, den sogenannten Haplotypen, organisiert sind. Jene Haplotypen bestehen aus mehreren SNP's, die räumlich nahe beieinander zu finden sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden. Diese Tatsache bezeichnet man als Kopplungsungleichgewicht. Folglich werden diese Haplotyp-Blöcke bei der Vererbung als Einheit weiter gegeben, von der in einer gegebenen Population oftmals nur drei bis vier quantitativ bedeutsame Versionen vorkommen. Um diese Blockstrukturen zu charakterisieren, würde es also ausreichen, nur einige wenige dieser gekoppelten Varianten bzw. SNP's zu bestimmen. Durch deren Kenntnis könnte dann mit Hilfe der HapMap bestimmt werden, welche anderen Varianten ein Individuum – zumindest sehr wahrscheinlich – im betrachteten Abschnitt des Erbguts besitzt.

Durch die Bereitstellung dieser kondensierten menschlichen Haplotyp-Karte erhofft man sich einen großen Nutzen für die Aufklärung der genetischen Grundlagen insbesondere im Bereich der sogenannten „Zivilisationskrankheiten“.

1.4 Kopiezahlvariationen

Dank verbesserter Methoden zur genaueren Untersuchung der DNA rückte in den letzten Jahren eine weitere Form genetischer Variabilität in den Vordergrund, die sogenannte „Kopiezahlvariation“ oder „copy number variation“ (CNV). Analog zu den bereits lange Zeit bekannten, mikroskopisch sichtbaren Chromosomenveränderungen, handelt es sich bei den CNV's um submikroskopische quantitative Variationen im Genom in Form von Deletionen, Duplikationen, Insertionen und komplexen strukturellen Rearrangements (Redon et al., 2006). Diese

umfassen definitionsgemäß mindestens einen Bereich von 1000 Basenpaaren, können jedoch auch mehrere hunderttausend Basenpaare lang sein und beinhalten eine variable Anzahl an Genkopien im Vergleich zu einem Referenzgenom (Redon et al., 2006). Diese Genkopien entsprechen kompletten und damit voll funktionsfähigen Genen, die identisch zum Ursprungsgen reguliert und exprimiert werden können. Allgemein als Polymorphismus und in Bezug auf CNV's als „copy number polymorphism“ (CNP) wird eine Variante bezeichnet, wenn sie mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung auftritt (Condit et al., 2002). Varianten mit geringerer Frequenz werden als Mutation bezeichnet.

Während die im Mikroskop sichtbaren Veränderungen fast immer mit charakteristischen Krankheitsbildern wie beispielsweise dem Down-Syndrom einhergehen, finden sich die sehr viel kleineren CNV's auch in gesunden Populationen (Feuk et al., 2006). Untersuchungen der vergangenen Jahre ermöglichten eine erste Einschätzung über die Prävalenz, Verteilung und Charakteristika der CNV's. So schätzt man heute, dass CNV's ungefähr 2 bis 12% des menschlichen Genoms betreffen (Cooper et al., 2007; Redon et al., 2006). Dabei ist ihre Verteilung nicht zufällig, sondern konzentriert sich auf perizentromere und subtelomere Regionen, die für hohe strukturelle Instabilität bekannt sind (Cooper et al., 2007). Bedeutsam für die phänotypische Relevanz der CNV's könnte die Tatsache sein, dass sie bevorzugt in Gen-reichen Regionen der Chromosomen auftreten (Cooper et al., 2007) und dass viele Gene, die für komplexe Merkmale verantwortlich sind, im Bereich von CNV's lokalisiert sind (Redon et al., 2006). Dabei lässt sich der größte Anteil der betroffenen Gene bestimmten Genfamilien zuordnen. So sind besonders solche Gene reich an CNV's, die sensorische Rezeptorproteine, Signal-, Zelladhäsions- oder Strukturpeptide kodieren oder auch in der Immunantwort eine Rolle spielen (Cooper et al., 2007).

Theoretisch können sich Variationen der Genkopiezahl in einer quantitativ veränderten Expression auswirken, sie können jedoch auch durch die veränderte DNA-Struktur andere Gene aufbrechen oder durch Positionseffekte Einfluss auf weiter entfernt liegende Gene ausüben (Redon et al., 2006). Ein tatsächlicher Einfluss variabler Genkopien auf den Phänotyp konnte bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt werden. So beobachteten Hollox et al. 2003 sowie Aldred et al. 2005 eine Korrelation zwischen vermehrten Genkopien und einer vermehrten Produktion von mRNA (Aldred et al., 2005; Hollox et al., 2003). Auch eine Assoziation von CNV's mit verschiedenen komplexen Krankheitsbildern wie der Glomerulonephritis, Parkinson, Alzheimer oder ent-

zündlichen Darmerkrankungen konnte gezeigt werden (Aitman et al., 2006; Fellermann et al., 2006a; Rovelet-Lecrux et al., 2006; Singleton et al., 2003).

Obwohl das Wissen über die Prävalenz und Verteilung der CNV's in den letzten Jahren rasant zugenommen hat und bereits eine erste Kartierung des menschlichen Genoms hinsichtlich der CNV's unternommen wurde (Redon et al., 2006), gibt es Grund zu der Annahme, dass besonders kleinere CNV's durch die angewendeten Methoden nur unzureichend erfasst werden können (Redon et al., 2006). Auch erfordert die exakte Beschreibung eines einzelnen CNV's in Form einer basengenauen Positionsangabe sowie der Anzahl vorliegender Genkopien noch einen sehr hohen technischen und zeitlichen Aufwand (Redon et al., 2006). Um jedoch tatsächlich verstehen zu können, wie sich Kopiezahlvariationen auf den Phänotyp auswirken, ist eine genaue Bestimmung der jeweiligen quantitativen Genverhältnisse eines Individuums unerlässlich. Der Zuwachs an Wissen hinsichtlich dieser methodisch schwierig zu klärenden Fragen wird in den nächsten Jahren entscheidend zu einem besseren Verständnis der CNV's beitragen.

1.5 Defensine

Antimikrobielle Peptide bilden eine große, heterogene Gruppe aus über 800 Proteinen, welche als natürliche antibiotische Substanzen eine elementare Rolle in der Immunabwehr besitzen (Pazgier et al., 2006). Eine bei Pflanzen, Insekten und Vertebraten besonders weit verbreitete Gruppe antimikrobieller Peptide bilden die Defensine. Dabei handelt es sich um kationische, amphiphile und als β -Faltblatt strukturierte Proteine mit einer Länge von 29-54 Aminosäuren. Das charakteristische Merkmal dieser Gruppe bilden Cysteinreste und die Ausbildung von Disulfidbrücken, welche die Faltung dieser Moleküle stabilisieren. Diese konservierte Grundstruktur sowie die Anordnung der Gene im Genom in Form von Nestern oder „Clustern“ begründen die These eines einzelnen gemeinsamen Genvorläufers für alle Wirbeltier-Defensine. Neuere Analysen gehen davon aus, dass die Vielfalt an Defensinen durch Duplikationen bereits vorhandener Gene und positiver Selektion durch die Umwelt entstanden ist (Pazgier et al., 2006; Semple et al., 2006).

Die Position der sechs bei humanen Defensinen vorhandenen Cysteinreste sowie ihre Verknüpfung untereinander durch Disulfidbrücken bestimmt die Zuordnung zu den Untergruppen der α -

β - oder θ -Defensine. Letztere besitzen allerdings kaum praktische Relevanz, da sie aufgrund vorzeitiger Stopp-Codons nicht als fertiges Proteinprodukt in Erscheinung treten (Ganz, 2003).

Die antimikrobielle Eigenschaft der Defensine besteht in der Inaktivierung einer Vielzahl verschiedener Bakterien, Pilze und einiger Viren. In dieser Funktion bilden sie einen wichtigen Bestandteil der frühen, angeborenen Immunabwehr zum Schutz vor eindringenden Keimen. Dementsprechend sind die epithelialen Organe als potentielle Eintrittspforten des Organismus Orte hoher Syntheseaktivität für die β -Defensine. Darüber hinaus werden die Gene der β -Defensine 2, 3 und 4 in Leukozyten exprimiert und das Protein ist im Plasma nachweisbar. Demgegenüber kommen α -Defensine in Neutrophilen und intestinalen Paneth-Zellen vor (Pazgier et al., 2006). Jüngere Forschungsergebnisse weisen aber auf eine weitaus komplexere Rolle der Defensine in der Koordination und Vernetzung von angeborener und erworbener Immunabwehr hin. So besitzen sie chemotaktische Wirkung auf Immunzellen, üben sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen aus und scheinen zusätzlich auf die Zelldifferenzierung zu wirken (Pazgier et al., 2006; Van et al., 1999). Diese vielfältigen immunmodulatorischen Wechselwirkungen erweitern die Sichtweise auf Defensine und rücken ihre Bedeutung im Rahmen systemischer Infektionen weiter in den Fokus der Forschung.

1.6 Humane β -Defensine

Das erste β -Defensin wurde 1991 aus der Mundhöhle von Kühen isoliert (Diamond et al., 1991). In seiner Struktur und Funktion ähnelte es den bereits bekannten α -Defensinen, jedoch bestand ein Unterschied in der Position der Cysteinreste sowie deren Verknüpfung untereinander durch Disulfidbrücken.

1995 entdeckten Bensch et al. erstmalig ein humanes β -Defensin (hBD-1) im Ultrafiltrat von Patienten mit fortgeschrittener Nierenerkrankung (Bensch et al., 1995). Es folgte die Isolation der β -Defensine 2 und 3 sowie die Identifikation von hBD-4 bis hBD-6 durch bioinformatische Untersuchungen des Erbguts (Pazgier et al., 2006). Obwohl genomische Analysen die Existenz einer Vielzahl von β -Defensinen nahe legen, sind bislang lediglich die ersten vier Vertreter dieser Gruppe genauer untersucht worden (Pazgier et al., 2006).

Das humane β -Defensin 1 wird primär in den Schleimhäuten der Atemwege und des Urogenitaltraktes konstitutiv exprimiert, kann aber auch durch Lipopolysaccharid, inaktiviertem *Pseudomonas aeruginosa* und Interferon gamma (IFN- γ) induziert werden. Seine stärkste Wir-

kung entfaltet es gegen grampositive Bakterien und Pilze, weniger effektiv wirkt es auf gramnegative Bakterien (Pazgier et al., 2006). Darüber hinaus entdeckte eine italienische Studie eine Assoziation zwischen einem SNP im zugehörigen Gen und HIV-Infektionen bei Kindern (Braida et al., 2004). Daneben scheint hBD-1 an der Stimulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie dem Prozess der Zelldifferenzierung beteiligt zu sein (Niyonsaba et al., 2005; Young et al., 2003). Das Wirkspektrum des humanen β -Defensins 2 ähnelt dem von hBD-1, neben dem Gastrointestinal- und Respirationstrakt findet sich hBD-2 jedoch auch in der Haut und weiteren Epithelien (Pazgier et al., 2006). Außerdem wird es nach Stimulation mit LPS im peripheren Blut transkribiert und exprimiert (Fang et al., 2003). Darüber hinaus scheint hBD-2 mit dem Komplementsystem zu interagieren und einen protektiven Effekt im Rahmen von schweren Lungenerkrankungen wie dem ALI sowie respiratorischen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* zu besitzen (Bhat et al., 2007; Shu et al., 2006).

Das humane β -Defensin 3 (hBD3) zeichnet sich durch ein sehr breites antibiotisches Spektrum gegen eine Vielzahl von Pilzen, grampositiven sowie gramnegativen Bakterien, HIV-1 und Herpes simplex aus. Im Gegensatz zu den anderen Defensinen behält hBD-3 seine antimikrobielle Aktivität auch bei hohen Salz- und Ionenkonzentrationen in der Umgebung und wird auch in verschiedenen nicht-epithelialen Geweben wie dem Herz, der Leber und dem Skelettmuskel als auch in Leukozyten produziert (Garcia et al., 2001; Hazrati et al., 2006; Pazgier et al., 2006;).

Die Expressionsorte des menschlichen β -Defensins 4 (hBD-4) sind noch nicht vollständig bekannt, jedoch wurde eine Induktion in respiratorischen Epithelzellen im Rahmen bakterieller Infektionen beobachtet und auch neutrophile Granulozyten exprimieren dieses Protein (Garcia et al., 2001). Daneben konnte die Expression in Keratinozyten induziert werden und in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion wurde hBD-4 nachgewiesen (Smiley et al., 2007; Yanagi et al., 2007). Besonders gegen diesen Problemkeim, der häufig Ursache von beatmungsassoziierten Pneumonien ist, scheint hBD-4 eine wichtige Rolle zu spielen (Agodi et al., 2007; Smiley et al., 2007).

Allen vier humanen Defensinen gemeinsam ist die Eigenschaft der Chemotaxis, also der konzentrationsabhängigen Rekrutierung anderer Immunzellen. Erste Untersuchungen fanden eine solche Wirkung auf unreife dendritische Zellen sowie T-Gedächtniszellen und postulierten eine Signaltransduktion unter anderem über den G-Proteingekoppelten Rezeptor CCR6 (Yang et al., 1999). Jüngere Ergebnisse widersprechen dem und beobachteten hingegen eine chemotaktische bzw. aktivierende Wirkung auf Makrophagen und Mastzellen (Niyonsaba et al., 2003; Soruri et

al., 2007). Eine Rekrutierung von Neutrophilen, die zuvor mit TNF inkubiert worden waren, konnte separat für hBD-2 gezeigt werden (Niyonsaba et al., 2004).

Analog der Eigenschaft der Chemotaxis sind alle vier β -Defensine induzierbar, jedoch hBD-2 bis 4 wesentlich stärker als hBD-1, welches primär konstitutiv synthetisiert wird (Pazgier et al., 2006). Die Induktion geschieht durch Bestandteile bakterieller Membranen wie LPS sowie durch körpereigene Entzündungsmediatoren wie TNF, INF- γ oder IL-1. Das Ausmaß der Induktion weist dabei interindividuelle Unterschiede auf und es findet sich eine Korrelation des Induktionspotentials mit dem Level basaler Expression des jeweiligen Defensins (Joly et al., 2005). Eine mögliche Erklärung könnte auf genetischer Ebene in einer interindividuell unterschiedlichen Anzahl an Genkopien für die β -Defensine liegen.

1.7 Genetische Variationen der beta-Defensine

Die Gene aller bislang entdeckten β -Defensine sind in vier Clustern auf drei verschiedenen Chromosomen angeordnet: 6p12, 20q11.1, 20p13 und 8p23.1 (Pazgier et al., 2006). Das Cluster auf Chromosom acht beherbergt die Gene für alle α -Defensine sowie die β -Defensine eins bis sechs (Hollox et al., 2003). Detaillierte Analysen dieser Region entdeckten die Existenz eines Genkopiepolymorphismus sowohl für die α -Defensine, als auch unabhängig davon für die β -Defensine zwei bis vier. Dies bedeutet, dass die Anzahl an Genkopien für diese Moleküle interindividuell verschieden ist. Dabei existieren hinsichtlich der β -Defensine widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Frage, ob eine Variation immer pauschal alle Gene von DEFB4, DEFB103 und DEFB104 betrifft, oder auch separat nur in einzelnen dieser Gene auftreten kann, die Genkopiezahl von DEFB4, DEFB103 und DEFB104 also auch untereinander variieren kann (Chen et al., 2006; Hollox et al., 2003).

Der Grund für die hohe Komplexität und Variabilität dieses Chromosomenbereichs liegt in seinen flankierenden Regionen. Sowohl proximal als auch distal des Clusters 8p23.1 bestehen diese aus repetitiven Abschnitten genannt REPD und REDD, welche untereinander eine starke Homologie von 85-100% aufweisen (Sugarawa et al., 2003). Beim crossing-over während der Reifeteilung der Zelle kann es bevorzugt an diesen Stellen zu ungleicher homologer Rekombination kommen, wodurch Duplikationen, Deletionen oder auch Inversionen entstehen können (Giglio et al., 2001). Dies erklärt auch die mit 25% hohe Prävalenz einer submikroskopischen Inversion in diesem Bereich, welche selbst zwar keinen Krankheitswert besitzt, jedoch sehr wahrscheinlich das Risiko

für makroskopische und phänotypisch relevante Aberrationen der Folgegeneration erhöht (Giglio et al., 2001).

Für die β -Defensine zwei bis vier wurde eine Bandbreite von Genkopien von 2-12 pro diploidem Genom beobachtet, wobei Träger mit 9-12 Kopien äußerst selten sind und als euchromatische Varianten bezeichnet werden (Hollox et al., 2003). Die bislang publizierte Verteilungen der Genkopiefrequenzen zeigen jedoch kein einheitliches Bild. Chen et al. fanden als häufigste Variante für DEFB4 vier Genkopien, für DEFB103 drei und für DEFB104 zwei (Chen et al., 2006). Interessanterweise fand sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Genkopien von DEFB4 und der Expressionsrate der m-RNA des zugehörigen Defensins hBD-2, wobei Unterschiede in der Expression zu 50% über die Genkopievariation erklärt werden konnten (Hollox et al., 2003). Möglicherweise könnte ein solch starker Einfluss der Gendosis auf die Syntheserate der Defensine interindividuelle Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Infektionen erklären. So scheint eine geringe Anzahl an DEFB4 Genkopien gemeinsam mit anderen Faktoren die Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung im Kolon zu begünstigen (Fellermann et al., 2006). Ebenso gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den β -Defensinen und der Psoriasis sowie chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (Matsushita et al., 2002; Schutte und Mccray, 2002).

Sowohl die wichtige Rolle der Defensine in der primären Immunabwehr als auch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften begründen die Annahme, dass eine unterschiedliche Menge an Genkopien sowie folgend eine variierende Expressionsrate von grundlegender Bedeutung im Rahmen einer systemischen Entzündung, z.B. einer Sepsis sein könnte. So fand eine chinesische Studie einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im hBD-1 Gen und erhöhter Suszeptibilität sowie schlechterem Ausgang bei septischen Patienten (Chen et al., 2007). Zwar handelte es sich dabei um einen einzelnen Basenaustausch (SNP), dennoch kann man dieses Ergebnis als Indiz dafür werten, dass genetische Variationen der Defensine von Bedeutung für die Sepsis sein könnten.

1.8 Methodische Aspekte

Es existieren zurzeit verschiedene methodische Ansätze zur Quantifizierung der Kopiezahl von Genen. Während man im Bereich der Genotypisierung von SNP's bereits über längere Erfahrung in Bezug auf die Evaluation und Charakterisierung der unterschiedlichen Methoden verfügt, gilt dies für die Genkopiepolymorphismen noch nicht. Die Bedeutung dieser Form genetischer Variabilität wurde erst in den letzten Jahren zunehmend erkannt. Aus diesem Grund ist das Wissen um die Vorzüge und Nachteile der für diese Fragestellung existierenden Methoden derzeit begrenzt und lückenhaft. Ein Goldstandard zur Quantifizierung von Genkopien konnte bisher nicht definiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Genkopiezahl der β -Defensine drei und vier durch einen eigens für diese Fragestellung etablierten real-time PCR-Versuchsaufbau. Zum besseren Verständnis der im Diskussionsteil vorgestellten und diskutierten unterschiedlichen Literaturergebnisse soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die unterschiedlichen Quantifizierungsansätze auf diesem Forschungsgebiet gegeben werden. Ebenso sollen die Gründe zur Wahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten quantitativen real-time PCR-Methode erläutert werden.

