

Etablierung des *RT-qPCR Readouts* zum Nachweis von Pyrogenen im Monozyten Aktivierungstest (*MAT*)

Bachelor-Thesis

Im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von

Marvin Lange

Matrikelnummer

■■■■■■■■■■

in Hamburg

am 21. Juli 2025

Betreut und geprüft von

Prof. Dr. Julien Béthune

(Erstgutachter, Professor der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg)

M. Sc. Lukas Focke

(Zweitgutachter, Head of R&D, acCELLerate GmbH)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich meinen Beitrag zur vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Quellen entnommen wurden, sowie sämtliche mit Hilfe generativer künstlicher Intelligenz erzeugte Passagen sind als solche kenntlich gemacht (sofern verwendet). Mir ist bekannt, dass fehlende oder fehlerhafte Angaben als Täuschungsversuch gewertet werden können.

Ort, Datum

Unterschrift

Vorwort

Diese Abschlussarbeit wurde angefertigt in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der acCELLerate GmbH im Rahmen des Studiums der Biotechnologie (B. Sc.).

Ich möchte mich äußerst herzlich bei Prof. Dr. Julien Béthune für die Betreuung und die Begutachtung der Thesis bedanken. Ebenso bei Dr. Oliver Wehmeier, der nicht nur als Geschäftsführer der acCELLerate GmbH, sondern auch stets als Ideengeber und kritisches Auge in schwierigen Fragen für mich erreichbar war. Des Weiteren danke ich Lukas Focke für die Arbeit und Bewertung in der Funktion als Zweitgutachter.

Dem Team der Forschung und Entwicklung, insbesondere Felix Hackstein, Danke ich für die großartige Einarbeitung und Eurer ansteckenden Neugier, Freundlichkeit und das offene Ohr. Den konstruktiven Austausch und die hilfreichen Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Ich möchte meinen tiefen Dank an alle Aussprechen, die mich in der Zeit des Studiums und während der Erstellung der Arbeit so außerordentlich begleitet haben. Dazu zählen vor allem meine Band, danke Dominik, Kilian, Martin und Marvin, und meine Kommilitonin Lisa. Ihr wart wundervolle Wegbegleiter während der ganzen Zeit und es ist auch euch zu verdanken, dass diese Arbeit hier ermöglicht wurde. Ebenso an meine besten Freunde Timmy und Regina. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich trotz der großen Entfernung unterstützt, wo es möglich war.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Paul, Nele, Maral, Annka, meiner Schwester Kimmy, meinen Eltern und Großeltern.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Lisa für die herausragende Unterstützung danken. Du hast mich immer motiviert, mir Kraft gegeben und den Rücken gestärkt. Mit dir konnte ich alles Beratschlagen und bei dem einen oder anderen Rückschlag stets auf dich zählen.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung.....	I
Vorwort	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Monozyten Aktivierungstest (MAT)	2
1.2 <i>RT-qPCR</i> als alternativer <i>Readout</i>	4
1.3 Hypothese und Ziel	6
2 Ergebnisse	7
2.1 Amplifikationseffizienz der <i>Primer/Probe</i> Systeme	7
2.2 Auswahl der <i>Housekeeping Gene</i>	11
2.3 Agarose Gelelektrophorese.....	12
2.4 Transformation in den <i>RT-qPCR Readout</i>	14
2.5 Reduktion der Inkubationszeit	17
2.6 Kalibrierung mit biologischem Referenzstandard	19
2.6.1 <i>IL1β</i>	21
2.6.2 <i>TNFα</i>	24
2.6.3 <i>Duplex</i> von <i>IL1β</i> und <i>UBC</i>	27
3 Diskussion und Ausblick	32
3.1 Diskussion	32
3.2 Fazit und Ausblick	35
4 Material und Methoden.....	36
4.1 Material	36
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien	36

4.1.2	Verwendete Kits	37
4.1.3	<i>Primer/Probes</i> und <i>RT-qPCR</i> Reagenzien	37
4.1.4	Geräte	38
4.1.5	Zelllinien	39
4.1.6	Software	39
4.2	Methoden	39
4.2.1	Zellkultur und Inkubation	39
4.2.2	Isolierung der <i>RNA</i>	40
4.2.3	Reinheit und Konzentrationsbestimmung	40
4.2.4	<i>RT-qPCR</i>	41
4.2.5	Agarose Gelelektrophorese	42
4.3	Auswertung und Statistik	43
4.3.1	Effizienzbestimmung	43
4.3.2	$\Delta\Delta C_t$ und Standardreihen	43
5	Literatur	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Aktivierungskaskade bei Bindung von <i>LPS</i> an den <i>TLR4</i>	1
Abbildung 2: Exemplarische Skizze für den Ablauf eines Sandwich- <i>ELISA</i>	4
Abbildung 3: Cycle-Auswertung der <i>TNFα</i> Effizienzbestimmung.....	9
Abbildung 4: Kalibriergeraden der Assays	10
Abbildung 5: Agarose Gelelektrophorese zur Amplifikationskontrolle	13
Abbildung 6: Erste RT-qPCR Analyse nach Transformation	16
Abbildung 7: Scouting verschiedener Inkubationszeiten	18
Abbildung 8: Aussaat der geometrischen Pyrogenverdünnungsreihe in 24-well plate	20
Abbildung 9: <i>BRP</i> -Standardreihe von <i>IL1β</i> als hyperbolischer Fit	22
Abbildung 10: Relative Genexpression von <i>IL1β</i> in der <i>BRP</i> -Standardreihe	23
Abbildung 11: <i>BRP</i> -Standardreihe von <i>TNFα</i> als hyperbolischer Fit	25
Abbildung 12: Relative Genexpression von <i>TNFα</i> in der <i>BRP</i> -Standardreihe	26
Abbildung 13: Aussaat der geometrischen 1:2 Pyrogenverdünnungsreihe in Triplikaten	27
Abbildung 14: <i>Duplex-Readout</i> der <i>BRP</i> -Standardreihe von <i>IL1β</i> als hyperbolischer Fit	29
Abbildung 15: Relative Genexpression des <i>Duplex</i> von <i>IL1β</i> und <i>UBC</i> in der <i>BRP</i> - Standardreihe	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Assayspezifische Effizienzbestimmung	8
Tabelle 2: Stabilität der <i>Housekeeping Gene</i>	11
Tabelle 3: Pyrogenkonzentration	14
Tabelle 4: Reaktionsansatz für den <i>RT-qPCR</i> Versuch nach Transformation des <i>ELISA</i>	15
Tabelle 5: <i>Cycle</i> -Profil für den <i>RT-qPCR</i> Versuch nach Transformation des <i>ELISA</i> .	15
Tabelle 6: Verdünnungsschema für den <i>BRP</i> -Standard	19
Tabelle 7: Auswertung der <i>BRP</i> -Reihe für <i>IL1β</i> als <i>Gene of Interest</i>	21
Tabelle 8: Auswertung der <i>BRP</i> -Reihe für <i>TNFα</i> als <i>Gene of Interest</i>	24
Tabelle 9: Auswertung der <i>BRP</i> -Reihe als <i>Duplex</i> von <i>IL1β</i> und <i>UBC</i>	28
Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien.....	36
Tabelle 11: Verwendete Primer/Probe Assays	37
Tabelle 12: Geräteliste	38
Tabelle 13: Verwendete Software	39

Abkürzungsverzeichnis

<i>B2M</i>	<i>β2-Mikroglobulin</i>
<i>BRP</i>	<i>Biologisches Referenzpräparat</i>
<i>cDNA</i>	<i>Komplementäre DNA</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>DPBS</i>	<i>Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung</i>
<i>EU / mL</i>	<i>Endotoxin Units per milliliter</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetales Kälberserum</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
<i>GOI</i>	<i>Gene of Interest</i>
<i>HEPES</i>	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
<i>HKG</i>	<i>Housekeeping Gen</i>
<i>HKSA</i>	<i>Heat-killed Staphylococcus aureus</i>
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
<i>IL1β</i>	<i>Interleukin-1β</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleukin-6</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<i>LTA</i>	<i>Lipoteichonsäure</i>
<i>MLC</i>	<i>Macrophage-Like Cells</i>
<i>NFκB</i>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<i>PBMC</i>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<i>Ph. Eur.</i>	<i>European Pharmacopoeia</i>
<i>PMA</i>	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>RPMI 1640</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>RT-qPCR</i>	<i>Reverse Transkriptase - Quantitative Polymerase Kettenreaktion</i>
<i>TAE</i>	<i>TRIS-Acetat-EDTA-Puffer</i>
<i>TNFα</i>	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
<i>TRIS</i>	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
<i>UBC</i>	<i>Ubiquitin C</i>

Zusammenfassung

Die bisher etablierte Methode zum Nachweis pyrogener Substanzen ist der Monozyten Aktivierungstest (*MAT*). In diesem, von der *European Pharmacopoeia* (*Ph. Eur.*) spezifizierten Test, werden humane monozytische Zellen mit Pyrogenen inkubiert und die Immunantwort über die Freisetzung von Zytokinen gemessen. Die Quantifizierung erfolgt bislang überwiegend mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (*ELISA*). Trotz der etablierten Sensitivität und Spezifität des *ELISA* sind die Nachweiszeiten vergleichsweise lang, da sowohl die Zellinkubation als auch die *ELISA*-Durchführung mehrere Tage in Anspruch nehmen.

Mit *Phorbol-12-myristat-13-acetat* (*PMA*) differenzierte *THP-1 Macrophage-Like Cells* können sowohl mit Endotoxinen wie dem Lipopolysaccharid-Standard *BRP* als auch mit non-endotoxin Pyrogenen (*NEP*) zur Zytokinbildung angeregt werden. Da die Inkubation der Zellen und der *ELISA* selbst zeitintensiv sind und drei Tage benötigt, herrscht ein Interesse an einer Reduktion und Vereinfachung des Assays. Die *RT-qPCR* zeigt hier das Potential die Inkubationszeit der Pyrogene auf ein bis zwei Stunden zu verringern. Die Genregulation und ihre relative Expressionsänderung lassen sich über die $\Delta\Delta C_t$ – Methode als Standardkurve auftragen. Als *Gene of Interest* sind *IL1 β* und *TNF α* untersucht worden. Als mögliche Referenzierungsgene zeigten sich *GAPDH* und *UBC* als besonders stabil bei Pyrogenkontakt. Diese neuartige *Readout*-Methode reduziert die Assay-Zeit auf knapp anderthalb Tage und zeigte stets gute Responsivität, sodass eine Validierung des Systems empfohlen wird.

1 Einleitung

Für die Verabreichung parenteraler Arzneimittelformulierungen ist die Abwesenheit von pyrogenen Verunreinigungen entscheidend. Pyrogene sind Substanzen, die fieberauslösend sind und eine starke Immunreaktion der angeborenen Immunantwort des Menschen auslösen können [1], [2]. Zu den bekanntesten Pyrogenen zählen die Endotoxine gramnegativer Bakterien, die Lipopolysaccharide (*LPS*), sowie die Lipoteichonsäure (*LTA*) grampositiver Bakterien. Auch *DNA*-Fragmente, Flagelline oder auch synthetische Substanzen können pyrogen sein [3]. Gemeinsam ist eine Aktivierung der Entzündungskaskade über Bindung an einen *Toll-Like Rezeptor (TLR)*, der überwiegend auf der Zellmembran von Monozyten, Makrophagen und weiterer, an der Immunreaktion beteiligter Zellen, vorkommt (Abbildung 1). Über eine Signalkaskade wird die proteolytische Spaltung von *NFκB* inhibiert, wodurch es im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirken kann. Zu der vielfältigen Anzahl an Genen, die durch *NFκB* exprimiert werden, zählen auch die der proinflammatorischen Zytokine wie *TNFα*, *IL1* und *IL-6* – Botenstoffe der Immunreaktion.

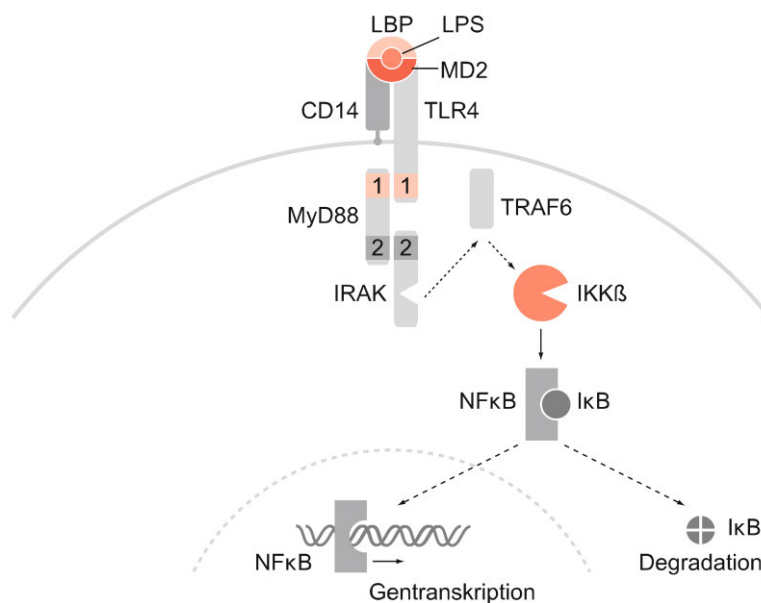


Abbildung 1: Molekulare Aktivierungskaskade bei Bindung von *LPS* an den *TLR4*

Bindung von *LPS* an den Toll-Like Rezeptor 4 aktiviert die „Inhibitor of NFκB Kinase“ (IKKβ). NFκB wird nicht mehr proteolytisch gespalten und dringt als Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Zytokine in den Zellkern ein.

Übernommen aus „Grundwissen Immunologie“ von Christine Schütt und Barbara Bröker, 2011, S. 46.

Historisch wurden Pyrogene primär mittels Kaninchentests durchgeführt, bei dem die Temperaturreaktion des lebenden Tieres nach Verabreichen geprüft wurde [1]. Die

Rektaltemperatur wurde hier im Vorfeld zur Stabilisierung mehrfach gemessen. Nach Verabreichung der Prüfsubstanz wurde alle 30 Minuten über drei Stunden die Körpertemperatur erfasst. Initial wurden drei Kaninchen getestet, bei dem keines der Kaninchen einen Anstieg von $\geq 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ zeigen durfte. Andernfalls wurde die Kohorte auf bis zu zwölf erhöht, wobei die Summe der Anstiege nicht mehr als $6,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ überschreiten durfte. Ethisch wie auch Sensitivitätsbedingt ist dieser Test fragwürdig, weshalb er auch 2024 aus den Regularien der *European Pharmacopoeia* (*Ph. Eur.*) entfernt wurde [4].

Ein gut etablierter Nachweis für bakterielle Endotoxine ist der Limulus-Amöbozyten-Lysat Test (*LAL*). Bei diesem wird eine Probe mit dem Lysat der Amöbozyten (Blutzellen) des Pfeilschwanzkrebses vermischt, wodurch bei Anwesenheit von Endotoxinen eine Gerinnung oder Farbreaktion auftritt die Turbidimetrisch gemessen werden kann [1]. Der Einsatz von *in vitro* Tests verzichtet auf Versuchstiere und erlaubt so eine Standardisierung, sowie die Durchführung von Analysen im Mikrotiterplatten-Format. Da beim *LAL* lysiertes Blutextrakt verwendet wird, ist auch dieser Test nicht vollständig Tierfrei. Zudem können mittels *LAL* auch nur Endotoxine gramnegativer Bakterien nachgewiesen werden.

Neuere Verfahren bieten tierversuchsfreie Methoden, wie den Monozyten-Aktivierungstest (*MAT*). Dieser, seit 2009 in der *Ph. Eur.* geführte Assay [5], nutzt menschliche Immunzellen, um auf das Vorhandensein pyrogener Substanzen zu Testen. Dabei wird die Immunantwort in Form sekretierter Zytokine erfasst.

1.1 Der Monozyten Aktivierungstest (*MAT*)

Der *MAT* beruht auf der Fähigkeit humaner Monozyten, bei Pyrogenkontakt die proinflammatorischen Zytokine *TNF α* oder Interleukine (*IL1 β* , *IL-6*) zu bilden und freizusetzen. Bisher etabliert ist die Verwendung von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (*PBMC*), wobei es sich um durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene einkernige Blutzellen mit rundem Zellkern handelt [6]. Für den *MAT* werden diese von meistens acht genetisch unterschiedlichen Spendern *gepoolt*, jedoch von nicht weniger als vier, um einen möglichst geringen Einfluss der Spendervariabilität auf die Responsivität zu erhalten. Da es sich bei den *PBMCs* um Zellen des menschlichen Immunsystems handelt, gelten sie als Goldstandard bei der Erkennung von endotoxischen und nicht-endotoxischen Pyrogenen (*NEP*). Jedoch ist die Beschaffung und

Verarbeitung der *PBMC* Kostenaufwendig, da stets genügend Spender vorhanden und immunmodulierende Medikamente ausgeschlossen sein müssen. Auch trotz der *gepoolten* Zellen ist eine Standardisierung des Tests schwierig und nicht stets reproduzierbar. Alternativ ist der Einsatz von aus Zellkultur stammenden Zelllinien möglich.

