

Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

Fachbereich Ökotrophologie

Untersuchungen zur Expression der Toll-like Rezeptor- und NOD-Gene bei Langlebigkeit

- Diplomarbeit -

angefertigt im

Institut für Klinische Molekularbiologie
(Direktor Prof. Dr. S. Schreiber)

Kiel

Dezember 2005

vorgelegt am 14.12.2005

von

Stefanie Derer

Krausstraße 17

24118 Kiel

Matrikelnr.: 1670606

Referentin: Prof. Dr. C. Behr-Völtzer

Koreferent: Prof. Dr. S. Schreiber

Tabellenverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	10
1.1. Langlebigkeit	10
1.2. Angeborenes Immunsystem	11
1.2.1. Die Familie der Toll-like Rezeptoren und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität	11
1.2.2. Die Familie der NOD-Proteine und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität	17
1.2.3. Funktionell assoziierte Gene	22
1.3. Zielsetzung der Arbeit	23
2. Methoden	25
2.1. Rekrutierung der Studienprobanden	25
2.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Vollblut	26
2.2.2. Quantifizierung der RNA	27
2.2.3. Qualitätskontrolle der RNA	28
2.2.4. Reverse Transkription	28
2.2.5. RT-PCR	29
2.2.6. Gelelektrophorese	31
2.2.7. Real Time-PCR mittels Micro Fluidic Card System	31
2.3. Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Konzentrationsmessung der RNA	36
3.2. RT-PCR	36
3.2.1. Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen mittels RT-PCR	36
3.1.2. Test-PCR mit cDNA-Proben	37
3.3. Auswertung der Ergebnisse der Low Density Arrays	38

3.3.1.	Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie	38
3.3.1.1.	Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie bei weiblichen Probanden	39
3.3.1.2.	Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie bei männlichen Probanden	40
3.3.2.	Ratios der NOD-Proteinfamilie	41
3.3.2.1.	Ratios der NOD-Proteinfamilie bei weiblichen Probanden	42
3.3.2.2.	Ratios der NOD-Proteinfamilie bei männlichen Probanden	43
3.3.3.	Ratios der funktionell assoziierten Gene	45
3.3.3.1.	Ratios der funktionell assoziierten Gene bei weiblichen Probanden	46
3.3.3.2.	Ratios der funktionell assoziierten Gene bei männlichen Probanden	47
3.3.4.	Gene mit besonders starker Expressionsveränderung	48
4.	<i>Diskussion</i>	50
4.1.	Zusammensetzung der Studiengruppen	50
4.2.	Herunterregulierung der Toll-like Rezeptor-Expression bei langlebigen Probanden	50
4.3.	NOD-Proteinfamilie	52
4.4.	Funktionell assoziierte Gene	55
5.	<i>Zusammenfassung</i>	57
6.	<i>Summary</i>	58
7.	<i>Literatur</i>	59
	<i>Anhang</i>	65
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	69
	<i>Danksagung</i>	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle I:	Die humane NOD-Proteinfamilie	18
Tabelle II:	Funktionell assoziierte Gene	22
Tabelle III:	Ablauf einer Reversen Transkription	29
Tabelle IV:	Zusammensetzung des Mastermixes für eine RT-PCR	30
Tabelle V:	Ablauf einer RT-PCR	30
Tabelle VI:	Zusammensetzung des PCR-Mixes	33
Tabelle VII:	Ablauf der Real Time-PCR	33
Tabelle VIII:	Auflistung der in der Studie untersuchten Gene	34
Tabelle IX:	Beispielrechnung für die vergleichende Ct-Methode	35
Tabelle X:	Beispielrechnung zur Ermittlung der RNA-Gesamtmenge	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung I:	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	13
Abbildung II:	Aufbau der TLRs und IL-1Rs	14
Abbildung III:	Toll-like Rezeptor Signalweg	15
Abbildung IV:	Domänenstruktur ausgewählter CATERPILLER-verwandter Genprodukte von verschiedenen Eukaryonten	19
Abbildung V:	Induced proximity model der NOD-Protein-Aktivierung	21
Abbildung VI:	5'-Nukleaseaktivität der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	32
Abbildung VII:	Test-PCR mit RNA	37
Abbildung VIII:	Test-PCR mit cDNA	37
Abbildung IX:	Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie	39
Abbildung X:	Ratios der TLR-Familie bei weiblichen Probanden	40
Abbildung XI:	Ratios der TLR-Familie bei männlichen Probanden	41
Abbildung XII:	Ratios der NOD-Proteinfamilie	42
Abbildung XIII:	Ratios der NOD-Proteinfamilie bei weiblichen Probanden	43
Abbildung XIV:	Ratios der NOD-Proteinfamilie bei männlichen Probanden	44
Abbildung XV:	Ratios der funktionell assoziierten Gene	45
Abbildung XVI:	Ratios der funktionell assoziierten Gene bei weiblichen Probanden	47
Abbildung XVII:	Ratios der funktionell assoziierten Gene bei männlichen Probanden	48
Abbildung XVIII:	MD2 Expressionsveränderungen	48
Abbildung XIX:	Genexpressionsänderungen bei ICEBERG	49
Abbildung XX:	Genexpressionsänderungen bei NALP11	49

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BIR	Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
bp	Basenpaare
CARD	Caspase activating and recruitment domain
Caspase	Cysteinylyl aspartate-specific protease
CATERPILLER	CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leucin rich repeats
cDNA	Complementary DNA
CIAS1	Cold-induced autoinflammatory syndrome 1
CINCA	Chronic neurologic cutaneous and articular syndrome
C _T	Zyklenzahl
DD	Death Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Double-stranded RNA (doppelsträngige RNA)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBD	Effector-binding domain
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1

IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine-rich repeats
LTA	Lipoteichoic acid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDP	Muramyl dipeptide
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NACHT	Neuronal apoptosis inhibitor protein, CIITA, HET-E and TP1
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitor
NALP	NACHT-, LRR-, and PYD-containing protein
NBS-LRR	Nucleotide-binding site and leucine-rich repeat
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
ng	Nanogramm
NOD	Nucleotide-binding and oligomerization domain
NOMID	Neonatal onset multisystem inflammatory disease
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-desoxythymidin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGN	Peptidoglycan
PRR	<i>PAMP</i> recognition receptor

PYD	Pyrin-Domäne
Ratio	Verhältnis zweier Ergebnisse
RICK	RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als Template (Reverse Transkriptase PCR)
SARM	Sterile α - and armadillo-motif-containing protein
S.aureus	Staphylococcus aureus
SIGIRR	Single immunoglobulin IL-1R-related molecule
SLC15A1	Solute carrier family 15 (Oligopeptide transporter), member 1
ssRNA	Single-stranded RNA
TAB	TAK1-binding protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK	Transforming-growth-factor- β -activated kinase
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF β	Transforming growth factor β
TIR	Toll/Interleukin 1 repeats
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumour necrosis factor α
TOLLIP	Toll-interacting protein
TRAF	Tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor

TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TUCAN	Tumour-upregulated CARD-containing antagonist of CASP9
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
UNG	Uracil- <i>N</i> -Glycosylase

Es sind folgende Fachtermini aus dem englischen Sprachgebrauch verwendet worden, deren Übersetzung in der molekularbiologischen Literatur nicht üblich ist:

<i>annealing</i>	Anlagerung der Primer an einzelsträngige DNA aufgrund komplementärer Basenpaarung.
<i>housekeeping gene</i>	Gen mit konstitutiver und zeitlich konstanter Expression, das zur Kontrolle bei semiquantitativen Expressionsanalysen benutzt wird
<i>kit</i>	Kommerziell erhältliche Zusammenstellung aller Komponenten, die für eine Versuchsdurchführung erforderlich sind.
<i>port</i>	Kammer, in die eine Probe pipettiert wird
<i>primer</i>	Kurzes Oligonukleotid, komplementär zu DNA- oder RNA-Bereichen. Dient zur gerichteten enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte.
<i>template</i>	DNA oder RNA, die als Ausgangssubstanz für die Amplifikation spezifischer Bereiche durch PCR benutzt wird.
<i>well</i>	Reaktionstasche, -schale oder -napf

1. Einleitung

1.1. Langlebigkeit

Das Erreichen eines Alters von über neunzig Jahren, also weit über dem Durchschnittsalter der Bevölkerung von zirka 78 Jahren, wird als Langlebigkeit bezeichnet. Dieser liegt eine multifaktorielle Basis des Alterns zugrunde, das heißt eine Vielzahl von Faktoren wirken auf das Altern ein. Ein verbesserter Standard in Hygiene, Medizin und Ernährung hat in den westlichen Industrienationen besonders in den letzten dreißig Jahren zu einer steigenden Lebenserwartung von durchschnittlich 60 auf 77 Jahre geführt (WHO ISSUES, 2000). Zudem ist die Lebenserwartung von Frauen in den letzten 160 Jahren um bis zu drei Monate pro Jahr gestiegen (OEPPEIN & VAUPEL, 2002). Anhand von Populations- und Zwillingsstudien (HERSKIND et al., 1996; SKYTTHE et al., 2003) konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass auch genetische Faktoren Einfluss auf das Altern haben.

Beim Alterungsprozess kommt es zu einer Beeinträchtigung unterschiedlicher Funktionen des Körpers (VASTO & CARUSO, 2004). So wird im Alter unter anderem eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen und einer verschlechterten Wundheilung sowie ein vermehrtes Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus und Krebs beobachtet (PLOWDEN et al., 2004). Eine wichtige Hypothese für die Erklärung der Langlebigkeit ist die differentielle (unterschiedlich individuelle) Funktionserhaltung des Immunsystems.

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wird häufig als Modellsystem zur Untersuchung von Alterungs- und Langlebigkeitsprozessen eingesetzt. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Mutationen im DAF-2-Gen, ein Homolog des insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 Rezeptors (*insulin/insulin-like growth factor 1 receptor, I/IGF-1R*), die Lebensspanne von *C. elegans* verlängern können (DORMAN et al., 1995). Weitere Studien konnten zeigen, dass die Funktion des angeborenen Immunsystems des Fadenwurms unter anderem durch die Signalgebung von DAF-2 beeinflusst wird (Kurz et al., 2004). Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und der Frage, warum das Immunsystem einiger Menschen nur minimale Funktionsverluste während des Alterns erfährt und diese Menschen

sehr alt (älter als 90 Jahre) werden können, während andere Menschen sehr starke Funktionsverluste erleiden und somit eine niedrigere Lebenserwartung haben.

1.2. Angeborenes Immunsystem

Das Immunsystem erkennt und eliminiert eindringende, pathogene Mikroorganismen und andere Krankheitserreger (z.B. Viren, parasitäre Metazoen). Es lässt sich in die „angeborene Immunität“ sowie die „adaptive Immunität“ (TAKEDA et al., 2003) einteilen.

Die Erkennung und Abwehr eingedrungener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben vielzelliger Organismen. Mit Hilfe spezifischer Rezeptoren (*PAMP recognition receptors*, PRRs) sind Pflanzen und Tiere in der Lage, molekulare Muster unterschiedlicher Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) zu erkennen. Die PRRs lassen sich aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation in zwei Klassen einteilen: die membranständigen *Toll-like Rezeptoren* (TLRs) und die zytoplasmatischen *Nucleotide-binding and Oligomerization Domain-Proteine* (*NOD-Proteine*). Während die Toll-like Rezeptoren in die Erkennung von PAMPs und deren Strukturen im extrazellulären Raum involviert sind (MEDZHITOV, 2001), übernehmen die NOD-Proteine diese Aufgabe intrazellulär (PHILPOTT et al., 2004).