Grundsätzlich existieren grobauflösende, genomweite Verfahren neben hochauflösenden, Lokus-spezifischen Methoden. Grobauflösende „Screening“-Verfahren suchen das gesamte Genom nach Genkopiepolymorphismen ab. Die resultierenden Kartierungen erlauben eine Vorstellung des Ausmaßes der CNV's sowie deren bevorzugte Lokalisationen im Gesamtgenom (Redon et al., 2006). Für diesen Zweck haben sich BAC-basierte Plattformen, die „comparative genomic hybridisation“ (CGH) und die Verwendung großer SNP-Chip-Plattformen bewährt (Freeman et al., 2006; Redon et al., 2006;). Allerdings ist keines dieser Verfahren geeignet für die hochauflösende Bestimmung der genauen Kopiezahl an einem spezifischen Genlocus. Für die detaillierte Beschreibung einzelner Genkopiepolymorphismen wurden bislang verschiedene Methoden vorgeschlagen. Die meisten von ihnen beruhen auf dem Prinzip, das in seiner Kopiezahl variable Gen mit einem invariablen Referenzgen zu vergleichen. Aus diesem Grund lässt sich bei allen Methoden, die sich dieses Prinzips bedienen, eine zunehmende Unschärfe im Bereich hoher Kopiezahlen beobachten, da die zu detektierenden relativen Unterschiede immer geringer werden. So berichten beispielsweise Armour et al. im Rahmen des „paralogue ratio test“ von einem Fehler unter 10% im Bereich niedriger Kopiezahlen, der jedoch auf 20-50% zunahm für Kopiezahlen größer oder gleich sechs (Armour et al., 2007).

Einen der ersten Ansätze im Rahmen der β -Defensin Quantifizierung bildete das „multiplex amplifiable probe hybridization“, kurz MAPH genannt. Hierbei erfolgt zunächst die Hybridisierung von Oligonukleotiden an die entsprechenden Bereiche der zu untersuchenden, fixierten DNA. Diese Bereiche liegen in den Genen, welche auf ihre Kopiezahl analysiert werden sollen. Wichtig ist die unterschiedliche Länge der verwendeten Sonden für ihre spätere elektrophoretische Auftrennung und Zuordnung zum jeweiligen Gen. Nach Waschen und Entfernen aller anderen Produkte werden die hybridisierten Sequenzen wieder aufgetrennt und die Sonden durch spezifische Primer amplifiziert. Dabei zeichnen sich alle verschiedenen Sonden durch dieselbe Primer-Sequenz aus und können folglich mit demselben Primerpaar amplifiziert werden. Dies dient der Minimierung unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen und erhöht die Genauigkeit der Methode. Nach Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff folgt die Auftrennung und Färbung der verschiedenen Sonden durch Elektrophorese, wo dank der unterschiedlichen Länge jeder einzelnen Sonde ein separater Balken auf dem Gel entsteht. Durch Messung der Signalintensitäten jeder Sonde und Normierung an den Intensitäten nahegelegener Referenzgene erfolgt die Bestimmung der Kopiezahl der interessierenden Gene. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, eine Vielzahl an verschiedenen Genen durch unterschiedliche Sonden in einem Ansatz untersuchen zu können sowie die Verwendung des gleichen Primerpaares mit identischer Amplifikationseffizienz für die unterschiedlichen Sonden. Nachteilig ist die bereits erwähnte zunehmende Ungenauigkeit der Quantifizierung im Bereich hoher Genkopiezahlen (Hollox et al., 2003). Außerdem erfordert das Fixieren der DNA, das Hybridisieren der Sonden, das Waschen, Amplifizieren, Auftrennen und die abschließende Elektrophorese eine Vielzahl von Arbeitsschritten, die den Durchsatz dieser Methode limitieren.

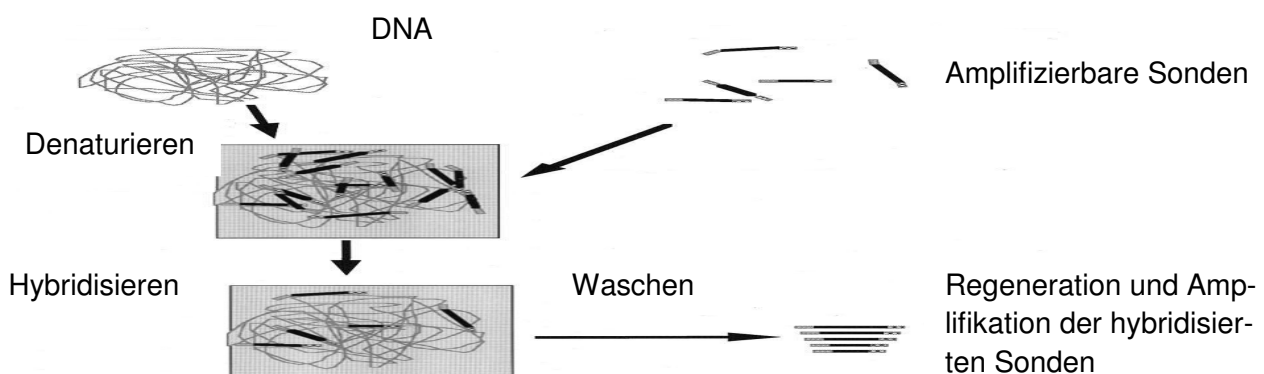


Abbildung 16: Schema der Arbeitsschritte des MAPH.

“Multiplex ligation dependent probe hybridization” (MLPA) stellt eine Weiterentwicklung der Methode MAPH dar. Auch hier werden spezifische Sonden unterschiedlicher Länge mit identischen Primersequenzen verwendet. Im Unterschied zu MAPH müssen die Sonden nach der Hybridisierung zunächst enzymatisch durch eine Ligase verbunden werden, bevor die Amplifikation und elektrophoretische Auftrennung erfolgt. Von Vorteil gegenüber MAPH ist der Verzicht auf Immobilisation der zu untersuchenden DNA sowie auf das sorgfältige Waschen und Entfernen nicht gebundener Sonden. Dies erleichtert die Anwendung besonders bei der Typisierung einer Vielzahl von Proben (Schouten et al., 2002).

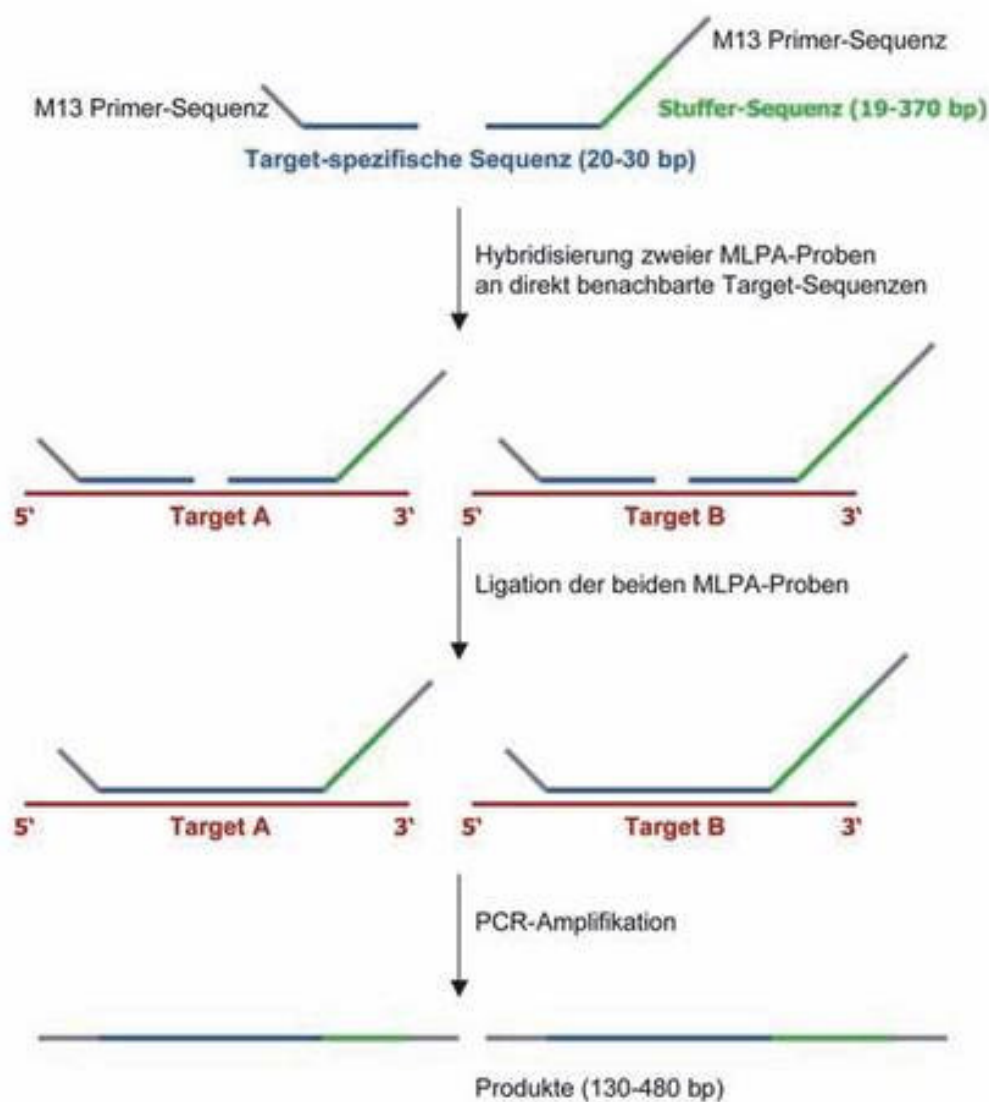


Abbildung 17: Prinzip des MLPA.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der β -Defensine drei und vier durch Verwendung der quantitativen real-time PCR. Diese Methode erwies sich in den vergangenen Jahren in der Quantifizierung verschiedenster Gene durch unterschiedliche Arbeitsgruppen als ein verlässliches und reproduzierbares Verfahren (Szilagyí et al., 2006; Taverniers et al., 2004; Tse et al., 2005; Wu et al., 2007). Es basiert auf der simultanen Amplifikation des Ziel- und eines Referenzgens mit Messung der PCR-Produkte über Fluoreszenzsignale nach jedem Zyklus, so dass eine charakteristische Kurve zunehmender Signalintensitäten sowohl für das Ziel- als auch das Referenzgen entsteht. Durch die Bestimmung des Cp-Wertes dieser Kurve und Standardisierung anhand des Referenzgens kann auf die Kopiezahl des Zielgens zurück geschlossen werden. Um potentielle Fehlerquellen dieses Verfahrens zu minimieren und die Versuchsparameter zu optimieren, wurden für diese Arbeit verschiedene Vorversuche durchgeführt. Durch Erstellung von Standardkurven sowohl für das Referenz- als auch das Zielgen wurde ein Korrekturkoeffizient ermittelt, der in den nachfolgenden PCR-Läufen die unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen von Ziel- und Referenzgen korrigierte. Desweiteren erfolgte die Bestimmung des Cp-Wertes der Fluoreszenzkurve mithilfe der Methode des Maximums der zweiten Ableitung, welche nach derzeitigem Wissensstand genauere Ergebnisse liefert als die sogenannte „fit point“-Methode (Chen et al., 2006). Zur Vermeidung von Messfehlern durch unspezifische Produkte erfolgte die Fluoreszenzmessung über spezifische Hybridisierungssonden, welche ausschließlich an die Sequenzen der jeweiligen Gene binden und somit eine hohe Spezifität garantieren. Zusätzlich wurde nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um unspezifische Produkte auszuschließen. Zur Evaluation des hier verwendeten Verfahrens erfolgten Messungen zur Intra- und Interassay-Variabilität sowohl für DEFB103 als auch für DEFB104.

1.9 Fragestellung dieser Arbeit

Es scheint heutzutage gesichert, dass die Entstehung und der Verlauf einer Sepsis entscheidend durch genetische Eigenschaften beeinflusst werden. Eine Identifizierung und Charakterisierung bedeutsamer genetischer Varianten und ihrer Auswirkung auf den septischen Prozess ist somit von großer Bedeutung für die künftige Diagnostik und Therapie auf den Intensivstationen. Die Zukunft liegt hier in der Bestimmung des individuellen genetischen Risikoprofils und der darauf abgestimmten, individualisierten Therapie.

Die vielfältige und weitreichende Rolle der Defensine sowohl als antimikrobielle Proteine als auch in der Koordination und Vernetzung der Immunabwehr ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden. Ebenso ist es eine neue Erkenntnis, dass die Anzahl an Genkopien einzelner Defensine in der normalen Bevölkerung stark variiert.

Folgende Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Unterscheidet sich die mittlere Kopiezahl an humanem β -Defensin drei oder vier zwischen einem Kollektiv septischer Patienten und einer Kontrollgruppe gesunder Probanden?
2. Wie stellt sich die natürliche Verteilung der Genkopiezahlen der beiden humanen β -Defensine drei und vier in der gesunden Population, gemessen an einem großen Untersuchungskollektiv, dar?
3. Ist eine intraindividuelle Variation der Genkopiezahlen von β -Defensin drei und vier zu beobachten oder verhalten sie sich konkordant?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Proben der septischen Patienten entstammten einer multizentrischen Studie zur Untersuchung der schweren Sepsis, jene der gesunden Probanden von freiwilligen Blutspenden. Deren Analyse und Auswertung im Rahmen dieser Fragestellung wurde von der Ethikkommission Bonn genehmigt (28.10.2003; Nr. 038/03). Für den Vergleich der Anzahl an DEFB104-Genkopien zwischen septischen Patienten und einer gesunden Kontrollpopulation umfasste diese Studie ein Gesamtkollektiv von 1004 Patienten und 566 gesunden Probanden, für DEFB103 betrug diese Zahlen 990, respektive 540. Die Proben der gesunden Kontrollen stammten aus dem Material freiwilliger Blutspenden, während die Proben des septischen Untersuchungskollektivs im Rahmen einer multizentrischen Studie zur Untersuchung genetischer Varianten bei schwerer Sepsis gewonnen wurden.

Einschlusskriterien

Kontrollkollektiv	Untersuchungskollektiv
<ul style="list-style-type: none"> • Alter \geq 18 Jahre • Höchstalter bei Erstspende 60 Jahre • Keine infektiösen Krankheiten 	<ul style="list-style-type: none"> • Alter \geq 18 Jahre • Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters • Diagnose einer schweren Sepsis (Definition s.u.)

Ausschlusskriterien

Kontrollkollektiv	Untersuchungskollektiv
<ul style="list-style-type: none"> • Alter \leq 18 Jahre • Alter bei Erstspende $>$60 Jahre • Infektiöse Krankheiten • Alter $>$ 68 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> • Alter $<$ 18 Jahre • Fehlende Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters • Schwangerschaft

2.2 Schwere Sepsis

Schwere Sepsis wurde hier gemäß den Kriterien der Konsensuskonferenz 1992 des American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definiert. Gemäß folgender Tabelle müssen zur Definition der schweren Sepsis die Kriterien 1 bis 3 vorliegen, also eine systemische Entzündungsreaktion aufgrund einer Infektion mit zusätzlicher Organdysfunktion.

1) Nachweis einer Infektion	2) SIRS (≥ 2 Kriterien erfüllt)	3) Organdysfunktion (≥ 1 Kriterium erfüllt)
Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen oder klinischen Nachweis	<ul style="list-style-type: none"> • Körpertemperatur >38 oder $<36^{\circ}\text{C}$ • Tachykardie: Herzfrequenz $>90/\text{min}$ • Tachypnoe: Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder Hyperventilation mit $\text{P}_a\text{CO}_2 <33\text{mmHg}$ • Leukozytose: >12.000 weiße Blutkörperchen/mm^3 oder Leukopenie ($<4000/\text{mm}^3$) oder $>10\%$ unreife Granulozyten 	<ul style="list-style-type: none"> • Hirnschädigung: verminderte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium • Thrombozytopenie: Thrombozyten $< 100.000/\text{mm}^3$ oder Abfall $>30\%$ innerhalb 24 Stunden • Hypoxie: $\text{P}_a\text{O}_2 <75\text{mmHg}$ oder $\text{P}_a\text{O}_2/\text{F}_i\text{O}_2$ -Verhältnis $<250\text{mmHg}$ unter O_2-Gabe • Diurese $\leq 0,5\text{ml}/\text{kgKG}/\text{h}$ für mind. 2 Stunden oder Anstieg Serumkreatinin auf mind. das Doppelte des üblichen Referenzbereichs • Metabolische Azidose: $\text{BE} < -5\text{mmol}$ oder Laktat 1,5-facher Wert des Referenzbereichs

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über einen peripher- oder bei den Intensivpatienten über einen zentralvenösen Zugang. Insgesamt wurde den Patienten ca. 20ml Blut abgenommen und in einem EDTA-Röhrchen gesammelt. Dies erfolgte beim Patientenkollektiv auf der Intensivstation und bei den gesunden Kontrollen im Rahmen der normalen Blutspende.

Probenaufbereitung

Die EDTA-Röhrchen wurden im Labor zentrifugiert und je 1000µl des Plasmaüberstandes in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese dann bei -20°C aufbewahrt.

DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem „QIAamp® DNA Mini Blood Kit“ (Qiagen, Hilden). Die gesamte Extraktionsprozedur umfasste drei Schritte:

1. Adsorption an die Säulenmembran
2. Beseitigung von übriggebliebenen Verunreinigung mit verschiedenen Waschpuffern und
3. Die Elution der reinen Nukleinsäuren.

Das Zentrifugieren der Säulen fand jeweils bei Raumtemperatur mit 13000 bzw. 8000 U/min statt.

Zu Beginn wurden die aufgetauten Proben kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen, 150µl TRIS Puffer zugegeben und gut vermischt. Nun wurden die Zellen in 20µl Proteinase und 200µl des AL-Lysepuffers aufgenommen und durch 15-sekündiges „vortexen“ lysiert. Durch genaue Einstellung der Salz- und pH-Werte des Lysats wurde sichergestellt, dass nur die Proteinstrukturen zerstört wurden, während die DNA unversehrt blieb. Hierauf erfolgte eine Erwärmung der Proben im Inkubator auf 56°C, bis nach 10 Minuten die Zellen vollständig aufgelöst waren. Nach Zugabe von 200µl Ethanol (95-100%) zur Fällung der DNA wurde wiederum 15 Sekunden „gevortext“ und kurz zentrifugiert (10 Sek bei 8000 U/min). Der Ansatz wurde dann auf die in einem 2ml Sammelröhrchen befindliche QIAamp®-Zentrifugationssäule gegeben. Diese Säule ist so konstruiert, dass die DNA-Partikel an ihr festhaften, während die restlichen Zellbestandteile während der Zentrifugation in das Sammelröhrchen tropfen. Sammelröhrchen samt Säule wurden

dann 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen platziert und mit 500µl des ersten Waschpuffers AW 1 (enthält 57% Ethanol) begossen. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 U/min wurde der Durchfluss wieder verworfen und die Säule erneut in ein Sammelröhrchen gestellt und 500µl des Waschpuffers AW 2 (enthält 70% Ethanol) zugegeben. Wiederum folgte eine Zentrifugation, diesmal für 3 Minuten bei 13000 U/min. Die Kombination beider Waschpuffer gewährleistet eine hohe Reinheit der gewonnenen DNA. Um auch den restlichen Puffer zu entfernen, wurde die trockene Säule für 1 Minute mit 100µl des AE-Elutionspuffers in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation mit 8000 U/min wurde dieser Vorgang wiederholt und gegebenenfalls noch ein drittes Mal, bis die Säule trocken war. Die daraus resultierenden Eluate enthielten die aufgereinigten Nukleinsäuren, die bei -20°C gelagert werden konnten.

Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei der Spektralphotometrie wird die Lichtabschwächung gemessen, die bei gleichbleibender Wellenlänge des Lichts von den Eigenschaften der Substanz im Strahlengang abhängig ist. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde im Spektralphotometer bei einer Absorption von 260nm analysiert, welches das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren ist. Zur Kalibrierung erfolgte zunächst ein Messvorgang mit einer Küvette, die mit autoklaviertem Wasser gefüllt war. Für die Konzentrationsmessung wurde die DNA dann 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt (5µl DNA auf 95µl Wasser) und in die Küvette gefüllt, die vor jeder neuen Messung mit Ethanol und autoklaviertem Wasser gereinigt wurde.