THP-1 ist eine monozytische Zelllinie, die aus dem Blut eines an Akuter monozytischer Leukämie erkrankten Patienten isoliert wurde [7]. Mit *Phorbol-12-myristat-13-acetat* (*PMA*) lassen sich die Monozyten in proliferationsunfähige Zellen differenzieren, die starke Ähnlichkeiten zu humanen Makrophagen aufweisen [8]. Diese *THP-1* Makrophagen, technisch korrekt *makrophagenähnliche Zellen* (engl.: *Macrophage-Like Cells, MLC*), bilden wie ihr humanes Pendant Oberflächenmarker wie *CD11b* oder *CD14* aus und haben als *M0*-Phänotyp Polarisierungseigenschaften. Eine anschließende Stimulation mit *LPS* führt zur weiteren Differenzierung in den proinflammatorischen *M1*-Phänotyp, der unter anderem für die Bildung von Zytokinen verantwortlich ist. Insbesondere die *M1*-Subpopulation bildet dabei die für die Responsivität auf *LPS* wichtigen *TLR*-Rezeptoren aus [9]. Die *THP-1 MLC* können als *Assay Ready Cells* validiert werden, sodass sie sofort nach dem Auftauen in zellbasierten Assays ohne Vorkultivierung eingesetzt werden [10]. So entfällt die Kulturhaltung der *THP-1* und die anschließende Differenzierung in der Anwendung.

Diese reproduzierbaren Eigenschaften bieten die Möglichkeit einer Standardisierung der Testverfahren, da so die Variabilität der Spender nicht mehr von Bedeutung ist. Sie ahmen die Entzündungsreaktion im Menschen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu humanen Immunzellen nach und sind daher in der Lage, sowohl endotoxische Pyrogene als auch *NEP* zu detektieren. Bisher erfolgte der Standard-*Readout* für den *MAT* auf Basis des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* [5]. Hierbei werden spezifische Antikörper zur Detektion und Quantifizierung mit dem Zellüberstand inkubierter Zellen gemischt [3]. Der *ELISA* (Abbildung 2) ist in der Biochemie ein weit verbreiteter und gut etablierter Test mit hoher Sensitivität und Spezifität. Allerdings ist die Durchführung zeit- wie auch kostenintensiv und je nach Assay auch nicht immer im Parallelbetrieb mit anderen Tätigkeiten durchzuführen – ein *MAT*-Assay mit *ELISA Readout* dauert drei Tage [10]. Diese Einschränkungen haben das Interesse an alternative Detektionsmethoden geweckt, insbesondere eine Reduktion der langen Assay-Zeit.

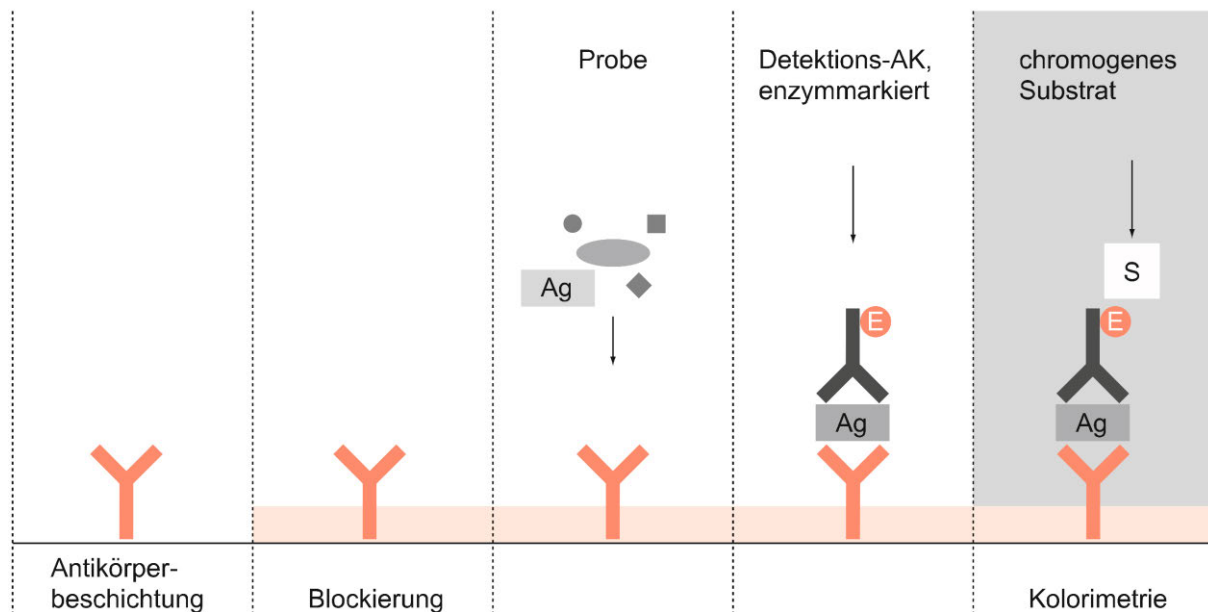


Abbildung 2: Exemplarische Skizze für den Ablauf eines Sandwich-ELISA

Die Mikrotiterplatte wird über Nacht mit dem Antikörper beschichtet, am nächsten Tag mit Puffer geblockt und mit der Probe in Kontakt gebracht. Die Testsubstanz bindet an den Antikörper, wodurch ein enzymgekoppelter Detektionsantikörper an den Komplex binden kann (Sandwich). Ein chromogenes Substrat wird vom Enzym gespalten und photometrisch gemessen.

Aus „Grundwissen Immunologie“ von Christine Schütt und Barbara Bröker, 2011, S. 127.

1.2 RT-qPCR als alternativer Readout

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von mRNA-Transkripten spezifischer Gene [11], [12]. Isolierte RNA wird hierbei, im Vergleich zur klassischen PCR, welche nur DNA amplifizieren kann, mittels *Reverse Transkriptase* in eine resultierende Komplementär-DNA (cDNA) transkribiert. Diese kann dann klassisch als PCR gemessen werden. Der Amplifikationsfortschritt kann in Echtzeit durch fluoreszenzbasierte Sonden, den *Probes*, vom Thermocycler gemessen werden. Interkalierende Farbstoffe wie *Ethidiumbromid* oder *SYBR Green I* binden dabei an die kleine Furche der DNA und erhalten dadurch ihre fluoreszierenden Eigenschaften – das Signal steigt damit proportional zur vorhandenen Menge an DNA.

Bei 5' nuklease Assays wird die Exonukleaseaktivität der verwendeten DNA-Polymerase genutzt. Zusätzlich zu den Primern befindet sich eine Oligonukleotidsonde im Reaktionsgemisch, an der ein Fluorophor am 5'-Ende und ein *Quencher* am 3'-Ende angebracht sind. Die Oligonukleotidsonde ist dabei spezifisch für einen Abschnitt des Amplifikats und lagert sich während des Annealing an. Bei der Elongation trennt die Polymerase durch die Exonukleaseaktivität die fluorophore Substanz von der

Sonde und verhindert damit die Weiterleitung der Anregungsenergie an den *Quencher*, wodurch diese bei Anregung ihre spezifische Wellenlänge emittiert.

Bei jeder Amplifikation wird der Anteil an freiem Fluorophor verdoppelt und die Emissionsintensität steigt daher proportional zum Amplifikationsfortschritt. Aufgrund der Spezifität der Fluorophor-*Probe*-Verbindungen können mehrere Ziele in der *qPCR* gleichzeitig gemessen werden [11], [13]. Werden mehrere Gene gleichzeitig in einer Reaktion getestet, so spricht man vom *Duplexing* (auch Zweifarbbassay), im Gegensatz zum einfachen *Simplex* [14], [15]. Charakteristisch für die *Real-Time qPCR* ist der *Cycle Theshold*, genannt C_t – Wert, bei dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen tritt [13]. Dieser ist Abhängig von der bis dahin amplifizierten *cDNA* Menge und damit das Maß für die Quantifizierung. Das Verhältnis zwei verschiedener Mengen von *mRNA* wird als ΔC_t – Wert bezeichnet. Er bildet die Differenz zwischen einem *Gene of Interest (GOI)* und einem Referenzgen und gibt an, wieviel über- oder unterexprimiert es jeweils in Bezug auf die Referenz ist. Die Änderung dieses Expressionsverhältnisses einer Stimulierten- zu einer Kontrollgruppe wird als $\Delta\Delta C_t$ – Wert ausgedrückt. Dabei gilt zu beachten, dass die C_t – Werte durch den Verdopplungscharakter der *PCR* quadratisch skalieren, also eine Änderung des C_t – Wertes um eins eine Verdopplung oder Halbierung der verfügbaren *cDNA* bedeutet.

Kritisch für eine zuverlässige *RT-qPCR* ist dabei vor allem die Qualität der isolierten *RNA* und der Isolierung allgemein [16]. So ist *mRNA* in der Zelle nicht lange stabil und das Verhältnis zwischen synthethisiertem Protein und vorhandener *RNA* ist nicht zwangsläufig proportional [17].

1.3 Hypothese und Ziel

Nach dem zentralen Dogma der Molekularbiologie wird von der *DNA* zur *RNA* transkribiert, von da zum Protein translatiert [18]. Die Konzentration von Zytokinen ist über den *ELISA* messbar, daher muss es auch die der zytokin-produzierenden *mRNA* sein. Bei erhöhter Konzentration an Pyrogenen wird durch stärkere Rezeptorbindung auch mehr *mRNA* gebildet, wodurch eine Standardkurve gegenüber dem Pyrogen auftragbar wird.

Um die Interassaystabilität durch beispielsweise Zellzahlunterschiede oder Lysezeiten zu gewährleisten, sollte die Genexpression und ihre Änderung auf ein Referenzgen, das sogenannte *Housekeeping Gen*, normiert werden. Ein *Housekeeping Gen* sollte wenn möglich nicht durch den Assay hoch- oder runterreguliert sein und zeigt mögliche off-target Effekte an.

Diese Arbeit soll den bestehenden *MAT*-Assay vom *ELISA* auf *RT-qPCR Readout* umstellen und für spätere Validierungszwecke vorbereiten.

2 Ergebnisse

2.1 Amplifikationseffizienz der *Primer/Probe* Systeme

Die verwendeten *Primer/Probe* Assays sind auf ihre Amplifikationseffizienz hin untersucht worden. Eine stabile *RT-qPCR* sollte reproduzierbar je Zyklus eine ungefähre Verdopplung erzielen, was mit der Effizienz ausgedrückt wird. Sollen zwei Zielgene miteinander verglichen werden ist eine ähnliche bis gleiche Verdopplungseffizienz vorauszusetzen.

Um über die nutzbare Zykluslänge die Amplifikationseffizienz bestimmen zu können werden *RNA*-Isolate (s. Abschnitt 4.2.1 u. 4.2.2) über Konzentrationsdekaden verdünnt und in bis zu vier technischen Replikaten amplifiziert. Die Effizienz wird über die „*Absolute Quantification*“ der *micPCR*-Software bestimmt und als Standardkurve für Versuche hinterlegt. In der folgenden Tabelle 1 sind die jeweilig eingesetzten *RNA*-Mengen und C_t – Werte angegeben, die Berechnung der Effizienz erfolgt nach Gleichung 2 (Kapitel 4.3.1).

Tabelle 1: Assayspezifische Effizienzbestimmung

Verdünnungsreihen über Konzentrationsdekaden von RNA-Isolaten aus Pyrogeninkubationen. 3 – 4 technische Replikate je Lauf. Fast-Cycle Methode nach Herstellerangaben für Simplex, Normal-Cycle Methode für den Duplex von IL1 β und UBC.

Die erzielten C_t – Werte der verdünntesten Probe während der TNF α Effizienzbestimmung liegen ca. einen ganzen Cycle auseinander (s. Abbildung 3), weshalb auf das Auftreten der Poisson-Verteilung geschlossen werden kann. Das Verwenden dieses Datenpunkts liegt daher außerhalb der zuverlässigen Nachweisgrenze und wird nicht verwendet.

	Gen	Template (ng/reaction)	Cycle value	Effizienz
Simplex	IL1 β	219,4	31,51 $\pm$ 0,14	0,9187
		21,9	28,03 $\pm$ 0,03	
		2,19	24,48 $\pm$ 0,02	
		0,219	20,95 $\pm$ 0,03	
		0,0219	17,37 $\pm$ 0,04	
	TNF α	298,8	22,03 $\pm$ 0,02	0,9898
		29,88	24,99 $\pm$ 0,02	
		2,988	28,37 $\pm$ 0,06	
		0,2988	32,00 $\pm$ 0,12	
		0,02988	35,58 $\pm$ 0,47	
	UBC	333,6	16,68 $\pm$ 0,06	0,9869
		33,36	19,22 $\pm$ 0,05	
		3,336	22,58 $\pm$ 0,09	
		0,3336	25,97 $\pm$ 0,02	
		0,03336	29,26 $\pm$ 0,07	
Duplex	IL1 β	169	19,10 $\pm$ 0,01	0,9828
		16,9	22,53 $\pm$ 0,02	
		1,69	25,93 $\pm$ 0,04	
		0,338	28,25 $\pm$ 0,03	
		0,0676	30,51 $\pm$ 0,10	
	UBC	169	17,72 $\pm$ 0,01	0,9708
		16,9	20,71 $\pm$ 0,02	
		1,69	24,11 $\pm$ 0,03	
		0,338	26,47 $\pm$ 0,02	
		0,0676	28,80 $\pm$ 0,05	

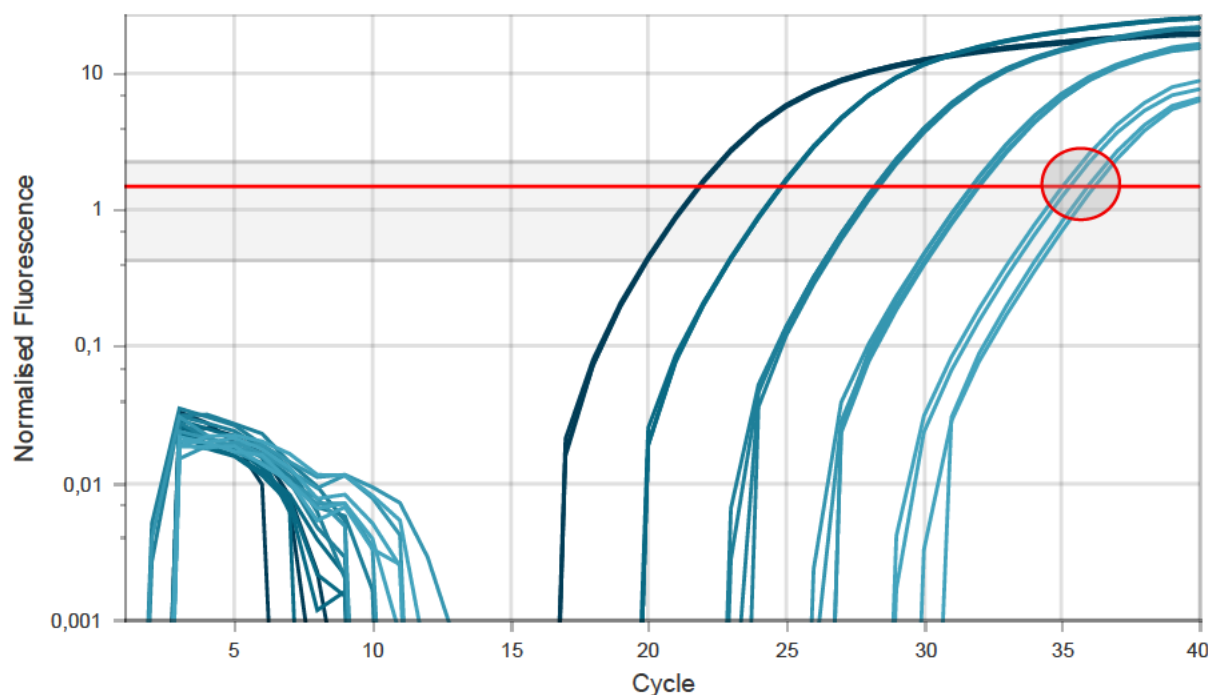


Abbildung 3: Cycle-Auswertung der *TNFα* Effizienzbestimmung

Die Effizienz des *TNFα* Assays ist durch Verdünnung von Konzentrationsdekaden und anschließendem Cycling in 3 – 4 technischen Replikaten bestimmt worden. Dargestellt sind die Kurvenverläufe des *micPCR*-Programms der fünf Verdünnungsstufen in logarithmischer normierter Fluoreszenz. Die verdünnteste Probe (roter Kreis) zeigt einen ganzen Cycle Abstand innerhalb der Replikate, was auf das Auftreten der Poisson-Verteilung schließen lässt.

Da der Master Mix für über 200 ng *RNA-Template* keine zuverlässigen Ergebnisse liefert [19], werden die höchstkonzentrierten Proben nur bei ausreichend guter Linearität verwendet. Daher ist die 333,6 ng Probe der *UBC-Simplex* Messung nicht in die Berechnung eingeflossen.

Die *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE)*-Guideline schreibt keine Mindesteffizienz für qPCR-Assays vor [20], allerdings ist die Verwendung von 90 – 110 % üblich und auch auf der Website so beschrieben. Alle bestimmten Effizienzen liegen in diesem Intervall und werden daher als geeignet angenommen. Eine Loglinearität ist über den gesamten Untersuchungsbereich gegeben (Abbildung 4) und der Anwendungsbereich des Herstellers gültig.