1.2.1. Die Familie der Toll-like Rezeptoren und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität

Zuerst wurde das Rezeptormolekül Toll und dessen Rolle in der angeborenen Immunabwehr bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Toll galt als ein wichtiger Faktor während der Embryogenese (ANDERSON et al., 1985). Später konnte seine entscheidende Rolle in der antifungalen Immunabwehr und der Abwehr gegenüber gram-positiven Bakterieninfektionen bei Insekten nachgewiesen werden (LEMAITRE et al., 1997). Die ersten Toll-Homologe bei Säugetieren, die Toll-like Rezeptoren (TLRs), wurden 1998 entdeckt (ROCK et al., 1998). Die TLRs gehören zur Gruppe der integralen Membran-Glykoproteine vom

Typ I (mit extrazellulärem N-Terminus) und werden aufgrund des homologen Aufbaus ihrer zytoplasmatischen Anteile der größeren Familie der IL-1 Rezeptoren (IL-1Rs) zugeordnet. Während die IL-1Rs drei Immunglobulin-ähnliche Domänen enthalten, weisen die TLRs extrazellulär leucin-reiche Domänen (*leucine-rich repeats*, LRR) auf. Dreizehn TLRs wurden bei Säugetieren identifiziert, von denen jedoch nur zehn (TLR1-10) beim Menschen exprimiert werden (LAUW et al., 2005).

Toll-like Rezeptoren sind in der Lage, viele verschiedene PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) zu erkennen. TLR2 und TLR4 erkennen Zellwandprodukte von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, während TLR5 ein strukturelles Epitop vom bakteriellen Flagellin bindet. Die physiologischen Liganden von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind verschiedene Formen mikrobieller Nukleinsäuren. Die Ligandenerkennungsregionen der Heterodimere TLR1/2 und TLR2/6 bilden funktionelle Paare und sind so in der Lage, eine Vielzahl mikrobieller Strukturen zu erkennen (AKIRA, 2003; BEUTLER et al., 2003). Da TLR1, TLR6 und TLR10 auf demselben Locus von Chromosom 4p14 lokalisiert sind und strukturell eine Ähnlichkeit aufweisen, könnte TLR10 ebenfalls die Funktion eines Co-Rezeptors für TLR2 einnehmen (HASAN et al., 2005). Hasan et al. (2005) gelang es jedoch nur nachzuweisen, dass TLR10 mit sich selbst assoziiert und so Homodimere bildet. Eine Bildung von Heterodimeren mit TLR1 oder TLR6 konnte nicht bestätigt werden. Interaktionen der TLRs mit ihren Liganden führen unter anderem zur Zerstörung von eindringenden Pathogenen und der Reparatur von Zellgeweben (Abb. I).

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und werden nach Aktivierung durch ihre spezifischen Liganden von Phagosomenstrukturen eingebunden. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die in die Erkennung von Nukleinsäurestrukturen involviert sind, werden nicht an die Zelloberfläche transportiert und sind somit intrazellulär vorzufinden (HOPKINS et al., 2005; ANDERS et al., 2005). TLR9 ist nur im Endoplasmatischen Retikulum vorzufinden und wird nach Stimulation mit CpG-DNA in endosomale/lysosomale Kompartimente rekrutiert.

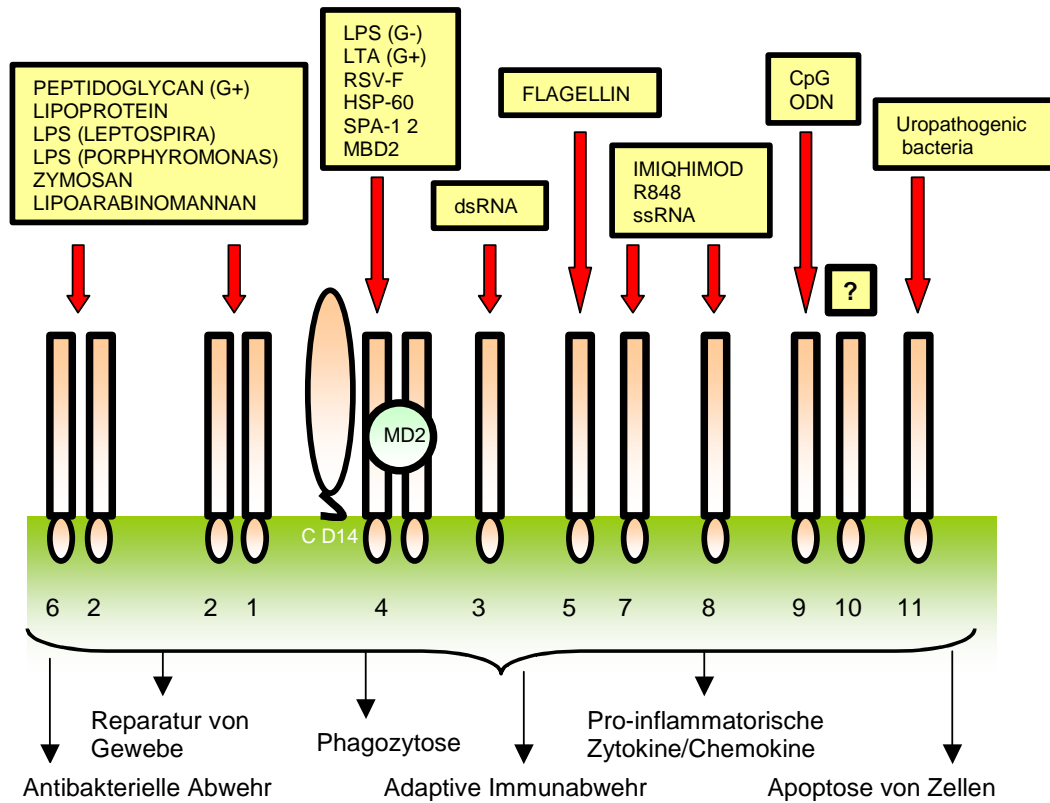


Abbildung I: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

G+ = Gram-positive Bakterien; G- = Gram-negative Bakterien; LPS = Lipopolysaccharid; LTA = Lipoteichonsäure; RSV-F = Respiratory-Syncytial-Virus F Protein; HSP-60 = Heat-shock Protein 60; SPA-12 = WD-Repeat Protein Specific to Phytochrome A; mBD2 = Methyl-CpG-Binding Domain Protein 2; R848 = Resiquimod; ODN = Oligodesoxynukleotid. (verändert nach Plowden et al., 2004)

TLRs und IL-1Rs besitzen in ihren zytoplasmatischen Bereichen eine konservierte Region, bestehend aus ungefähr 200 Aminosäuren, die als *Toll/IL-1R (TIR)* Domäne bezeichnet wird. Die Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen den TIR-Domänen, die in ihrer Größe variieren, beträgt 20 bis 30 Prozent (Abb. II).

Die extrazelluläre Domäne der TLRs beinhaltet 19 bis 25 tandemrepetitive Kopien von LRR-Motiven (Abb. II). Jede Region besteht aus 24 bis 29 Aminosäuren und setzt sich aus einer leuzin-reichen XLXXLXLXX und einer weiteren konservierten Sequenz $X\phi XX\phi X_4 FXXLX$ zusammen (wobei X für eine beliebige und ϕ für eine hydrophobe Aminosäure stehen). Die leuzin-reichen Regionen, von denen angenommen wird, dass sie direkt in die Erkennung verschiedenster molekularer Motive involviert sind, umfassen einen β -Strang und eine α -Helixstruktur, die durch

Schleifen verbunden sind und eine hufeisenförmige Struktur bilden (AKIRA et al., 2004).

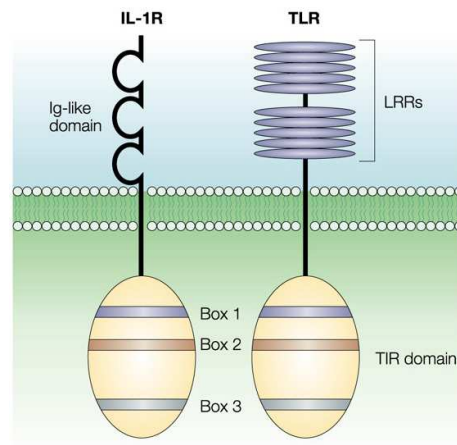


Abbildung II: Aufbau der TLRs und IL-1Rs

IL-1R = Interleukin-1 receptor, TLR = Toll-like Receptor, LRR = leucine-rich repeats, TIR domain = Toll/IL-1R domain, Ig-like domain = Immunglobulin-like domain. (AKIRA et al., 2004)

Bei einer Stimulation der TLRs durch ihre Liganden gehen diese eine Verbindung mit MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) ein und rekrutieren IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*). An den entstandenen Molekülkomplex bindet IRAK1. IRAK4 induziert daraufhin die Phosphorylierung von IRAK1 und ermöglicht die Bindung von TRAF6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) an phosphoryliertes IRAK1. IRAK1 und TRAF6 lösen sich im nächsten Schritt vom Rezeptorkomplex und gehen an der Plasmamembran eine neue Verbindung mit TAK1 (*transforming-growth-factor- β -activated kinase*), TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) und TAB2 ein, wodurch die Phosphorylierung von TAB2 und TAK1 induziert wird. IRAK1 wird an der Plasmamembran abgebaut. Der verbleibende Komplex (bestehend aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2) wandert ins Zytosol, wo er mit den Ubiquitin-Ligasen UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) und UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) assoziiert. Dies führt zu einer Ubiquitinierung von TRAF6, wodurch wiederum TAK1 aktiviert wird. Anschließend phosphoryliert TAK1 einerseits MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein-Kinasen*) und andererseits den IKK-Komplex (*inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase Komplex*), welcher aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ (auch bekannt als IKK1, IKK2 und *nuclear factor- κ B (NF- κ B) essential modulator*, NEMO) besteht. Daraufhin phosphoryliert der IKK-

Komplex I κ B, was zu dessen eigenen Ubiquitinierung und anschließendem Abbau führt. Dies ermöglicht NF- κ B in den Zellkern zu wandern und die Expression von Zielgenen wie IL-8 (*Interleukin-8*), IL-6 (*Interleukin-6*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), die eine inflammatorische Antwort zur Eliminierung der eingedrungenen Pathogene initiieren, zu induzieren (BEUTLER et al., 2003; AKIRA & TAKEDA 2004; PLOWDEN et al., 2004) (Abb. III).

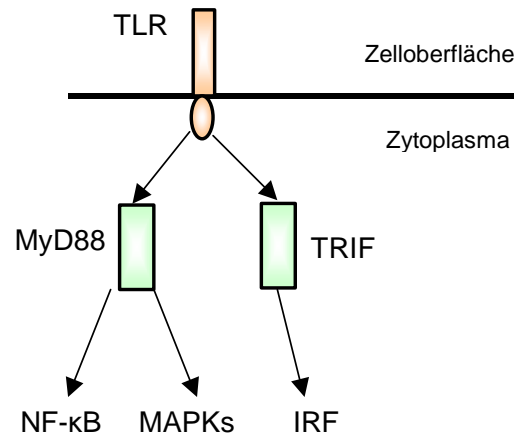


Abbildung III: Toll-like Rezeptor Signalweg.

NF- κ B = nuclear factor- κ B; MAPK = mitogen-activated protein kinase; IRF = Interferon regulatory factor; TRIF = TIR domain-containing adapter inducing IFN- β ; MyD88 = myeloid differentiation primary-response protein 88.

In die Erkennung von PAMPs sind neben den TLRs auch sogenannte Co-Rezeptoren (z.B. CD14 und MD2) und Adaptormoleküle der TLRs (z.B. MyD88, TRIF, TIRAP und SARM) involviert. Alle Adaptormoleküle der TLRs verfügen über eine TIR-Domäne.

Die Stimulation des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) ermöglicht die Aktivierung von zwei alternativen Signalwegen: den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Signalweg.

Das Adaptormolekül MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) besitzt neben einer amino-terminalen Todesdomäne (*Death Domain*, DD) auch eine carboxy-terminale TIR-Domäne. Während die TIR-Domäne von MyD88 mit den TIR-Domänen der TLRs und IL-1Rs assoziiert, interagiert die Todesdomäne von MyD88 mit der Todesdomäne von IRAK (*IL-1R-associated kinase*) und rekrutiert diese dadurch an den Rezeptorkomplex. MyD88 verbindet also die TLRs/IL-1Rs mit nachgeschalteten Signalmolekülen, die über eine Todesdomäne verfügen, und leitet die Produktion von inflammatorischen Zytokinen ein. Die

Stimulation von TLR3 und TLR4 führt in Kooperation mit TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) zur MyD88-unabhängigen Induktion von Typ I Interferonen (*Interferon- α/β*) (Abb. III).

TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) fungiert als ein weiteres Adaptormolekül im MyD88-unabhängigen Signalweg. Während TIRAP im MyD88-abhängigen Signalweg essentiell für die Signalübertragung durch TLR2 und TLR4 ist, ist die Funktion von SARM (*sterile α - and armadillo-motif-containing protein*) in der Signalübertragung durch TLRs noch nicht vollständig beschrieben.

Neben den Adaptormolekülen nehmen Co-Rezeptoren wie CD14 und MD2 auch eine wichtige Rolle in der Signalübertragung durch TLRs ein. Bevor LPS in direkten physischen Kontakt mit dem TLR4/MD2-Komplex tritt, erfolgt dessen Bindung an den Co-Rezeptor CD14. CD14 ist ein LPS-Rezeptor mit einer hohen Bindungsaffinität, der entweder im Serum oder auf der Zelloberfläche von Makrophagen vorzufinden ist. MD2 ist ein weiteres Protein in dem LPS-Rezeptor-Komplex. Es fehlt ihm eine transmembrane Region und ist in Assoziation mit TLR4 auf der Zelloberfläche lokalisiert.

Toll-like Rezeptor-Signalwege werden durch mehrere Moleküle, die durch die Stimulation der TLRs induziert werden, negativ reguliert. Zu diesen Molekülen gehören unter anderem SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*) und TOLLIP (*Toll-interacting protein*). SIGIRR ist ein membrangebundenes Molekül mit einer TIR-Domäne und interagiert vorübergehend mit TLR4, IRAK1 und TRAF6 und reguliert hierdurch die TLR-Signalübertragung negativ. TOLLIP verfügt über eine TIR-Domäne, über die es direkt mit der zytoplasmatischen TIR-Domäne der IL-1Rs, von TLR2 und TLR4 nach deren Stimulation durch Pathogene assoziiert und so die Phosphorylierung und Kinase-Aktivität von IRAK1 unterdrückt. Dies führt zur Blockierung der durch TLRs-vermittelten zellulären Antwort auf eindringende Pathogene. Zusammenfassend fungiert TOLLIP als ein Suppressor-Protein, das für die Aufrechterhaltung eines ruhenden Zustandes von Immunzellen sowie für die Signalübertragung durch TLR/IL-1R-induzierte Zellen während Entzündungsprozessen und Infektionen zuständig ist (CARIO & PODOLSKY, 2005; AKIRA & TAKEDA, 2004).

1.2.2. Die Familie der NOD-Proteine und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität

Die Beschreibung der extrazellulären Pathogenerkennung durch epitheliale Rezeptoren wie die TLRs (AKIRA et al., 2001; DUNE et al., 2003; AKIRA & TAKEDA, 2004) führte schon früh zur Vermutung, dass derartige Mechanismen zur Erkennung bakterieller Strukturen und zur Induzierung von Entzündungsprozessen ebenfalls intrazellulär vorhanden sein müssten (PHILPOTT et al., 2000). NOD1 und NOD2 (*nucleotide-binding and oligomerization domain* Proteine) wurden als erste zytosolische Proteine beschrieben, die diese Aufgaben innerhalb der Zelle erfüllten.

Die NBS-LRR-Familie (*nucleotide-binding site and leucine-rich repeat*), auch unter dem Namen CATERPILLER (*CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leucine-rich repeats*)-Familie bekannt, umfasst ungefähr 30 zytoplasmatische Proteine, die durch drei strukturelle Domänen charakterisiert sind: eine carboxy-terminale Ligandenerkennungs-Domäne wie LRR (leuzin-reiche Region), die mikrobielle Muster erkennen kann, eine zentrale NBS- oder NACHT-Domäne (*neuronal apoptosis inhibitor protein, CIITA, HET-E and TP1*), die für die Oligomerisierung von NBS-LRR-Proteinen zuständig ist, und eine amino-terminale effektor-bindende Domäne (EBD) (HARTON et al., 2002).

Die strukturell verwandten Gene verteilen sich auf acht Chromosomen, wobei eine Akkumulation auf den Chromosomen 11, 16 und 19 vorzufinden ist (Tab.I) (INOHARA & NUNEZ, 2001; INOHARA et al., 2002; INOHARA & NUNEZ, 2003; TSCHOPP et al., 2003). Allen NOD-Proteinen ist die Eigenschaft gemeinsam, durch Selbstoligomerisierung nachgeschaltete Effektormoleküle zu aktivieren.

Aufgrund der verschiedenen amino-terminalen Domänen wird die NBS-LRR-Familie in NALPs (*NACHT-, LRR-, and PYD-containing protein*), NODs (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) und NAIP (*neuronal apoptosis inhibitor*) eingeteilt. NALPs beinhalten PYD-Domänen, NODs hingegen CARD-Domänen und NAIP trägt BIR-Domänen (GIRARDIN et al., 2002; INOHARA et al., 2002; INOHARA & NUNEZ, 2003; TSCHOPP et al., 2003).

Tabelle I: Die humane NOD-Proteinfamilie

Funktion und nachfolgende Effektoren wurden nur genannt, wenn mindestens zwei Publikationen vorlagen. AC = Apoptose und/oder Caspase-Aktivierung; AD = Aktivierungsdomäne; BIR = Baculovirus Inhibitor der Apoptose- repeats; CARD = Caspase-rekrutierende Domäne; EBD = Effektor-Binde-Domäne; LRD = Liganden-Erkennungsdomäne; LRR = leucin-rich repeats; MDP = Muramyl-Dipeptid; NALP = *NACHT*-, *LRR*-, and *PYD-containing protein*; PYD = Pyrin-Domäne; WDRs = WD40-repeats. (Nach: INOHARA & NUNEZ, 2003)

Protein	Synonym	Genort	EBD	Effektor	LRD	Ligand	Funktion
<i>APAF1</i>		12q23	CARD	Caspase-9	WDRs	Cytochrom C	aktiviert Caspase-9, induziert AC
<i>NOD1</i>	CARD4	7p14	CARD	RICK, Caspase-1	LRRs	DAP = Diamino-pimelinsäure	aktiviert NF- κ B, steigert AC
<i>NOD2</i>		16q12	2CARDs	RICK	LRRs	MDP, Peptidoglycan	aktiviert NF- κ B, steigert AC
<i>IPAF</i>	CARD12, CLAN	2p22	CARD	(ASC, Caspase1)	LRRs		aktiviert NF- κ B, steigert AC
<i>Cryopyrin</i>	PYPAF1, NALP3, CIAS1	1q44	PYD	(ASC)	LRRs		Inflammasom
<i>PYPAF5</i>	NALP6	11p15	PYD		LRRs		
<i>NOD5</i>	NALP14	11p15	PYD		LRRs		
<i>PYPAF7</i>	NALP12	19q13	PYD		LRRs		
<i>MATER</i>	NALP5	19q13	PYD		LRRs		
<i>PAN2</i>	PYPAF4, NALP4	19q13	PYD		LRRs		
<i>NALP2</i>	PYPAF2	19q13	PYD		LRRs		
<i>PYPAF3</i>	NALP7, NOD12	19q13	PYD		LRRs		
<i>PYPAF6</i>	NOD17, NALP11	19q13	PYD		LRRs		
<i>NOD6</i>	NALP9	19q13	PYD		LRRs		
<i>NOD14</i>	NALP13	19q13	PYD		LRRs		
<i>NOD16</i>	NALP8	19q13	PYD		LRRs		
<i>NOD27</i>		16q13	PYD		LRRs		
<i>NOD8</i>	NALP10	11q15	PYD		-		
<i>NAIP</i>		5q13	3 BIRs		LRRs		
<i>CIITA</i>		16q13	AD	(RFX5, CBF, NF- γ)	LRR		MHC-II-Coaktivator
<i>NALP1</i>	DEFCAP, CARD7, NAC	17p13.1	PYD, CARD		LRR		steigert AC, Inflammasom
<i>NOD3</i>		16p13	X		LRR		
<i>NOD9</i>		11q23	X		LRR		

Die Domänen der NBS-LRR-Proteine und die der Krankheits-Resistenz-Proteine in Pflanzen, die R-Proteine, weisen einen strukturell homologen Aufbau auf. Werden intrazelluläre Pathogene durch R-Proteine erkannt, führt dies zu einer Stoffwechseländerung der betroffenen Pflanzenzelle. Die Einleitung einer Form des programmierten Zelltodes (Hypersensitivitätsreaktion) führt zum Absterben der betroffenen Zellen und damit zur Limitierung der Infektion (DANGL & JONES, 2001). Aufgrund der Homologie zwischen den Genen wurde vermutet, dass die CATERPILLER-Familie beim Säugetier ebenfalls eine wichtige Funktion in der Abwehr von Pathogenen einnehmen könnte (GIRARDIN et al., 2002).

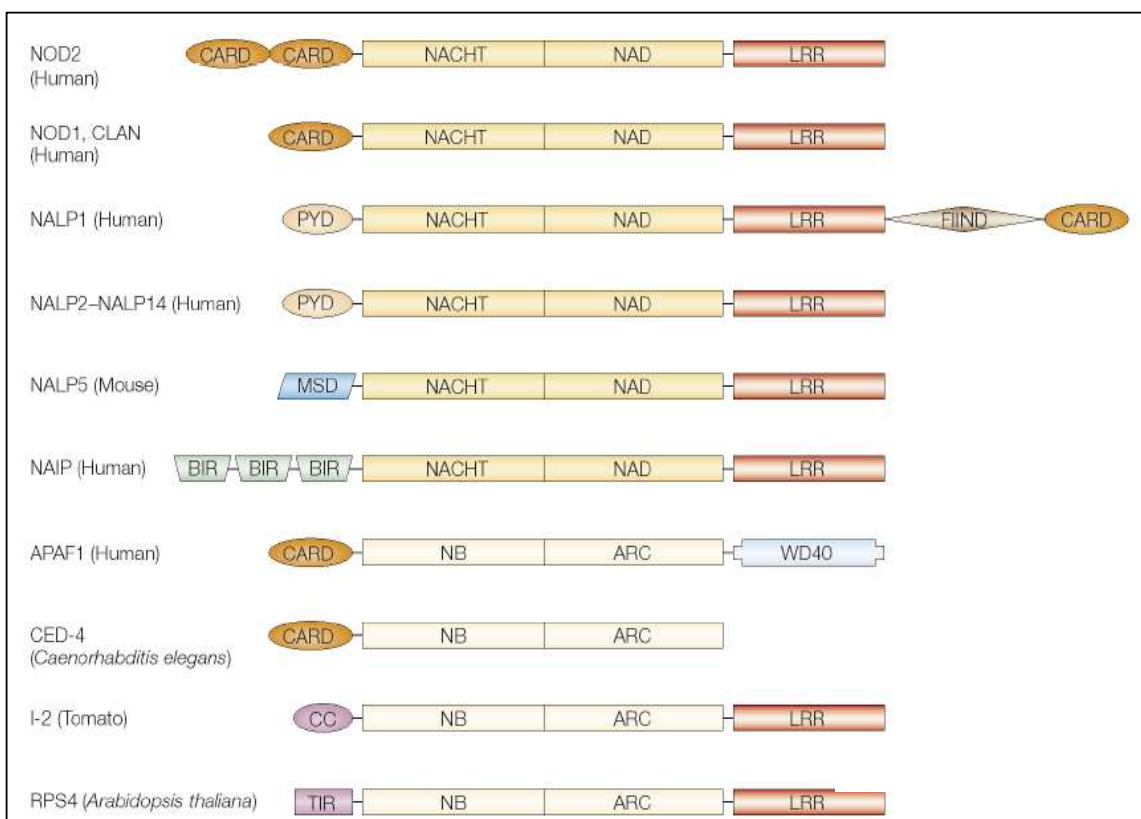


Abbildung IV: Domänenstruktur ausgewählter CATERPILLER-verwandter Gene von verschiedenen Eukaryonten.