Die optische Dichte einer Probe (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm ist definiert als der Extinktionswert, der sich durch Absorptionsmessung der Probe in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke ergibt. Bei doppelsträngiger DNA ergibt sich aus empirischen Werten für eine OD von 1 eine DNA-Konzentration von 50µg/ml. Die Konzentration errechnet sich dann wie folgt:

$$c [\text{DNA}] = \text{OD}_{260} (\text{gemessen}) \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung}$$

Grundlage bildet hier das Lambert-Beer'sche-Gesetz:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

Diese Gleichung beschreibt die Tatsache, dass die Extinktion E einer Probe linear von der Konzentration c der gelösten Substanz sowie der Schichtdicke d der Küvette abhängt. ϵ beschreibt hier den molaren Extinktionskoeffizienten und ist für jede Substanz und Wellenlänge charakteristisch. Bei konstanter Schichtdicke d der Küvette ist die Extinktion daher proportional der Konzentration c der gelösten Substanz. Die Schichtdicke der Küvetten beträgt standardmäßig 1cm, daher ist die Extinktion E gleich der optischen Dichte.

Um den Grad der Verunreinigung zu bestimmen, wurde die OD zusätzlich bei 280nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen, sowie daraufhin der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Dieser sollte im Bereich zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf einen zu hohen Proteingehalt hin, während höheren Werten eine Denaturierung der DNA oder auch das Vorhandensein von RNA zugrunde liegen kann.

Wenn die gemessene DNA-Konzentration im gewünschten Bereich lag, konnten die Proben dann der eigentlichen Analyse, der quantitativen Echtzeit-PCR zugeführt werden.

2.3 Allgemeines Prinzip der PCR

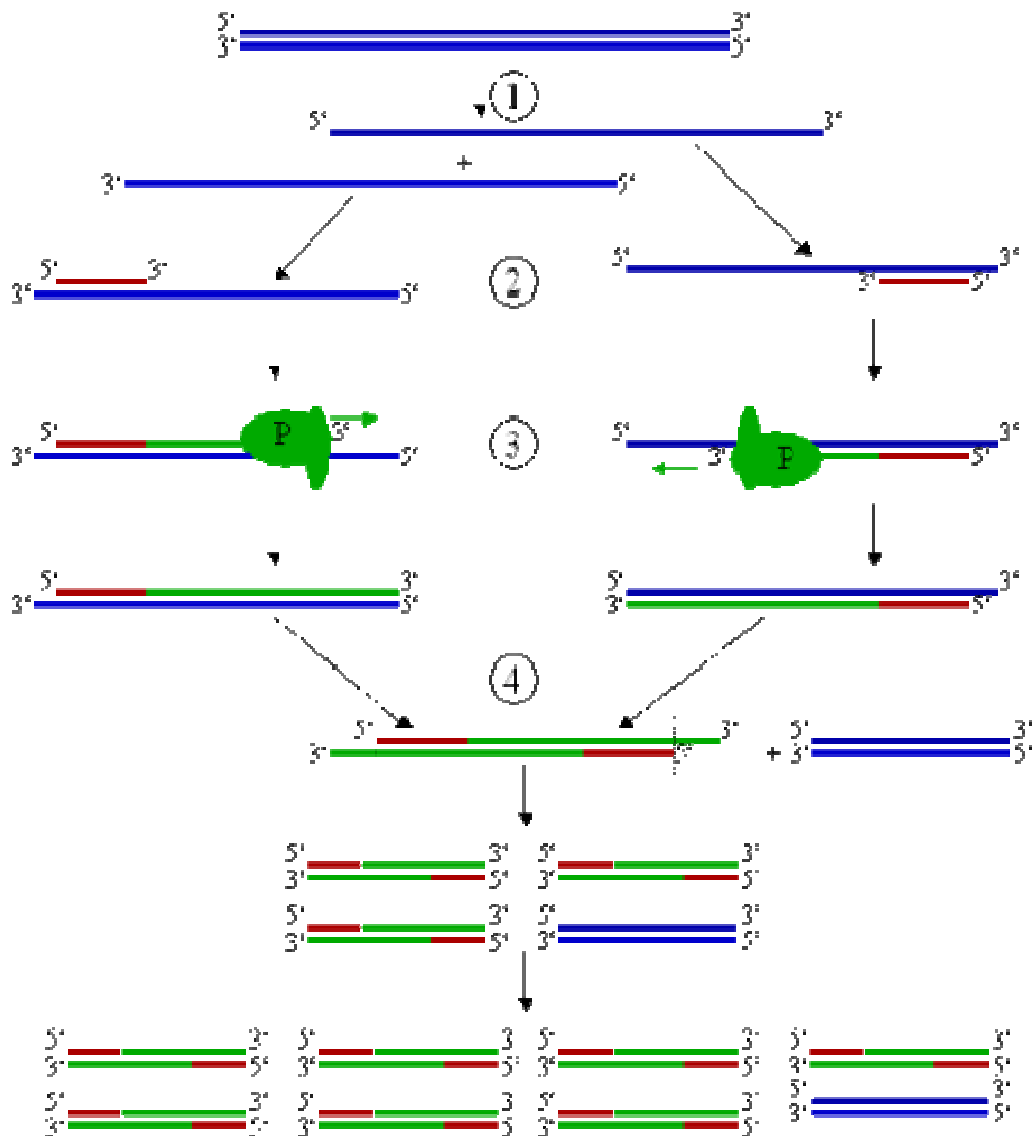


Abbildung 1: Allgemeines Prinzip der PCR, nach Markus Manske.

Die 1985 von Kary B. Mullis et al. und Saiki et al. entwickelte Polymerase-Kettenreaktion dient der zyklischen in-vitro Vermehrung spezifischer Nukleotidsequenzen. Dabei besteht jeder Zyklus aus dem thermischen Auftrennen (Denaturieren) der doppelsträngigen Ausgangs-DNA, dem Hybridisieren der Primer (Annealing) und der nachfolgenden Synthese komplementärer DNA-Sequenzen entlang der Einzelstrangmatrize (Extension). Das hierfür verwendete Enzym ist normalerweise eine hitzebeständige DNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte „Taq-Polymerase“, die aus dem thermophilen Bakterium „*Thermophilus aquaticus*“ isoliert wurde. Die

Primer bestehen aus Oligonukleotiden, die komplementär an die DNA binden und der DNA-Polymerase als Start- und Zielpunkte dienen. Sie werden so hergestellt, dass sie die zu vervielfältigende Zielsequenz einrahmen und somit spezifisch der gewünschte Abschnitt amplifiziert wird. Aufgrund der exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA verfügt diese Methode über eine hohe Sensitivität und ist in der modernen molekularbiologischen Forschung unverzichtbar geworden.

Quantitative Echtzeit-PCR („Real-time PCR“)

In der klassischen, qualitativen PCR wird in einem ersten Schritt die Zielsequenz zyklisch amplifiziert und die Produkte daraufhin auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der resultierenden Banden können unterschiedliche Produkte identifiziert und grob quantifiziert werden. Interessiert man sich hingegen mehr für die exakte und verlässliche Quantifizierung, also die Menge an Ausgangsmaterial, bietet sich die „Echtzeit-PCR“ oder „Real-time PCR“ als Verfahren der Wahl an, von dem im Rahmen dieses Versuches Gebrauch gemacht wurde. Der entscheidende Unterschied im Vergleich zur qualitativen PCR besteht darin, dass amplifizierte DNA-Sequenzen bereits während der einzelnen Zyklen der PCR durch fluoreszierende Farbstoffe sichtbar gemacht werden, die ihrerseits an Sonden angelagert sind. Durch diese „online-Fluoreszenzmessung“ nach jedem Zyklus ergibt sich eine charakteristische Kurve der Menge entstehender DNA-Produkte. Nimmt man nun einen definierten Punkt dieser Kurve, welcher je nach Ausgangsmenge früher oder später, also nach mehr oder weniger Zyklen erreicht wird, so kann man über die Zykluszahl auf die Ursprungsmenge an DNA rückschließen.

2.4 Prinzip der Fluoreszenzmessung

Für die Messung der Menge entstehender DNA-Produkte stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Fluoreszenzfarbstoffe wie Sybr-Green oder Sybr-Gold binden allgemein an doppelsträngige DNA-Strukturen und emittieren in dieser Form nach Anregung ein Fluoreszenzsignal energiereicherer Strahlung. Aufwändiger und teurer, aber auch wesentlich spezifischer ist die Verwendung fluorophormarkierter Sonden, auf die in diesem Versuch zurück gegriffen wur-

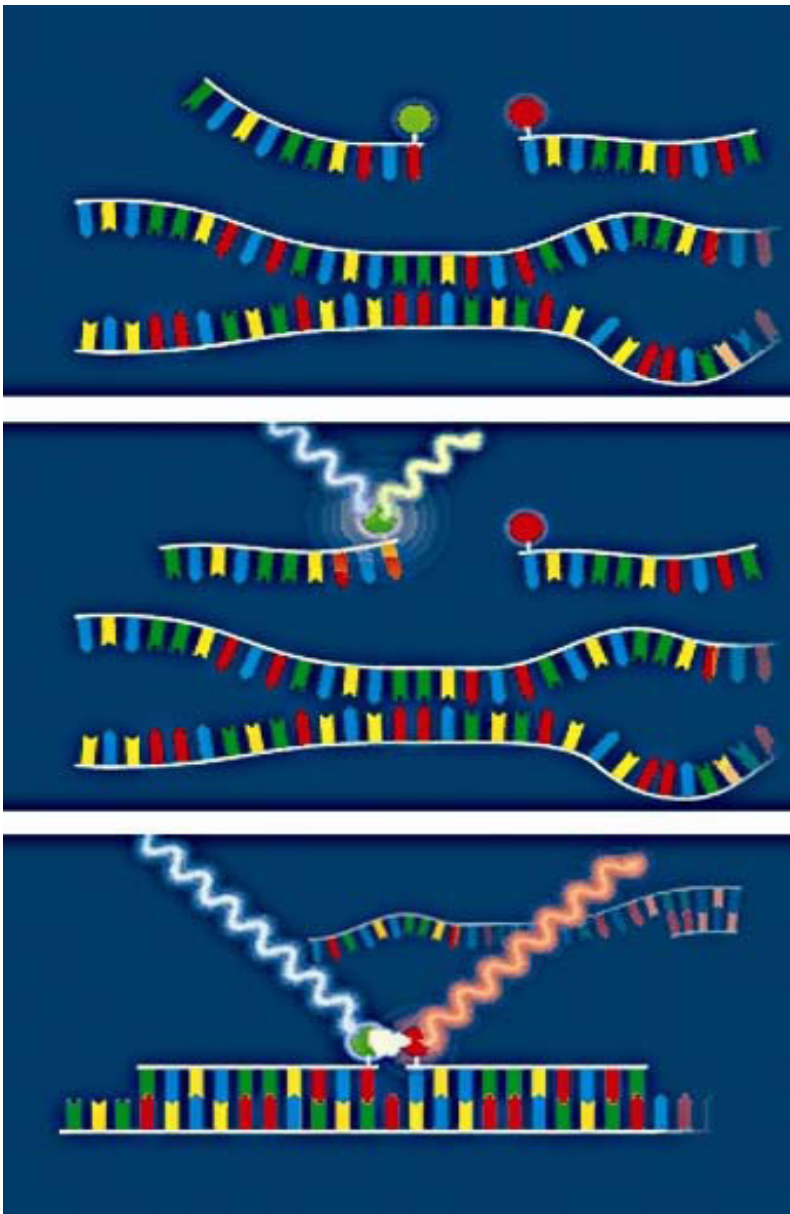


Abbildung 2: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mittels Hybridisierungssonden. Nach Roche Applied Science.

de. Dieses Sondensystem besteht aus einem Paar markierter Sonden, die an unmittelbar benachbarten Stellen auf der Zielsequenz binden. Die erste dieser Oligonukleotidsonden („Donorsonde“) ist am 3′-Ende mit Fluoreszein markiert, die zweite („Akzeptorsonde“) besitzt am 5′-Ende den Fluoreszenzfarbstoff „Light-Cycler[®]-red-640“ (LC-640, für DEFB104) oder „Light-Cycler[®]-red-705“ (LC-705, für humanes Serumalbumin als Referenzgen). Die Akzeptorsonde ist am 3′-Ende zusätzlich phosphoryliert, um eine automatische Kettenverlängerung zu vermeiden. Die Verwendung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (LC-640 und LC-705) ermöglicht die gleichzeitige Messung zweier verschiedener amplifizierter Gensequenzen in demselben Reaktionsansatz. In diesem Ver-

such wurden die Sonden so konstruiert, dass ihr Schmelzpunkt 5-10°C über dem der Primer lag. Mit einem Abstand von 1-5 Basenpaaren binden diese Sonden nach der Denaturierung zwischen den beiden Primern an komplementäre Sequenzen. Nur in dieser Form kommen Donor- und Akzeptorfluorophor in eine solche Nähe zueinander (10-100Å), dass ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen den Farbstoffen ermöglicht wird. Nach Anregung durch die Light-Cycler[®]-LED Lichtquelle transferiert der Spenderfarbstoff Fluoreszein einen Teil seiner Excitationsenergie mit einer Wellenlänge von 530nm auf den Empfängerfarbstoff LC-604 bzw.

LC-705. Dieser emittiert daraufhin Fluoreszenz geringerer Energie (640 bzw. 705nm), die unmittelbar durch den Light-Cycler[®] gemessen wird und deren Intensität direkt proportional der Menge an spezifischen DNA-Produkten ist. Durch die unterschiedliche Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz der beiden verschiedenen Akzeptorsonden kann zwischen den Signalen der verschiedenen Genprodukte unterschieden werden. Mit zunehmender Menge amplifizierter Sequenzen bindet eine größere Anzahl an Sonden, es findet mehr Energietransfer statt und das Fluoreszenzsignal nimmt zu.

Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden von TIB-MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert und als Lyophilisat geliefert. Dieses wurde in destilliertem Wasser gelöst, Gebrauchskonzentrationen von 10pmol/µl hergestellt und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Gen	Primer / Sonde	Sequenz der Primer und Sonden	Nukleotidposition	Genomische Organisation
DEFB103	DEFB103_A	5'-CACACTTTACAACACTCTCgTCATgT-3'	117,055-117,080	Exon2
	DEFB103_S	5'-CCTTCCTAAAACCTTTCCgTg-3'	117,278-117,258	Intron1
	DEFB103_FL	5'-gCAgCTgAgCACAgCACACCg-FL	117,160-117,180	Exon2
	DEFB103_LC	5'-LC640-CCgCCTCTgACTCTgCAATAATATTCTgT-PH	117,182-117,211	Exon2
DEFB104	DEFB104_A	5'-CAgCgACTCTAgggAcc-3'	5989-5973	Exon 2
	DEFB104_S	5'-ACAgTgCCATATCCTgTTATCT-3'	5774-5795	Intron 1
	DEFB104_FL	5'-CATgCTgTTTgAgAAAATgggAT-FL	5906-5928	Exon 2
	DEFB104_LC	5'-LC640-AgAgCTTACTgAATCgTACAAAACCCT-PH	5930-5956	Exon 2
ALB	ALB_F	5'-ggTCCTgAACCAgTTATgTg-3'	15,5542-15,561	Exon 12
	ALB_R	5'-TAAgggCAAACTCCAATAC-3'	15,884-15,865	Intron 12
	ALB_FL	5'-CATggTCgCCTgTTCACCAAggAT-FL	15,637-15,614	Exon 12
	ALB_705	5'-LC705-CTgTgCAgCATTgTgACTCTgTCA-PH	15,612-15,587	Exon 12

Tabelle 1: Sequenz und Position der verwendeten Primer und Sonden.

Um sicher zu stellen, dass ausschließlich genomische DNA amplifiziert wurde, erfolgte die Konstruktion der Primer-Paare derart, dass sie sowohl in Exon-Abschnitten als auch in Intron-Bereichen hybridisierten. In Vorversuchen mit einer Auswahl an verschiedenen Primern als auch unterschiedlichen Konzentrationen wurde für jedes Gen jene Primer-Kombination mit der höchsten Amplifikationsrate bzw. PCR-Effizienz ausgewählt. Die Schmelztemperatur der Primer lag 5-10°C unterhalb jener der Fluoreszenzsonden.

Vorbereiten des Reaktionsansatzes

Der Reaktionsansatz wurde in Glaskapillaren, die zuvor auf einem gekühlten und lichtgeschützten Metalladapter platziert wurden, vorbereitet. Die spezielle Form dieser Glaskapillaren mit einem hohen Oberfläche/Volumenverhältnis erlaubt eine schnelle Temperaturänderung von bis zu 20 Kelvin pro Sekunde, wobei die Temperaturverteilung im gesamten Probenvolumen sehr gleichmäßig ist.

Für alle Ansätze eines Laufes wurde in einem ersten Schritt ein einheitlicher „Mastermix“ vorbereitet. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe des Roche-Kits „LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe“ der Enzymansatz vorbereitet, zu dem dann in einem zweiten Schritt die spezifischen Primer und Sonden hinzugefügt wurden. Eine vorzeitige, unspezifische Vervielfältigung in diesem Ansatz wurde durch die in diesem Kit enthaltene „Fast-Start Taq DNA-Polymerase“ verhindert. Dieses Enzym wird bei Raumtemperatur durch hitzelabile Moleküle blockiert, und erst nach einer Prä-Inkubation über 5-10 Minuten bei 95°C (im PCR-Protokoll enthalten) aktiv. Durch Verwendung dieser „Hot-Start“ Methode wird eine hohe Spezifität und Sensitivität der PCR garantiert. Jede Kapillare enthielt folgende Zusammensetzung:

- *1× LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe*
- *4mM MgCl₂*
- *1000nM Albumin Vorwärts-Primer*
- *1000nM Albumin Rückwärts-Primer*
- *150nM Albumin Donorsonde*
- *150nM Albumin Akzeptorsonde*
- *100nM DEFB104 bzw. DEFB103 Donorsonde*

- *100nM DEFB104 bzw. DEF103 Akzeptorsonde*
- *200nM DEFB104 bzw. DEFB103 Vorwärts-Primer*
- *200nM DEFB104 bzw. DEFB103 Rückwärts-Primer*

Zuletzt wurde jeder Glaskapillare 10ng der jeweiligen Proben-DNA hinzugefügt, wobei jede Probe als Duplikat in zwei aufeinanderfolgenden Kapillaren gemessen wurde. Zusätzlich enthielt jeder Lauf einen Kalibrator und eine positive Kontrolle jeweils als Duplikat sowie eine einfache negative Kontrolle ohne DNA-Material. Das endgültige Reaktionsvolumen von 20µl wurde dann kurz bei 100 U/min zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen zu entfernen und den Reaktionsansatz in den unteren Teil der Glaskapillare zu befördern. So konnten die Kapillaren dann in das Probenkarussell des LightCyclers[®] eingebracht werden. In jedem Lauf enthielten die ersten beiden Positionen des Probenkarussells den Kalibrator, die vorletzten beiden Positionen die Positiv-Kontrollen und die letzte Position wurde mit der Negativ-Kontrolle bestückt. Dazwischen befanden sich die DNA-Proben der Patienten.