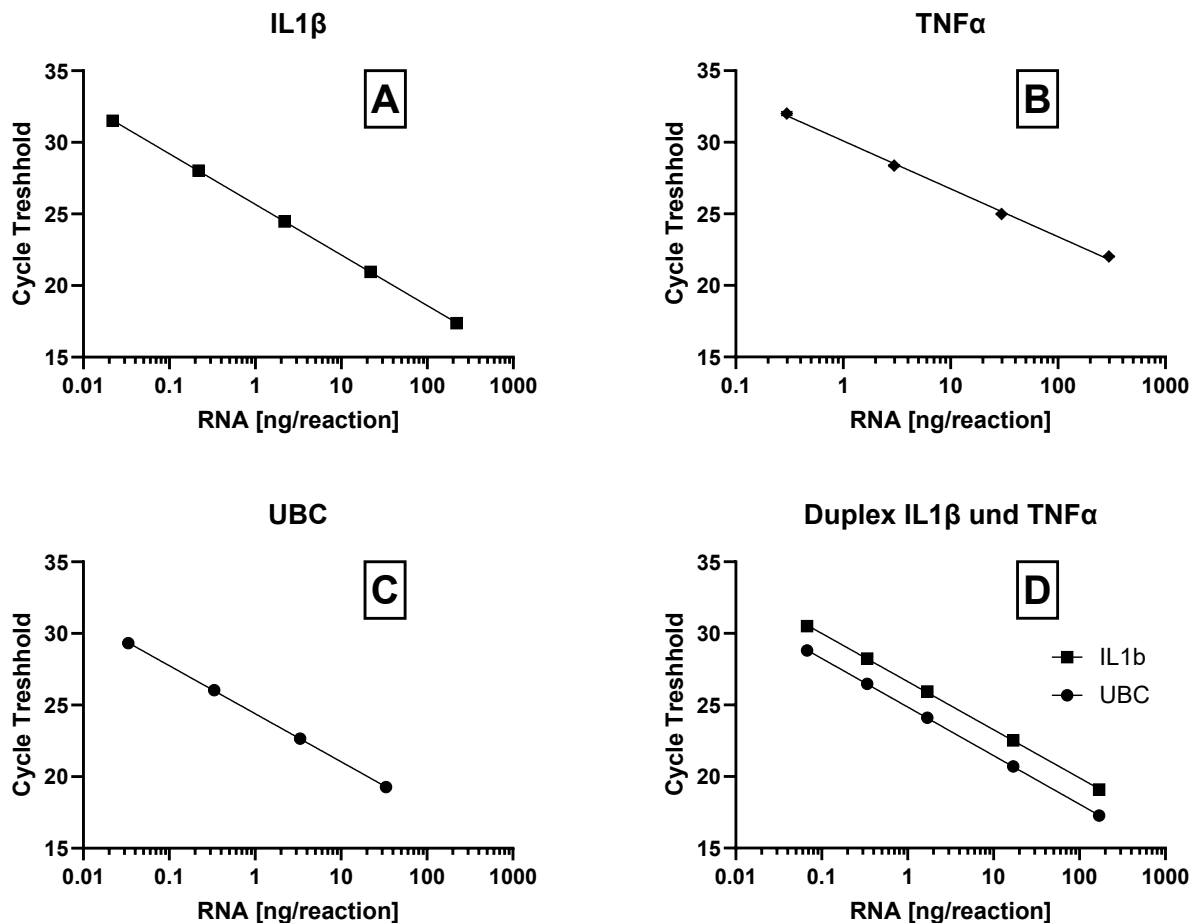


Abbildung 4: Kalibriergeraden der Assays

Die Effizienzen der Primer/Probe Systeme werden über die Steigung der Regressionsgeraden berechnet. Die Simplex-Assays (A – C) wurden im Fast-Cycle Modus untersucht. Im Duplex (D) wird der Normal-Cycle nach IDT genutzt. Analysiert wurden RNA-Isolate von pyrogeninkubierten THP-1 Macrophage-Like Cells ($n = 3 - 4$). Dargestellt sind alle verwendeten Messpunkte im loglinearen Bereich der Verdünnungsreihe.

Simplexeffizienzen – (A) IL1 β = 0,9187; (B) TNF α = 0,9898; (C) Ubiquitin C = 0,9708.

Duplexeffizienz – (D) IL1 β = 0,9828 & Ubiquitin C = 0,9708.

Es konnte gezeigt werden, dass die erworbenen Genexpressionsassays mit dem verwendeten *One-Step Master Mix* auf der *micPCR* – Plattform zu Amplifikationseffizienzen von ca. 92 – 100 % führen. Die Voraussetzung für eine Verdopplung des Amplifikats pro *Cycle* ist gegeben.

Da anhand der ungefähren Verdopplung je Zyklus gezeigt werden kann, dass amplifiziert wird, wird als nächstes die Reproduzierbarkeit der Versuche überprüft. Insbesondere da nicht bekannt ist, wie viele *mRNA*-Kopien im Isolat vorhanden sind, sondern nur die Gesamtmasse innerhalb der Lösung.

2.2 Auswahl der *Housekeeping Gene*

Um die Genexpression des Zielgens durch z.B. Variationen der Zellzahl, oder Degradation vorhandener *mRNA*, normieren zu können, wird auf die Zuhilfenahme eines *Housekeeping Gens (HKG)* gesetzt. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, sollte die Expression und die Menge des *HKG* innerhalb der Zellen möglichst konstant sein und nicht von dem Testverfahren beeinflusst werden.

Vielversprechend sind dabei vor allem die Gene *UBC*, *B2M* und *GAPDH*, da gezeigt werden kann, dass sie bei *THP-1 MLC* einen sehr geringen C_t – Shift unter *LPS* Stimulation aufweisen [21]. Zusätzlich wird *HPRT1* als *HKG* untersucht. Berechnet wird der Shift über die Gleichung 1.

$$\Delta C_t = C_t(\text{treatment}) - C_t(\text{control}) \quad \text{Gleichung 1}$$

Nach Kapitel 4.2.1 werden je $3 \cdot 10^6$ Zellen / 1,8 mL in einer 6-well plate ausgesät und nach der 24-stündigen Erholung für 2 h mit *LPS* (1,6 EU/mL) inkubiert, die Negativkontrolle mit *Assay Buffer A*. Nach der *RNA*-Isolation (4.2.2 – 4.2.3) werden 1 μg *RNA* in 4 technischen Replikaten im *Fast-Cycle* amplifiziert.

Tabelle 2: Stabilität der *Housekeeping Gene*

THP-1 Macrophage-Like Cells werden mit 1,6 EU/mL *LPS* inkubiert und der C_t – Shift gegen die *Assay Buffer A* Kontrolle untersucht. 1 μg *RNA*, *Fast-Cycle*. Ein kleinerer Shift zeigt dabei eine geringere Beeinflussung der Stimulationssubstanz und damit eine höhere Eignung für die Verwendung als *Housekeeping Gen* an.

Gen	C_t <i>LPS</i>	C_t <i>Assay Buffer A</i>	ΔC_t
<i>UBC</i>	$15,28 \pm 0,05$	$15,23 \pm 0,02$	0,046
<i>GAPDH</i>	$14,27 \pm 0,04$	$14,23 \pm 0,01$	0,035
<i>B2M</i>	$12,50 \pm 0,04$	$12,79 \pm 0,15$	-0,295
<i>HPRT1</i>	$18,21 \pm 0,01$	$18,28 \pm 0,05$	-0,067

Der Shift der in Tabelle 2 gezeigten C_t 's ist für *UBC*, *GAPDH* und *HPRT1* in einer ähnlichen Größenordnung, *B2M* zeigt den größten Shift. Da der ΔC_t bei *UBC* und *GAPDH* ähnlich ausfällt, können beide als *Housekeeping Gen* verwendet werden. Aufgrund des stabileren Verhaltens bei Kontakt zu höheren *LPS*-Konzentrationen [21] und trotz des leicht höheren C_t – Werts wird für die weiteren Versuche *UBC* als Referenzgen verwendet, ohne dass sich *GAPDH* bei dem Versuch als über- oder unterlegener zeigt.

2.3 Agarose Gelelektrophorese

Da geeignete Referenzierungsgene gefunden wurden, welche die Reproduzierbarkeit gewährleisten, muss die Spezifität überprüft werden. Es hat ein Nachweis zu erfolgen, dass nur die gesuchte *mRNA* des *Gene of Interest* und des *HKG* amplifiziert werden und die *Primer* selektiv für diese sind.

Zur Amplifikationskontrolle werden *RNA*-Isolat und *PCR*-Amplifikat via Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5) aufgetrennt. Dabei wandern die, durch das Phosphatrückgrat negativ geladenen, *RNA*- und *DNA* – Moleküle entlang eines elektrischen Feldes durch ein Agarose Gel. Kleinere Sequenzen wandern dabei schneller durch das quervernetzte Polysaccharid, sodass nach Größe aufgetrennt und zugeordnet werden kann. Gezeigt werden soll die Spezifität der verwendeten *Primer* – dass je *Primer* ein Amplifikat gebildet wird. Durch Ähnlichkeiten oder Übereinstimmungen zu anderen Gensequenzen könnte mehr als nur das Zielgen analysiert werden. Ebenso soll ausgeschlossen werden, dass genomische *DNA* ein Fehlsignal liefert, daher spannen die *forward*- und *reverse Primer* das *Annealing* über die Exons der Gene auf.

Eine mit *LPS* (1,6 EU/mL) inkubierte und isolierte Probe ist einmal unverarbeitet und einmal nach deinem *Duplex*-Lauf von *IL1 β* und *UBC* auf einem Gel aufgetragen (Abbildung 5) worden. Auffällig sind die verteilten punktförmigen Signale im *RNA*-Isolat. Normalerweise ist das Aussehen Bandenförmig, die Konzentration entscheidet über die Breite und Intensität des Signals. Die Punkte liegen auf ähnlicher Höhe wie die Banden der *DNA-Ladder*, weshalb es sich vermutlich um Artefakte der Kamera oder anderweitiger Lichtstreuung handelt. Am oberen Ende der *RNA*-Isolat Linie befindet sich eine schwache Bande. Aufgrund ihrer Größe kann es sich um ribosomale *RNA* handeln, oder um genomische *DNA*, da kein *DNA*-Verdau bei der Isolierung erfolgt.

Da das *RT-PCR* Produkt aus einem *Duplex* stammt werden zwei Banden kurzer Länge erwartet. Diese liegen bei ca. 100 bp und 150 bp mit schwacher Trennung vor, zusätzlich zu einer schwachen Bande bei < 70 bp.

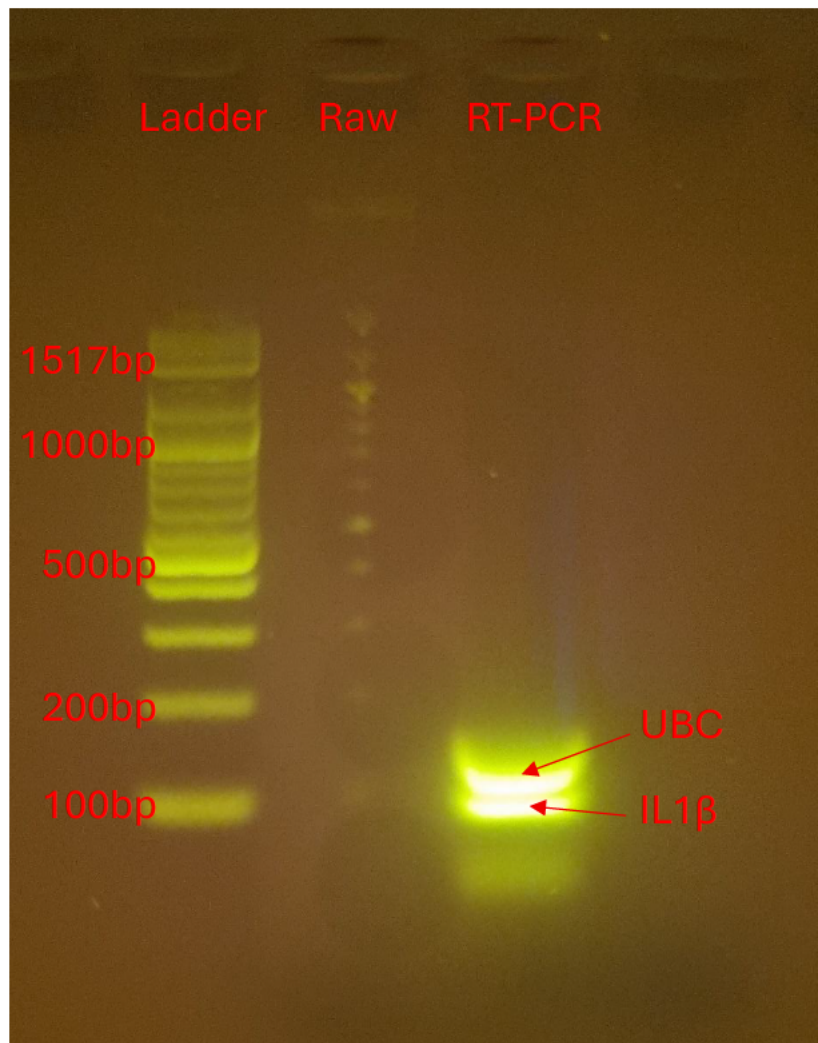


Abbildung 5: Agarose Gelelektrophorese zur Amplifikationskontrolle

RNA-Isolat und RT-PCR Duplex-Amplifikat wurden mit 2 % Agarose Gel bei 100 V für 60 min aufgetrennt, gefärbt mit GelGreen. Das RNA-Isolat zeigt homogen verteilt kleine, punktförmige Signale entlang der DNA-Leiter und eine erkennbare Bande am oberen Ende. Die Punktförmigkeit im RNA-Isolat lassen auf Bild- oder Messartefakte schließen, da die Bandenbreite nicht übereinstimmt und die Positionierung auf Markerhöhe läuft. Die obere Bande lässt auf genomische DNA-(Fragmente) oder ribosomale RNA-Rückstände schließen RT-PCR Amplifikat von *IL1β* und *UBC* weist zwei intensive, fast überlappende Banden auf, bei ca. 100 bp und 150 bp. Die Intensität und Position deuten auf die Zielprodukte hin. Die schwächere Bande bei ca. 70 bp zeigt vermutlich Dimerisierung von Primern.

Die Amplifikatlänge der *Primer* für *IL1β* und *UBC* wurden mithilfe von *Primer-BLAST* (NCBI) auf *cDNA*-Ebene analysiert. Die Analyse basierte auf den *RefSeq*-Transkripten NM_000576.3 (*IL1β*) [22] und NM_021009.7 (*UBC*) [23] unter Verwendung der Standardeinstellungen für *Homo sapiens*. Die Produktlänge wurde mit 105 bp für *IL1β* und 150 bp für *UBC* ermittelt. Damit wird in Abbildung 5 die obere intensive Produktbande *UBC*, die anliegend darunter liegende *IL1β* zugeordnet. Bei der schwachen Bande < 70 bp wird von *Primer*-Dimerisierung ausgegangen.

Bisher wurde gezeigt, dass die *Primer* spezifisch und effizient die resultierenden *cDNAs* amplifizieren. Auf Basis der Referenzierungsgene kann nun durch Normierung die relative Genexpression bei Endotoxinkontakt vs. Kontrollen untersucht und mit dem Entwurf zum alternativen Assay – *Readout* begonnen werden.

2.4 Transformation in den *RT-qPCR Readout*

Startpunkt der Etablierung ist die Transformation des bestehenden *MAT-ELISA* Assays [10] auf *RT-qPCR*. Der Hersteller des Isolierungskits gibt eine angestrebte Zellzahl von $10^6 - 10^7$ Zellen an, spezifiziert jedoch bei Zelllinien mit unbekanntem *RNA*-Inhalt auf $3 \cdot 10^6$ Zellen je Isolierung.

Als Pyrogene werden analog zum *BRP*-Standard selbsthergestellte *LPS*-Verdünnungen verwendet. Da die Endotoxinwirkung je nach ursprünglichem *LPS*-Organismus unterschiedlich ausfallen kann, wird mit der Schätzung $0,1 \text{ ng/mL} \approx 1 \text{ EU/mL}$ gerechnet [24]. Das *LPS* und die non-endotoxin-Pyrogene *HKSA*, *LTA* und Flagellin werden äquivalent zur *ELISA* Inkubation wie in Tabelle 3 für eine $200 \text{ }\mu\text{L}$ Zugabe in Assay *Buffer A* als 10x Verdünnung angesetzt.

Tabelle 3: Pyrogenkonzentration

LPS und *NEP*-Verdünnungen für die Inkubation von $3 \cdot 10^6$ Zellen *THP-1 MLC* in 6-well plates. Das *LPS* wird als 10x Konzentrat angesetzt und durch Zugabe von $200 \text{ }\mu\text{L}$ in $1,8 \text{ mL}$ Zellsuspension 1:10 verdünnt. Kultur- und Verdünnungsmedium ist jeweils Assay *Buffer A*.

Pyrogen	Konzentration 10x Ansatz	Konzentration in well	Einheit
<i>LPS</i>	16	1,6	<i>EU/mL</i>
<i>HKSA</i>	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^8$	<i>Zellen/mL</i>
<i>LTA</i>	2	0,2	$\mu\text{g/mL}$
<i>Flagellin</i>	0,5	0,05	$\mu\text{g/mL}$

Zwei Vials *THP-1 MLC* werden nach Kapitel 4.2.1 aufgetaut und $1,8 \text{ mL}$ mit je $3 \cdot 10^6$ Zellen pro well in einer 6-well plate ausgesät. Nach 24 h Erholung im Inkubator werden die Zellen mit *LPS* und *NEP* für 18 h inkubiert. Lyse und Isolierung erfolgen nach den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.3.

Für die *RT-qPCR* wird auf das Signal von *IL1 β* , *IL-6* und *TNF α* im Vergleich zur Kontrolle in technischen Duplikaten getestet (Reaktionsmix und Cycle-Profil in Tabelle 4 und Tabelle 5).

Tabelle 4: Reaktionsansatz für den RT-qPCR Versuch nach Transformation des ELISA

Mit LPS und NEP inkubierte THP-1 MLC gegen Assay Buffer A. Da der mRNA – Gehalt des GOI nicht bekannt ist, wird mit 1 µg Template gecycled.