CARD: Caspase-rekrutierende Domäne; PYD = Pyrin-Domäne; NALP = NACHT-, LRR-, and PYD-containing protein; CC = Coiled Coil; TIR = Toll/Interleukin-1 Rezeptor-Domänen; NAD = NACHT-associated domain; ARC = APAF1, R-Genprodukte und CED-4; APAF1 = apoptotic protease-activating factor 1; BIR = baculovirus inhibitor of apoptosis repeat; CED-4 = *C. elegans* death protein 4; CLAN = caspase recruitment domain protein 12; FIIND = eine Interaktionsdomäne, die in die Inflammasomformation involviert ist; MSD = murine maternal-specific Domäne mit unbekannter Funktion; NACHT = nucleotide-binding domain; NAIP = neuronal apoptosis inhibitory protein 1; NB = nucleotide binding; WD40 = cytochrome c sensing domain von APAF1. (SCHREIBER et al., 2005)

NALPs sind in der Lage mit CARD-tragenden Molekülen wie IPAF oder Caspase-1 und Caspase-5 zu interagieren. TSCHOPP et al. (2003) definierten den Aufbau der NALPs, wobei sie feststellten, dass NALP2-14 jeweils aus einer PYD-, einer NBS- und einer LRR-Domäne bestehen, während NALP1 zusätzlich eine CARD-Domäne am carboxy-terminalen Ende aufweist (Abb. IV).

Eine weitere Funktion der NALPs ist die Bildung des Inflammasoms. Das NOD-Protein NALP1 (TSCHOPP et al., 2003), sowie auch NALP3 (MANJI et al., 2002; AGOSTINI et al., 2004) interagieren mit ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), Caspase-5 und/oder Caspase-1. Dies führt über die Aktivierung von Caspase-1 zur Umwandlung von pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β (CHAMAILLARD et al., 2003; TSCHOPP et al., 2003).

Die effektor-bindenden Domänen (EBD) wie CARD (*caspase activating and recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) oder BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*) binden durch homophile CARD/CARD-, PYD/PYD- oder BIR/BIR-Interaktionen nachgeschaltete Effektormoleküle und aktivieren somit den programmierten Zelltod, die *Apoptose*, und NF- κ B. Die Aktivierung sowie die Signalgebung von NOD-Proteinen wurde erstmals in Studien über APAF-1 beschrieben, das eine strukturelle Homologie zu den LRR-enthaltenden NOD-Proteinen aufweist. In Folge der Apoptose wird Cytochrom C aus den depolarisierten Mitochondrien freigesetzt, das die Oligomerisierung von APAF-1 sowie die Rekrutierung und Autoaktivierung von Pro-Caspase-9 induziert (SALEH et al., 1999; BENEDICT et al., 2000). Bei diesem Prozess, der als *induced proximity signalling* oder *induced proximity model* (Abb. V) bezeichnet wird, entsteht ein Proteinkomplex, das sogenannte „Apoptosom“ (INOHARA & NUNEZ, 2001; SALVESEN & DIXIT, 1999).

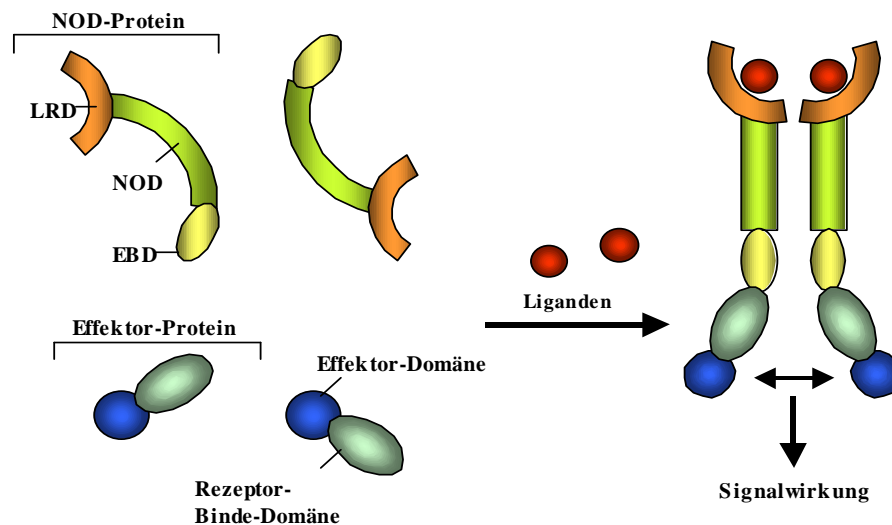


Abbildung V: Induced proximity model der NOD-Protein-Aktivierung

Exogene oder endogene Liganden werden durch die Liganden-Erkennungsdomäne (LRD) der NOD-Proteine erkannt, die dann durch Konformationsänderung die Selbst-Oligomerisierung über die NOD-Domäne erlaubt. Dies ist wiederum für die Induktion der Rekrutierung nachfolgender Effektormoleküle über die Effektor-Bindedomäne (EBD) essentiell. (INOHARA & NUNEZ, 2003)

Zusammengefasst übernimmt die NOD-Proteinfamilie intrazellulär eine wichtige Aufgabe in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen und der Apoptose und hat nicht nur einen großen Einfluss auf das Immunsystem und auf immunzellen-reiche Gewebe und Organe, wie Haut, Zentrales Nervensystem, Lunge und Gastrointestinaltrakt, sondern auch eine Funktion in Epithelzellen (ROSENSTIEL et al., 2002). Ihre Bedeutung zeigt sich zusätzlich in der funktionellen Assoziation mit einer Vielzahl autoinflammatorischer, immunologischer und neurologischer Krankheiten. Es konnte nachgewiesen werden, dass genetische Variationen bei CIITA, NOD2 und Cryopyrin in die Entwicklung genetischer Erkrankungen involviert sind. Mutationen in CIITA verursachen das Typ II Syndrom der nackten Lymphozyten. NOD2 und CIAS1, das für CIITA kodiert, nehmen Einfluss in autoinflammatorischen Prozessen. NOD2 wird mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (HAMPE et al., 2001), während CIAS1 unter anderem in die Entstehung vom Muckle-Wells-Syndrom involviert ist (DODÉ et al., 2002).

1.2.3. Funktionell assoziierte Gene

Die in dieser Arbeit als funktionell assoziiert bezeichneten Gene und deren Funktionen werden in Tabelle II dargestellt. Es werden lediglich diejenigen Gene erläutert, die noch nicht in den Kapiteln 1.2.1. und 1.2.2. erwähnt wurden.

Tabelle II: Funktionell assoziierte Gene

Gen-bezeichnung	vollständiger Genname	Synonym	Genort	Funktion
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	PYCARD	16p11.2-p12.1	inhibiert Apoptose; NF- κ B-Aktivierung
TUCAN	Tumor-upregulated CARD-containing Antagonist of CASP9	CARD8	19q13.33	inhibiert/induziert Apoptose; inhibiert NF- κ B-Aktivierung
ICEBERG			11q21-q22	inhibiert NF- κ B-Aktivierung; verhindert IL-1 β Sekretion
COP/pseudo-ICE	Pseudo-interleukin-1 β converting enzyme		11q22	verhindert IL-1 β Sekretion; NF- κ B-Aktivierung
RIP2	RIP-like interacting CLARP kinase	RICK, CARDIAK		induziert Apoptose; NF- κ B-Aktivierung
SLC15A1	Solute Carrier Family 15 (Oligopeptide Transporter), Member 1	HpepT1	13q33-q34	Oligopeptidtransporter

ASC und RIP2 sind nachgeordnete Adaptormoleküle, die mit PYD- und CARD-enthaltenden Proteinen interagieren, um deren Signalwege und besonders NF- κ B zu aktivieren. ASC ist neben NALP1, NALP3, Caspase-1 und Caspase-5 ebenfalls in die Bildung des Inflammasoms involviert (INOHARA & NUNEZ, 2003; TSCHOPP et al., 2003).

TUCAN enthält eine CARD-Domäne und ist in Apoptose- und Entzündungsprozessen in die Aktivierung von Caspasen und NF- κ B involviert (PATHAN et al., 2001; RAZMARA et al., 2002).

ICEBERG und Pseudo-ICE sind CARD-Domänen enthaltende Proteine, die die Generierung von IL-1 β und die Sekretion von Interferon- γ verhindern, indem sie mit Caspase-1 (*cysteinyI aspartate-specific protease 1*) interagieren und somit dessen Assoziation mit RIP2 unterbinden, welches als Aktivator von Caspase-1 agiert, (HUMKE et al., 2000; DRUILHE et al., 2001). Pseudo-ICE ist zusätzlich noch in der Lage mit RIP2 zu interagieren und NF- κ B zu aktivieren (DRUILHE et al., 2001).

Der Oligopeptidtransporter Pept1, der in der Darmzottenmembran lokalisiert ist, ermöglicht in Verbindung mit dem Membranprotein HTP1 die Absorption von Di- und Tripeptiden aus dem Dünndarm (ADIBI et al., 1997). VAVRICKA et al. (2004) zeigten in einer weiteren Studie, das hPepT1 das bakterielle MDP, den Liganden von NOD2 transportiert.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation der angeborenen Immunantwort als physiologisch ältester Mechanismus der Pathogenabwehr stellt einen wichtigen Faktor für die physiologische Homöostase dar. Der Einfluss dieses Systems auf die Langlebigkeit beim Menschen ist bisher nicht ausreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, in Anlehnung an den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand Kandidatengene daraufhin zu untersuchen, wie stark sie in der Gruppe der sehr alten Menschen (>90 Jahre) im Vergleich zu jüngeren Probanden exprimiert sind.

Um den Zusammenhang zwischen der Funktionserhaltung des Immunsystems und der Langlebigkeit erklären zu können, werden in der vorliegenden Arbeit bestimmte Gene des menschlichen Genoms untersucht, deren Genprodukte als Rezeptoren des Immunsystems fungieren. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLRs) TLR1-10, die NOD-Proteine (Nucleotide-binding and oligomerization domain) und Transkriptionsfaktoren dieser Gene (AKIRA & TAKEDA, 2004). Vorangegangene Studien konnten belegen, dass eine niedrige Expression der TLRs und hierdurch eine verringerte zelluläre Reaktion auf Pathogene mit dem Altern einhergeht (RENSHAW et al., 2002; FLYNN et al., 2003). Obwohl eine Reihe von Studien (FLYNN et al. 2003; LANCASTER et al. 2005; RENSHAW et al. 2002;) die Rolle von TLRs beim Alterungsprozess bereits diskutiert hat, soll diese Arbeit weiter dazu beitragen, eine systematische Analyse des Zusammenhangs zwischen Langlebigkeit und differentieller TLR- und NOD-Expression zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich signifikant von vorangegangenen Studien in der Größe der Probandengruppen und dem Alter der langlebigen Probanden.

Durch die Untersuchung aller bekannten TLRs, ausgewählter NOD-Proteine sowie funktionell assoziierter Gene dieser beider Gruppen wird es möglich sein, einen tiefgreifenderen Einblick hinsichtlich des Einflusses der angeborenen Immunität auf den Alterungsprozess zu erlangen.

Ziele:

- Rekrutierung von Studienprobanden zur Kollektion von Probanden RNA
- Systematische Expressionsanalyse der Kandidatengene
- Statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der Expressionsanalyse

2. Methoden

Alle in den folgenden Methoden benutzten Puffer, Medien, Kits, Enzyme und Primer sind in gegliederter Auflistung im Anhang zu finden. Die Zusammensetzung der in den verwendeten Kits enthaltenen Puffer ist vom Hersteller nicht bekannt gegeben worden.

2.1. Rekrutierung der Studienprobanden

Die Untersuchungsgruppe umfasste 18 langlebige Probanden (älter als 90 Jahre) aus Schleswig-Holstein und setzte sich aus 13 Frauen und 5 Männern zusammen.

Die Probanden der Kontrollgruppe stammten ebenfalls aus Schleswig-Holstein. Diese Gruppe war in zwei Untergruppen unterteilt, die ebenfalls jeweils 18 bis 19 Probanden umfassen. Hierzu sind 30- bis 49-jährige und 50- bis 70-jährige Probanden rekrutiert worden, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme frei von schweren Erkrankungen (akute Infektionen, schwere Herz-Kreislauf-Erkrankungen) waren. Die Struktur der Geschlechtsverteilung in den Kontrollgruppen und der Untersuchungsgruppe waren nahezu identisch.

Alle Probanden wurden über mögliche Risiken einer Blutentnahme sowie allgemein über die vorliegende Arbeit informiert. Zusätzlich unterschrieben sie eine Einwilligung zur Blutentnahme.