2.5 Aufbau des LightCyclers®

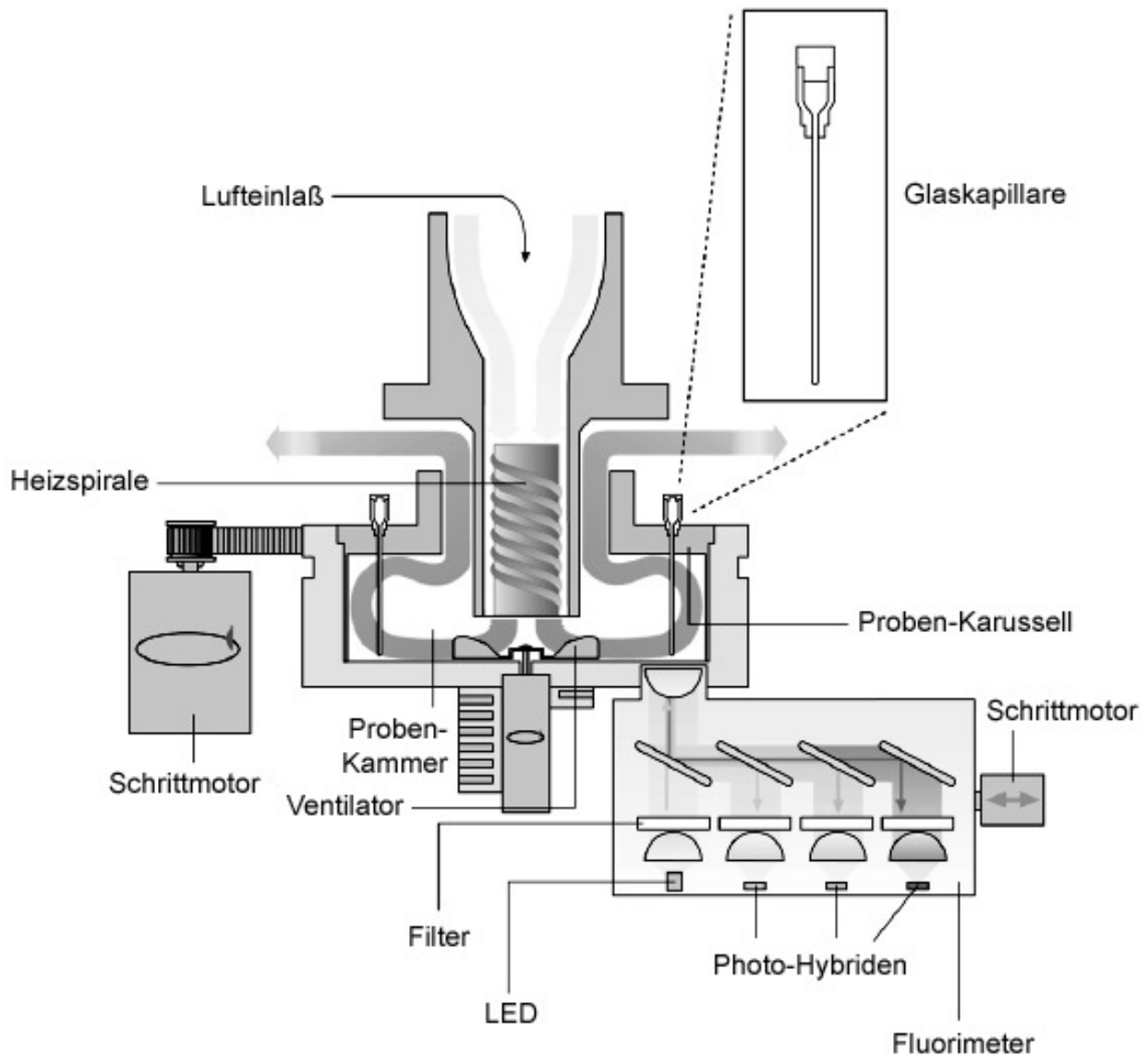


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Light-Cyclers®, modifiziert nach Roche Diagnostics (Bedienungsanleitung).

Als wesentliches Merkmal des LightCyclers® ermöglicht die Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter, Daten schon während der laufenden PCR in Echtzeit anzuzeigen und zu analysieren. Das Probenkarussell als zentrales Element fasst 32 Proben in Form der Glaskapillaren, die als Kuvetten für die fluorimetrische Bestimmung der gebildeten PCR-Produkte dienen. In der thermischen Kammer sorgt ein Ventilator für die gleichmäßig schnelle Ausbreitung der durch die Heizspirale in die Kammer geblasenen Luft. Die Energiequelle der optischen Fluoreszenzkomponente besteht aus einer blauen Diode, deren Licht mittels einer Spezialoptik auf 470nm Wellen-

länge gefiltert wird. Dieses Lichtbündel wird während der Messung auf die Proben in den einzelnen Glaskapillaren fokussiert. Bei Vorliegen spezifischer PCR-Produkte bewirkt das einfallende Licht einen Energietransfer (FRET) zwischen den hybridisierten Sonden. Das emittierte Fluoreszenzsignal der Akzeptorsonde wird über dichroitische Filter an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Die optische Einheit enthält drei Interferenzfilter für Licht der Wellenlängen von 530, 640 und 710nm, so dass eine simultane Detektion von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen mit den entsprechenden Emissionsmaxima möglich ist.

Da sich immer nur eine Glaskapillare über dem Linsensystem befinden kann, können die Proben nur sequenziell gemessen werden. Zur Messung einer Probe wird das Probenkarussell mit Hilfe eines Schrittmotors so gedreht, dass die Glaskapillare mit der zu messenden Probe zentrisch über dem Linsensystem positioniert wird. Die Fluoreszenz kann entweder einmal pro Zyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden oder in Form eines kontinuierlichen Messvorgangs, zum Beispiel zum Erstellen einer Schmelzkurve.

Ein gesamter Lauf benötigte 60 Minuten und folgte dem nachfolgenden Protokoll.

	Temperatur	Zeit (sek)	Zyklen
Prä-Inkubation	95°C	600	1
Denaturierung	95°C	5	45
Annealing	59°C	8	45
Extension	72°C	8	45

Table 2: Protokoll der real-time-PCR.

Im Anschluss an einen vollendeten Lauf folgte eine Schmelzkurvenanalyse, um während der Amplifikation entstandene, unspezifische Produkte zu identifizieren. Dazu wird von einem Ausgangswert von 45-60°C die Temperatur kontinuierlich um 0,1°C pro Sekunde erhöht bis zum Erreichen von 95°C. Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgte hier im kontinuierlichen Modus. Beim Überschreiten der Schmelztemperatur kommt es zum Ablösen der Sonden und Abbruch des Fluoreszenzsignals. Dieser Schmelzpunkt ist für jede Sonde und jedes Amplifikat charakteristisch und unspezifische oder fehlerhafte Bindungen resultieren in einer veränderten Schmelzkurve.

2.6 Prinzip der relativen Quantifizierung

Prinzipiell existieren Methoden zur absoluten und zur relativen Quantifizierung von Genen. Die relative Quantifizierung dient dazu, Effizienzschwankungen der PCR sowie Unterschiede in der Qualität und Quantität der einzelnen DNA-Proben zu kompensieren. Für diesen Versuch wurde der Ansatz der relativen Quantifizierung verwendet und die Menge der DEFB103- bzw. DEFB104-Gene mit dem Gen des humanen Serumalbumins (ALB) als Referenzgen normalisiert. Das Albumin-Gen ist konstant nur einmal pro Chromosom vorhanden, bei einem normalen diploiden Chromosomensatz also mit zwei Genkopien vertreten. Dies ist Voraussetzung dafür, dass über diese „Referenz“ durch das in der PCR gemessene Verhältnis von Ziel- zu Referenzgenmenge auf die Anzahl von Zielgenkopien geschlossen werden kann. Während der PCR wird folglich als sogenannte „interne Kontrolle“ in jedem Reaktionsansatz parallel zum Zielgen das Referenzgen amplifiziert. Unterschiede zwischen den Ansätzen in Bezug auf die Menge an Ausgangsmaterial oder auch die qualitative Aufbereitung der DNA werden durch diesen internen Standard korrigiert.

Um Werte aus verschiedenen PCR Läufen miteinander vergleichen zu können, wird ein Kalibrator benötigt, der in jedem Lauf in einem eigenen Ansatz amplifiziert wird. Dieser enthält ein konstantes Verhältnis von Ziel- zu Referenzgen. Für diesen Versuch wurde sowohl für die DEFB103 als auch für DEFB104 als Kalibrator ein Plasmid verwendet, in den je eine Kopie des Zielgens (DEFB103 bzw. DEFB104) sowie des Referenzgens Albumin geklont worden waren. Das Verhältnis der Cp-Werte (siehe unten) von Zielgen zu Referenzgen des Kalibrators konnten somit in jedem Lauf gleich eins gesetzt werden. Konstante Unterschiede in der Detektion von Ziel- und Referenzgen wurden dadurch ebenfalls kompensiert.

Cp-Wert und Effizienz

Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf folgender grundlegender PCR-Gleichung:

$$N = N_0 \times E^{Cp}$$

N= Molekülzahl zu einem bestimmten Zyklus

N₀= ursprüngliche Molekülzahl

E= Amplifikationseffizienz

Cp= Zyklusanzahl am „crossing point“ (Schwellenwert)

Anstelle absoluter Werte für N₀ erhält man im Rahmen der relativen Quantifizierung als Ergebnis einen Verhältniswert von Zielgen zu Referenzgen, aus dem man aufgrund des mengenmäßig konstanten Vorkommens des Referenzgens auf die Kopiezahl des Zielgens schließen kann. Dieser Verhältniswert ist eine Funktion der PCR-Effizienz und dem Cp-Wert und erfordert keine Bestimmung der absoluten Kopiezahl des Zielgens. Die jeweilige PCR-Effizienz muss also bekannt sein und der Cp-Wert aus den Messungen ermittelt werden.

Bestimmung des Cp-Wertes

Wird die Intensität der einzelnen durch den LightCycler® erhobenen „online-Fluoreszenzmessungen“ gegen die Anzahl an PCR-Zyklen aufgetragen, ergibt sich eine charakteristische Kurve (s. Abbildung 4). Die Form dieser Kurve besteht immer aus einem leicht steigenden Anfangsteil mit linearem Trend, einer exponentiellen Phase und einer abschließenden Plateauphase, bei der die Akkumulation der Produkte die Reaktion zunehmend behindert. Der Übergang von linearer zu exponentieller Phase wird als „crossing point“ (Cp) bezeichnet. Die zu diesem Zeitpunkt gemessene Menge einer beliebigen DNA ist am ehesten proportional zur initialen DNA-Menge. Beim Erreichen dieses Schwellenwertes befindet sich in jedem Ansatz dieser Reaktion die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist, um diesen Punkt im jeweiligen Ansatz zu erreichen, variiert in Abhängigkeit der ursprünglich

vorhandenen DNA-Menge. Ist viel Ausgangsmaterial vorhanden, sind weniger Amplifikationszyklen nötig und umgekehrt. Um also auf die Menge ursprünglicher DNA schließen zu können, muss für jeden Ansatz der C_p -Wert ermittelt werden. Eine besonders genaue Berechnung des C_p -Wertes mit geringer Standardabweichung wurde in diesem Versuch durch die Bestimmung des Maximums der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve sicher gestellt.

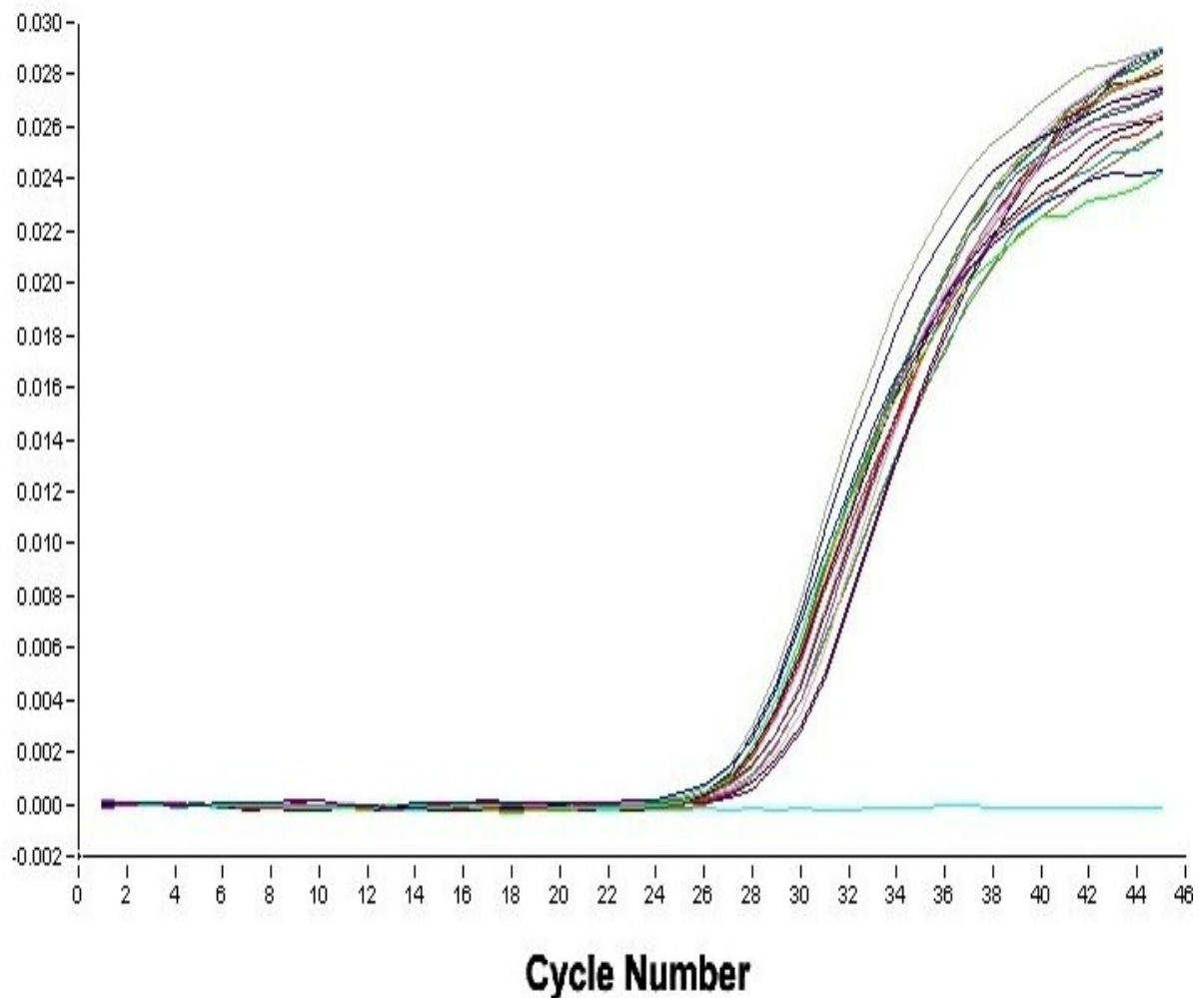


Abbildung 4: graphische Darstellung eines real-time-PCR Laufes. Die Anzahl an PCR-Zyklen ist gegen die Fluoreszenzmessung aufgetragen. Anhand der unterschiedlichen Farben kann für jede Probe der Übergang zur exponentiellen Phase ermittelt werden. Dies entspricht dem C_p -Wert. Die negative Kontrolle (hellblau) zeigt keinen Anstieg der Fluoreszenz.

PCR-Effizienz

Wie zuvor dargelegt, kann durch Normalisierung mit dem Referenzgen und dem Kalibrator eine Vielzahl störender Variablen kompensiert werden. Eine potentielle Fehlerquelle bleibt aber durch etwaige Unterschiede in den PCR-Effizienzen bestehen.

Effizienz beschreibt in diesem Fall die kinetischen Eigenschaften der Reaktion, welche sich zwischen Ziel- und Referenzgen unterscheiden. Im optimalen, theoretischen Fall beträgt die Effizienz 2, d.h. dass in jedem Zyklus die vorhandene Menge an Gensequenzen verdoppelt wird. Für diese Annahme lautet die PCR-Gleichung:

$$N = N_0 \times 2^n$$

n steht in diesem Fall für die Anzahl an Amplifikationszyklen. In der Realität liegt die Effizienz jedoch aufgrund von Störfaktoren unter 2 und unterscheidet sich für jedes Gen und jede neue Kombination verwendeter Primerpaare. Jedoch können auch unterschiedliche Konzentrationen an Ausgangsmaterial die PCR-Effizienz für ein und dasselbe Gen beeinflussen. Wird dies nicht berücksichtigt, können geringe Unterschiede in der Effizienz zu großen Fehlern bei der Berechnung der quantitativen Verhältnisse führen. Folgende Tabelle veranschaulicht dies:

Crossingpoint PCR-Effizienz	10	20	30
2,00	-	-	-
1,97	16%	35%	57%
1,95	29%	66%	113%
1,90	67%	179%	365%
1,80	187%	722%	2260%
1,70	408%	2480%	13000%

Tabelle 3: systematischer Fehler bei einer PCR-Effizienz ungleich zwei. Nach Roche Applied Science Technical Note No. LC 13/2001.

Die schattierte Zeile in Tabelle 3 zeigt, dass bei einem Unterschied von 0,05 in der PCR-Effizienz zwischen Ziel- und Referenzgen das errechnete Endergebnis nach 30 Zyklen doppelt so hoch ist wie in Wirklichkeit. Um diese verschiedenen PCR-Effizienzen zu berücksichtigen, wurden im Rahmen von Vorversuchen Standardkurven aus PCR-Reaktionen von Verdünnungsreihen sowohl für das Ziel- als auch das Referenzgen erstellt. Aus diesen Kurven berechnete sich dann ein Koeffizient, der nachfolgend in den Rechenprozess zur Quantifizierung integriert wurde und somit die unterschiedlichen PCR-Effizienzen von Albumin- und DEFB103- bzw. DEFB104-Gen kompensierte.

2.7 Datenauswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte über die „LightCycler® Software 3.5“ sowie die „LightCycler® Relative Quantification Software 1.0“. Zunächst errechnete die Light Cycler® Software 3.5 die Cp-Werte der einzelnen Messungen. Diese Werte wurden dann in die Relative Quantification Software exportiert, durch welche die relative Quantifizierung in zwei Schritten erfolgte:

- 1.: Das Verhältnis von Ziel- zu Referenzgen wurde für jede Probe und für den Kalibrator bestimmt.
- 2.: Der Verhältniswert jeder Probe wird durch den Verhältniswert des Kalibrators dividiert. Dieser Schritt gleicht unterschiedliche Sensitivitäten in der Erkennung von Ziel- und Referenzgen aus.

Das errechnete Ergebnis bestand in einem Verhältniswert, der sich auf Basis folgender Gleichung berechnete:

$$\text{Verhältnis} = \frac{cT(S)}{cR(S)} : \frac{cT(C)}{cR(C)} = E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$$

C=Konzentration; T=Ziel-Gen; R=Referenz-Gen ;S=unbekannte Probe; C=Kalibrator; E=PCR-Effizienz;

Da das Verhältnis von Defensin-Kopiezahl zu Albumin-Kopiezahl des Kalibrators gleich eins war, bedeutete ein probenspezifischer Quotient von z.B. zwei, dass in der Probe bezogen auf Albumin eine zweimal höhere DNA-Menge an DEFB103 bzw. DEFB104 vorlag, als im Kalibrator. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes mit zwei Albumin-Genkopien pro Genom konnte man somit auf vier Genkopien an DEFB103 bzw. DEFB104 dieser spezifischen Probe schließen.

Voraussetzung für die Verwendung der Ergebnisse jedes PCR-Laufes war eine gültige positive Kontrolle. Die positive Kontrolle bestand aus genomischer DNA mit einem bekannten Defensingen- zu Albumingenquotienten von zwei für DEFB103 und 1,5 für DEFB104. Ein PCR-Lauf wurde nur dann ausgewertet, wenn der Mittelwert beider Ergebnisse dieser Positiv-Kontrolle zwischen 1,75 und 2,19 für DEFB103 oder zwischen 1,26 und 1,75 für DEFB104 lag.