Substanz	Zugabe
Template	1 µg
One Step Master Mix (2x)	10 µL
Primer/Probe	2 µL
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µL

Tabelle 5: Cycle-Profil für den RT-qPCR Versuch nach Transformation des ELISA

Amplifikation von TNFα, IL1β und IL-6 in RNA-Isolaten aus pyrogeninkubierten THP-1 MLC.
Probes: TNFα - Cy5 (rot); IL1β - HEX (gelb); IL-6 - FAM (grün)

-- Programm --		
Zeit	Temperatur	Beschreibung
15 min	50 °C	Reverse Transkription
1 min	95 °C	Aktivierung Polymerase
	40 x	
5s	95 °C	Denaturieren
20 s	60 °C	Anlagern
10 s	72 °C	Elongation
–	–	Fluoreszenzmessung

Alle drei Assays (Abbildung 6) zeigen Amplifikation, der C_t – Wert der Kontrolle ist für IL1β mit 15,6 am geringsten. IL-6 besitzt den niedrigsten C_t – Wert mit 29,8 und 31,0. Das NEP HKSA liefert bei IL1β und TNFα den deutlichsten Shift zur Kontrolle, LPS hingegen bei IL-6.

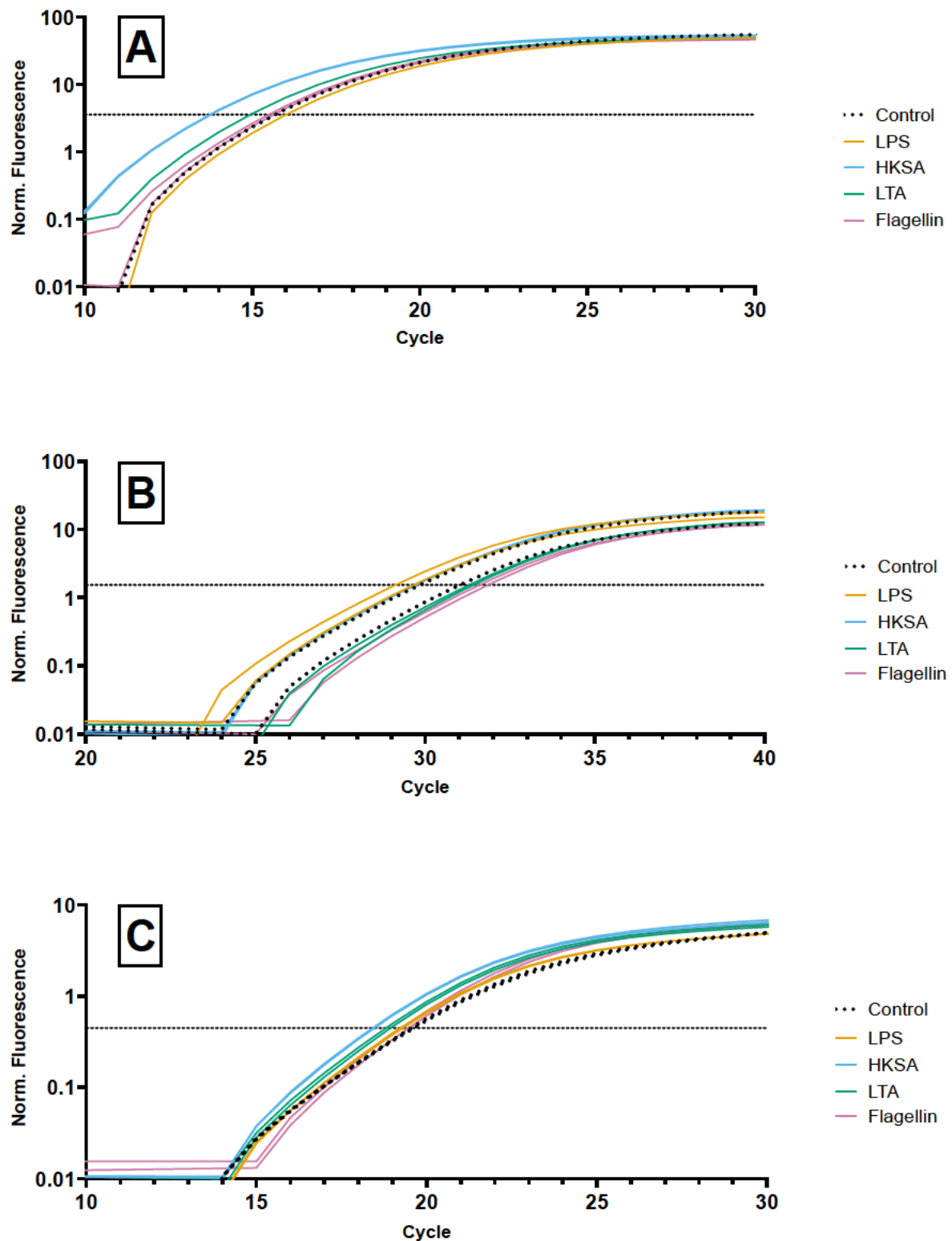


Abbildung 6: Erste RT-qPCR Analyse nach Transformation

Analog zum MAT-ELISA sind THP-1 MLC inkubiert worden. 24 h Anwachsen + 18 h Inkubation der Pyrogene. Die RNA-Isolate wurden im Fast-Cycle Modus auf IL1 β (A), IL-6 (B) und TNF α (C) analysiert. Horizontal gestrichelt dargestellt ist der errechnete Threshold Value. Dabei zeigte bei einem Einsatz von 1 μ g RNA IL1 β den geringsten C_t -Wert für die Kontrolle. Bei allen Kurven zeigen sich Streuungen oder geringe Shifts zur Kontrolle, IL-6 ist mit >29 Cycles des stärksten Signals nah an der Detektionsgrenze des Systems. Trotz der Inkubation mit der höchsten LPS-Konzentration des ELISA-Readouts und den dort verwendeten Positivkontrollen ist nur ein geringer Shift zur Kontrolle im Allgemeinen sichtbar. Der Assay bedarf weitere Optimierung, um die Auflösung und Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

2.5 Reduktion der Inkubationszeit

Nachdem gezeigt wurde, dass die Inkubation mit Pyrogenen zu einem C_t – Shift führt, ist die Optimierung der Inkubationszeit der nächste wichtige Schritt. Da der *MAT-ELISA* aus dem Inkubationsüberstand *TNF α* nachweist, sollte möglichst viel davon gebildet werden. Auf Ebene der *mRNA* kann es sich modellhaft Verhalten wie die mathematisch zeitliche Ableitung zur Proteinkonzentration [25], sodass Anfangs die größte Menge *mRNA* gebildet wird. Daher sollte eine Reduktion der Inkubationszeit angestrebt werden.

Analog zu Kapitel 2.4 werden *THP-1 MLC* mit *LPS* mit verschiedenen Inkubationszeiten inkubiert. Auf *IL-6* wird nicht weiter getestet, da der C_t der Negativkontrolle bei einem Einsatz von 1 μg *RNA* hoch und nahe der Detektionsgrenze ist (Abbildung 3) ist. Bei Einsatz geringerer *RNA*-Mengen würde der C_t – Wert weiter Richtung Nachweisgrenze wandern, ein restlich möglicher Shift um 4 Cycle würde einer 1:16 Verdünnung entsprechen.

Für *TNF α* liegt die optimale getestete Inkubationszeit (Abbildung 7) bei 1 h ($\Delta C_t = 4,74$), für *IL1 β* bei 2 h ($\Delta C_t = 3,06$). Da *TNF α* bei 2 h ebenfalls eine gute und im Vergleich zum *IL1 β* sogar deutlichere Auflösung liefert ($\Delta C_t = 4,10$), wird für den Assay eine Zeit von 2 h empfohlen – insbesondere, wenn ein *Duplexing* der beiden Zytokine angestrebt wird. *IL1 β* kann bei längerer Inkubation als robuster angesehen werden, *TNF α* hingegen bei kürzerer. Bei 18 h Inkubationszeit zeigt sich nahezu kein Shift mehr, oder gar eine Runterregulation.

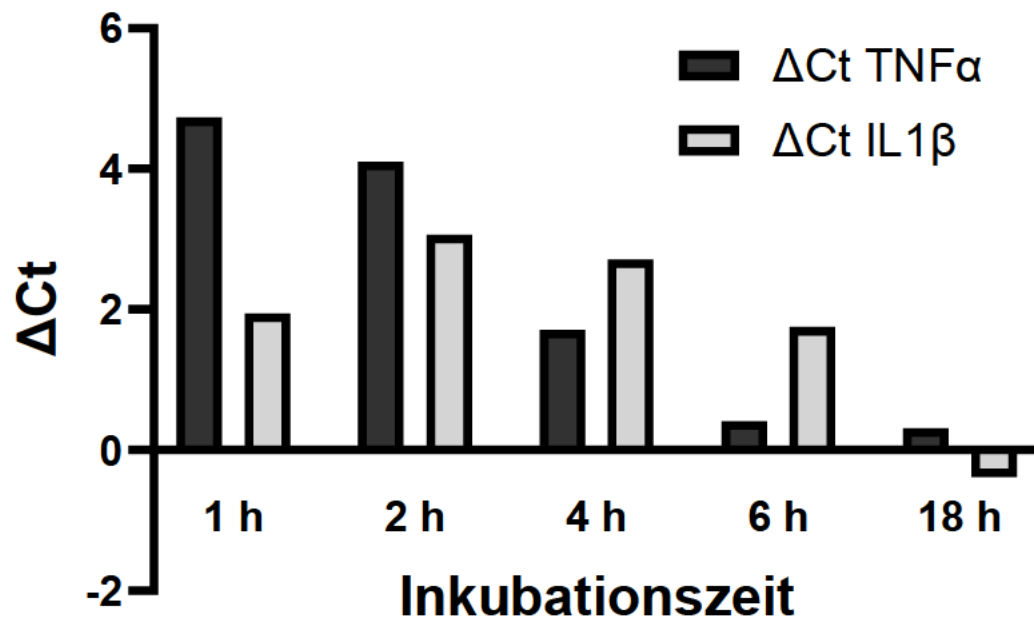


Abbildung 7: Scouting verschiedener Inkubationszeiten

Inkubation mit 1,6 EU/mL LPS und Assay Buffer A (Kontrolle) nach 24 h Erholungsphase im Inkubator. TNF α weist den höchsten Abstand zur Kontrolle von $\Delta C_t = 4,74$ auf. IL1 β hat nach 2 h die größte Sensitivität ($\Delta C_t = 3,06$). Kombiniertes Optimum bei 2 h, TNF α zeigt hier $\Delta C_t = 4,10$.

Durch die Optimierung der Inkubationszeiten und damit einhergehender Steigerung der Sensitivität sind die Vorüberlegungen für einen ersten Versuch zur Kalibrierung abgeschlossen. Bis hier ist bekannt, dass IL1 β und TNF α geeignet sind, mit UBC als Referenz, C_t – Shifts durch Pyrogeninkubation nachzuweisen.

2.6 Kalibrierung mit biologischem Referenzstandard

Bisher erfolgten die Inkubationen mit eigens hergestellten *LPS* – Lösungen unbekannter Endotoxinwirkung. Als Intraassaykalibrierung wird mit dem biologischen Referenzstandard für Endotoxine (*BRP*) je Assay inkubiert. Dieser Standard wird von der *Ph. Eur.* als Referenz für Endotoxinverhalten vorgegeben. Anhand dieser Kalibrierung soll dann eine spätere Probe auf Endotoxinaktivität getestet werden können. Für den Ansatz der *BRP*-Standardreihe wurde die Stammlösung von 2000 EU/mL 1:50 zu einer 40 EU/ml Vorverdünnung verdünnt. Aus der Vorverdünnung wurde durch eine 1:5 Verdünnung die 5x konzentrierte Arbeitslösung für den höchsten *BRP*-Standard von 8 EU/ml (*C8*) generiert. Durch eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe wurde die 5x konzentrierten Arbeitslösungen *C7-C1* pipettiert. Für die Inkubation der Zellen wurden 200µl der jeweiligen 5x konzentrierten Arbeitslösungen mit 800µl Zellsuspension vermischt, die zuvor in einer 24-well plate ausgesät wurden.

Tabelle 6: Verdünnungsschema für den *BRP*-Standard

Endotoxinstandard BRP als geometrische Verdünnungsreihe in Assay Buffer A gelöst. Angesetzt für 200 µL 5x-Pyrogenansatz in 800 µL Zellsuspension. Inkubation in 24-well plate. Die BRP-Stammlösung (2000 EU/mL) wird 1:50 auf 40 EU/mL vorverdünnt und 1:5 in die C8-Lösung verdünnt. Die Verdünnung erfolgt anschließend seriell von C8 – C1.

Bezeichnung	Konzentration 5x Ansatz [EU/mL]	Konzentration in well [EU/mL]
C1	0,0625	0,0125
C2	0,125	0,025
C3	0,25	0,05
C4	0,5	0,1
C5	1	0,2
C6	2	0,4
C7	4	0,8
C8	8	1,6

Aufgetaut wird ein Vial kryokonservierter *THP-1 MLC* nach Kapitel 4.2.1, davon werden in eine 24-well plate je 0,8 mL mit insgesamt $5 \cdot 10^5$ Zellen pro well in biologischen Duplikaten ausgesät (Abbildung 8). So entstehen 18 Proben (die Verdünnungsreihe *C1 – C8* und die Negativkontrolle, je Probe zwei). Die Zellen werden für 24 h zur Erholung und zum Anwachsen inkubiert. Anschließend wird mit der Verdünnungsreihe aus Tabelle 6 für 2 h inkubiert. Die Isolierung und Kontrolle / Quantifizierung der *RNA* erfolgt nach den Kapiteln 4.2.2 – 4.2.3. An diesem Punkt ist die *RT-qPCR* im Rahmen

dieser Arbeit abschließend optimiert und wird nach der Methode im Kapitel 4.2.4 durchgeführt. Getestet wird auf *IL1 β* und *TNF α* , jeweils gegen *UBC* als Referenzgen.

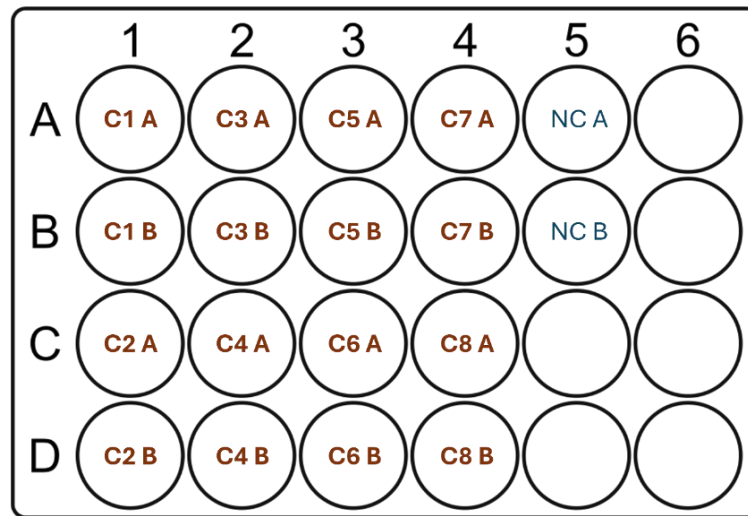


Abbildung 8: Aussaat der geometrischen Pyrogenverdünnungsreihe in 24-well plate

Für eine geometrische 1:2 BRP-Verdünnungsreihe werden $5 \cdot 10^5$ Zellen / 0,8 mL THP-1 MLC in Assay Buffer A ausgesät. Die Konzentration von Pyrogen in der Standardreihe reicht von C1 (0,0125 EU/mL) bis C8 /1,6 EU/mL), die Negativkontrolle (NC) wird mit Assay Buffer A inkubiert. 200 μ L des 5x Pyrogenstandards werden mit der Zellsuspension in der 24-well plate verdünnt, es ergibt sich eine 1:5 Verdünnung auf die Zielkonzentration. Gezeigt ist die schematische Belegung einer 24-well plate für die Inkubation.

2.6.1 IL1 β

Von jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten wird der C_t – Wert von IL1 β und UBC aufgezeichnet. Der ΔC_t wird gebildet und anhand der Negativkontrolle auf den $\Delta\Delta C_t$ normiert (s. Gleichung 3 und Gleichung 4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Auswertung der BRP-Reihe für IL1 β als Gene of Interest

Der Endotoxinstandard BRP als geometrische Verdünnungsreihe inkubiert und als Standardkurve mit zwei technischen und zwei biologischen Duplikaten via RT-qPCR bestimmt. Aus den $\Delta\Delta C_t$ – Werten kann die Standardkurve gebildet werden. Die relative Expression wird über $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet, was eine Amplifikationseffizienz von 100 % annimmt.