Die Rekrutierung der Studienprobanden erfolgte im Rahmen des popgen-Projektes, das an der Uniklinik Kiel vom Institut für Medizinische Statistik und Informatik und dem Institut für Klinische Molekularbiologie (Leiter Prof. Dr. med S. Schreiber) zur molekulargenetischen Erforschung von zwölf bedeutenden Erkrankungen sowie der Langlebigkeit in Nord-Schleswig-Holstein durchgeführt wird. Für die Untersuchungen wird DNA aus Blutproben vieler zehntausend Menschen gewonnen, um diese anschließend anonym und verschlüsselt analysieren zu können. Weiterhin beantworten die Probanden Fragebögen zu ihrem Krankheitsbild.

Popgen wird für diesen Zweck vom Bundesministerium für Bildung und Forschung innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes gefördert. Über die Einhaltung

der Sicherheitsvorschriften wacht die Ethikkommission des Uniklinikums Kiel und der Datenschutzbeauftragte des Landes Schleswig-Holstein.

2.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Vollblut

Für die RNA-Isolierung wurde das Blutentnahme-Set PAXgene™ RNA Tubes und das PAXgene™ Blood RNA Kit von PreAnalytix (Qiagen, Hilden) benutzt. Die Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Puffer wurde vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

In der Untersuchungsgruppe sowie in der Kontrollgruppe wurden bei jedem Probanden 10 ml peripheres Blut in vier PAXgene™ RNA Tubes (2,5 ml Blut pro PAXgene™ RNA Tube) entnommen und mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine komplette Lyse der Zellen zu gewährleisten.

Im ersten Schritt wurde das Blut für 10 Minuten bei 4300 rpm zentrifugiert (Varifuge 3.0R, Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold), um ein Pellet von mit Zellrückständen verunreinigten Nukleinsäuren zu erhalten. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml RNase freiem Wasser gewaschen und resuspendiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt (Varifuge 3.0R, Heraeus) für zehn Minuten bei 4300 rpm, nach dem der Überstand erneut verworfen wurde. Das Pellet wurde erneut mit 360 µl Puffer BR1 resuspendiert und dann in ein 2 ml-Tube pipettiert, in das zusätzlich 300 µl Puffer BR2 und 40 µl Proteinase K pipettiert wurden. Nach dem Mixen wurde das Tube für 10 Minuten bei 55°C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg), um die Proteine abzubauen. Durch zusätzliches Zentrifugieren (3 min, maximale Geschwindigkeit, Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) wurden Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Tube überführt. Um die Bindungseigenschaften anzupassen, wurden anschließend 350 µl Ethanol zugesetzt. 700 µl des Lysats wurden dann auf eine PAXgene™ Säule in einem 2 ml-Tube aufgebracht und für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf), um die RNA selektiv an der PAXgene™ Silikongel-Membran

zu binden. Mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) wurde die kontaminierende genomische DNA abgebaut. Hierzu wurden 350 μ l Puffer BR3 in die PAXgeneTM Säule pipettiert und anschließend für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf), um die gebundene RNA zu waschen. Im nächsten Schritt wurde ein DNase I-Inkubationsmix (bestehend aus 10 μ l DNase I Lösung und 70 μ l Puffer RDD) auf die PAXgeneTM Membran gebracht, für 30 Minuten bei 20 bis 30°C inkubiert und bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf). Dieser DNA-Verdau wurde nach einem erneuten Waschschriff mit Puffer BR3 wiederholt. Nach dem zweiten DNA-Verdau wurde die PAXgeneTM Säule mit dem Puffer BR3 gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit Puffer BR4 (jeweils 500 μ l) wurde die RNA in 40 μ l Puffer BR5 eluiert und bei -80°C gelagert.

Für die Untersuchung der RNA-Proben hinsichtlich Kontaminationen mit genomischer DNA wurde eine Test-PCR gemäß den Angaben in Abschnitt 2.2.5. mit 2 μ l RNA als Template und speziellen Primern für das *housekeeping* Gen GAPDH bei 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Nur Proben, bei denen eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte, wurden für die anschließende Reverse Transkription verwendet. Kontaminierte Proben wurden einer weiteren DNase I-Behandlung unterzogen.

2.2.2. Quantifizierung der RNA

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde dessen Absorption bei 260 nm (A_{260}) in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3100 pro, UV/visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) mit einem Umrechnungsfaktor von 40 ng/ μ l (für OD=1) gemessen. Für die Messung in einer 7 μ l-Küvette wurde ein Verdünnungsfaktor von 1:5 (entsprechend 2 μ l RNA verdünnt in 8 μ l 10 mM Tris·Cl, pH 7,5) gewählt. Die Reinheit der Präparation ließ sich aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei den Wellenlängen von 260 nm zu 280 nm ableiten, wobei der Quotient für RNA bei mindestens 2,0 liegen sollte.

2.2.3. Qualitätskontrolle der RNA

Nach dem Protokoll für das RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Böblingen) wurde die RNA hinsichtlich ihrer Qualität überprüft. Bei einer intakten RNA sind lediglich die 18S- und 28S-rRNA-Banden sichtbar, während zusätzliche oder verschmierte Banden auf eine Degradation der RNA hinweisen. Im ersten Schritt wurde ein Gelmix hergestellt, indem 550 µl der Nano Gelmatrix auf einen Zentrifugenfilter gegeben und bei 4000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurden 65 µl dieses Mixes mit 1 µl Farbstoff vermischt und bei 13.000 xg für zehn Minuten zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Nano Chip zunächst mit dem Mix und danach mit 5 µl des RNA 6000 Nano Markers und 1 µl der jeweiligen Probe beladen. Die Analyse der Proben erfolgte in einem Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Böblingen).

2.2.4. Reverse Transkription

Die Herstellung einer komplementären DNA (cDNA) aus einem mRNA-Template erfolgte durch die Reverse Transkription. Die Reverse Transkriptase ist ein aus Retroviren stammendes Enzym, das eine Doppelstrang-DNA-Kopie von einer Einzelstrang-RNA-Matrize erzeugt, indem es zunächst ein RNA/DNA-Hybrid-Molekül und dann eine DNA/DNA-Doppelhelix synthetisiert. Für die vorliegende Arbeit wurden für diesen Zweck eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (= Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *MMLV* (*moloney-murine leukemia virus*) und Oligo-(dT)₁₈-Primer zum Binden an den 3'-Poly-A-Schwanz der mRNA benutzt. Alle Komponenten entstammten dem Advantage[®] RT-for-PCR-Kit von Clontech (BD Bioscience/Clontech, Heidelberg).

Für alle weiteren Verfahren war es wichtig, dass jede cDNA aus der gleichen Menge RNA synthetisiert wurde. Aufgrund dessen wurde bei jeder Probe eine Menge von 0,2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Im ersten Schritt wurde das eingesetzte Volumen der RNA-Probe mit DEPC-behandeltem Wasser auf 12,5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 1,0 µl eines Oligo-(dT)₁₈-Primers hinzugefügt. Der Mix wurde dann für zwei Minuten auf 70°C erhitzt (Gene Amplification PCR System 9700, Perkin Elmer), damit das Anlagern des Primers an den 3'-Poly-A-

Schwanz der mRNA erfolgen konnte. Anschließend wurden 6,5 µl eines Mastermixes (Tab. III) hinzugefügt und das Gesamtvolumen von 20 µl für eine Stunde bei 42°C inkubiert (Gene Amplification PCR System 9700, Perkin Elmer). Nach der Inkubation erfolgte eine Erhitzung von fünf Minuten bei 98°C (Gene Amplification PCR System 9700, Perkin Elmer), bei der das Enzym inaktiviert wurde. Abschließend wurde die cDNA mit 80 µl DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und bei –80°C gelagert.

Die Überprüfung der Qualität der cDNA erfolgte gemäß den Angaben in Abschnitt 2.2.5. Hierbei wurde das *housekeeping* Gen GAPDH eingesetzt. Nur cDNA-Proben, die bei 1000 bp die erwartete Bande aufwiesen, wurden für die weiteren Verfahren verwendet.

Tabelle III: Ablauf einer Reversen Transkription

Komponente	Menge (µl)	Inkubation
Gesamt-RNA	0,2 µg	
Oligo-(dT) ₁₈ Primer	1	
DEPC-H ₂ O	ad 13,5	2 min/70°C
5X Puffer	4	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1	
RNase-Inhibitor	0,5	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1	1 h 42°C + 5 min/95°C
Gesamtvolumen	20	

2.2.5. RT-PCR

Bei der RT-Polymerase-Kettenreaktion (*Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction*, PCR) handelt es sich um eine PCR in Anlehnung an die Methode nach Mullis (MULLIS & FALOONA, 1987), bei der cDNA als Template verwendet wird. Als Primer wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet. Die RT-PCR wurde mit dem Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden) in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer (Gene Amp. PCR System 9700, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Die Zusammenstellung des benutzten Mastermixes einer typischen RT-PCR mit cDNA als Template findet sich in Tabelle IV.

Tabelle IV: Zusammensetzung des Mastermixes für eine RT-PCR

Komponente	Menge [μ l]
PCR-H ₂ O	10,75
10X PCR Puffer	2
5X Q-Solution	4
dNTPs (je 10 mM)	0,5
Primermix (je 10 μ M)	0,5
cDNA-Template	2
Taq-Polymerase	0,25
Gesamtvolumen	20

Während der thermischen Denaturierung bei 94-96°C erfolgte die Trennung beider DNA-Stränge, um ein einzelsträngiges DNA-Template zu erhalten. Das anschließende *Annealen* der Primer (bei ~50°C) definierte den Abschnitt der DNA, der während der PCR-Reaktion exponentiell amplifiziert wurde. Die Hybridisierungstemperatur ist primerspezifisch und wurde aus der Anzahl und Art der Primerbasen errechnet. Abschließend erfolgte die DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (bei 72°C) (Tab. V).

Tabelle V: Ablauf einer RT-PCR

Temp. [°C]	Zeit [Min]	Zyklusanzahl
95	4	} 28-32 x
95	0,5	
T _{Anneal}	0,75	
72	1	
72	5	
4	∞	

Die Zykluszahl, in der noch eine exponentielle Amplifikation erfolgte, lag je nach Gen zwischen 28 und 32 Zyklen.

Abschließend wurden die kompletten Reaktionsansätze auf 1%igen ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt, mittels eines UV-

Spektrrophotometers (Ultrospec 3100 pro, UV/visible , Amersham Biosciences Europe) sichtbar gemacht und mit einer Software für densitometrische Auswertung (SigmaGel, Jandel Scientific Corp., Erkrath) quantifiziert.

2.2.6. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. In vielen Geltypen ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines DNA-Fragments bis zu einer gewissen Grenze umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Zur Auftrennung der Genfragmente wurden Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung eines 1 %igen (w/v) Agarosegels wurden für die Mini-Gelkammer 0,5 g Agarose mit 50 ml 1 X TAE-Laufpuffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 0,5 µl Ethidiumbromid (Gibco, Eggenstein) versetzt. Nach Polymerisierung wurde das Gel mit 1 X TAE-Puffer bedeckt und die mit 10 X DNA-Ladepuffer (1:10) versetzten Proben aufgetragen. Die Probenauftrennung erfolgte bei 5 V/cm für ca. 30 Minuten. Die PCR-Produkte wurden abschließend mittels Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) unter UV-Licht detektiert.

2.2.7. Real Time-PCR mittels Micro Fluidic Card System

Das ABI Prism[®] 7900HT Sequence Detection System ermöglicht in Kombination mit dem Micro Fluidic Card System (Applied Biosystems, Darmstadt) die Erstellung chronologisch gemessener Daten während einer quantitativen Real Time-PCR, indem es die durch die PCR-Reaktionen entstandenen Fluoreszenzen jedes einzelnen PCR-Zyklus erfasst. Eine Micro Fluidic Card (384 Well-Platte) kann bis zu acht cDNA-Proben in einem Real Time-PCR-Experiment auswerten. In dieser Arbeit wurde eine Micro Fluidic Card eingesetzt, mit der jeweils 47 Gene bei vier Probanden in Replikaten analysiert werden konnten. Von den 47 Genen ist GAPDH als *housekeeping* Gen für die quantitative Normalisierung gewählt worden. Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse verwendet das System die vergleichende C_T-Methode.