War diese Erfordernis gegeben, erfolgte die Auswertung der Probenergebnisse nach folgendem Schema: Zunächst wurde der Mittelwert der Ergebnisse aus den Duplikaten gebildet und anhand folgender Richtlinien die Kopiezahl dieser Probe bestimmt:

Verhältnis Ziel- zu Referenzgen	Kopiezahl (haploid)	Kopiezahl (diploid)
0,26 – 0,69	0,5	1
0,75 – 1,19	1	2
1,26 – 1,75	1,5	3
1,75 – 2,19	2	4
2,26 – 2,75	2,5	5
2,75 - 3,19	3	6

Tabelle 4: Zuordnung der Quotienten von Ziel- zu Referenzgen zu diskreten Genkopiezahlen.

Analog dieser skizzierten Vorgehensweise erfolgte die Bestimmung der Genkopiezahlen von DEFB103 und DEFB104 aller Patienten sowie der Kontrollen. Mittelwerte, welche außerhalb der in der Tabelle angegebenen Wertebereiche lagen, wurden als nicht eindeutig quantifizierbar gewertet und in einem zweiten Lauf wiederholt. Einzelne Proben, die sich wiederholt als nicht quantifizierbar erwiesen, wurden verworfen.

2.8 Statistische Auswertung

Alle Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS für Windows (Version 15) durchgeführt. Die Verteilungen des Gesamtkollektivs sowie der Untergruppen der Patienten und gesunden Probanden wurden sowohl für DEFB104 als auch für DEFB103 auf Normalverteilung überprüft. Aufgrund des großen Stichprobenumfangs war dieser Test für alle Verteilungen positiv, so dass in der weiteren statistischen Analyse von normalverteilten Daten ausgegangen werden konnte, welche durch den Mittelwert und die Standardabweichung charakterisiert wurden. Zusätzlich wurde der Median angegeben.

Für den Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Verteilungen wurde der t-Test für normalverteilte Zufallsvariablen verwendet. Die Prüfung erfolgte für jede Fragestellung sowohl ein- als auch zweiseitig. Für die Prüfung der Homogenität der Varianzen wurde der F-Test herangezogen.

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl an DEFB103 und DEFB104-Genkopien erfolgte eine lineare Regressionsanalyse mit Testung des Korrelationskoeffizienten auf statistische Signifikanz.

Die Berechnung des Variationskoeffizienten erfolgte wie unter 3.2 angegeben.

Bei allen statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Datenauswertung

Für DEFB104 wurden insgesamt 1004 Proben septischer Patienten und 566 Proben gesunder Kontrollen mit Hilfe der quantitativen real-time PCR auf die Anzahl an Genkopien untersucht. In die statistische Analyse flossen die Daten von 656 septischen Patienten und 503 gesunden Probanden ein. Für DEFB103 konnten von 990 Proben septischer Patienten 706 erfolgreich typisiert werden, von ursprünglich 540 Kontrollproben konnten die Ergebnisse von 477 ausgewertet werden.

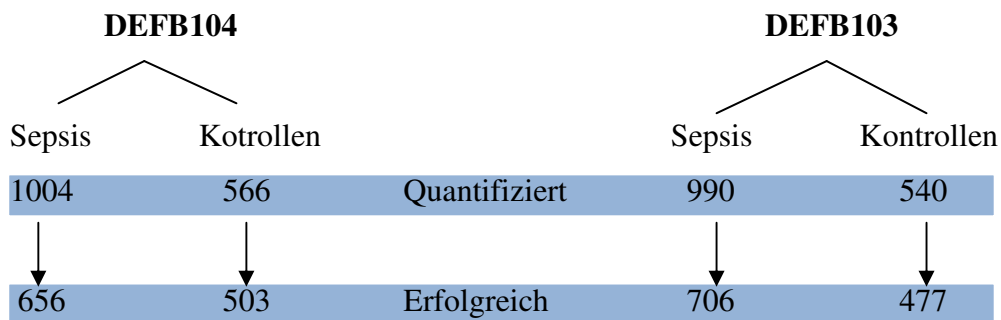


Abbildung 5: Flussdiagramm der Datenauswertung.

Gründe für eine fehlgeschlagene Typisierung der DNA-Kopien waren im Einzelnen:

- Mangelhafte DNA-Qualität
- Zu geringe DNA-Konzentration
- Versagen der Positivkontrolle
- Ergebnisse außerhalb der Wertebereiche des Auswertungsschemas
- Cp-Wert außerhalb des linearen Messbereiches

Ursache für den geringeren Quantifizierungserfolg der Sepsis-Proben war die schlechtere Qualität der über einen längeren Zeitraum gelagerten DNA im Vergleich zu den Proben der gesunden Kontrollprobanden.

3.2 Intra- und Interassay Variabilität

Die Intraassay-Variabilität beschreibt die Streuung der Werte bei wiederholten Messungen innerhalb eines Experimentes. Zur Bestimmung wurden jeweils Duplikate von 23 Proben in einem Lauf für DEFB104 sowie für DEFB103 quantifiziert und der Variationskoeffizient berechnet. Der Variationskoeffizient ist eine standardisierte Maßzahl der Streuung und kann somit zu allgemeinen Vergleichen heran gezogen werden. Er berechnet sich aus der Standardabweichung und dem arithmetischen Mittelwert wie folgt:

Variationskoeffizient = Standardabweichung / arithmetischer Mittelwert

Der Variationskoeffizient für die Intraassay-Variabilität rangierte dabei von 0% bis 8% für DEFB103 und zwischen 0% bis 7% für DEFB104. Diese Werte deuten auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines PCR-Laufes hin.

Analog beschreibt die Interassay-Variabilität die Streuung der Messwerte in verschiedenen PCR-Läufen. Auch hierfür wurden 23 Proben jeweils für DEFB103 und DEFB104 an zwei unterschiedlichen Tagen gemessen und der Variationskoeffizient errechnet. Für DEFB103 ergab sich ein Bereich zwischen 0,7% bis 12% und für DEFB104 zwischen 0% bis 7%. Auch hinsichtlich unterschiedlicher Messzeitpunkte zeigte sich also eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit. Tabellen 5 und 6 zeigen die Variationskoeffizienten für die Intra- und Interassay-Variabilität von DEFB103 und DEFB104.

Probe	1. Lauf	2. Lauf	CV intraassay	1. Tag	2. Tag	CV inter-assay
RC31	2,01	1,97	0,014	1,99	1,84	0,055
RC38	1,43	1,42	0,004	1,425	1,28	0,075
RC40	1,41	1,41	0	1,41	1,31	0,051
RC42	0,99	0,88	0,083	0,935	1,115	0,124
RC46	1,41	1,41	0	1,41	1,255	0,082
RC56	0,95	0,9	0,038	0,925	0,915	0,007
RC66	1,06	1,01	0,034	1,035	0,97	0,045
RC81	1,59	1,46	0,06	1,525	1,615	0,04
RC86	1,55	1,41	0,066	1,48	1,45	0,014
RC109	1,98	1,98	0	1,98	1,75	0,087
RC112	1,5	1,57	0,032	1,535	1,615	0,035
RC121	2	1,99	0,003	1,995	1,92	0,027
RC134	1,51	1,58	0,032	1,545	1,56	0,006
RC166	0,94	0,97	0,022	0,955	0,94	0,011
RC202	2,06	1,95	0,038	2,005	1,835	0,062
RC205	1,54	1,54	0	1,54	1,395	0,069
RC218	1,55	1,49	0,027	1,52	1,315	0,102
RC225	1,56	1,55	0,004	1,555	1,52	0,016
RC234	1	1,09	0,06	1,045	1,075	0,02
RC241	1,04	0,95	0,063	0,995	1,08	0,057
SS2098	1,86	2,08	0,078	1,97	1,785	0,069
GS4303	1,34	1,33	0,005	1,335	1,45	0,058
YK4411	1,01	1	0,007	1,005	1,175	0,11

Tabelle 5: Intra- und Interassayvariabilität für DEFB103. CV= Variationskoeffizient.

Probe	1. Lauf	2. Lauf	CV intraassay	1. Tag	2. Tag	CV inter-assay
RC30	0,96	0,92	0,030	0,94	0,94	0
RC34	1,07	1,03	0,027	1,05	1,08	0,020
RC36	1,07	1,04	0,020	1,055	1,095	0,026
RC58	1,47	1,42	0,024	1,445	1,495	0,024
RC65	1,43	1,38	0,025	1,405	1,38	0,013
RC78	0,99	1	0,007	0,995	1,06	0,045
RC83	0,99	1,07	0,055	1,03	1,145	0,075
RC90	1,45	1,47	0,010	1,46	1,35	0,055
RC92	1,53	1,43	0,048	1,48	1,435	0,022
RC97	1,49	1,42	0,034	1,455	1,38	0,037
RC104	1,49	1,49	0	1,49	1,345	0,072
RC111	1,03	1	0,021	1,015	0,93	0,062
RC124	1,41	1,52	0,053	1,465	1,325	0,071
RC126	0,97	1,06	0,063	1,015	0,97	0,032
RC140	1,04	1,05	0,007	1,045	1,1	0,036
RC150	1,39	1,5	0,054	1,445	1,385	0,030
RC154	1,39	1,35	0,021	1,37	1,43	0,030
RC179	1,49	1,39	0,049	1,44	1,375	0,033
RC205	1	0,97	0,022	0,985	0,97	0,011
RC252	1,39	1,43	0,020	1,41	1,285	0,066
RC255	1,42	1,35	0,036	1,385	1,355	0,015
RC263	1,05	0,95	0,071	1	0,945	0,040
RC293	0,99	1,04	0,035	1,015	0,995	0,014

Tabelle 6: Intra- und Interassayvariabilität für DEFB104. CV= Variationskoeffizient.

3.3 Verteilungen der Genkopiezahlen im Gesamtkollektiv

Die methodische Auswertung aller Ergebnisse für DEFB104 und DEFB103 ergab folgende Werte:

Genkopien	Mittelwert	Spannweite	SD	CV (%)	Genotypfrequenz
1	0,62	0,57-0,65	0,03	5,03	0,5% (6/1183)
2	1,04	0,76-1,19	0,1	9,78	15,8% (187/1183)
3	1,46	1,26-1,69	0,12	7,92	60,2% (712/1183)
4	1,93	1,76-2,18	0,11	5,63	20,9% (247/1183)
5	2,40	2,28-2,65	0,09	3,89	2,03% (24/1183)
6	2,94	2,77-3,19	0,15	4,99	0,6% (7/1183)

***Tabelle 7:** Methodische Auswertung und Genotypfrequenzen für DEFB103 aus dem Gesamtkollektiv. SD=Standardabweichung, CV= Variationskoeffizient.*

Genkopien	Mittelwert	Spannweite	SD	CV (%)	Genotypfrequenz
1	0,63	0,49-0,69	0,06	9,91	2,33% (27/1158)
2	1,04	0,76-1,19	0,12	11,56	63,21% (732/1158)
3	1,46	1,26-1,68	0,10	7,28	32,56% (377/1158)
4	1,93	1,76-2,07	0,09	4,60	1,90% (22/1158)

***Tabelle 8:** Methodische Auswertung und Genotypfrequenz für DEFB104 aus dem Gesamtkollektiv. SD=Standardabweichung; CV= Variationskoeffizient.*

Analog der Abbildung 5 umfasste das Gesamtkollektiv (septische Patienten und gesunde Probanden) für DEFB103 1183 Proben während 1158 Proben das Gesamtkollektiv von DEFB104 bilden.

Wie in Abbildung 6 ersichtlich, ergab die Analyse der Genotypfrequenzen im Gesamtkollektiv der septischen Patienten sowie der gesunden Kontrollen für DEFB103 eine Anzahl von drei Genkopien mit 60,2% als häufigsten Genotyp. Es folgten mit einer Häufigkeit von 20,9% vier Genkopien und mit 15,8% zwei Genkopien. Fünf Genkopien fanden sich bei 2,03% und sehr selten zeigten sich Genotypen mit einer bzw. sechs Genkopien, welche mit Frequenzen von 0,5% bzw. 0,6% auftraten.

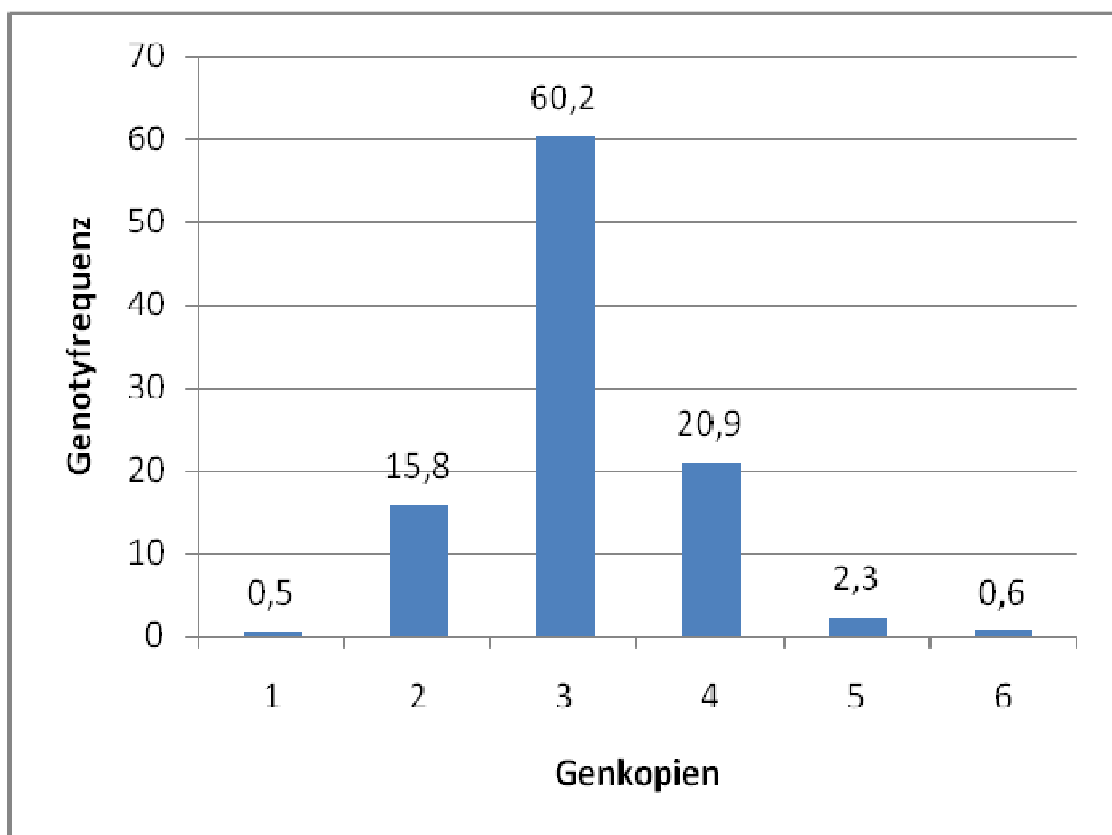


Abbildung 6: Genotypfrequenzen in Prozent von DEFB103 des Gesamtkollektivs mit $n=1183$. Mittelwert=3,1; Standardabweichung=0,36, Median=3.

Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass für DEFB104 zwei Genkopien mit 63,21% den häufigsten Genotyp bildeten, gefolgt von drei Genkopien mit 32,56%. Eine und vier Genkopien stellten mit 2,33% und 1,9% seltene Befunde dar. Im Gegensatz zu DEFB103 wurden Genotypen mit fünf oder sechs Kopien nicht beobachtet.

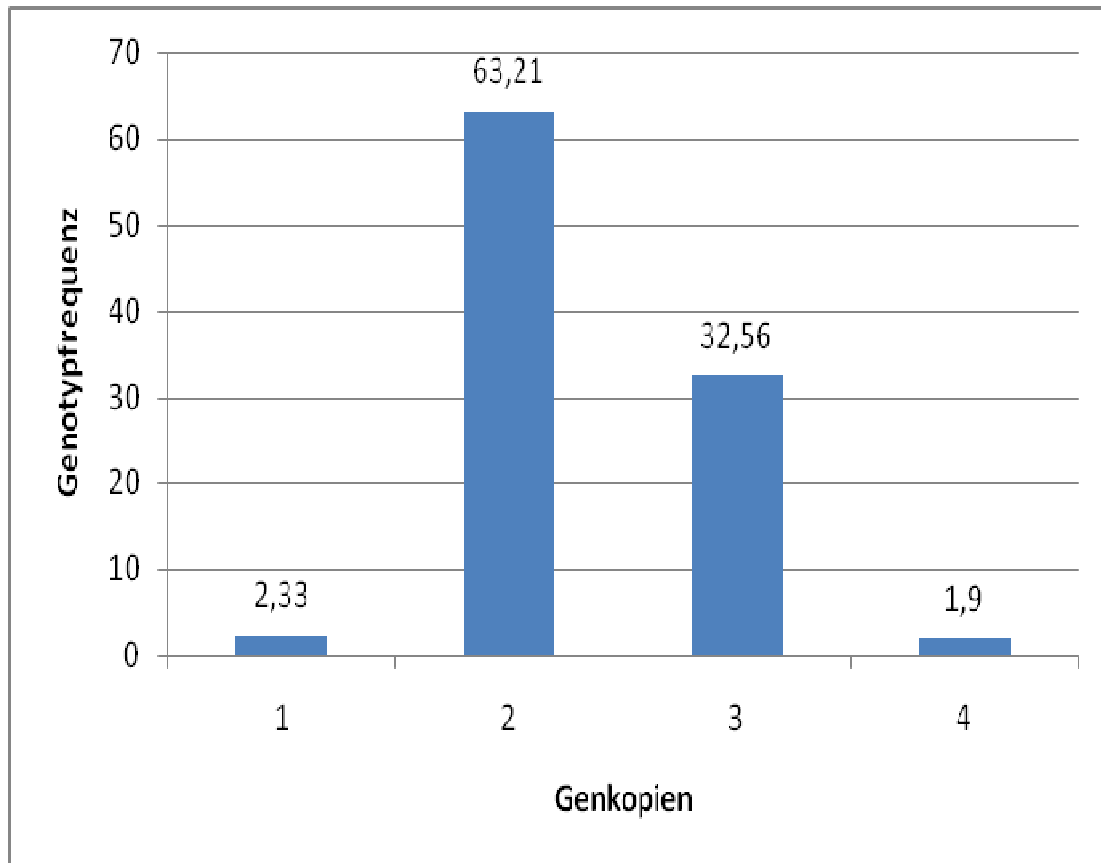


Abbildung 7: Genotypfrequenzen in Prozent von DEFB104 des Gesamtkollektivs mit $n=1158$. Mittelwert=2,3; Standardabweichung=0,28; Median=2.

3.4 Vergleich des Sepsis-Kollektivs mit dem Kontrollkollektiv

Der Vergleich der Verteilung der Genotypfrequenzen von DEFB103 zwischen dem septischen Patientenkollektiv und den Kontrollprobanden ist in Abbildung 8 dargestellt und zeigte keine signifikanten Unterschiede. Beide Verteilungen bestätigten die für das Gesamtkollektiv ermittelten Werte. Der T-Test für den Vergleich der Mittelwerte der Genkopien (s. Abbildung 9) zwischen den septischen Patienten und den gesunden Kontrollen zeigte sowohl für die ein- als auch für die zweiseitige Testung keinen signifikanten Unterschied ($p=0,16$, bzw. $0,31$). Ebenso ergab der F-Test hinsichtlich der Varianzen keinen signifikanten Unterschied, so dass die Annahme, beide Verteilungen stammen aus derselben Grundgesamtheit, nicht verworfen werden kann ($p=0,91$).

Genkopien	1	2	3	4	5	6
Sepsis	0,1%	16,20%	58,70%	21,81%	2,55%	0,42%
Kontrolle	1,05%	15,09%	62,26%	19,50%	1,47%	0,63%

Tabelle 9: Genotypfrequenzen von DEFB103 in Sepsis- und Kontrollkollektiv. T-Test für Mittelwertsunterschiede beider Kollektive: $p=0,31$; F-Test für Varianzen: $p=0,91$.