Bezeichnung	BRP		Replikat	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	Rel. Expression
	Konzentration	[EU/mL]				
C1	0,0125		A	1,500	-0,256	1,066
			B	1,828	0,072	
C2	0,025		A	1,620	-0,136	1,099
			B	1,620	-0,136	
C3	0,05		A	1,212	-0,544	1,386
			B	1,359	-0,397	
C4	0,1		A	0,634	-1,122	2,112
			B	0,721	-1,035	
C5	0,2		A	0,286	-1,470	3,103
			B	-0,042	-1,798	
C6	0,4		A	-0,409	-2,165	4,329
			B	-0,307	-2,063	
C7	0,8		A	-0,885	-2,641	6,526
			B	-1,016	-2,771	
C8	1,6		A	-1,215	-2,971	7,875
			B	-1,228	-2,984	
NC	0		A	1,765	—	—
			B	1,747	—	

Der $\Delta\Delta C_t$ wird mit einem nonlinearen hyperbolischen Fit (Gleichung 5) gegen die BRP-Konzentration aufgetragen (Abbildung 9). Aus dieser Form der Hyperbelgleichung lassen sich die Parameter B_{max} und K_d bestimmen. Das Plateau, an welches sich die Funktion annähert, wird mit B_{max} angezeigt. Die Halbwertskonstante K_d gibt an, bei welcher Konzentration der halbe Plateauwert erreicht ist. Bei niedrigem K_d besitzt die

Funktion eine höhere Sensitivität, da sie schon bei geringerer Konzentration zu höherem Funktionswert führt. Es zeigt sich ein klarer Shift ab 0,05 EU/mL und der Fit nähert sich bei der höchsten Konzentration langsam einem Plateau an. Zwischen 0,025 EU/mL und 0,8 EU/mL zeigt sich eine loglineare Phase. Für den Fit wurde ein Plateau von $B_{max} = -3,496$ errechnet und ein $K_d = 0,2514$. Mit einem R^2 von 0,9936 und dem schmalen 95 % Konfidenzband handelt es sich um eine sehr geeignete Zuordnungsmethode. Auffällig dabei die große Unsicherheit der Einzelwerte, wobei hier auf die Anzahl der biologischen Replikate ($n = 2$) verwiesen werden muss. Mit einem optimierten Cycle Profil könnte die Abweichung reduziert werden (Kapitel 2.6.3).

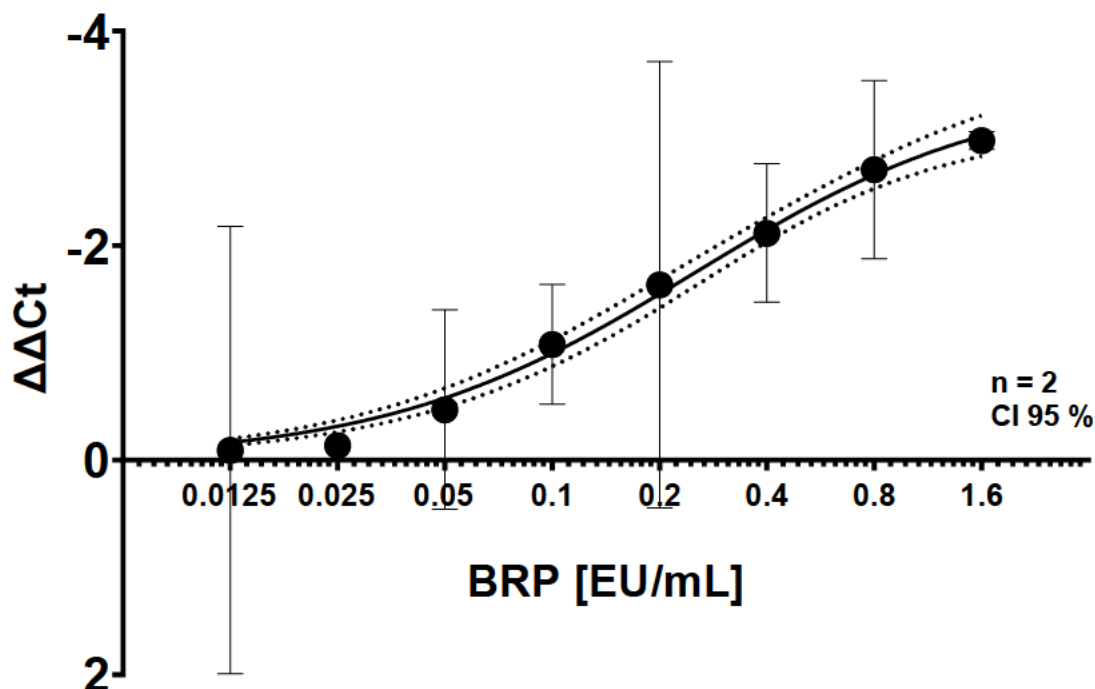


Abbildung 9: BRP-Standardreihe von IL1 β als hyperbolischer Fit

Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von BRP, $\Delta\Delta C_t$ von IL1 β gegen UBC. Datenpunkte und Konfidenzband des Fits sind je als 95 % CI gezeigt. Zu Beginn zeigt sich noch keine Responsivität gegenüber dem BRP. Zwischen 0,025 EU/mL und 0,8 EU/mL geht der Verlauf in eine loglineare Phase über. Zum Ende der Kurve beginnt sich leicht ein Plateau abzuzeichnen, welches im Fit mit dem Parameter $B_{max} = -3,496$ gerechnet wird. Die Halbwertskonstante wird mit $K_d = 0,2514$ berechnet. R^2 0,9936.

Aufgrund der exponentiellen Transformation der relativen Expression aus dem $\Delta\Delta C_t$ – Wert wird die Kalibriergerade über den $\Delta\Delta C_t$ – Wert selbst gebildet. Da sie eine abgeleitete Größe aus den $\Delta\Delta C_t$ – Werten ist, müsste daher auch die Kalibrierung bei Benutzung der eher üblichen Darstellung der relativen Genexpression mittransformiert werden. Es wäre zwar Äquivalent, bietet allerdings mathematisch keinen Vorteil. Die relative Expression nach der $\Delta\Delta C_t$ – Methode (dargestellt in Abbildung 10) zeigt einen loglinearen Bereich ab ca. 0,1 EU/mL. Sie ist für die Kalibrierung nicht erforderlich, da

äquivalent, zeigt jedoch anschaulich die Steigerung der Genexpression des Zytokins bei steigendem Pyrogenkontakt.

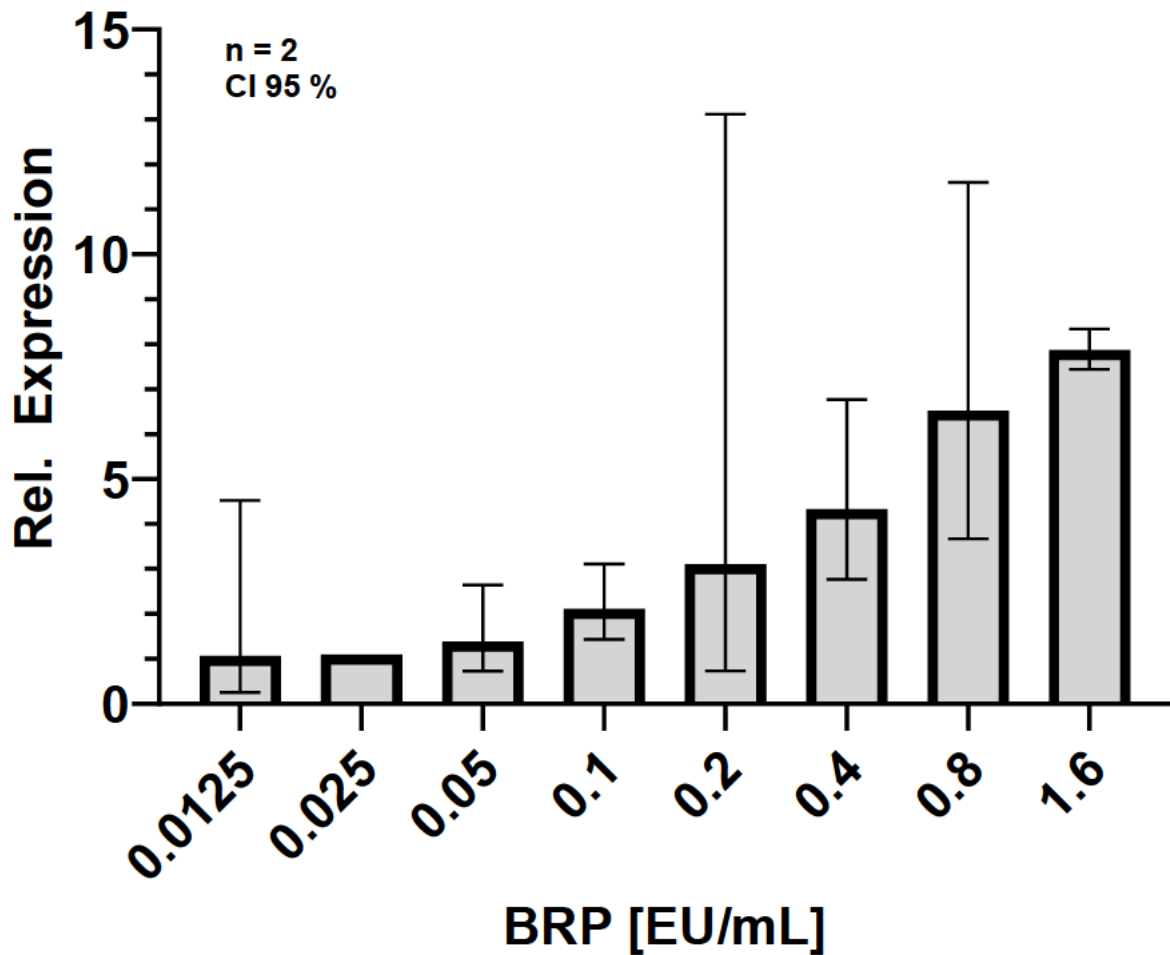


Abbildung 10: Relative Genexpression von *IL1β* in der *BRP*-Standardreihe

Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von *BRP*, relative Genexpression von *IL1β* gegen *UBC* nach der $\Delta\Delta C_t$ – Methode. Für die exponentielle Transformation wird eine Amplifikationseffizienz von 100 % angenommen. Anstieg ab 0,05 EU/mL erkennbar, loglinear ab ca. 0,05 – 0,1 EU/mL.

2.6.2 *TNF α*

Die Beprobung verläuft analog zum vorigen Kapitel 2.6.1 mit *TNF α* als *Gene of Interest*. Ebenfalls getestet als biologische und technische Duplikate (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auswertung der *BRP*-Reihe für *TNF α* als *Gene of Interest*

Der Endotoxinstandard BRP als geometrische Verdünnungsreihe inkubiert und als Standardkurve mit zwei technischen und zwei biologischen Duplikaten via RT-qPCR bestimmt. Aus den $\Delta\Delta C_t$ – Werten kann die Standardkurve gebildet werden. Die relative Expression wird über $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet, was eine Amplifikationseffizienz von 100 % annimmt. Circa zweieinhalbfache Erhöhung der relativen Expression im Vergleich zu IL1 β .

Bezeichnung	<i>BRP</i> Konzentration [EU/mL]	Replikat	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	Rel. Expression
C1	0,0125	A	4,861	-0,262	1,083
		B	5,155	0,032	
C2	0,025	A	4,644	-0,479	1,191
		B	5,097	-0,026	
C3	0,05	A	4,422	-0,700	1,532
		B	4,592	-0,531	
C4	0,1	A	3,765	-1,358	2,632
		B	3,688	-1,435	
C5	0,2	A	3,199	-1,924	4,261
		B	2,865	-2,258	
C6	0,4	A	2,320	-2,803	6,752
		B	2,415	-2,708	
C7	0,8	A	1,516	-3,607	11,446
		B	1,696	-3,427	
C8	1,6	A	0,903	-4,220	18,140
		B	0,980	-4,142	
NC	0	A	5,105	—	—
		B	5,141	—	

Der $\Delta\Delta C_t$ wird mit einem nonlinearen hyperbolischen Fit (Gleichung 5) gegen die *BRP*-Konzentration aufgetragen (Abbildung 9). Es zeigt sich ab ca. 0,025 – 0,05 EU/mL ein loglinearer Bereich bis zur Höchstkonzentration von 1,6 EU/mL. Ein zu erreichendes Plateau ist nicht klar zu erkennen, wird vom Fit jedoch bei $B_{max} = -4,873$ errechnet. Die Halbwertskonstante wird mit $K_d = 0,2887$ berechnet. Mit einem R^2 von 0,9959 und dem schmalen 95 % Konfidenzband handelt es sich ebenfalls wie die Auswertung mit IL1 β

um eine sehr geeignete Zuordnungsmethode. Die Verwendung von *TNF α* zeigt sich vergleichbar zu *IL1 β* , trotz des insgesamt niedrigeren $\Delta\Delta C_t$ – Wertes. Die höhere Expression zeigt sich nicht in einer höheren Sensitivität, da das Streuintervall der einzelnen Messwerte vergleichbar groß zu *IL1 β* ist (vgl. Abbildung 9).

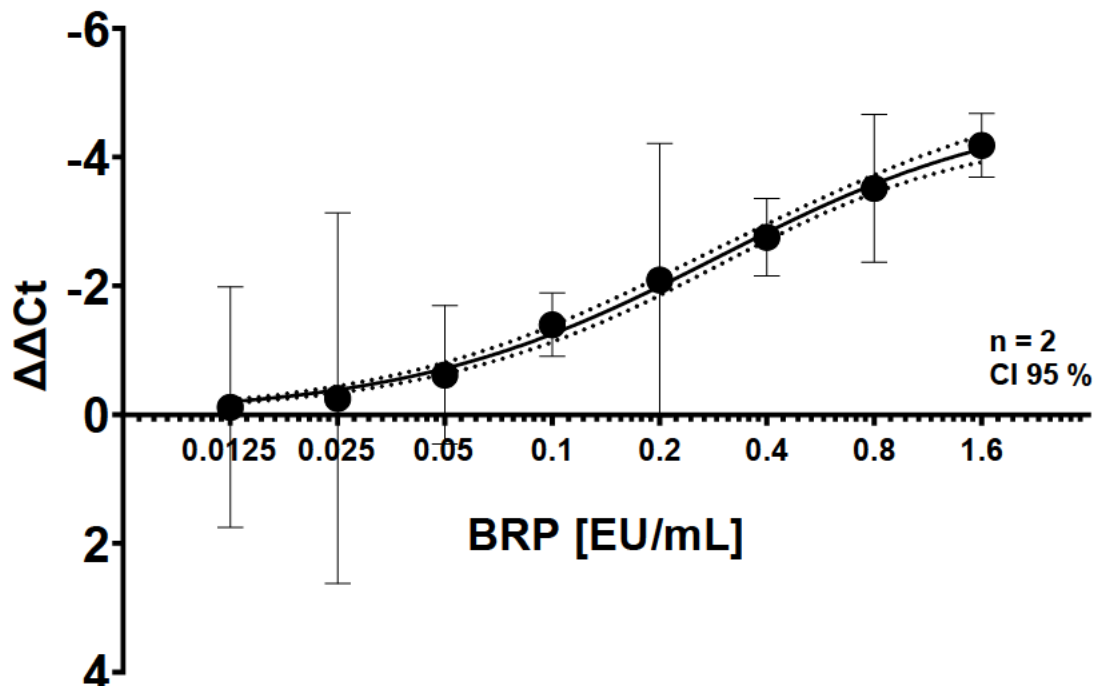


Abbildung 11: BRP-Standardreihe von *TNF α* als hyperbolischer Fit

Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von BRP, $\Delta\Delta C_t$ von *TNF α* gegen UBC. Datenpunkte und Konfidenzband des Fits sind je als 95 % CI gezeigt. Die Responsivität zeigt sich, wie bei *IL1 β* , ab ca. 0,05 EU/mL. Zwischen 0,025 – 0,05 EU/mL und 1,6 EU/mL zeigt sich ein loginearer Verlauf. Ein Plateau wird vom Fit mit $B_{max} = -4,873$ berechnet, ist jedoch anhand der Datenpunkte nicht eindeutig erkennbar. Die Halbwertskonstante wird mit $K_d = 0,2887$ berechnet. R^2 0,9959. Generell ist der Verlauf durch niedrigere $\Delta\Delta C_t$ – Werte und damit höhere Expression als bei *IL1 β* gekennzeichnet. Das relative Streuintervall ist jedoch ähnlich verteilt wie bei *IL1 β* und zeigt sich damit vergleichbar in der Nutzung.

Die relative Expression nach der $\Delta\Delta C_t$ – Methode (Abbildung 12) zeigt einen durchgehend exponentiellen Anstieg, spätestens ab ca. 0,1 EU/mL. Eine ca. dreifach größere relative Expressionsänderung ist erkennbar, jedoch ohne Vorteil der Sensitivität. Die Streuung der Einzelwerte bleibt in vergleichbarer Größenordnung. Es wird auf die Anzahl der biologischen Replikate ($n = 2$) verwiesen. Mit einem optimierten Cycle Profil könnte die Abweichung reduziert werden (Kapitel 3.6.3).