Die PCR-Reaktionen nutzen die 5'-Nukleaseaktivität der AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, um eine TaqMan[®]-Probe zu amplifizieren. Die TaqMan[®]-Probe beinhaltet am 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende ein die Fluoreszenz-Entstehung hemmendes Molekül (*Quencher*). Während der Amplifizierung der Probe werden die beiden Farbstoffe räumlich getrennt, indem am 5'-Ende der TaqMan[®]-Probe der Reporterfarbstoff abgetrennt wird. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Reportermoleküls. Der Fluoreszenzanstieg des Reporterfarbstoffes ist proportional zur Akkumulation der PCR-Produkte und kann somit detektiert werden (Abb. VI).

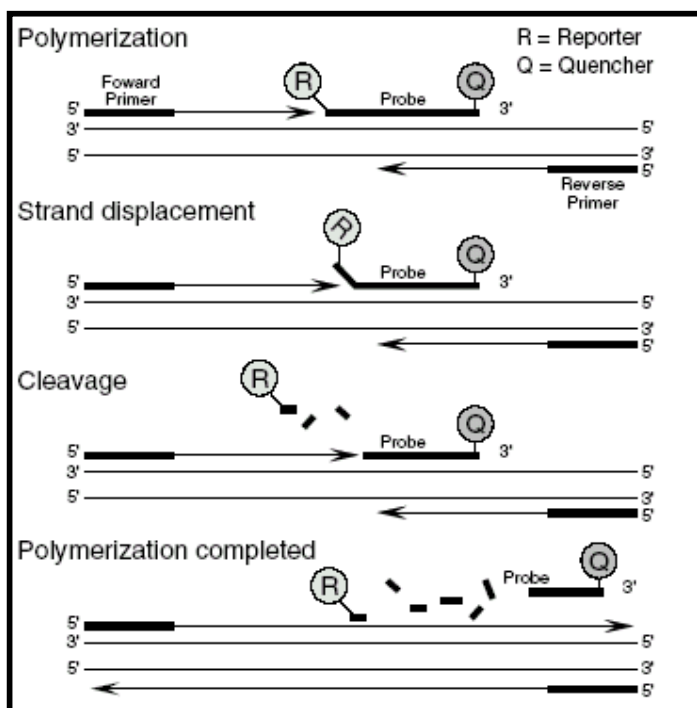


Abbildung VI: 5'-Nukleaseaktivität der AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (ABI PRISM[®] 7900 HT User Guide, Applied Biosystems, 2003)

Zur Ermittlung der Menge cDNA, die für die Untersuchungen eingesetzt wurde, wurde eine Micro Fluidic Card mit unterschiedlichen Konzentrationen cDNA erstellt. Ab einer Menge von 17,5 µl cDNA konnten alle Gene erfolgreich amplifiziert werden.

Als erstes wurde ein probenspezifischer PCR-Mix angesetzt, dessen Zusammensetzung in Tabelle VI angegeben ist.

Tabelle VI: Zusammensetzung des PCR-Mixes

Komponente	Volumen pro Probe (μ l)
cDNA-Probe	17,5
RNase/DNase-freies Wasser	32,5
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2X)	50
Gesamt	100

Der TaqMan[®] Universal Mastermix lag in zweifacher Konzentration vor und enthielt eine AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, AmpErase[®] UNG, dNTPs mit dUTP und optimierte Pufferkomponenten, die jedoch vom Hersteller nicht bekannt gegeben wurden. Uracil-*N*-Glykosylase (UNG) und Desoxyuridintriphosphat (dUTP) ermöglichen einen selektiven enzymatischen Verdau potentiell kontaminierender dUTP-haltiger Amplifikate.

Nachdem der proben-spezifische PCR-Mix angesetzt worden ist, wurde dieser in die Micro Fluidic Card pipettiert. Pro Karte wurden Proben von vier Probanden analysiert, mit denen jeweils zwei Ports befüllt wurden. Damit sich der PCR-Mix in die einzelnen Wells verteilen konnte, wurde die Karte anschließend zwei Mal für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert (Multifuge 3s, Heraeus[®]). Abschließend wurde die Karte versiegelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System Software (SDS 2.1 Software).

Eine Darstellung der durchgeführten Real Time-PCR findet sich in Tabelle VII.

Tabelle VII: Ablauf der Real Time-PCR

Temp. [°C]	Prozess	Zeit [Min.]	Zyklusanzahl
50	Aktivierung der AmpErase UNG	2	
94,5	Aktivierung AmpliTaq Gold DNA Polymerase	10	
97	Verschmelzung	0,5	} 50
59,7	Annealen, Erweiterung	1	

In Tabelle VIII sind die in dieser Arbeit untersuchten Gene aufgelistet. Mittels des Micro Fluidic Card Systems wurden 46 Zielgene und das *housekeeping* Gen GAPDH analysiert.

Tabelle VIII: Auflistung der in der Studie untersuchten Gene. TLR = Toll-like Rezeptor; NOD = Nukleotid-bindende- und Oligomerisierungsdomäne; CARD = Caspase-rekrutierende Domäne; NALP = Nacht-, LRR-, and PYD-containing protein;

NR.	Name	Gruppe
1	TLR1	TLR-Familie
2	TLR2	
3	TLR3	
4	TLR4	
5	TLR5	
6	TLR6	
7	TLR7	
8	TLR8	
9	TLR9	
10	TLR10	
11	NOD1/CARD4	NOD-Familie
12	NOD2/ CARD15	
13	NOD3	
14	NOD5	
15	NOD6	
16	NOD8	
17	NOD9	
18	NOD12	
19	NOD14	
20	NOD16	
21	NOD17	
22	NOD27	
23	NALP2	
24	NALP3/ Cryopyrin	
25	NALP4	
26	NALP5	
27	NALP6	
28	NALP12	
29	CARD12/Ipaf	
30	NALP1/DEFCAP/ CARD7	
31	APAF 1	Funktionell assoziierte Gene
32	Bcl10	
33	CARD8/TUCAN	
34	MyD88	
35	CD14	
36	MD2	
37	SIGIRR	
38	TIRAP	
39	TRIF/TICAM	
40	SARM	
41	TOLLIP	
42	ASC	
43	ICEBERG	
44	COP/ pseudo-ICE	
45	RIP2	
46	HpepT1/ SLC15A1	

2.3. Statistische Auswertung

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte durch die vergleichende C_T -Methode. Bei der vergleichenden C_T -Methode wird die Quantität eines Zielgenes zunächst an dem *housekeeping* Gen GAPDH normalisiert und dann in Relation zu einer kalibrierten Probe gemessen, die bei der gesamten Messung die 1x-Probe darstellt. Alle Quantitäten der anderen Proben werden als das N-fache dieser Kalibrierung ermittelt. Die Formel für diese Berechnungen lautet:

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

ΔC_T ergibt sich aus der Differenz der Zyklenzahlen (C_T) des Zielgenes und GAPDH.

Tabelle IX: Beispielrechnung für die vergleichende Ct-Methode

Probanden- gruppe	APAF1 C_T	GAPDH C_T	ΔC_T (APAF1-GAPDH)	$\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_{T, >90\text{Jahre}}$)	Ratio APAF1 rel. >90 Jahre ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
>90 Jahre	33,3868405	26,6223885	6,764452	0,00	1,0
30-49 Jahre	30,690171	25,67541	5,014761	-1,749691	3,36

Im ersten Schritt wird bei jedem einzelnen Probanden ΔC_T für jedes Gen berechnet. Anschließend wird pro Gen der Median aus den einzelnen ΔC_T – Werten ermittelt. $\Delta\Delta C_T$ ergibt sich dann aus den Differenzen der Mediane.

Für die Überprüfung der errechneten Daten hinsichtlich ihrer Signifikanz wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Als statistisch signifikant galt vereinbarungsgemäß ein errechneter Wert, wenn galt: $p \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Konzentrationsmessung der RNA

Die Konzentrationsmessung der isolierten Probanden-RNA wurde mit einem Spectrophotometer (Kapitel 2.2.2) durchgeführt.

Zur Ermittlung der Gesamtmenge RNA wurde die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen multipliziert (Tab. X). Alle RNA-Extraktionen lieferten eine RNA-Menge von 0,5 µg bis 10 µg.

Tabelle X: Beispielrechnung zur Ermittlung der RNA-Gesamtmenge einer Probe

Probe	260 nm	280 nm	Ratio	Konz. (µg/ml)	Gesamtmenge (µg)
18a	0,436	0,221	1,98	174,4	6,976
18b	0,373	0,189	1,97	149,2	5,968
18c	0,374	0,190	1,97	149,6	5,984
18d	0,352	0,183	1,93	140,8	5,632

3.2. RT-PCR

3.2.1. Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen mittels RT-PCR

Um die isolierte RNA der Probanden hinsichtlich ihrer Reinheit zu überprüfen, wurde eine RT-PCR (Kapitel 2.2.1.) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hierzu eine aus einer humanen Zelllinie generierte cDNA. Sind bei den RNA-Proben keine GAPDH-Banden nachweisbar, deutet dies darauf hin, dass die Proben frei von DNA-Kontaminationen sind. In Abbildung VII ist eine derartige RT-PCR mit den RNA-Proben von den Probanden 3 (a-d) und 5 (a-d) exemplarisch dargestellt.

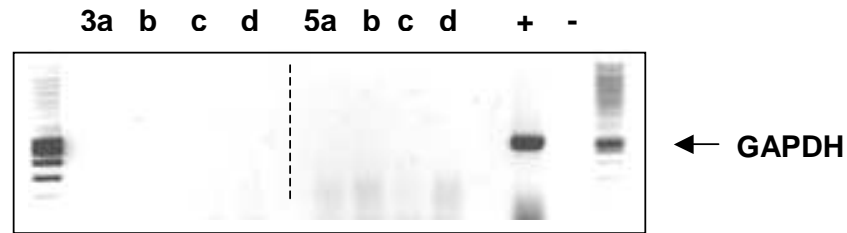


Abbildung VII: Test-PCR mit RNA. 1%-iges Agarosegel (100ml) mit 1 μ l Ethidiumbromid; beladen mit jeweils 20 μ l RNA-Probe pro Geltasche; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle

Anhand einer Positiv(+)- und einer Negativ(-)kontrolle wurde die Test-PCR hinsichtlich ihrer Funktionalität überprüft. Die Positivkontrolle enthielt eine cDNA einer humanen Zelllinie, während die Negativkontrolle als anstatt eines DNA-Templates lediglich PCR-H₂O enthielt.

Keine der hier benutzten RNA-Proben zeigte eine Bande, die auf GAPDH bzw. auf eine Kontamination mit genomischer DNA hätte hinweisen können.

3.1.2. Test-PCR mit cDNA-Proben

An die Reverse Transkription anknüpfend erfolgte die Überprüfung der entstandenen cDNA hinsichtlich ihrer Funktionalität mittels einer RT-PCR (Kapitel 2.2.5). Als *housekeeping* Gen wurde GAPDH verwendet. Wie in Abbildung VIII zu sehen ist, deuten Banden bei 1000 bp auf eine erfolgreiche cDNA-Synthese hin.

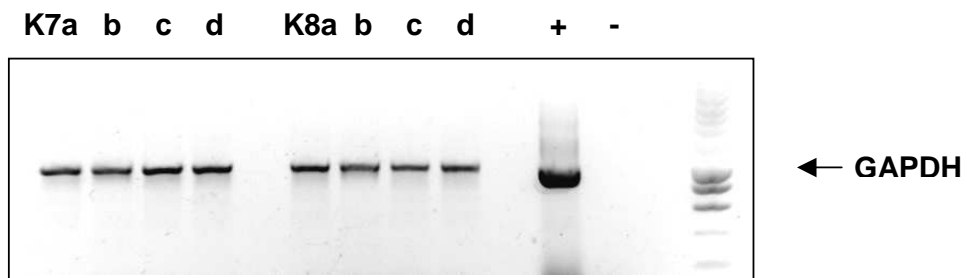


Abbildung VIII: Test-PCR mit cDNA. 1%-iges Agarosegel (100 ml) mit 1 μ l Ethidiumbromid; beladen mit jeweils 20 μ l cDNA-Probe pro Geltasche; + = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle

K7a-d und K8a-d sind Probanden-cDNAs. Zur Kontrolle der Test-PCR wurden Positiv- und Negativkontrollen verwendet.