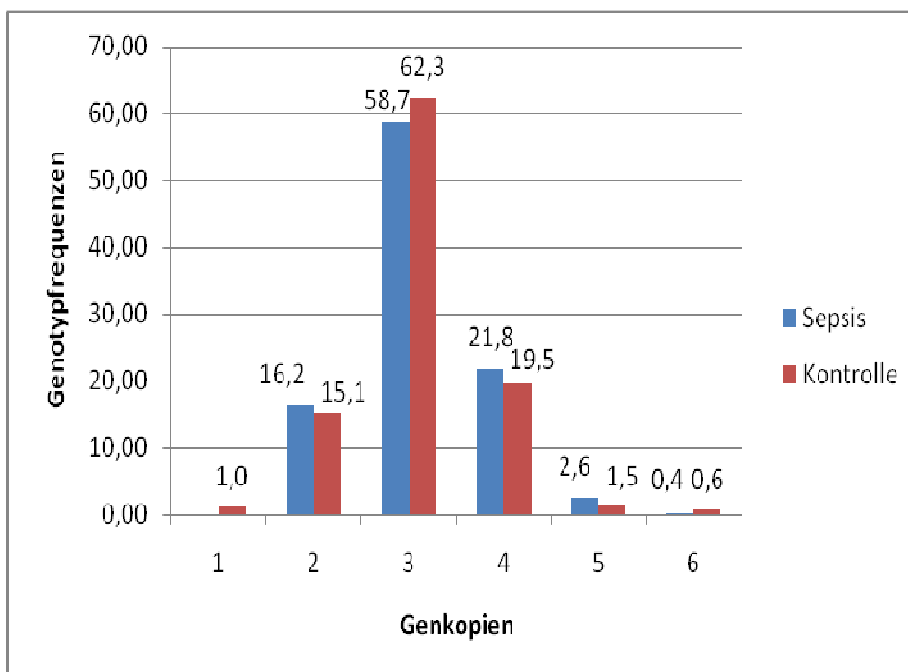


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt die Genotypverteilungen in Prozent von DEFB103 separat für das Sepsis-Kollektiv (blau, $n=706$) und das Kontrollkollektiv (rot, $n=477$). Der T-Test auf Mittelwertunterschiede als auch der F-Test für Varianzen waren nicht signifikant ($p=0,31$ zweiseitig, bzw. $p=0,91$).

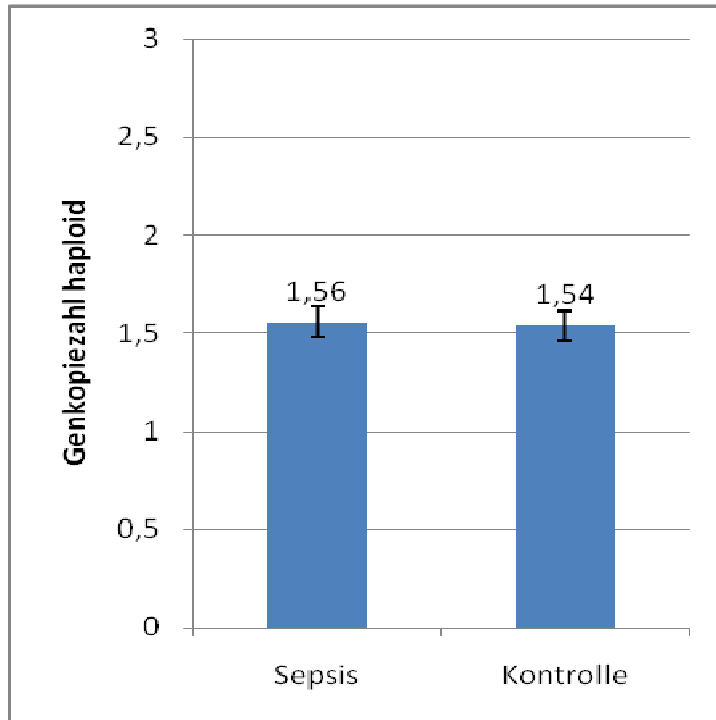


Abbildung 9: Vergleich der mittleren Genkopiezahl für DEFB103 von Sepsis- ($n=706$) und Kontrollkollektiv ($n=477$) mit Standardabweichung (0,36 für beide Kollektive). Der T-Test auf Unterschiede war nicht signifikant ($p=0,31$ zweiseitig; $p=0,16$ einseitig).

Wie Abbildung 10 zeigt konnten auch für DEFB104 keine signifikanten Verteilungsunterschiede der einzelnen Genotypfrequenzen zwischen dem septischen Patientenkollektiv und dem Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Der F-Test auf Varianzunterschiede beider Verteilungen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,92$). Wie im Fall von DEFB103 spiegelte auch hier jedes einzelne beider Kollektive die Verteilung des Gesamtkollektivs wider. Abbildung 11 zeigt die mittlere Anzahl an Genkopien im Sepsis- und Kontrollkollektiv, welche sich im Rahmen des T-Tests weder beim einseitigen noch beim zweiseitigen Test signifikant unterschieden ($p=0,08$ bzw. $0,16$).

Genkopiezahl	1	2	3	4
Sepsis	2,30%	61,1%	34,90%	1,70%
Kontrolle	2,40%	66%	29,40%	2,20%

Tabelle 10: Genotypfrequenzen von DEFB104 in Sepsis- und Kontrollkollektiv. T-Test für Mittelwertunterschiede beider Kollektive: $p=0,16$; F-Test für Varianzen: $p=0,92$.

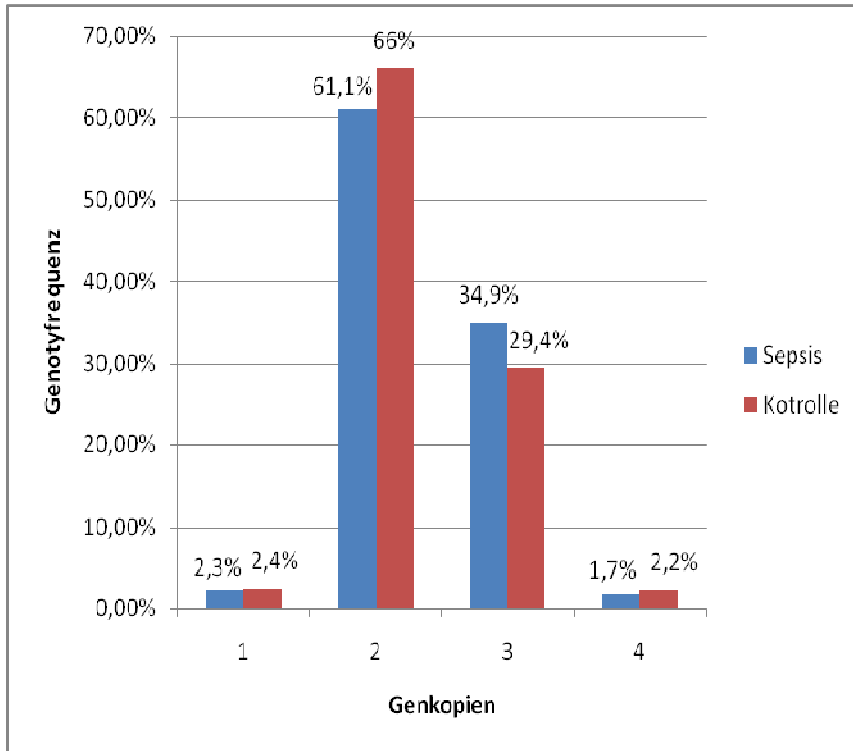


Abbildung 10: Genotypverteilungen in Prozent von DEFB104 separat für das Sepsis-Kollektiv (blau, $n=656$) und das Kontroll-Kollektiv (rot, $n=503$). Der T-Test für Mittelwertunterschiede als auch der F-Test für Varianzen waren nicht signifikant ($p=0,16$ zweiseitig bzw. $p=0,92$).

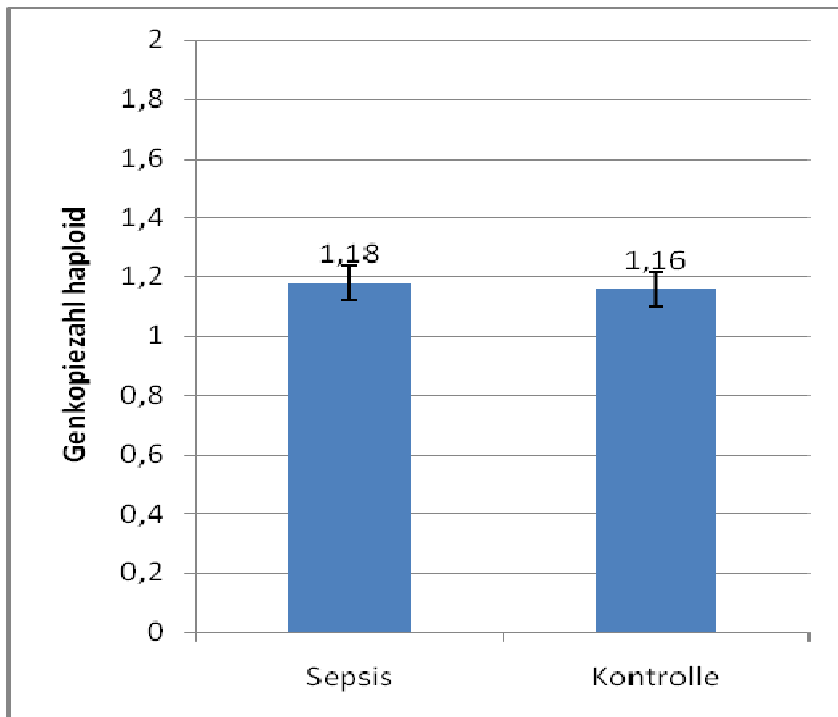


Abbildung 11: Vergleich der mittleren Genkopiezahl für DEFB104 von Sepsis ($n=656$) und Kontrollkollektiv ($n=503$) mit Standardabweichung (0,27 für beide Kollektive). Der T-Test auf Unterschiede war nicht signifikant ($p=0,16$ zweiseitig; $p=0,08$ einseitig).

3.5 Intraindividuelle Wechselwirkung zwischen DEFB103 und DEFB104

In Bezug auf die Fragestellung, wie die Genkopiezahlen von DEFB103 und DEFB104 innerhalb eines Individuums zusammen hängen, konnten die Datenpaare von insgesamt 1058 Proben untersucht werden. Die Anzahl an Genkopien von DEFB103 und DEFB104 zeigten intraindividuelle Variationen, stimmten also in einem Individuum zahlenmäßig nicht zwangsläufig überein. Wie Abbildung 12 veranschaulicht, fand sich in nur 27,9% der 1058 Datenpaare eine Konkordanz zwischen DEFB103 und DEFB104.

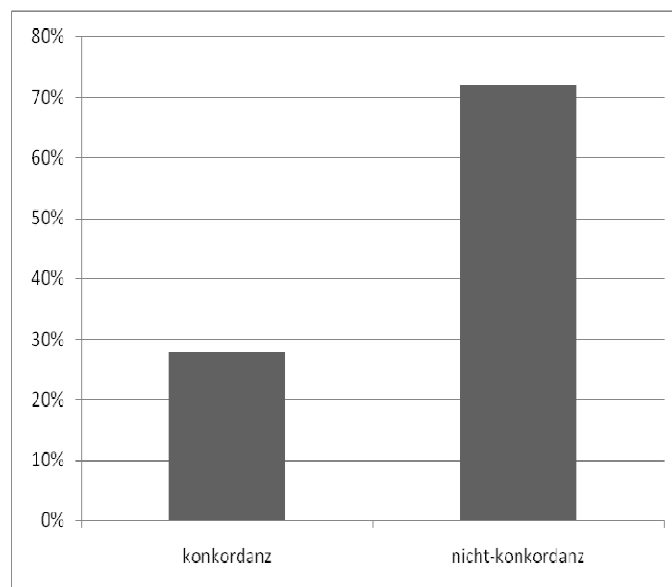


Abbildung 12: Anteil der konkordanten und diskordanten Datenpaare von DEFB103 und DEFB104 in 1058 Proben. In 27,9% stimmten die gemessenen Kopiezahlen beider Gene überein.

Auch ist zu beobachten, dass sowohl der Anteil an Diskordanz als auch die intraindividuelle Differenz der Genkopiezahlen im Bereich hoher Kopiezahlen zunimmt. Hierfür wurden die Daten von DEFB103 entsprechend ihrer Genkopiezahl in Gruppen geordnet. Innerhalb dieser Gruppen wurde dann für jedes Datenpaar von DEFB103- und DEFB104-Genkopien die Differenz berechnet und in einem weiteren Schritt der Mittelwert der Differenzen einer Gruppe gebildet. Wie Ab-

bildung 13 zeigt, fand sich eine zunehmende mittlere Kopiezahldifferenz im Bereich steigender Genkopiezahlen für DEFB103. Je mehr Genkopien von DEFB103 ein Individuum besitzt, umso stärker unterscheiden sich die Genkopiezahlen für DEFB103 und DEFB104 bei diesem.

Neben der Differenzbildung wurde für jede Gruppe von DEFB103-Genkopien der Anteil an Datenpaaren bestimmt, bei dem Konkordanz hinsichtlich der Genkopiezahlen von DEFB103 und DEFB104 bestand. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmender Genkopiezahl der Anteil an Konkordanz, also gleicher Kopiezahlen für DEFB103 und DEFB104, stark abnahm. Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass im Falle von einer Genkopie pro diploidem Chromosomensatz für DEFB103 100% Konkordanz hinsichtlich der Kopiezahl von DEFB104 besteht. Bei einer Anzahl von fünf oder sechs Genkopien an DEFB103 pro diploidem Chromosomensatz ist hingegen bei keinem Datenpaar Konkordanz zu finden.

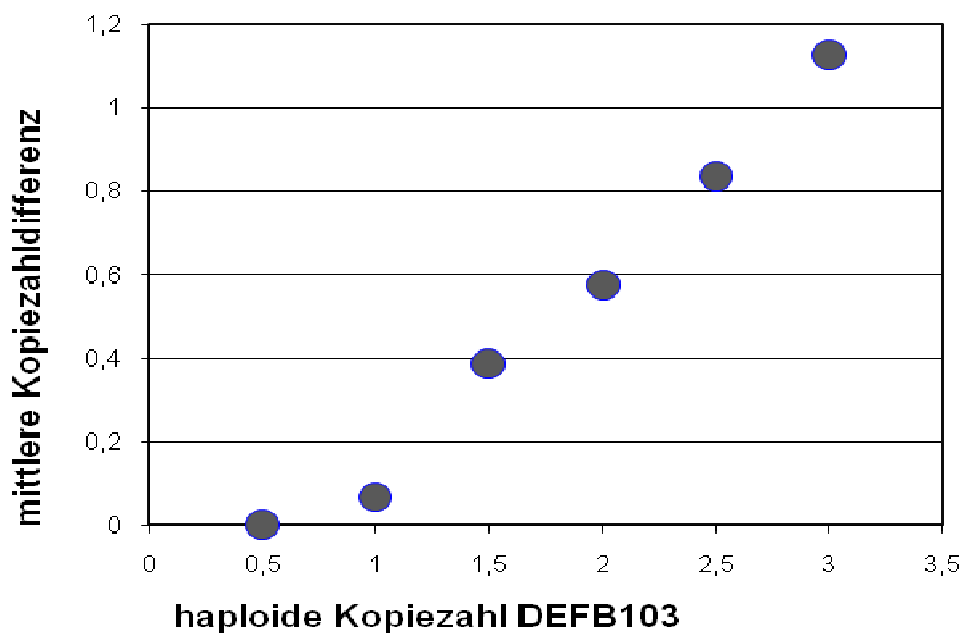


Abbildung 13: Mittlere intraindividuelle Differenz von DEFB103 und DEFB104 in Abhängigkeit der Kopiezahl von DEFB103. Bei Individuen mit vielen Genkopien von DEFB103 findet sich ein großer Unterschied zu ihren DEFB104-Genkopien. Bei Individuen mit niedriger DEFB103-Kopiezahl ist dieser Unterschied kleiner.

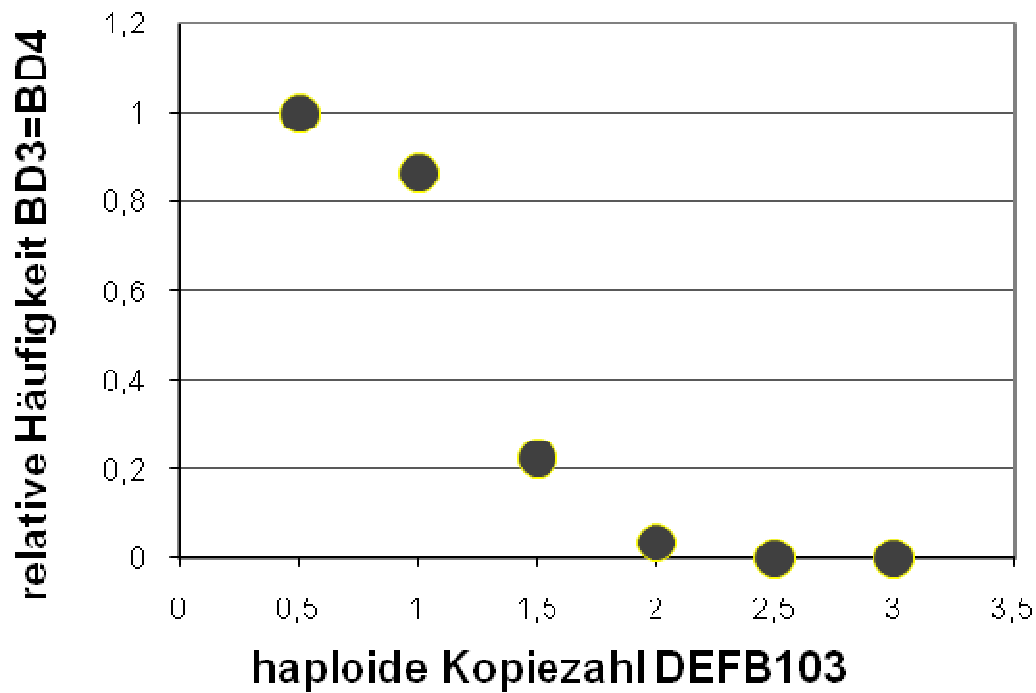


Abbildung 14: Relative Häufigkeit an Konkordanz in Abhängigkeit der Kopiezahl von DEFB103. Alle Individuen mit einer (haploid=0,5) DEFB103-Genkopie besitzen auch nur eine DEFB104-Genkopie, d.h. es besteht 100% Konkordanz. Im Bereich steigender DEFB103-Kopiezahlen nimmt der Anteil an Konkordanz kontinuierlich ab und beträgt für 5 und 6 DEFB103-Genkopien null.

Allerdings zeigte sich, dass eine geringe Anzahl an Kopien des einen Gens tendenziell mit einer geringen Anzahl an Genkopien des anderen Gens einherging. Das gleiche zeigte sich für den Bereich hoher Genkopiezahlen. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,65 und erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0.001$). Abbildung 15 zeigt weiterhin, dass bei allen 1058 Datenpaaren die Kopiezahl von DEFB103 größer oder gleich derjenigen von DEFB104 ist.