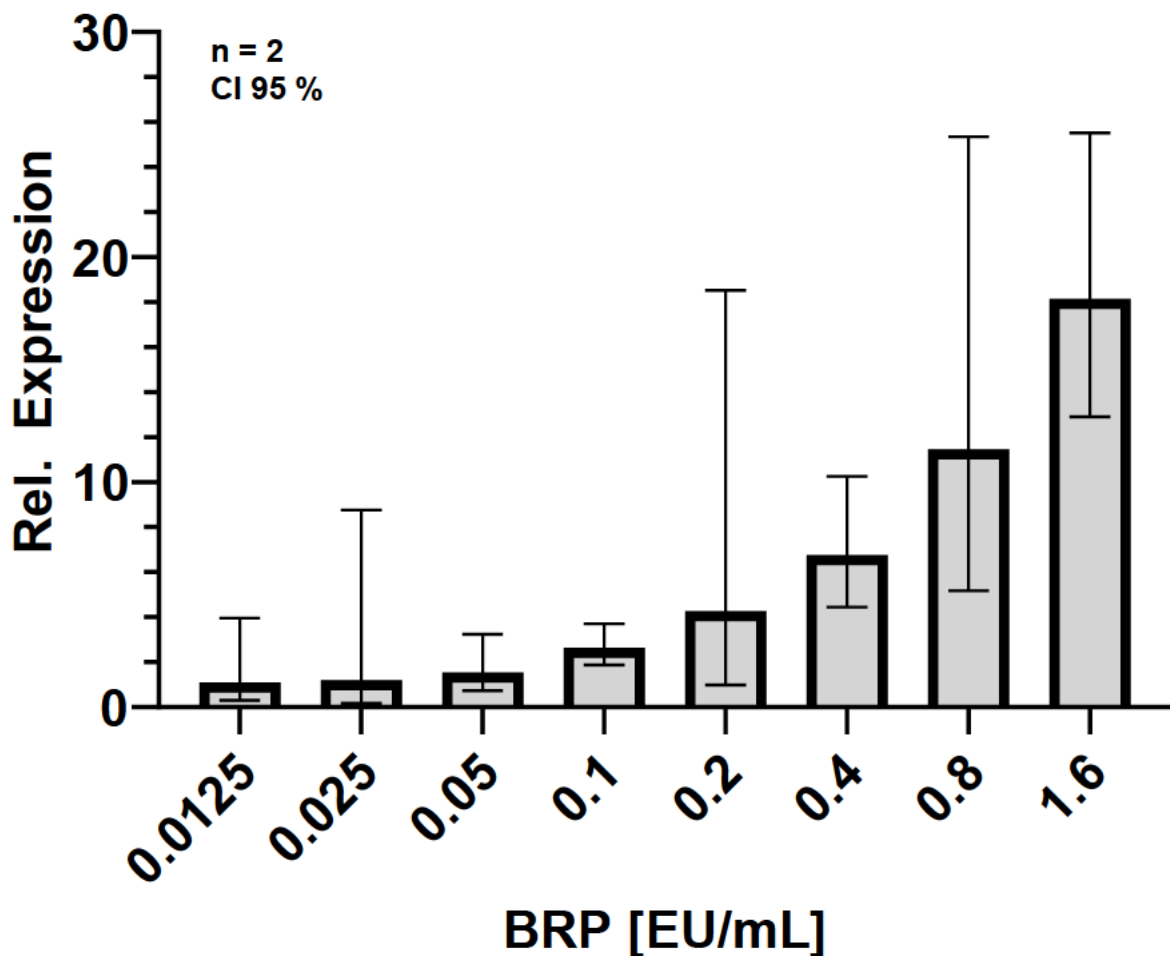


Abbildung 12: Relative Genexpression von $TNF\alpha$ in der BRP-Standardreihe

Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von BRP, relative Genexpression von $TNF\alpha$ gegen UBC nach der $\Delta\Delta C_t$ – Methode. Für die exponentielle Transformation wird eine Amplifikationseffizienz von 100 % angenommen. Eine Expressionserhöhung ist ab 0,1 EU/mL klar erkennbar, sie scheint im Allgemeinen exponentiell (und damit linear zur BRP-Konzentration) anzusteigen.

Es zeigt sich bei $IL1\beta$ und $TNF\alpha$ jeweils eine nutzbare Kalibrierung. Durch das schmale Konfidenzband der Fits und durch die jeweils hohen Bestimmtheitsmaße ($R^2_{IL1\beta} = 0,9936$ / $R^2_{TNF\alpha} = 0,9959$) eignen sich die Standardkurven für eine Zuordnung der Pyrogenkonzentration. Eine geringere Varianz der Probenmessungen ist dabei allerdings entscheidend. Eine Erhöhung der Standards sowie eine stabilere Amplifizierung wären für eine Intraassaykalibrierung vorteilhaft.

2.6.3 Duplex von *IL1 β* und *UBC*

Aufgrund der Plattformlimitierung von 48 Reaktionen des Thermocyclers liefen die bisherigen Assays als biologische Duplikate. Durch Einführung einer *Duplex-qPCR* lassen sich pro Lauf die doppelte Anzahl an Proben messen. Die Endotoxin-Standardreihe wird daher mit biologischen Triplikaten angefertigt (Abbildung 13) und mit einem optimierten Programm im *Normal Cycle* Modus amplifiziert (Kapitel 4.2.1 – 4.2.4). Aussaat, Inkubation und *RNA*-Isolierung sind wie beim *Simplex* erfolgt, in 24-well plates und mit der Verdünnungsreihe aus Tabelle 6. Die vorhandenen *Primer/Probe* Systeme ließen nur den *Duplex* von *IL1 β* und *UBC* zu, da sowohl *TNF α* als auch *UBC* mit *FAM* als Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und damit den parallelen *Readout* verhindern. Die *RNA* wird als technisches Duplikat gecycled. Der ΔC_t wird gebildet und anhand der Negativkontrolle auf den $\Delta\Delta C_t$ normiert (Gleichung 3 und Gleichung 4 aus Kapitel 4.3.2, dargestellt in Tabelle 9).

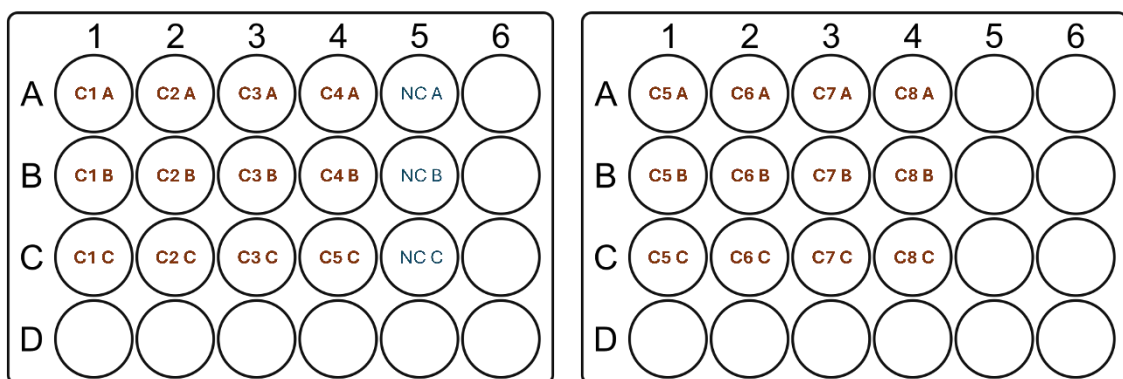


Abbildung 13: Aussaat der geometrischen 1:2 Pyrogenverdünnungsreihe in Triplikaten

Aussaat von $5 \cdot 10^5$ Zellen / 0,8 mL THP-1 MLC in Assay Buffer A. Geometrische 1:2 BRP-Verdünnungsreihe C8 (1,6 EU/mL) – C1 (0,0125 EU/mL) und Negativkontrolle (NC) mit Assay Buffer A. Zur Erhöhung der statistischen Signifikanz wird die Inkubation auf drei biologische Replikate erhöht.

Tabelle 9: Auswertung der BRP-Reihe als Duplex von IL1 β und UBC

Der Endotoxinstandard BRP als geometrische Verdünnungsreihe inkubiert und als Standardkurve mit zwei technischen und drei biologischen Duplikaten via RT-qPCR im Duplex bestimmt. IL1 β -Primer markiert mit HEX, UBC-Primer mit FAM. Aus den $\Delta\Delta C_t$ – Werten kann die Standardkurve gebildet werden. Die relative Expression wird über $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet, was eine Amplifikationseffizienz von 100 % annimmt. Circa zweieinhalbfache Erhöhung der relativen Expression im Vergleich zu IL1 β -Simplex und ähnliches Expressionsniveau wie beim TNF α -Simplex

Bezeichnung	BRP		ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	Rel. Expression
	Konzentration [EU/mL]	Replikat			
C1	0,0125	A	1,818	-0,284	1,296
		B	1,647	-0,456	
		C	1,721	-0,382	
C2	0,025	A	1,462	-0,641	1,540
		B	1,451	-0,652	
		C	1,527	-0,576	
C3	0,05	A	1,058	-1,045	2,128
		B	1,033	-1,070	
		C	0,949	-1,154	
C4	0,1	A	0,178	-1,925	3,844
		B	0,188	-1,915	
		C	0,115	-1,988	
C5	0,2	A	-0,876	-2,979	7,898
		B	-0,940	-3,043	
		C	-0,819	-2,922	
C6	0,4	A	-1,495	-3,598	11,979
		B	-1,435	-3,538	
		C	-1,508	-3,610	
C7	0,8	A	-1,827	-3,930	15,598
		B	-1,879	-3,982	
		C	-1,875	-3,978	
C8	1,6	A	-2,119	-4,222	18,629
		B	-2,090	-4,193	
		C	-2,140	-4,243	
NC	0	A	2,177	—	—
		B	2,010	—	
		C	2,123	—	

Der $\Delta\Delta C_t$ wird mit einem nonlinearen hyperbolischen Fit (Gleichung 5) gegen die *BRP*-Konzentration aufgetragen (Abbildung 14). Bereits ab der geringsten Konzentration ist eine Hochregulation messbar. Für den Fit wurde ein Plateau von $B_{max} = -4,679$ errechnet, der Übergang in dieses ist am Kurvenverlauf gut zu erkennen. Die Halbwertskonstante $K_d = 0,1366$ weist eine höhere Sensitivität als ihre Vorgängerkurven (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 11) auf. Es zeigt sich ein für *Dose-Response*-Kurven typischer S-Kurven förmiger Verlauf. Mit einem R^2 von 0,9974 ist er ebenfalls gut als Standardkurve geeignet. Die Streuung der Einzelwerte ist erkennbar niedriger und hat nahezu überall ein schmaleres Vertrauensband als die gerechnete Standardkurve selbst.

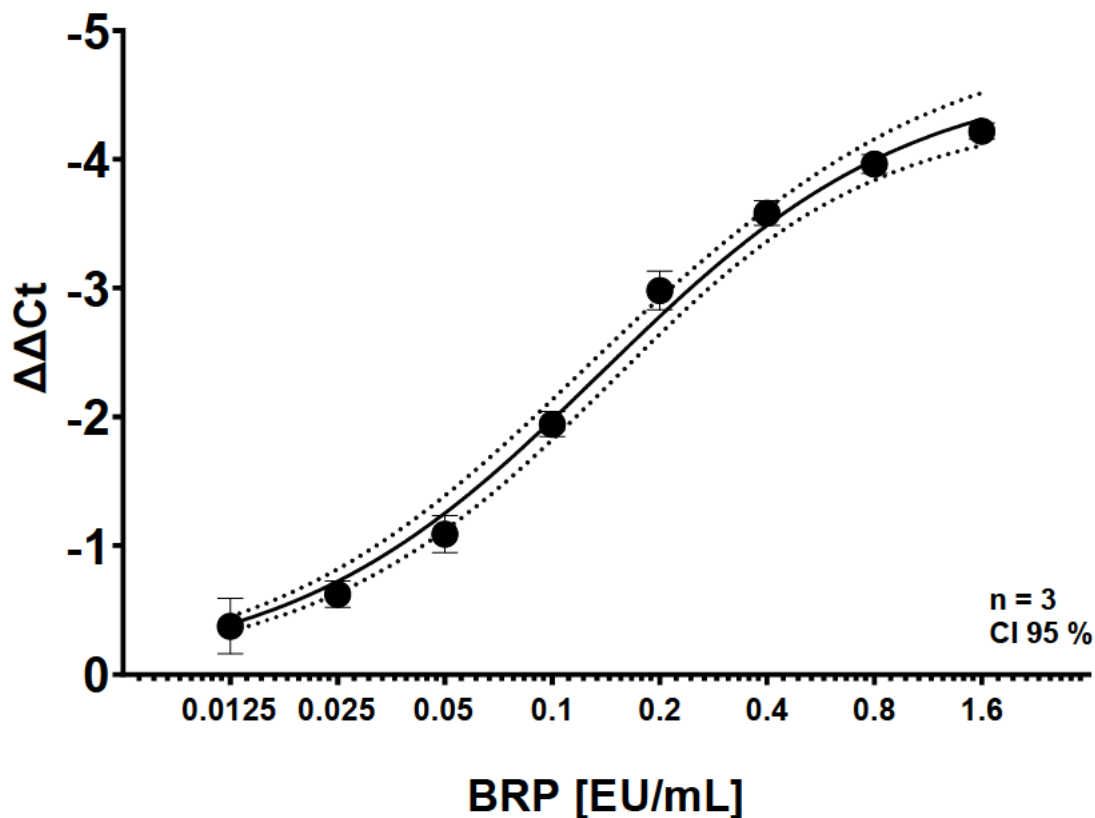


Abbildung 14: Duplex-Readout der *BRP*-Standardreihe von *IL1β* als hyperbolischer Fit

*Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von BRP, $\Delta\Delta C_t$ von *IL1β* gegen UBC im Duplex. Datenpunkte und Konfidenzband des Fits sind je als 95 % CI gezeigt. Responsives Verhalten ab dem ersten Datenpunkt bei 0,0125 EU/mL BRP. Geringe Einzelstreuung und ähnlich hohes Expressionsniveau wie bei *TNFα*, die höchste *BRP*-Konzentration liegt hier bei $\Delta\Delta C_t = -4,2$. S-Kurven förmiger Verlauf über die Konzentrationsspanne. Fittingparameter: $B_{max} = -4,679$, $K_d = 0,1366$, R^2 0,9974.*

Wie in Kapitel 2.6.1 erwähnt, wird aufgrund der exponentiellen Transformation der relativen Expression die Kalibriergerade über den $\Delta\Delta C_t$ gebildet. Die Messwerte und der Plot sind je als 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Im Vergleich zu den biologischen Duplikaten der *Simplex*-Messungen ist das 95 % Konfidenzintervall der Einzel-

messungen deutlich schmäler. Die statistische Erhöhung auf $n = 3$, sowie vor allem der *Normal Cycle* Modus, auch dessen höhere Effizienz (vgl. Kapitel 2.1), lassen auf diese Präzisionssteigerung schließen.

Die relative Expression (Abbildung 15) mittels der $\Delta\Delta C_t$ – Methode zeigt anfangs einen leichten Anstieg, gefolgt von einer loglinearen Phase ab ca. 0,05 – 0,1 EU/mL. Die Expressionsänderung ist hier ähnlich hoch (18,6x) wie bei der *TNF α* – Standardkurve (18,1x), die Einzelwertstreuung ist jedoch deutlich geringer.

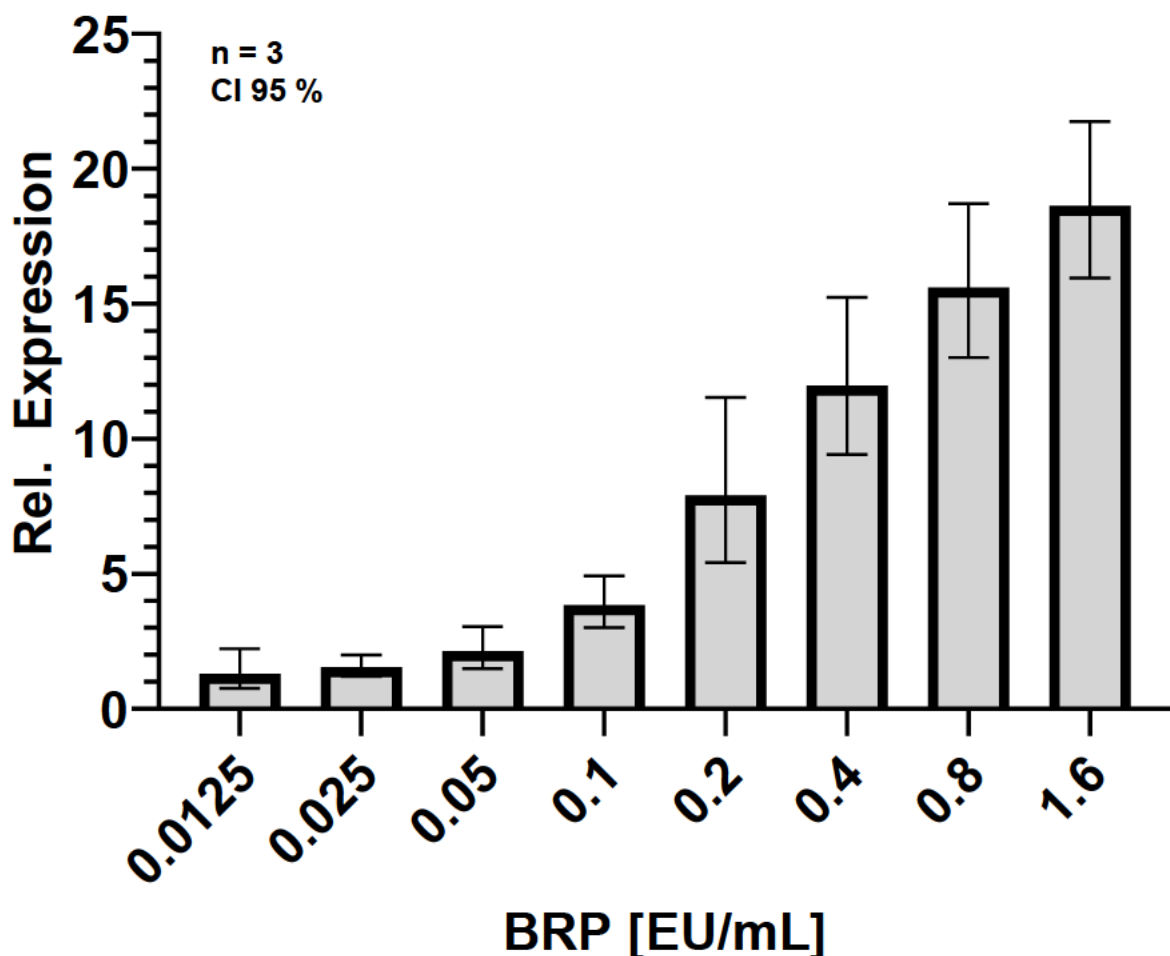


Abbildung 15: Relative Genexpression des Duplex von *IL1 β* und *UBC* in der *BRP*-Standardreihe
 Geometrische 1:2 Standardverdünnungsreihe von *BRP*, relative Genexpression von *IL1 β* gegen *UBC* nach der $\Delta\Delta C_t$ – Methode. Die RT-qPCR wurde als Duplex ausgeführt. Es liegt eine ähnliche Amplifikationseffizienz der beiden Targets von knapp 99 % vor, optimal für den Einsatz der $\Delta\Delta C_t$ – Methode. Eine Erhöhung der Expression um ca. 1,3x liegt ab dem ersten Datenpunkt vor, die höchste *BRP*-Konzentration steigt auf 18,6x an und liegt damit über der größten Expression des *TNF α* Simplex Versuchs (18,1x).