3.3. Auswertung der Ergebnisse der Low Density Arrays

Der Auswertung der Daten der Real Time-PCR-Experimente liegt die vergleichende Methode der C_T -Methode (Kap. 2.3.) zugrunde. Um die Ergebnisse der einzelnen Probandengruppen miteinander in Bezug setzen zu können, werden folgende Gegenüberstellungen der Daten verwendet:

1. Ratio der über 90-Jährigen versus 30- bis 49-Jährige (= Ratio₁)
2. Ratio der über 90-Jährigen versus 50- bis 70-Jährige (= Ratio₂)
3. Ratio der 50- bis 70-Jährigen versus 30- bis 49-Jährige (= Ratio₃).

Eine Ratio kleiner als eins steht für eine Herunterregulation eines Genes in Bezug auf die erstgenannte Gruppe, während eine Ratio größer als eins für eine Hochregulation steht. Für die Auswertung wurden Genexpressionsdaten mit einer Ratio größer als 1,5 oder kleiner als 0,66 als deutliche Veränderungen zwischen zwei verglichenen Gruppen eingestuft, die näher diskutiert werden sollen. Genexpressionsänderungen mit Werten zwischen diesen Grenzen wurden zunächst vernachlässigt. Starke Veränderungen, die ebenfalls als statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) gelten, werden durch ein Sternchen markiert.

Die Ergebnisse jeder Gengruppe (TLRs, NOD-Proteine, funktionell assoziierte Gene) werden zunächst insgesamt betrachtet, um dann in einer geschlechtsspezifischen Analyse der Daten überprüfen zu können, ob zwischen den Geschlechtern Unterschiede in den Genexpressionsleveln vorherrschen.

3.3.1. Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie

In Abbildung IX werden die Ratios der TLR-Familie aller Probanden dargestellt.

Mittels des Mann-Whitney U-Testes wurden signifikante Daten bei TLR1 und TLR9 in den ersten beiden Gegenüberstellungen und bei TLR7 und TLR10 lediglich in der ersten Gegenüberstellung ermittelt. Nicht signifikant in allen drei Vergleichen sind die Daten von TLR2, TLR4-6 und TLR8.

Allgemein lässt sich anhand von Abbildung VIII ein Trend zur Herunterregulierung (entsprechend einer Ratio < 1) aller TLRs im Alter erkennen. Eine starke

signifikante Herunterregulierung im hohen Alter weisen TLR1 (Ratio₁ = 0,45), TLR3 (Ratio₁ = 0,47 und Ratio₂ = 0,58), TLR9 (Ratio₁ = 0,53 und Ratio₂ = 0,55) und TLR10 (Ratio₁ = 0,61) auf.

TLR3 konnte bei elf von 55 Probanden während des gesamten Experimentes nicht amplifiziert werden.

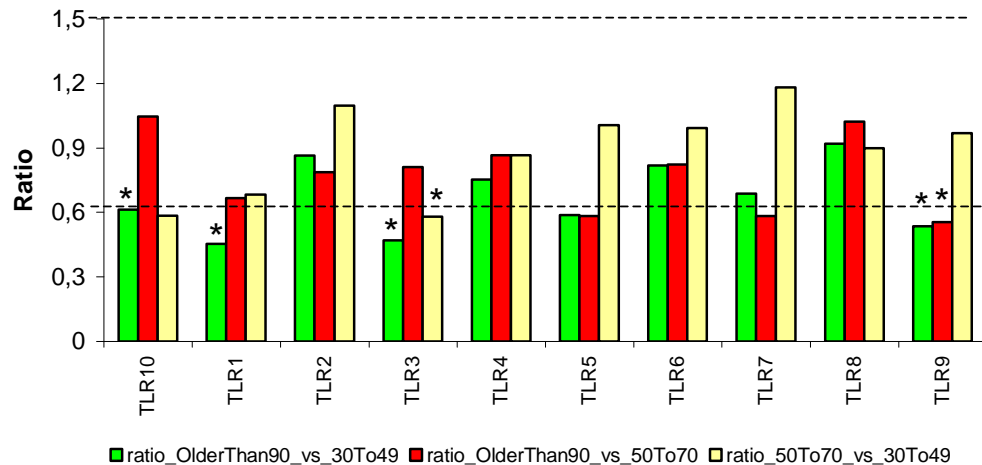


Abbildung IX: Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

3.3.1.1. Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie bei weiblichen Probanden

Die Berechnungen des Mann-Whitney U-Testes ergaben für die Werte von TLR1 und TLR10 bei den über 90-Jährigen gegenüber den 30- bis 49-Jährigen sowie gegenüber den 50- bis 70-jährigen Frauen signifikante Ergebnisse. Die Werte von TLR9 sind in allen drei Gegenüberstellungen signifikant. Die Daten aller weiteren TLRs bei weiblichen Probanden sind statistisch nicht signifikant.

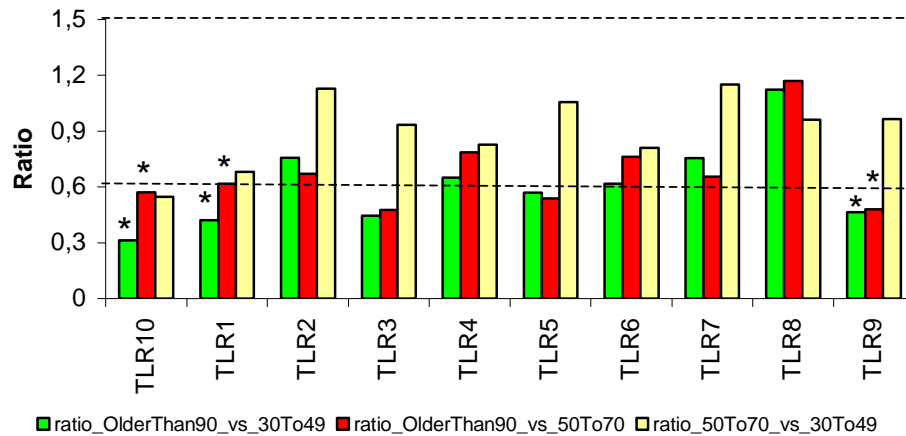


Abbildung X: Ratios der TLR-Familie bei weiblichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

TLR1 und TLR10 weisen in allen Altersvergleichen eine Herunterregulierung auf, wobei jedoch lediglich die Gegenüberstellung der langlebigen gegenüber den 30- bis 49-jährigen und den 50- bis 70-jährigen Probanden eine starke signifikante ($\text{Ratio} < 0,66$ und $p \leq 0,05$) Abnahme der TLR1- und TLR10-Expression aufzeigt. Die Ratios der Gegenüberstellungen der über 90-Jährigen versus 30- bis 49-Jährige und der über 90-Jährigen versus den 50- bis 70-Jährigen bei TLR9 fallen unter die 0,66-Grenze und können somit als eine signifikante ($p \leq 0,05$) Herunterregulierung der TLR9-Expression im Alter angesehen werden. Bei den 50- bis 70-Jährigen im Vergleich zu den 30- bis 49-Jährigen lässt sich kaum eine Veränderung der TLR9-Expression erkennen.

3.3.1.2. Ratios der Toll-like Rezeptorfamilie bei männlichen Probanden

Die Berechnungen im Zuge des Mann-Whitney U-Testes ergaben, dass das Ergebnis für TLR7 in der Gegenüberstellung der über 90-Jährigen versus den 30- bis 49-Jährigen (= Ratio_1) signifikant ist. Die weiteren Daten der TLRs bei den männlichen Probanden sind statistisch nicht signifikant. Dieses Ergebnis hängt mit der Tatsache zusammen, dass die männlichen Probandengruppen lediglich aus fünf bis sechs Personen pro Gruppe bestehen.

Allgemein lässt sich anhand der Abbildung XI bei Männern ein Trend zur Herunterregulierung aller TLRs im hohen Alter erkennen. Am stärksten herunterreguliert werden TLR1, TLR7 und TLR9.

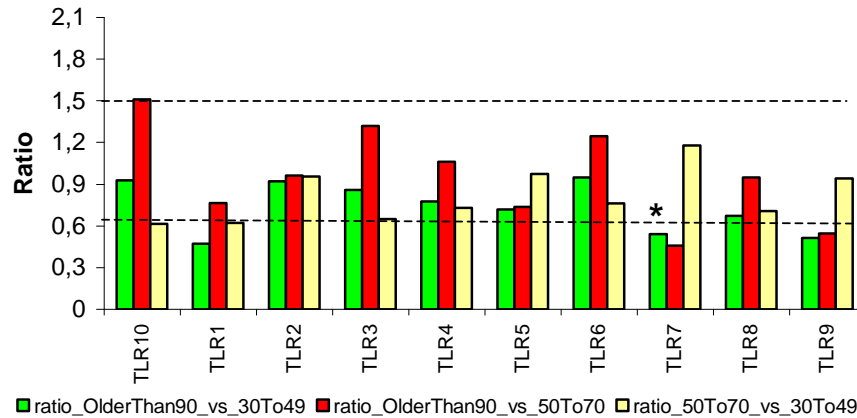


Abbildung XI: Ratios der TLR-Familie bei männlichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

3.3.2. Ratios der NOD-Proteinfamilie

Die Ratios der NOD-Proteinfamilie aller Probanden werden in Abbildung XII dargestellt. Die vereinbarten Grenzen der Ratios bei 1,5 und 0,66 sind hier jeweils durch eine gestrichelte Linie wiedergegeben.

Mittels des Mann-Whitney U-Testes sind die Ratios aller drei Gegenüberstellungen bei APAF1, BCL10, CARD4, CARD8, NOD3, NOD9 und PYCARD/ASC statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Die Ergebnisse von CARD12 und NALP12 ergaben eine Signifikanz für die Gegenüberstellung der über 90-Jährigen versus den 30- bis 49-Jährigen (= Ratio₁). Die Daten von CARD15, NALP1 und NALP2 sind statistisch nicht signifikant.

NALP11 erfährt mit einer Ratio von 1,83 (>90-Jährige vs. 30-49-Jährige) und 1,56 (>90-Jährige vs. 50-70-Jährige) während des Alterns eine deutliche Hochregulierung. Die Ratio der 50- bis 70-Jährigen versus der 30- bis 49-Jährigen kann mit einem Wert von 1,17 vernachlässigt werden.

Eine starke und statistisch signifikante Herunterregulierung mehrerer Gene in der Gruppe der Langlebigen wurde ermittelt. APAF1, BCL10, CARD4, CARD8, NALP3, NALP14, NALP4, NALP6, NOD3 sowie NOD9 liegen unterhalb der 0,66

Ratio-Grenze, wobei NALP14 mit einer Ratio von 0,23 (>90-Jährige vs. 30-49-Jährige) und 0,18 (>90-Jährige vs. 50-70-Jährige) die geringsten Werte aufweist. In der Gruppe der 50- bis 70-Jährigen versus den 30- bis 49-Jährigen erfährt NALP14 jedoch eine Hochregulierung mit einer Ratio von 1,33.

NALP5 und NALP13 konnten während des gesamten Experimentes nicht amplifiziert werden. Von insgesamt 55 Probanden/Probandinnen konnten NALP8 und NALP9 jeweils einmal, NALP10 dreimal, NALP14 fünfmal, NALP11 achtmal und NALP4 achtzehnmal amplifiziert werden. Diese Gene ergaben keine Ergebnisse im Statistiktest.