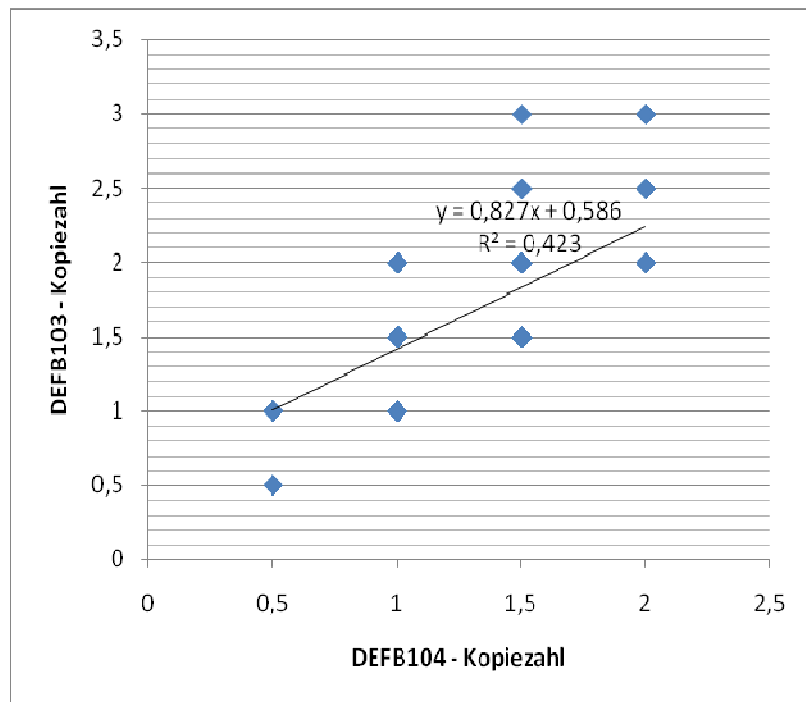


Abbildung 15: Korrelation der Anzahl an Genkopien für DEFB103 und DEFB104 für Datenpaare aus 1058 Proben. Die Größe der Rauten entspricht nicht der Anzahl der Datenpaare.

4. Diskussion

4.1 Genkopievariationen der Defensine in Zusammenhang mit Sepsis

Die Sepsis ist ein Krankheitsbild, welches durch ein überschießendes, fehlreguliertes Immunsystem gekennzeichnet ist. Pro- und antiinflammatorische Komponenten des Organismus sind aus dem Gleichgewicht geraten und können in der weiteren Folge selbst zu Organschäden führen. Genetische Variationen der beteiligten Proteine oder deren Regulatorgene könnten für Entstehung und Verlauf der Sepsis von Bedeutung sein (Arcaroli et al., 2005; Stuber et al., 2005), so konnten Chen et al. einen Einfluss eines „single nucleotide polymorphism“ des humanen β -Defensins eins auf die Suszeptibilität und einen schweren Verlauf der Sepsis zeigen (Chen et al., 2007). Neben dem Austausch einzelner Basen rückten in jüngster Zeit zunehmend Kopiezahlvariationen von Genen und deren potenzielle phänotypische Relevanz in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Humangenetische Analysen zeigten, dass die Gene der humanen β -Defensine zwei, drei und vier auf Chromosom 8p22-23 einen Genkopiepolymorphismus aufweisen, also in der normalen Bevölkerung mit unterschiedlicher Anzahl an Genkopien auftreten. Defensine gehören als Teil der angeborenen Immunabwehr zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide und wirken gegen verschiedene Bakterien, Pilze und Viren. Neuere Ergebnisse belegen zusätzlich immunmodulatorische Funktionen der Defensine in der Vernetzung von angeborener und adaptiver Immunabwehr (Pazgier et al., 2006). Inwieweit dieser Genkopiepolymorphismus phänotypische Konsequenzen hat, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

Um die Assoziation der Genkopiezahlen der β -Defensine drei und vier mit der Inzidenz der Sepsis genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit septische Patienten und gesunde Kontrollprobanden hinsichtlich ihrer Genkopiezahl der beta-Defensine drei und vier untersucht. Es gelang dabei, ein sehr großes Patienten- und Kontrollkollektiv von insgesamt 1159 Individuen für DEFB104 und 1183 Individuen für DEFB103 zu untersuchen. Die Analyse solch großer Studienpopulationen ermöglicht die statistisch abgesicherte Detektion relativ kleiner Unterschiede und Effekte. Dennoch zeigte sich in der Analyse der Ergebnisse kein signifikanter Unterschied in der mittleren Genkopieanzahl zwischen septischen und gesunden Probanden weder für DEFB104 noch für DEFB103. Für beide Gene zeigten sich hinsichtlich der Häufigkeiten der einzelnen Genkopien in der septischen und Kontrollpopulation beinahe identische Verteilungen, welche

sehr gut mit der beobachteten Genotypfrequenzen von Chen et al. übereinstimmten (Chen et al., 2006). Die hohe Übereinstimmung der Verteilungen des septischen mit dem Kontrollkollektiv legt die Vermutung nahe, dass beide Stichproben die Genotypfrequenzen der normalen kaukasischen Bevölkerung für DEFB103 und DEFB104 widerspiegeln. Die genetische Ausstattung an Genkopien für diese Defensine scheint somit nach diesen Daten für die Entstehung einer Sepsis keine Relevanz zu besitzen. Eine Erklärung dafür könnte in der multifaktoriellen Pathogenese des septischen Geschehens sowie dem heterogenen Patientenkollektiv liegen. Dies macht es schwierig, den Einfluss zahlreicher externer Variablen zu kontrollieren und selbst in einem großen Studienkollektiv geringe relative Effekte zu messen. Einem ähnlichen Problem begegnete man bereits bei den Versuchen, das relative Risiko einzelner SNP's hinsichtlich der Sepsis zu untersuchen. Auch hier erschwerten der komplexe Verlauf der Sepsis und das heterogene Patientenkollektiv allgemeine Aussagen in Bezug auf Genotyp und Risikoprofil (Arnalich et al., 2002; Fang et al., 1999; Feterowski et al., 2003; Schroeder et al., 1999; Stuber et al., 1995). Da aber eine funktionelle Relevanz gewisser Genpolymorphismen für den septischen Verlauf sehr wahrscheinlich ist und deren Identifizierung von großem Nutzen sein könnte, scheint eine Intensivierung und Modifizierung der Bemühungen auf diesem Forschungsfeld vielversprechend. So scheint die Frage berechtigt, inwieweit beispielsweise der Verlauf einer Sepsis oder auch die Entwicklung einer solchen bei Individuen mit ähnlichen Grunderkrankungen durch eine unterschiedliche Anzahl an β -Defensin-Genkopien moduliert werden könnte. Hierfür würden sich Subgruppenanalysen anbieten, welche Patienten mit ähnlichen Merkmalen wie Alter, Geschlecht, Grunderkrankungen oder Ursache der Sepsis untereinander hinsichtlich ihrer Ausstattung an β -Defensin-Genkopien vergleichen. In jeder dieser Subgruppen könnte eine andere Mediatorfunktion der β -Defensine im Vordergrund stehen, was im Gesamtkollektiv übersehen, in der Subgruppenanalyse aber zutage treten könnte.

4.2 Vergleich der ermittelten Genotypverteilungen mit der Literatur

Neben der Frage nach dem Zusammenhang der Genkopien mit dem septischen Krankheitsbild erfolgte ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Genotypverteilungen mit den bislang publizierten Daten.

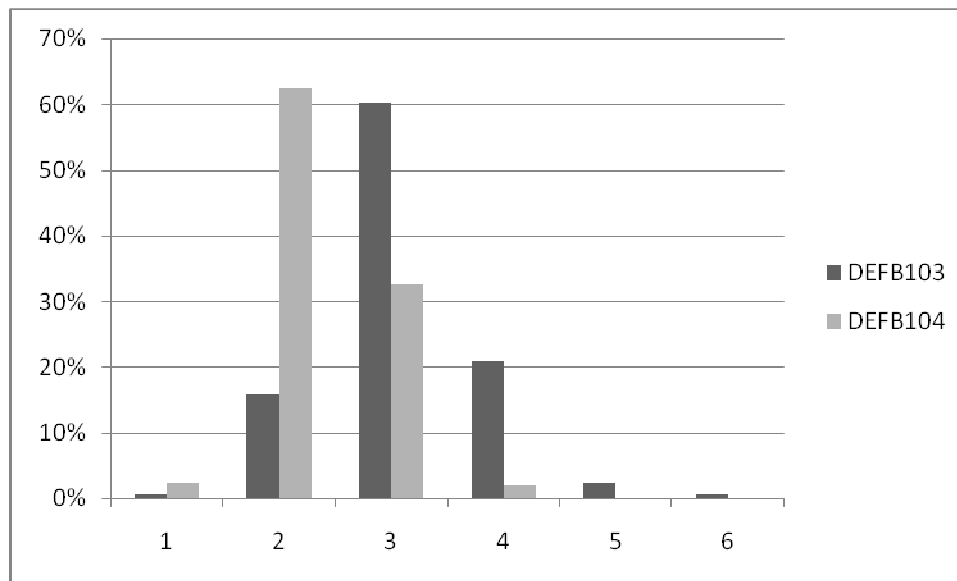


Abbildung 18: Verteilungen der Genkopiezahlen von DEF B103 und DEF B104 im Gesamtkollektiv dieser Arbeit.

Der Vergleich der einzelnen Studienkollektive zeigt, dass in der vorliegenden Arbeit wohl die größte Anzahl an Individuen untersucht wurde (Fellermann et al., 2006; Groth et al., 2008; Hollox et al., 2003; Hollox et al., 2005; Linzmeier und Ganz, 2005). Hierbei muss betont werden, dass für diese Arbeit genetisches Material deutscher, also kaukasischer Bevölkerung untersucht wurde und keine Rückschlüsse auf Genotypen anderer ethnischer Populationen erlaubt. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Verteilungen für DEF B103 als auch für DEF B104 stimmen gut mit zuvor an einem kleineren Kollektiv unter Verwendung derselben Methode gemessenen Ergebnissen von Chen et al. überein (Chen et al., 2006). Andere bislang veröffentlichte Daten über die Verteilung der β -Defensin Genkopievarianten unterscheiden sich jedoch im Vergleich zu diesen Ergebnissen sowie auch untereinander, wie Abbildung 19 veranschaulicht.

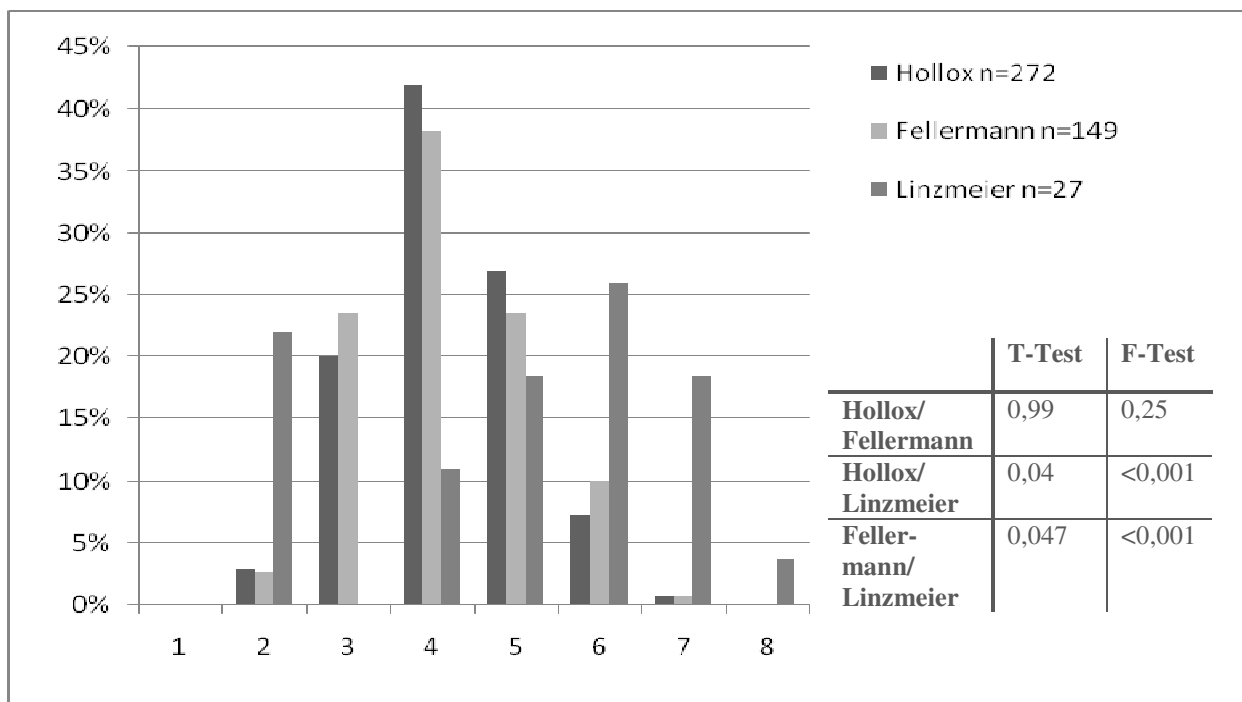


Abbildung 19: Verteilungen für die Genkopiezahlen der beta-Defensine von unterschiedlichen Autoren. Hollox:(HOLLOX, 2008), Fellermann:(FELLERMANN et al., 2006a), Linzmeier:(LINZMEIER und GANZ, 2005a). Die Tabelle zeigt die p-Werte des statistischen Vergleiches der Verteilungen untereinander. Die Daten von Linzmeier entstammen der statistischen Auswertung zufolge einer anderen Grundgesamtheit als jene von Hollox und Fellermann.

Es zeigt sich bei der Betrachtung anderer Untersuchungen eine Verschiebung der Verteilung in den Bereich höherer Kopiezahlen im Vergleich zu dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass alle diese Autoren von einer intraindividuellen Konkordanz der Genkopiezahlen für diesen Genlocus ausgehen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit sollen also die einzelnen β -Genkopiezahlen in einem Individuum stets konkordant sein. Die abgebildeten Verteilungen beruhen folglich im Falle der Fellermann-Daten nur auf der Messung von DEFB4 und bei Linzmeier auf der Messung von DEFB4 und DEFB103 (Fellermann et al., 2006; Linzmeier und Ganz, 2005). Dieser Aspekt gewinnt an Bedeutung bei der Betrachtung von älteren Quantifizierungsergebnissen für DEFB4, welche mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode von Chen et al. erhoben wurden (Chen et al., 2006). Wie in Abbildung 20 ersichtlich wird, zeigen diese, für DEFB4 gemessenen Daten, eine deutlichere Übereinstimmung mit den Daten der Verteilungen von Hollox und Fellermann als die Ergebnisse dieser Arbeit (F-

Test für Varianzen: $p=0,64$ für den Vergleich der Verteilungen Chen/Hollox bzw. $p=0,27$ für Chen/Fellermann).

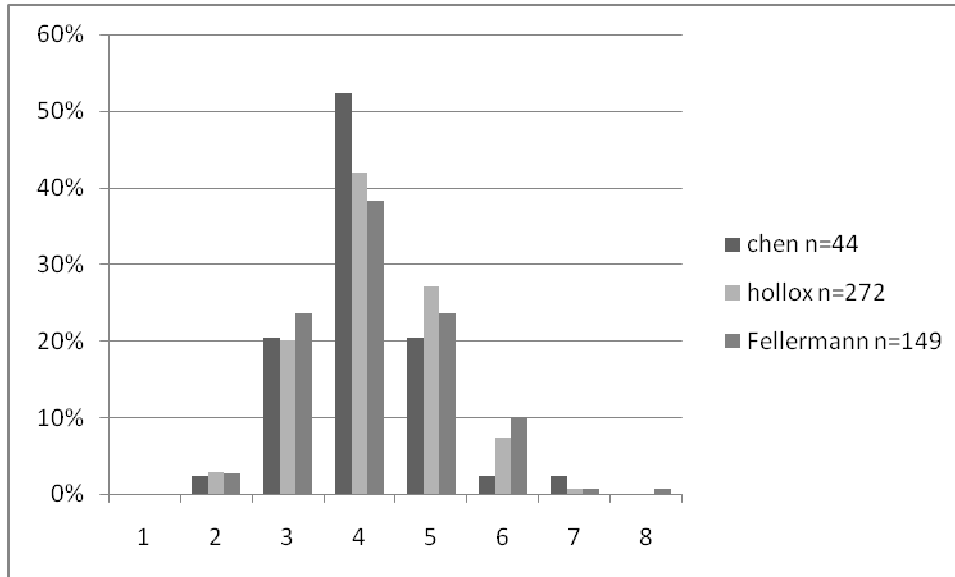


Abbildung 20.: Vergleich von älteren Daten aus Vorversuchen für DEF B4 mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode (Chen) mit der Literatur. Chen: (CHEN et al., 2006), Hollox: (HOLLOX, 2008), Fellermann (FELLERMANN et al., 2006a). Der F-Test für Varianzunterschiede ergibt $p=0,64$ für Chen/Hollox bzw. $p=0,27$ für Chen/Fellermann und ist somit nicht signifikant.

Es könnte also sein, dass die Verteilungen der anderen Autoren in erster Linie die Genkopieverteilungen für das humane β -Defensin zwei wiedergeben, während in dieser Arbeit genaueres Augenmerk auf die Verteilungen von DEF B103 und DEF B104 gelegt wurde. Für den Fall der intraindividuellen Diskordanz dieses Genkopiepolymorphismus würde diese Tatsache die unterschiedlichen Verteilungen dieser Arbeit erklären. Für einen wirklichen Vergleich der verschiedenen Arbeiten wäre die Quantifizierung der DEF B4-Genkopien des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs interessant. Tatsächlich zeigt diese Quantifizierung von DEF B4 (nicht veröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung) eine Verteilung, die in hohem Maße die Daten von Chen et al. bestätigt und eine ähnlich starke Übereinstimmung mit den Verteilungen von Hollox und Fellermann zeigt.

Ein weiterer Grund für die Heterogenität der Verteilungen könnten die unterschiedlichen methodischen Ansätze sein, die den einzelnen Daten zugrundeliegen. Tatsächlich verwendeten Hollox et al MAPH für die Genquantifizierung, während sowohl Linzmeier als auch Fellermann wie

Chen et al. mit quantitativer real-time PCR arbeiteten. Die starken Unterschiede der Verteilungen letzterer lässt sich also durch methodische Differenzen nur unzureichend begründen. Ein zu kleines und nicht repräsentatives Untersuchungskollektiv (n=27) könnte teilweise die auffälligen Daten von Linzmeier erklären, welche tatsächlich die größte Abweichung in Bezug auf alle anderen Autoren aufweisen.

Insgesamt betrachtet gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für einzelne Unterschiede der bisher publizierten β -Defensin-Genkopieverteilungen, allerdings scheint weder eine einzelne, noch ihre Summe befriedigend die Divergenzen der Verteilungen begründen zu können. Weitere Studien, eventuell mit anderen Methoden sind erforderlich, um eine Goldstandard-Methode zu definieren.

4.3 Intraindividuelle Konkordanz oder Variabilität der einzelnen beta-Defensine?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine intraindividuelle Variabilität der Genkopiezahlen der β -Defensine drei und vier hin. Ein Individuum kann also verschiedene Genkopiezahlen für DEFB103 und DEFB104 besitzen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu anderen bislang publizierten Daten, welche eine Konkordanz des gesamten Gencluster für die β -Defensine zwei, drei und vier zeigten (Groth et al., 2008; Hollox et al., 2003; Hollox, 2008; Linzmeier und Ganz, 2005). Die Klärung dieser Frage ist von großer Relevanz für zukünftige Studien dieses Clusters, da entweder jedes β -Defensingen einzeln gemessen werden müsste, oder aber die Messung eines einzelnen Gens als repräsentativ und somit ausreichend für das gesamte Cluster gelten würde. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit der Methode der real-time PCR gearbeitet wurde, kann diese Frage hier nicht beantwortet werden. Es sollen aber einige Aspekte diskutiert werden, die für die widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten.

Linzmeier und Ganz quantifizierten 2005 DEFB4 und DEFB103 mittels real-time PCR und ermittelten in einem Kollektiv von 27 Probanden konkordante Genkopiezahlen. Im Gegensatz zu einigen anderen Untersuchungen stammten die amplifizierten und quantifizierten Sequenzen tatsächlich direkt aus dem Bereich der betreffenden Gene, was die Aussagekraft dieser Arbeit stärkt. Allerdings weichen die gemessenen Verteilungen dieser Gene auffallend deutlich von allen anderen bislang publizierten Verteilungen ab (s. Abb.19). Trotz des relativ kleinen Studienumfangs

generiert diese Tatsache Zweifel bezüglich der Repräsentativität dieser Daten, solange keine andere befriedigende Erklärung gefunden wird.