Zusammengefasst lässt sich zeigen, dass die Standardkurve erwartungsgemäß von der Einführung des Duplex profitiert. Die Streuungen der $\Delta\Delta C_t$ – Werte sind im Duplex

geringer, vermutlich da dort im *Normal Cycle* Modus gearbeitet wird und dadurch präzisere *Thresholds* vom *Cycler*-Programm errechnet werden können. Zusammen mit der Erhöhung der biologischen Replikate erweist sich die Standardkurve als bisheriges Optimum.

3 Diskussion und Ausblick

3.1 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht, wie sich der Monozyten Aktivierungstest beschleunigen lässt, wenn die herkömmliche Zytokinbestimmung per *ELISA* durch eine *RT-qPCR*-basiert Messung der zytokinproduzierenden *mRNA* ersetzt wird. Durch Time-Course Experimente konnte ein Optimum der Stimulationszeiten auf ein bis zwei Stunden für den *RT-qPCR Readout* nachgewiesen werden. Die Einführung eines *Duplex*-Assays erlaubt dabei die gleichzeitige Quantifizierung von *IL 1 β* und dem *Housekeeping Gen UBC* und profitiert dabei bei der Nachweisgrenze und Sensitivität. Nachfolgend wird die Robustheit der Etablierung einordnend bewertet und konkrete Ansatzpunkte für Verbesserungen diskutiert.

Außerhalb dieser Arbeit existiert bis dato ein funktionierender *MAT*-Assay auf Basis von *PCR* [26]. Dieser nutzt differenzierte *HL-60* als Indikationszellen und testet mittels *digital PCR (dPCR)* auf *IL 1 β* , *TNF α* und ein nicht namentlich genanntes *Housekeeping Gen*. Der dort verwendete Assay reduziert die Pyrogeninkubationszeit auf vier Stunden [27], mit dieser Arbeit konnte eine Reduktion auf ein bis zwei Stunden durch den Einsatz der *THP-1 MLC* erfolgen. Aus ähnlichen Versuchen ist bekannt, dass die *mRNA*-Ausbeute zwischen 1 – 6 Stunden am größten ist [28], [29], mit einem Peak bei 1 h für *TNF α* und 1,5 h für *IL 1 β* [30]. Der *dPCR* Assay ist für das pharmazeutisch relevante *High Throughput Screening* entwickelt, in dem er für die automatisierte *RNA*-Isolierung und *dPCR* ausgelegt ist. Was hier vor allem für Endotoxinnachweise bei größeren Bedarfen gedacht ist, setzt einen entsprechenden apparativen Aufwand voraus. Der Anschaffungspreis einer solchen Plattform und die Mikrofluidik-Verbrauchsmaterialien limitieren Routine-Anwendungen in QC-Laboren kleinerer Hersteller. Die *dPCR* verhindert durch ihre Funktionsweise zwar zuverlässig Matrixeffekte [31], [32], diese können allerdings bei der in diesem *Readout* eingesetzten (mindestens 1:50) Verdünnung auf 1,25 ng/ μ L voraussichtlich vernachlässigt werden. Wenn standardisiertes *RNA*-Isolat verwendet wird, werden die Matrixeffekte damit, wenn vorhanden, berechenbar. Die Automatisierbarkeit des *dPCR*-Assays zeigt vor allem in der *RNA*-Isolierung seine Stärke. Ein nicht geringer Arbeitsanteil der hier entwickelten Methode ist die Isolierung der *mRNA* aus den stimulierten Zellen. Die *Ph. Eur.* schreibt für den *ELISA-Readout* mindestens vier biologische Replikate vor [5], was inkl. Negativkontrolle in dieser

Konfiguration 36 zeitgleiche *RNA*-Isolierungen bedeuten würde. Selbst bei Validierung dieser Isolierung sollte der Arbeitsaufwand dessen nicht vernachlässigt werden. Dies würde beispielsweise mit einem skalier- und automatisierbaren Isolierungssystem wie *Magnetic Beads* oder einem Extraktionsroboter realisierbar sein. Möglich wäre auch die Erforschung und Optimierung von unisolierter *mRNA* über rohprobenfähige *One-Step Master Mixes* [33], was den Aufwand der Isolierung deutlich verringern würde. Die neue *MIQE 2.0 – Guideline* [20] erwähnt diese Methode Vorteilhaft, verweist aber auf den besonderen Etablierungsbedarf, um Zuverlässigkeit und Genauigkeit gewährleisten zu können.

Die *MIQE (2.0) – Guideline* ist eine anerkannte Richtlinie für die analytische (*RT-qPCR*). Sie gibt Empfehlungen für die Handhabung der *RT-qPCR* und welche Daten erhoben werden sollten, wie die Effizienzen oder die Spezifität der Amplifikationen. Sie gibt vor, dass die Amplifikationseffizienzen bekannt sein sollen, sie erwähnt dabei jedoch kein tolerierbares Intervall. Eine Verwendung bei 90 – 110 % ist hier üblich und auch auf der Website der *MIQE* (im Unterabschnitt „*qPCR efficiency*“) so verwendet. Alle ermittelten Effizienzen liegen im Bereich 91,9 – 99,0 % und damit innerhalb des Empfehlungsrahmens der *MIQE*. Die Spezifität der erworbenen *mRNA*-Assays ist über die Agarose Gelelektrophorese nachgewiesen worden. Im *Duplex* zeigte sich keine Tertiäramplifikation eines Hybrids und damit keine unspezifische Amplifikation. Die *MIQE – Guideline* empfiehlt eine Normierung auf *Housekeeping Gene*. Hier konnten *UBC* und *GAPDH* als besonders stabil nachgewiesen werden. Die *Guideline* erwähnt als Referenz den Einsatz von mindestens zwei Referenzgenen und dessen geometrischen Mittelwert. Auf dies wurde hier verzichtet, da der Nachweis der nicht Beeinflussung auf die *Housekeeping Gene* erbracht werden konnte.

Eine belastbare Aussage zur Langzeitstabilität des *Readouts* ist ohne formale Validierung noch nicht möglich. Allerdings ist im Vergleich vom *IL1 β -Simplex* zum *Duplex* eine fast dreimal so hohe relative Genexpression der höchsten Probe 1,6 EU/mL beim *Duplex* zu sehen. Fleige et al. stellt einen Zusammenhang von C_t – Werten und der *RNA*-Integrität fest [34]. Da die Integrität der isolierten *RNA* nicht untersucht wurde, kann eine Degradation nicht ausgeschlossen werden und damit die relative Genexpression niedriger erscheinen. Eine Verbesserung der Stabilität könnte hier durch den Einsatz mehrerer *Gene of Interest* erzielt werden. Der *dPCR*-Assay arbeitet mit einem kombinierten Signal von *IL1 β* und *TNF α* . Bei einer *RT-qPCR* dieser beiden

Zytokingene und durch die Bildung eines geometrischen Mittels würden sich Signifikanz und Varianz verbessern und zu aussagefähigeren Nachweisen führen. Dennoch hat die nonlineare Regression funktioniert, wie an den ähnlich schmalen Banden des Konfidenzintervalls im *Simplex* und *Duplex* zu sehen. Die hyperbolischen Fits zeigen alle ein Bestimmtheitsmaß $R^2 > 99\%$ und lediglich die Streuweiten einiger Einzelmessungen des *Simplex Fast-Cycle* zeigen Optimierungspotenzial. Da trotz der konkurrierenden Reaktion im *Duplex* eine geringere C_t – Wert Streuung als im *Simplex* auftrat, sollte an dieser Stelle in Betracht gezogen werden, den *PCR*-Lauf zugunsten einer höheren Effizienz und Präzision im *Normal Cycle* Modus zu fahren. Die K_d – Werte der *Simplex* Kurven waren mit $K_{d,IL1\beta} = 0,2514$ und $K_{d,TNF\alpha} = 0,2887$ weniger sensitiv als die Standardreihe im *Duplex* mit einem $K_d = 0,1366$.

Für eine Steigerung der statistischen Aussagekraft sollte auch stets überlegt werden ausreichend Negativkontrollen mitzutesten. Da jeder Messpunkt gegen die Negativkontrolle normalisiert wird, ist deren Präzision entscheidend. Die statistische Unsicherheit dieser Probenkohorte wirkt sich dadurch auf die gesamte Standardkurve aus. Auch die Nachweisgrenze des Systems hängt davon ab, da die *Limit of Detection (LOD)* eines Assays von der Streuung der Negativkontrollen bestimmt wird – genauer „Negativkontrolle $\pm 3\sigma$ “, vorgegeben von der *Ph. Eur.* im *ELISA-Readout*. Da in der hier verwendeten $\Delta\Delta C_t$ – Methode die Negativkontrolle bereits verwendet wird, kann der Ansatz aus der Pharmakopöe nicht verwendet werden. Für die gleiche statistische Relevanz müsste überprüft werden ab wann ein Messpunkt mit 99,7 % Konfidenz nicht mehr den Nullwert (Definition der Negativkontrolle) erreicht.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erlauben eine erste Einschätzung des Potentials der *RT-qPCR* hinsichtlich ihrer Eignung als funktionellen *Readout* in der Pyrogendetektion.

3.2 Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *RT-qPCR* als *Readout* für den *MAT* geeignet ist. Die Assay-Zeit wurde von drei auf zwei Tage reduziert, wobei eine hohe Sensitivität gegeben ist. Für die Validierung und entsprechende Markteinführung ist die Grundlage geschaffen. Nach den Regeln der Analytik kann nun die Robustheit und Nachweisgrenze bestimmt werden. Für die Einführung hat der *Duplex* von *IL1 β* und *UBC* gute Ergebnisse durch eine signifikante Standardkurve gezeigt, das Testen auf ein weiteres Zytokin-Gen könnte jedoch die statistische Signifikanz erhöhen. Ein *Duplex* aus *TNF α* und *UBC* wäre empfehlenswert, da die Stimulationszeit bei einer Stunde den höchsten *TNF α* -Shift und damit die größte potenzielle Sensitivität ausweist. Die Erarbeitung eines Dreifarbassays, bestehend aus *IL1 β* und *TNF α* als *Gene of Interest* und *UBC* als *Housekeeping Gen*, ist ein interessanter nächster Schritt, um auch ohne Erhöhung der biologischen Replikate eine höhere Aussagekraft über die Quantifizierung zu gewinnen.

Für Forschungszwecke ist stets mit größeren Zellmengen in 6 – 24-well plates gearbeitet worden. Die Zellzahl wurde in dieser Arbeit nicht auf ein Minimum reduziert, lediglich für die Zwecke und die vorhandenen Apparaturen notwendig verringert. Eine Auslegung in ein 96-well Format würde eine Reduktion der Zell- und damit *mRNA*-Menge bedeuten.

Für eine Validierung notwendig wäre neben den formalen Parametern der Genauigkeit, Wiederholbarkeit, Wiederfindungsrate und weiteren die Überprüfung auf die relevanten nonendotoxin Pyrogene. In dem Transformationsversuch sind die Positivkontrollen aus dem *ELISA-Readout* mit getestet worden, zeigten dort jedoch nicht zuverlässig C_t – Shifts an. Nach erfolgter Inkubationszeit und *Readout*-Optimierung muss dieser Nachweis noch erfolgen. Ebenfalls ist eine Testung weiterer Rezeptoren, wie den intrazellulären *TLR7/8*, durch beispielsweise *Imiquimod* mit diesem Assay durchzuführen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien

Übersicht aller Chemikalien, Medien(-zusätze), Pyrogene und Hilfsstoffe die für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden.

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
<i>RPMI 1640</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P04-17500</i>
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P06-07100</i>
<i>HEPES</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P05-01100</i>
<i>FBS</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P30-5500</i>
<i>L-Glutamin</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P04-80100</i>
<i>Natriumpyruvat</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>S8636-100ML</i>
<i>LPS</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>L6529-1MG</i>
<i>BRP-Standard</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>E0150000</i>
<i>HKSA</i>	<i>InvivoGen</i>	<i>tlrl-hksa</i>
<i>LTA</i>	<i>InvivoGen</i>	<i>tlrl-pslta</i>
<i>Flagellin</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>SRP8029-10UG</i>
<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Solution (DPBS)</i>	<i>PAN-Biotech</i>	<i>P04-36500</i>
<i>Nuklease-freies Wasser</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i>	<i>AM9930</i>
<i>Ethanol absolut</i>	<i>Merck</i>	<i>1.00986.1000</i>
<i>IGEPAL® CA-630</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>I3021-50ML</i>
<i>Agarose</i>	<i>VWR</i>	<i>A8963.0250</i>
<i>RNAse STOP</i>	<i>bayNOMIC GmbH</i>	<i>20190011000</i>
<i>GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain</i>	<i>Biotium</i>	<i>41005</i>
<i>Gel Loading Dye, Orange (6X)</i>	<i>New England Biolabs</i>	<i>B7022S</i>
<i>Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder</i>	<i>New England Biolabs</i>	<i>N0551S</i>
<i>TAE Puffer (50x)</i>	<i>AppliChem</i>	<i>A1691,1000</i>
<i>TRIS</i>	<i>AppliChem</i>	<i>A1379,0500</i>

4.1.2 Verwendete Kits

Assay	Hersteller	Katalognummer
RNeasy Mini Kit	QIAGEN N.V.	74104

4.1.3 Primer/Probes und RT-qPCR Reagenzien

Die Reagenzien für die RT-qPCR wurden von *Integrated DNA Technologies*® (IDT) bezogen. Die qPCR-Assays sind Predesigned von IDT.

Tabelle 11: Verwendete Primer/Probe Assays

Übersicht aller genutzten Genexpressionsassays.

Gen	Dye	Quencher	5' – Sequenz – 3'		Konzentration
IL1β	HEX	Iowa Black®	Fwd	CAG CCA ATC TTC ATT GCT CAA G	500 nM
			Rev	GAA CAA GTC ATC CTC ATT GCC	500 nM
			Probe	/5HEX/AGA AGT ACC /ZEN/TGA GCT CGC CAG TGA /3IABkFQ/	250 nM
IL-6	FAM	Iowa Black®	Fwd	GCA GAT GAG TAC AAA AGT CCT GA	500 nM
			Rev	TTC TGT GCC TGC AGC TTC	500 nM
			Probe	/56-FAM/CAA CCA CAA /ZEN/ATG CCA GCC TGC T/3IABkFQ/	250 nM
TNFα	Cy5	3' Black Hole	Fwd	TGC ACT TTG GAG TGA TCG G	500 nM
			Rev	TCA GCT TGA GGG TTT GCT AC	500 nM
			Probe	/5Cy55/AGA TGA TCT GAC TGC CTG GGC C/3BHQ-3/	250 nM
	FAM	Iowa Black®	Fwd	TGC ACT TTG GAG TGA TCG G	500 nM
			Rev	TCA GCT TGA GGG TTT GCT AC	500 nM
			Probe	/56-FAM/AGA TGA TCT /ZEN/GAC TGC CTG GGC C/3IABkFQ/	250 nM
UBC	FAM	Iowa Black®	Fwd	GAT TTG GGT CGC AGT TCT TG	500 nM
			Rev	CCT TAT CTT GGA TCT TTG CCT TG	500 nM
			Probe	/56-FAM/TCG ATG GTG /ZEN/TCA CTG GGC TCA AC/3IABkFQ/	250 nM
GAPDH	FAM	3' Black Hole	Fwd	ACA TCG CTC AGA CAC CAT G	500 nM
			Rev	TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G	500 nM
			Probe	56-FAM/AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT GGT C/3BHQ-1	250 nM

Gen	Dye	Quencher	5' – Sequenz – 3'		Konzentration
B2M	FAM	3' Black Hole	Fwd	GGA CTG GTC TTT CTA TCT CTT GT	500 nM
			Rev	ACC TCC ATG ATG CTG CTT AC	500 nM
			Probe	56-FAM/CCT GCC GTG TGA ACC ATG TGA CT/3BHQ-1	250 nM
HPRT1	FAM	3' Black Hole	Fwd	TTG TTG TAG GAT ATG GCC CTT GA	500 nM
			Rev	GCG ATG TCA ATA GGA CTC CAG	500 nM
			Probe	56-FAM/AGC CTA AGA TGA GAG AGT TCA AGT TGA GTT TGG/3BHQ- 1	250 nM

Verwendet wurde der *PrimeTime™ One-Step RT-qPCR Master Mix (2x)*, CAT 10007066

4.1.4 Geräte

Tabelle 12: Geräteliste

Übersicht über die verwendeten Laborgeräte, Hilfsmittel und Maschinen die für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermocycler	Mic Real Time PCR Cycler (48-well qPCR)	Bio Molecular Systems
PCR-Reaktionsgefäße	Mic Tubes and Caps	Bio Molecular Systems
Leuchttisch für Agarosegele	TruBlu™ 2	EDVOTEK
Fluorometer	Quantus™ Fluorometer	Promega GmbH
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Biochrom US
Sterilwerkbank	HERAsafe KS	Fisher Scientific GmbH
Wasserbad	WNE 14	Memmer GmbH + Co. KG
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	INTERGRA Biosciences AG
Multikanalpipette	Xplorer	Eppendorf SE
Zellzählung	CASY TTC	Schärfe System GmbH
Inkubator	Steri-Cycle-i250	Fisher Scientific GmbH
div. serologische Pipetten	div. serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co.
Tischzentrifuge	VWR® Micro Star 17	Avantor
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40R	Fisher Scientific GmbH

4.1.5 Zelllinien

Verwendet wurden Assay Ready, mit *PMA* differenzierte, *THP-1 Macrophage-Like Cells*

Aus interner Bank, LOT: 83-240708VIP01.