Hollox et al. führten 2003 eine umfassende Untersuchung des gesamten Clusters 8p23 unter Verwendung der Methode MLPA durch (Hollox et al., 2003). Mit Hilfe zahlreicher Sonden über das gesamte Cluster verteilt, gelangten auch sie zum Ergebnis konkordanter Genkopien. Tatsächlich erscheint diese Arbeit unter methodischen Aspekten und hinsichtlich der hochauflösenden Abdeckung dieses Gensegmentes sehr verlässlich und aussagekräftig. Allerdings befand sich unter den verwendeten Sonden nur eine einzelne, welche unmittelbar im Bereich von DEFB4 platziert war. DEFB103 und DEFB104 wurden indirekt quantifiziert durch Sonden nahegelegener Gene unter Annahme der Repräsentativität dieser Surrogate. Strenggenommen erfolgte also keine direkte Messung von zwei der drei relevanten Gene. Auch die Bedeutung wiederholt gemessener Signalunterschiede innerhalb einiger untersuchter Gencluster bleibt noch ungeklärt (Hollox et al., 2003; Hollox, 2008).

Eine weitere Untersuchung stammt von Groth et al. aus dem Jahr 2008 unter Verwendung von MLPA. Auch hier ergab die Analyse konkordante Genkopiezahlen, jedoch bleiben ähnlich wie bei Hollox letzte Zweifel an der Spezifität der verwendeten Sonden. So befanden sie sich zwar wie bei Linzmeier tatsächlich im Bereich der zu quantifizierenden Gene, jedoch scheint eine sichere Unterscheidung zwischen anderen paralogen Genen nicht gewährleistet (Groth et al., 2008). Besonders hinsichtlich der Konkordanzfrage ist aber die Gewissheit unbedingt notwendig, dass einzig das Zielgen amplifiziert und gemessen wird.

Ein weiteres Erklärungsmoment ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und der genauen Analyse der beobachteten intraindividuellen Variabilität. Wie im Ergebnisteil dargestellt, steigt der Anteil und auch das Ausmaß der Variation im Bereich höherer Genkopiezahlen. Genau dort wächst jedoch auch die Ungenauigkeit der verwendeten Methoden an, so dass die genaue Festlegung der Genkopiezahl immer schwieriger und unsicherer wird.

Jedoch auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode birgt Fehlerquellen und konsekutiv die Gefahr der fehlerhaften Quantifizierung. Während die Analyse der Variationskoeffizienten der Intra- und Interassay-Variabilität auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methode hindeutet, so kann durch sie kein systematischer Fehler ausgeschlossen werden, der die Genkopiezahlen generell über- oder unterschätzen würde. Ein kritischer Aspekt liegt in der Verwendung unterschiedli-

cher Primer für das Ziel- und Referenzgen mit verschiedenen Amplifikationseffizienzen. Die Quantifizierungsalgorithmen und somit die Verlässlichkeit der Ergebnisse setzen identische Amplifikationseffizienzen voraus. Zwar wurden im Rahmen der Optimierung dieser Methode Standardkurven für verschiedene Verdünnungen von Ziel- und Referenzgen erstellt und ein Koeffizient berechnet, welcher die Effizienzunterschiede kompensiert, dennoch stellt dieser Umstand eine potentielle Fehlerquelle für die Quantifizierung dar (Szilagyí et al., 2006). Analog zu den Amplifikationseffizienzen zwischen Ziel- und Referenzgen müssen auch jene zwischen den Kalibratoren und dem zu untersuchenden Material identisch sein. Für diese Arbeit wurde als Kalibrator ein Plasmid verwendet, das genau eine Kopie von Ziel- und Referenzgen enthielt. In verschiedenen anderen Untersuchungen hatte sich dieses Vorgehen bewährt und verlässliche Ergebnisse erzeugt (Chain et al., 2005; Taverniers et al., 2004; Tse et al., 2005). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Unterschiede in der Amplifikationseffizienz zwischen Plasmid- und genomischer DNA bestehen, die zu einer konstanten Verzerrung der Ergebnisse führen. Zur Klärung dieser Frage müsste eine Probe genomischer DNA mit bekannter Genkopiezahl als Kalibrator verwendet werden und diese Ergebnisse mit den bereits durch den Plasmidkalibrator quantifizierten Proben verglichen werden. Jüngere Untersuchungen weisen zudem auf eine Unterschätzung der Genkopiezahlen durch quantitative real-time-PCR im Bereich höherer Genkopiezahlen hin (Wu et al., 2007). Nach Wu et al. sollte deshalb ab einer Genkopiezahl von über drei pro diploidem Genom eine Korrektur mittels linearer Transformation erfolgen. Dies könnte eine Erklärung für Messungenauigkeiten im Bereich höherer Kopiezahlen sein. Jedoch zeigen sich in dieser Untersuchung auch intraindividuelle Kopiezahlunterschiede im Bereich geringerer Kopiezahlen, welcher nach Wu durch die quantitative real-time-PCR sehr verlässlich und genau gemessen wird.

Zusammengefasst birgt jede der bislang verwendeten Methoden zur Genquantifizierung unterschiedliche Fehlerquellen und ein methodischer Goldstandard ist auf diesem relativ jungen Gebiet noch nicht definiert. Die meisten Untersuchungen hinsichtlich des β -Defensinclusters 8p23.1 zeigen eine intraindividuelle Konkordanz der β -Defensine zwei, drei und vier. Allerdings erwies sich die in dieser Arbeit verwendete real-time PCR bereits auf verschiedensten Gebieten als verlässliche und ökonomische Methode zur Genquantifizierung mit reliablen Ergebnissen (Szilagyí et al., 2006; Taverniers et al., 2004; Tse et al., 2005). Solange keine Methode als offizieller Goldstandard festgelegt wurde und noch Zweifel hinsichtlich der Konkordanz bestehen, sollte Vorsicht vorherrschen bei der Verallgemeinerung einzelner Genquantifizierungen auf das gesamte

Cluster. Die Bedeutung der β -Defensin Genkopievarianten für verschiedene systemische und regional begrenzte Pathologien ist von großem Interesse. Daher hat die Entwicklung und Etablierung einer verlässlichen und mit vertretbarem Aufwand durchführbaren Methode eine hohe Priorität.

Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen im Rahmen einer septischen Entzündungsreaktion in den vergangenen Jahrzehnten blieben bahnbrechende therapeutische Erfolge bis heute aus. Ein Schwerpunkt aktueller Forschungsbemühungen liegt bei der Untersuchung genetischer Prädispositionen und ihrer Bedeutung für die Entstehung und den Verlauf einer Sepsis. Die humanen β -Defensine bilden einen Teil der angeborenen Immunabwehr und verfügen darüber hinaus über immunomodulatorische Eigenschaften. Die Gene für die β Defensine zwei bis vier sind auf Chromosom 8 (8p23.1) lokalisiert. 2003 wurde gezeigt, dass sich die Anzahl an Genkopien von Mensch zu Mensch unterscheidet. Diese Kopiezahlvariation betrifft gesunde Individuen und ist hinsichtlich ihrer potentiellen Relevanz für Krankheiten Gegenstand vielfältiger Forschungsprojekte.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine unterschiedliche Anzahl an Genkopien für die humanen β -Defensine drei und vier von Bedeutung im Rahmen der Sepsis ist. Hierfür wurde die Anzahl dieser Gene bei septischen Patienten quantifiziert und mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen. Das Gesamtkollektiv umfasste für DEFB103 1183 und für DEFB104 1159 Patienten. Desweiteren wurden die Genkopien dieser beiden Gene auf intraindividuelle Konkordanz hin überprüft, da hierzu in der Literatur widersprüchliche Aussagen vorliegen. Die Genquantifizierung erfolgte mittels real-time PCR.

Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der Genkopiezahlen septischer und gesunder Individuen für keines der beiden untersuchten Defensine. Für die Entstehung einer Sepsis scheint die Anzahl der Genkopien nach diesen Daten also keinen Einfluss zu besitzen.

Im Gegensatz zur Mehrheit der publizierten Daten fand sich im Untersuchungskollektiv dieser Arbeit keine strikte intraindividuelle Konkordanz der Genkopien dieser beiden Proteine. Die Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse muss bei den verwendeten Quantifizierungsverfahren vermutet werden. Anders als bei den meisten Vorgängerstudien wurden die beiden Gene von DEFB103 und DEFB104 im Rahmen dieser Studie direkt gemessen und nicht durch nahegelegene Surrogatmarker. Auch das große Untersuchungskollektiv stützt die Aussagekraft dieser Ergebnisse. Jedoch können trotz sorgfältigster Versuchsplanung und –durchführung methodische Fehler nicht ausgeschlossen werden, besonders vor dem Hintergrund eingeschränkter Erfahrung

mit dieser Methode auf dem noch jungen Forschungsgebiet der Genquantifizierung. Es ist zu hoffen, dass eine Weiterentwicklung der verschiedenen Methoden sowie zusätzliche Untersuchungen dieses Genabschnitts weitere Erkenntnis in Bezug auf die Frage der Konkordanz schaffen werden.

Liste der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Allgemeines Prinzip der PCR	28
Abbildung 2: Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mittels Hybridisierungssonden	30
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Light Cyclers®	35
Abbildung 4: graphische Darstellung eines real-time-PCR Laufes mit negativer Kontrolle	39
Abbildung 5: Flussdiagramm der Datenauswertung	44
Abbildung 6: Genotypfrequenzen von DEFB103 des Gesamtkollektivs	48
Abbildung 7: Genotypfrequenzen von DEFB104 des Gesamtkollektivs	49
Abbildung 8: Genotypverteilungen von DEFB103 in Sepsis- und Kontrollkollektiv	50
Abbildung 9: Vergleich der mittleren Genkopiezahl für DEFB103 von Sepsis- und Kontrollkollektiv mit Standardabweichung	51
Abbildung 10: Genotypverteilungen von DEFB104 in Sepsis- und Kontrollkollektiv	52
Abbildung 11: Vergleich der mittleren Genkopiezahl von Sepsis- und Kontrollkollektiv	52
Abbildung 12: Anteil der konkordanten und diskordanten Datenpaare Von DEFB103 und DEFB104	53
Abbildung 13: Mittlere intraindividuelle Differenz von DEFB103 und DEFB104 in Abhängigkeit der Kopiezahl von DEFB103	54
Abbildung 14: Relative Häufigkeit an Konkordanz in Abhängigkeit der Kopiezahl von DEFB103	55
Abbildung 15: Korrelation der Anzahl an Genkopien für DEFB103 und DEFB104	56
Abbildung 16: Schema der Arbeitsschritte des MAPH	59
Abbildung 17: Prinzip des MLPA	60
Abbildung 18: Verteilung der Genkopiezahlen von DEFB103 und DEFB104 im Gesamtkollektiv dieser Arbeit	64
Abbildung 19: Verteilungen für die Genkopiezahlen der beta-Defensine von unterschiedlichen Autoren	65
Abbildung 20: Vergleich von älteren Daten aus Vorversuchen für DEFB4 Mit der Literatur	66

Tabellen

Tabelle 1:	Sequenz und Position der verwendeten Primer und Sonden	31
Tabelle 2	Protokoll der real-time PCR	36
Tabelle 3	systematischer Fehler bei einer PCR-Effizienz ungleich zwei	41
Tabelle 4	Zuordnung der Quotienten von Ziel- zu Referenzgenen zu Diskreten Genkopiezahlen	43
Tabelle 5	Intra- und Interassayvariabilität für DEFB104	46
Tabelle 6	Intra- und Interassayvariabilität für DEFB103	46
Tabelle 7	Methodische Auswertung und Genotypfrequenzen für DEFB103 aus dem Gesamtkollektiv	47
Tabelle 8:	Methodische Auswertung und Genotypfrequenzen für DEFB104 aus dem Gesamtkollektiv	47
Tabelle 9	Genotypfrequenzen von DEFB103 in Sepsis- und Kontrollkollektiv	50
Tabelle 10:	Genotypfrequenzen von DEFB104 in Sepsis- und Kontrollkollektiv	51

Literaturverzeichnis

The International HapMap Project. Nature 2003; 426:789-796

Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. J Infect Dis 2002; 186:1522-1525

Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. Pseudomonas aeruginosa carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive Care Med 2007; 33: 1155-1161

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. Nature 2006; 439: 851-855

Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. Hum Mol Genet 2005; 14: 2045-2052

Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. Shock 2005; 24: 300-312

Armour JA, Palla R, Zeeuwen PL, den Heijer M, Schalkwijk J, Hollox EJ. Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. Nucleic Acids Res 2007; 35: e19

Arnalich F, Lopez-Maderuelo D, Codoceo R, Lopez J, Solis-Garrido LM, Capiscol C, Fernandez-Capitan C, Madero R, Montiel C. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. Clin Exp Immunol 2002; 127: 331-336

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. FEBS Lett 1995; 368: 331-335

Bhat S, Song YH, Lawyer C, Milner SM. Modulation of the complement system by human beta-defensin 2. J Burns Wounds 2007; 5: e10

Braida L, Boniotto M, Pontillo A, Tovo PA, Amoroso A, Crovella S. A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. AIDS 2004; 18: 1598-1600

Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. Pharmacoeconomics 2004; 22: 793-813

Chain JL, Joachims ML, Hooker SW, Laurent AB, Knott-Craig CK, Thompson LF. Real-time PCR method for the quantitative analysis of human T-cell receptor gamma and beta gene rearrangements. J Immunol Methods 2005; 300: 12-23

Chen Q, Book M, Fang X, Hoeft A, Stuber F. Screening of copy number polymorphisms in human beta-defensin genes using modified real-time quantitative PCR. J Immunol Methods 2006; 308: 231-240

Chen QX, Lv C, Huang LX, Cheng BL, Xie GH, Wu SJ, Fang XM. Genomic variations within DEFBI are associated with the susceptibility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Genes Immun* 2007; 8: 439-443

Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat* 2002; 19: 69-75

Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: 22-29

Danai P, Martin GS. Epidemiology of sepsis: recent advances. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7: 329-334

Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3952-3956

Fang XM, Schroder S, Hoeft A, Stuber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27: 1330-1334

Fang XM, Shu Q, Chen QX, Book M, Sahl HG, Hoeft A, Stuber F. Differential expression of alpha and beta-defensins in human peripheral blood. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 82-87

Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 439-448

Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 439-448

Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, Holzmann B, Weighardt H. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 2003; 109: 426-431

Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 2006; 15 Spec No 1: R57-R66

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 2006; 16: 949-961

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-720

Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, Adermann K, Kluver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 257-264

Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001; 15: 1819-1821

Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 874-883

Groth M, Szafranski K, Taudien S, Huse K, Mueller O, Rosenstiel P, Nygren AO, Schreiber S, Birkenmeier G, Platzer M. High-resolution mapping of the 8p23.1 beta-defensin cluster reveals strictly concordant copy number variation of all genes. *Hum Mutat* 2008; 29: 1247-1254

Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 2006; 177: 8658-8666

Hegele RA. Copy-number variations add a new layer of complexity in the human genome. *CMAJ* 2007; 176: 441-442

Hollox EJ. Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease. *Cytogenet Genome Res* 2008; 123: 148-155

Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 591-600

Hollox EJ, Davies J, Griesenbach U, Burgess J, Alton EW, Armour JA. Beta-defensin genomic copy number is not a modifier locus for cystic fibrosis. *J Negat Results Biomed* 2005; 4: 9

Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB, Jr., Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005; 42: 1073-1084

Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2008; 56: 1-120

Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics* 2005; 86: 423-430

Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics* 2005; 86: 423-430

Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med* 2003; 31: 34-38

Ma P, Chen D, Pan J, Du B. Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 1046-1050

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554

Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N. Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 17-22

Menges T, Hermans PW, Little SG, Langefeld T, Boning O, Engel J, Sluijter M, de Groot R, Hempelmann G. Plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and prognosis of severely injured patients. *Lancet* 2001; 357: 1096-1097

Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282: 561-568

Moerer O, Burchardi H. [The cost of sepsis]. *Anaesthesist* 2006; 55 Suppl 1: 36-42

Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1440-1446

Nguyen DQ, Webber C, Ponting CP. Bias of selection on human copy-number variants. *PLoS Genet* 2006; 2: e20

Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2: 224-231

Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 2004; 111: 273-281

Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 175: 1776-1784

Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1294-1313

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-454

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 2006; 38: 24-26

Schluter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van AH, Assmann G, Berendes E. Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 2002; 30: 32-37

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57
- Schroeder S, Reck M, Hoeft A, Stuber F. Analysis of two human leukocyte antigen-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27: 1265-1270
- Schutte BC, McCray PB, Jr.. [beta]-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 709-748
- Semple CA, Taylor K, Eastwood H, Barran PE, Dorin JR. Beta-defensin evolution: selection complexity and clues for residues of functional importance. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 257-262
- Shu Q, Fang X, Chen Q, Stuber F. IL-10 polymorphism is associated with increased incidence of severe sepsis. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 1756-1759
- Shu Q, Shi Z, Zhao Z, Chen Z, Yao H, Chen Q, Hoeft A, Stuber F, Fang X. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis-induced lung injury by overexpression of beta-defensin-2 in rats. *Shock* 2006; 26: 365-371
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841
- Smiley AK, Gardner J, Klingenberg JM, Neely AN, Supp DM. Expression of human beta defensin 4 in genetically modified keratinocytes enhances antimicrobial activity. *J Burn Care Res* 2007; 28: 127-132
- Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318: 727-732
- Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2474-2486
- Stuber F, Klaschik S, Lehmann LE, Schewe JC, Weber S, Book M. Cytokine promoter polymorphisms in severe sepsis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 7: 416-420
- Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, Nedospasov SA. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1995; 46: 42-50
- Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 2003; 82: 238-244
- Szilagyi A, Blasko B, Szilassy D, Fust G, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes. *BMC Genet* 2006; 7: 1

Taverniers I, van Bockstaele E, de Loose M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378: 1198-1207

Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, Capeau J. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem* 2005; 51: 1093-1101

Van Wetering S, Sterk PJ, Rabe KF, Hiemstra PS. Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1131-1138

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, bu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrai ,S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351

Winning J, Claus RA, Huse K, Bauer M. Molecular biology on the ICU. From understanding to treating sepsis. *Minerva Anestesiol* 2006; 72: 255-267

Wood KA, Angus DC. Genetic epidemiology of sepsis and septic shock. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25: 611-618

Wu YL, Savelli SL, Yang Y, Zhou B, Rovin BH, Birmingham DJ, Nagaraja HN, Hebert LA, Yu CY. Sensitive and specific real-time polymerase chain reaction assays to accurately determine copy number variations (CNVs) of human complement C4A, C4B, C4-long, C4-short, and RCCX mod-

ules: elucidation of C4 CNVs in 50 consanguineous subjects with defined HLA genotypes. *J Immunol* 2007; 179: 3012-3025

Yanagi S, Ashitani J, Imai K, Kyoraku Y, Sano A, Matsumoto N, Nakazato M. Significance of human beta-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 63-69

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528

Young AN, de Oliveira Salles PG, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS, Amin MB. Beta defensin-1, parvalbumin, and vimentin: a panel of diagnostic immunohistochemical markers for renal tumors derived from gene expression profiling studies using cDNA microarrays. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 199-205

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Makbule Kobilay und XiangHong Zhang für ihre Geduld, Rat und Hilfe im Labor und so manche nette Kaffeepause.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Malte Book sowie Prof. Frank Stüber für die große Unterstützung sowohl im Rahmen dieser Forschungsarbeit als auch darüber hinaus.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Dr. Rainer Perne für unzählige anregende Gespräche und Denkanstöße.