4.1.6 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Übersicht über die (Auswertungs-)Software und Tools die für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Office 365</i>	<i>Microsoft Corporation</i>
<i>Mic qPCR Analysis Software 2.12.2</i>	<i>Bio Molecular Systems</i>
<i>GraphPad Prism 10.5.0</i>	<i>GraphPad Software</i>
<i>Primer-BLAST</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>Zotero 7.0.19</i>	<i>Digital Scholar (Open Source)</i>
<i>ChatGPT¹⁾, basierend auf GPT-o4-mini-high</i>	<i>OpenAI</i>

- 1) Ausschließlich als Hilfsmittel genutzt. Es sind keine von generativer KI erstellten Texte und Textpassagen in dieser Arbeit verwendet.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur und Inkubation

	Komponente	Endkonzentration	Menge
Recovery Buffer A	<i>RPMI 1640</i>	–	<i>500 mL</i>
	<i>Penicillin/Streptomycin</i>	<i>100 Units / 0,1 mg/mL</i>	<i>5 mL</i>
	<i>HEPES</i>	<i>10 mM</i>	<i>5 mL</i>
	<i>FBS</i>	<i>10 %</i>	<i>50 mL</i>
Assay Buffer A	<i>RPMI 1640</i>	–	<i>500 mL</i>
	<i>Penicillin/Streptomycin</i>	<i>100 Units / 0,1 mg/mL</i>	<i>5 mL</i>
	<i>HEPES</i>	<i>20 mM</i>	<i>10 mL</i>
	<i>FBS</i>	<i>10 %</i>	<i>50 mL</i>
	<i>L-Glutamin</i>	<i>2 mM</i>	<i>5 mL</i>
	<i>Natriumpyruvat</i>	<i>1 mM</i>	<i>5 mL</i>

Die benötigte Anzahl an Kryovials mit *THP-1 Macrophage-Like Cells* ($1 \cdot 10^7$ Zellen/Vial) wird für 3 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. 5 mL *Recovery Buffer A* werden in ein Zentrifugier-Röhrchen vorgelegt, davon 4 mL mit einer serologischen

Pipette aufgezogen. Die aufgetaute Zellsuspension wird mit aufgezogen und bis auf 1 mL in das Zentrifugier-Röhrchen pipettiert. Mit dem verbleibenden Medium wird das Kryovial am Rand gespült und überführt. Für jedes weitere *Vial* werden erneut 4 mL Medium verwendet und dem Zentrifugier-Röhrchen zugegeben.

Die Zellen werden bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und auf die benötigte Zellkonzentration (z.B. $1,67 \cdot 10^6$ Zellen / mL) mit *Assay Buffer A* versetzt. Die Aussaat erfolgt in 6- oder 24-well plates. Inkubiert wird für 24 h bei 37 °C / 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre.

Die Pyrogene werden mit *Assay Buffer A* verdünnt, ggf. als geometrische Verdünnungsreihe angesetzt, zugegeben und für den entsprechenden Zeitraum inkubiert.

4.2.2 Isolierung der *RNA*

Die *RNA*-Isolierung erfolgt gemäß des Herstellerprotokolls (*QIAGEN RNeasy Mini Kit*).

Der Zellüberstand wird abgesaugt, mit 0,5 mL *DPBS* gewaschen und mit 350 µL Lyse-puffer versetzt. Das Lysat wird mehrmals über den Kulturgefäßboden gespült und anschließend in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Zur Homogenisierung wird das Lysat mit einer 3 mL Spritze mehrmals durch eine *G20* Kanüle gezogen und anschließend mit 70 % Ethanol (1:1 v/v) versetzt. Das durch pipettieren gemischte Ethanol-Lysat Gemisch wird auf die Säule gegeben und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule mit 700 µL *RW1* (15 s bei 8000 xg), 500 µL *RPE* (15 s bei 8000 x g), 500 µL *RPE* (2 min bei 8000 x g) gewaschen. Eluiert wird mit 40 µL Nuklease-freiem Wasser. Das Eluat wird in beschrifteten 1,5 mL Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Reinheit der *RNA* wird photometrisch durch Messung des $A_{\frac{260}{280}}$ bestimmt, die Konzentration über die Quantifizierungsfunktion des Photometers.

4.2.3 Reinheit und Konzentrationsbestimmung

Die isolierte *RNA* wird auf Eis aufgetaut und mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. 30 µL der verdünnten Probe werden in eine UV-Küvette pipettiert und im Photometer gemessen. Die Küvette wird zwischen den Messungen je zweimal mit Wasser gespült und mit einer 10 µL Pipette geleert. Gemessen werden die Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm Korrekturmessung

4.2.4 RT-qPCR

Aufgrund des Charakters einer Methodenetablierung wird auf die einzelnen herführenden Schritte im Teil Ergebnisse eingegangen. Daher wird die etablierte Version hier erwähnt.

Die isolierte *RNA* wird auf Eis aufgetaut und entsprechend der photometrischen Messung auf 1,25 ng/μL verdünnt. In die 48-well *micPCR-Tubes* werden je 16 μL Reaktionsgemisch vorgelegt (aus dem selben, größeren Ansatz), bestehend aus

- » 10 μL *PrimeTime™ One-Step RT-qPCR Master Mix (2x)*
- » Je 2 μL *Primer/Probe* Ansatz (*Simplex/Duplex*)
- » Nukleasefreiem Wasser, *ad* 16 μL

Dafür wird für die Reproduzierbarkeit die Dispensefunktion einer 100 μL Multikanalpipette verwendet. Anschließend werden 4 μL *RNA-Template* in technischen Duplikaten in die Tubes pipettiert, und je eine NTC mit 4 μL nukleasefreiem Wasser pro verwendetem Reaktionsmix. Die Pipettenspitze wird dabei in die Flüssigkeit getaucht, dreimal auf- und abgezogen und potenziell vorhandene Tropfen an der inneren Wandung abgelassen. Die Tubes werden mit Stopfen verschlossen, mehrfach invertiert und im Thermocycler positioniert.

Simplex

Im Einfarbassay wird die *Fast-Cycle* Methode verwendet, die *micPCR* Software auf *FAST-Taq*-Polymerase eingestellt.

- | | | |
|-------------------------------|-------|---------|
| 1. Reverse Transkription | 50 °C | 15 min. |
| 2. Aktivierung der Polymerase | 95 °C | 3 min. |
| 3. 40x Amplifikation | | |
| a. Denaturierung | 95 °C | 5 sek. |
| b. Anlagern/Elongation | 60 °C | 30 sek. |
| c. Fluoreszenzmessung | | |

Duplex

Im Zweifarbassay wird das *Normal-Cycling* verwendet, die *micPCR* Software ist auf *FAST-Taq*-Polymerase eingestellt.

- | | | |
|-------------------------------|-------|---------|
| 1. Reverse Transkription | 50 °C | 15 min. |
| 2. Aktivierung der Polymerase | 95 °C | 3 min. |
| 3. 40x Amplifikation | | |
| a. Denaturierung | 95 °C | 15 sek. |
| b. Anlagern/Elongation | 60 °C | 60 sek. |
| c. Fluoreszenzmessung | | |

4.2.5 Agarose Gelelektrophorese

2 g Agarose werden in einer 250 mL *Schottflasche* eingewogen und auf 100 mL mit *TAE*-Puffer befüllt. Die Flasche wird für 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt und vorsichtig zum Sieden gebracht. Nach dem Abkühlen auf Handwärme werden 5 µL *GelGreen* zupipettiert und das Gel mit einem Kamm gegossen. Nach 30 Minuten kann der Kamm vorsichtig entfernt werden. Das fertige Gel wird nun in das Elektrophoresebecken gelegt und bis zur Markierung mit *TAE*-Puffer befüllt. Nach Zugabe von je 5 µL Ladepuffer und 4 µL *DNA-Ladder* werden die Proben in die Taschen pipettiert, je Probe ca. 5 µL. Die Elektroden werden angeschlossen und für 60 Minuten bei 100 V getrennt. Das Gel wird anschließend auf dem *UV*-Tisch analysiert und fotografiert.

4.3 Auswertung und Statistik

4.3.1 Effizienzbestimmung

Die von der *micPCR*-Software erhaltenen C_t – Werte der Effizienzbestimmung werden in *GraphPad* eingetragen. Von dem Datensatz wird ein „*Semilog Line*“ Nonlinearer Fit erstellt und die Effizienz über die erhaltene Steigung mit Gleichung 2 berechnet.

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1 \quad \text{Gleichung 2}$$

Mit: m = Steigung der Regressionsgeraden

4.3.2 $\Delta\Delta C_t$ und Standardreihen

Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert normiert dabei Abstand zwischen dem *Gene of Interest* und dem Referenzgen zwischen den Behandelten und Kontrollzellen. Er wird berechnet nach Gleichung 3 und Gleichung 4.

$$\Delta C_t = C_t(GOI) - C_t(HKG) \quad \text{Gleichung 3}$$

Mit GOI : Gene of Interest

HKG : Housekeeping Gen

Woraus folgt

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(treatment) - \Delta C_t(control) \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Auswertung erfolgt über *GraphPad Prism*. Der ΔC_t wird über die „*remove Baseline*“ Funktion gebildet, $\Delta\Delta C_t$ über „*Transform*“, in dem vom ΔC_t der Messpunkte der Negativkontrolle abgezogen wird.

Die $\Delta\Delta C_t$ – Werte werden mit einem nonlinearen hyperbolischen Fit gegen die *BRP*-Konzentration der Gleichung 5 aufgetragen.

$$\Delta\Delta C_t(c_{BRP}) = \frac{B_{max} \cdot c_{BRP}}{K_d + c_{BRP}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Mit c_{BRP} : Konzentration des *BRP*-Standards

B_{max} : Grenzwert der Funktion am Plateau

K_d : Halbwertskonstante der Funktion. Gibt an, bei welcher Konzentration der halbe Plateauwert erreicht ist.

Die relative Expressionsänderung lässt sich dann anhand der Gleichung 6 bestimmen.

$$\text{Rel. Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Gleichung 6

5 Literatur

- [1] N. Prajitha, S. Athira, und P. Mohanan, „Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections“, *Immunology Letters*, Bd. 204, S. 38–46, Dez. 2018, doi: 10.1016/j.imlet.2018.10.006.
- [2] K. E. Cooper, Hrsg., „The nature of pyrogens, their origins and mode of release“, in *Fever and Antipyresis: The Role of the Nervous System*, Cambridge: Cambridge University Press, 1995, S. 36–46. doi: 10.1017/CBO9780511526701.005.
- [3] C. Schütt und B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011. doi: 10.1007/978-3-8274-2647-5.
- [4] „Ph. Eur. bids adieu to rabbit pyrogen test in its monographs - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM“, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Zugegriffen: 3. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.edqm.eu/en/-/ph.-eur.-bids-adieu-to-rabbit-pyrogen-test-in-its-monographs>
- [5] Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, 10.0. in monograph 2630. Strasbourg, France, 2017.
- [6] C. R. Kleiveland, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, und H. Wichers, Hrsg., Cham (CH): Springer, 2015. Zugegriffen: 14. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/>
- [7] „THP-1 - TIB-202 | ATCC“, <https://www.atcc.org>. Zugegriffen: 3. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/tib-202>
- [8] Z. N. Mohd Yasin, F. N. Mohd Idrus, C. H. Hoe, und G. B. Yvonne-Tee, „Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review“, *Differentiation*, Bd. 128, S. 67–82, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.diff.2022.10.001.
- [9] F. O. Martinez und S. Gordon, „The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment“, *F1000Prime Rep*, Bd. 6, März 2014, doi: 10.12703/P6-13.
- [10] „instaCELL® Pyrogen Detection Kit (MAT)“. Zugegriffen: 7. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.accelerate.me/product/instacell-pyrogen-detection-kit.html>
- [11] H.-J. Müller und D. R. Prange, *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016. doi: 10.1007/978-3-662-48236-0.
- [12] D. A. Rappolee, D. Mark, M. J. Banda, und Z. Werb, „Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping“, *Science*, Bd. 241, Nr. 4866, S. 708–712, Aug. 1988, doi: 10.1126/science.3041594.
- [13] M. Kubista u. a., „The real-time polymerase chain reaction“, *Molecular Aspects of Medicine*, Bd. 27, Nr. 2, S. 95–125, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- [14] S. F. C. Hawkins und P. C. Guest, „Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR“, in *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications*, P. C. Guest, Hrsg., New York, NY: Springer, 2017, S. 125–133. doi: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- [15] „What is multiplexing? - DE“. Zugegriffen: 3. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/what-is-multiplex-qpcr.html>
- [16] S. Fleige, V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm, und M. W. Pfaffl, „Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR“, *Biotechnol Lett*, Bd. 28, Nr. 19, S. 1601–1613, Okt. 2006, doi: 10.1007/s10529-006-9127-2.

- [17] T. Maier, M. Güell, und L. Serrano, „Correlation of mRNA and protein in complex biological samples“, *FEBS Letters*, Bd. 583, Nr. 24, S. 3966–3973, 2009, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- [18] M. Cobb, „60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology“, *PLOS Biology*, Bd. 15, Nr. 9, S. e2003243, Sep. 2017, doi: 10.1371/journal.pbio.2003243.
- [19] „PrimeTime One-Step RT-qPCR Master Mix | IDT“, Integrated DNA Technologies. Zugegriffen: 26. Juni 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/gene-expression/primetime-one-step-rt-qpcr-master-mix>
- [20] „MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“. Zugegriffen: 14. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <http://miqe.gene-quantification.info/>
- [21] G. Ren, M. Juhl, Q. Peng, T. Fink, und S. R. Porsborg, „Selection and validation of reference genes for qPCR analysis of differentiation and maturation of THP -1 cells into M1 macrophage-like cells“, *Immunol Cell Biol*, Bd. 100, Nr. 10, S. 822–829, Nov. 2022, doi: 10.1111/imcb.12590.
- [22] „Primer-Blast results IL1b“. Zugegriffen: 28. Juni 2025. [Online]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primer-tool.cgi?ctg_time=1751106354&job_key=BQ_aoMA-dzbXqi9eO2u7zvKD14o6N5vmTjA
- [23] „Primer-Blast results UBC“. Zugegriffen: 28. Juni 2025. [Online]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primer-tool.cgi?ctg_time=1751106179&job_key=I51JQo9Ogual3BLZH7k262WiJ9llsTzESQ
- [24] C. Hirayama und M. Sakata, „Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles“, *Journal of Chromatography B*, Bd. 781, Nr. 1, S. 419–432, Dez. 2002, doi: 10.1016/S1570-0232(02)00430-0.
- [25] R. de S. Abreu, L. O. Penalva, E. M. Marcotte, und C. Vogel, „Global signatures of protein and mRNA expression levels“, *Mol Biosyst*, Bd. 5, Nr. 12, S. 1512–1526, Dez. 2009, doi: 10.1039/b908315d.
- [26] D. Vollenbroich, D. Bage, S. Kussatz, J. Michalski, und N. Paland, „DEVELOPMENT OF A MONOCYTE ACTIVATION TEST BASED ON DIGITAL PCR - NAT-MAT“, *Cytotherapy*, Bd. 26, Nr. 6, S. S122, Juni 2024, doi: 10.1016/j.jcyt.2024.03.232.
- [27] „NAT-MAT® All-in-One System“, Minerva Biolabs GmbH. Zugegriffen: 16. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://minerva-biolabs.com/de/pyrogen-testung/nat-mat-all-in-one-system>
- [28] W. Chanput, J. J. Mes, H. F. J. Savelkoul, und H. J. Wichers, „Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds“, *Food Funct.*, Bd. 4, Nr. 2, S. 266–276, 2013, doi: 10.1039/C2FO30156C.
- [29] M. Fujihara u. a., „Lipopolysaccharide-triggered desensitization of TNF- α mRNA expression involves lack of phosphorylation of I κ B α in a murine macrophage-like cell line, P388D1“, *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 68, Nr. 2, S. 267–276, 2000, doi: 10.1189/jlb.68.2.267.
- [30] J. Adamik u. a., „Distinct Mechanisms for Induction and Tolerance Regulate the Immediate Early Genes Encoding Interleukin 1 β and Tumor Necrosis Factor α “, *PLoS One*, Bd. 8, Nr. 8, S. e70622, Aug. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070622.
- [31] „Digital PCR | Nanoplate dPCR technology | QIAGEN“. Zugegriffen: 17. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr>
- [32] A. Zafeiriadou, K. Nano, N. S. Thomaidis, und A. Markou, „Evaluation of PCR-enhancing approaches to reduce inhibition in wastewater samples and enhance

viral load measurements“, *Science of The Total Environment*, Bd. 955, S. 176768, Dez. 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.176768.

- [33] „PrimeTime One-Step 4X Broad-Range MasterMix | IDT“, Integrated DNA Technologies. Zugriffen: 7. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/gene-expression/primetime-one-step-4x-broad-range-mastermix>
- [34] S. Fleige, V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm, und M. W. Pfaffl, „Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR“, *Biotechnol Lett*, Bd. 28, Nr. 19, S. 1601–1613, Okt. 2006, doi: 10.1007/s10529-006-9127-2.