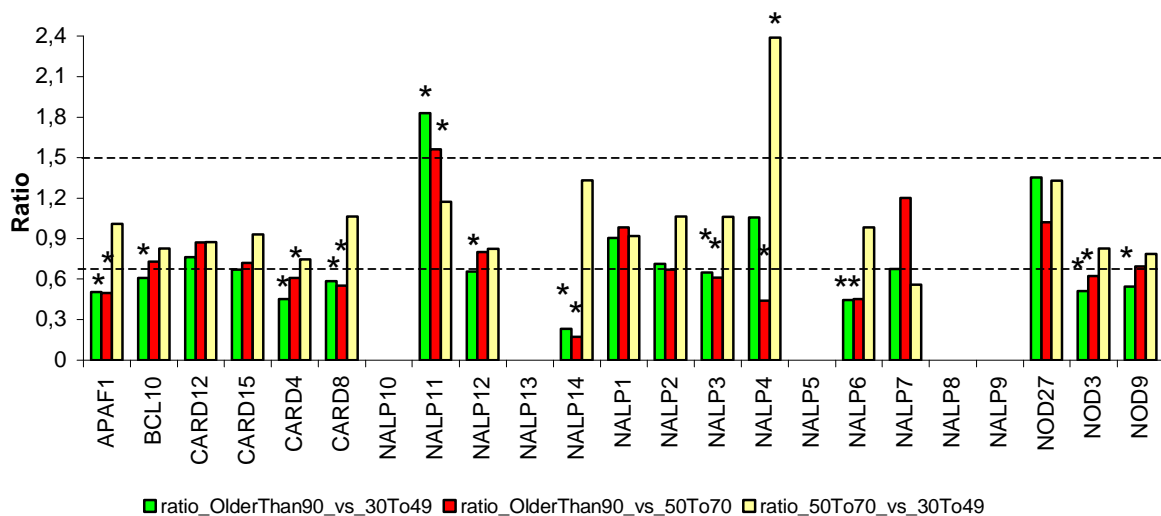


Abbildung XII: Ratios der NOD-Proteinfamilie. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

3.3.2.1. Ratios der NOD-Proteinfamilie bei weiblichen Probanden

Die Daten von APAF1, BCL10, CARD4, CARD8, NALP6, NOD3, NOD9 und PYCARD sind in allen drei Vergleichen signifikant, während die Ergebnisse von CARD12, CARD15, NALP1, NALP2 und NALP12 statistisch nicht signifikant sind. Die Signifikanz konnte bei NALP4, NALP5, NALP7-9, NALP10, NALP11, NALP13, NALP14 und NOD27 aufgrund der geringen Amplifizierung nicht berechnet werden.

Bei den 39 weiblichen Probanden wurden NALP8 bis 10 jeweils einmal, NALP14 viermal, NALP11 achtmal, NALP 4 fünfzehnmal und NOD27 29mal amplifiziert.

Wie schon in der obigen Gesamtbetrachtung (Männer und Frauen zusammen) lässt sich anhand der 1,5-Ratiogrenze bei NALP11 ($\text{Ratio}_1=1,83$; $\text{Ratio}_2=1,56$) eine Hochregulierung im hohen Alter beobachten.

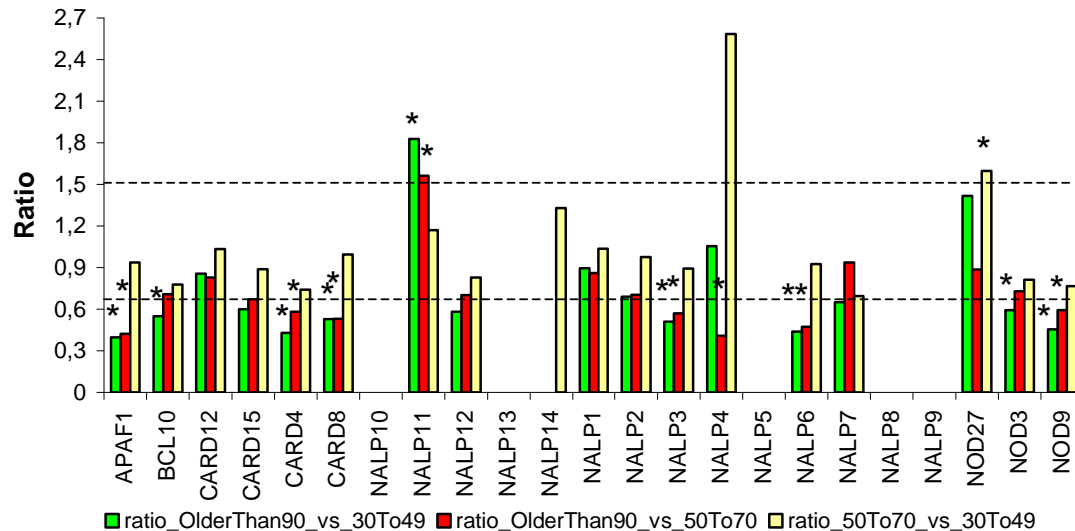


Abbildung XIII: Ratios der NOD-Proteinfamilie bei weiblichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

In den Gegenüberstellungen 1 und 2 werden APAF1 ($\text{Ratio}_1=0,39$; $\text{Ratio}_2=0,42$), CARD4 ($\text{Ratio}_1=0,42$; $\text{Ratio}_2=0,58$), CARD8 ($\text{Ratio}_1=0,53$; $\text{Ratio}_2=0,53$), NALP3 ($\text{Ratio}_1=0,51$; $\text{Ratio}_2=0,57$), NALP6 ($\text{Ratio}_1=0,43$; $\text{Ratio}_2=0,47$) und NOD 9 ($\text{Ratio}_1=0,45$; $\text{Ratio}_2=0,59$) stark herunterreguliert (entsprechend einer Ratio kleiner als 0,66). Ebenfalls für eine deutliche Herunterregulation im hohen Alter sprechen die Daten von BCL10 ($\text{Ratio}_1=0,55$), NALP4 ($\text{Ratio}_2=0,40$) und NOD3 ($\text{Ratio}_1=0,59$).

3.3.2.2. Ratios der NOD-Proteinfamilie bei männlichen Probanden

In Abbildung XIV sind die einzelnen Ratios der NOD-Proteinfamilie aller männlichen Probanden in den obenaufgeführten Gegenüberstellungen dargestellt.

Der statistische Signifikanztest ergab lediglich für drei Daten einen Wert $p \leq 0,05$. Als statistisch signifikant gelten CARD4, CARD8 und NOD3 in der Gegenüberstellung der über 90-Jährigen versus den 30- bis 49-Jährigen (= Ratio_1).

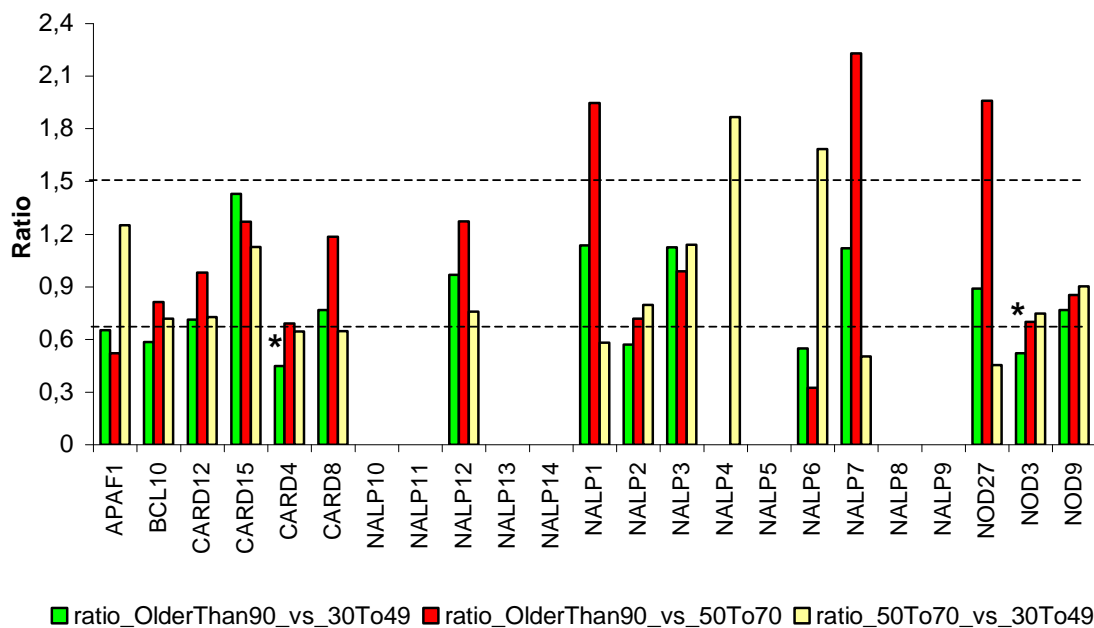


Abbildung XIV: Ratios der NOD-Proteinfamilie bei männlichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

Eine deutliche Hochregulierung ($\text{Ratio} > 1,5$) bei langlebigen männlichen Probanden (versus 50- bis 70-Jährigen) erfahren NALP1 ($\text{Ratio}_2 = 1,94$), NALP7 ($\text{Ratio}_2 = 2,22$) und NOD27 ($\text{Ratio}_2 = 1,95$). Mittels des Mann-Whitney U-Testes wurden diese drei Gene als nicht signifikant ermittelt. Die Ratio von NALP1 könnte trotz des Signifikanzwertes von $p = 0,09$ für eine starke Hochregulierung stehen, da die männliche Probandengruppe zu klein für eine eindeutige Signifikanzberechnung ist.

Eine deutliche Herunterregulierung, statistisch jedoch nicht signifikant, erfährt NALP6 ($\text{Ratio}_1 = 0,54$; $\text{Ratio}_2 = 0,32$) bei den langlebigen Probanden.

Die signifikanten Daten von CARD4 ($\text{Ratio}_1 = 0,44$) und NOD3 ($\text{Ratio}_1 = 0,52$) deuten darauf hin, dass diese Gene im hohen Alter ebenfalls stark herunterreguliert werden.

Bei den insgesamt 16 männlichen Probanden konnten NALP5, NALP8, NALP9, NALP11 und NALP13 nicht amplifiziert werden. Ebenfalls selten amplifiziert wurden NALP14 (1x), NALP10 (2x), NALP4 (3x) und NOD27 (11x).

3.3.3. Ratios der funktionell assoziierten Gene

In Abbildung XV werden mit den TLRs und NOD-Proteinen funktionell assoziierte Gene und deren Ratios in den in Kapitel 3.3. erläuterten Gegenüberstellungen der Probandengruppen aufgeführt.

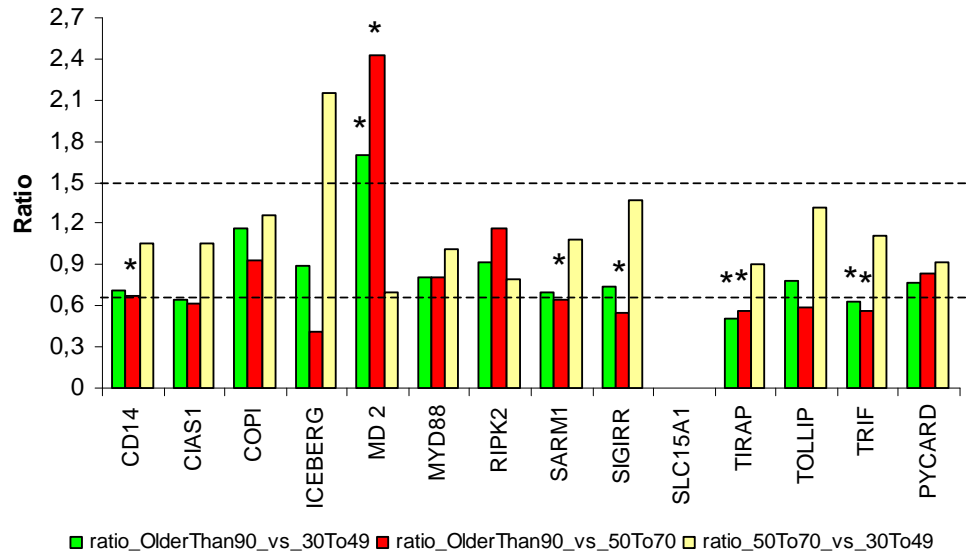


Abbildung XV: Ratios der funktionell assoziierten Gene. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

Statistisch signifikant in allen drei Vergleichen sind die Ergebnisse von MD2, SIGIRR, TIRAP, TRIF und PYCARD, während die Daten von CD14, MyD88 und SARM1 lediglich in den Vergleichen der Langlebigen versus den 30- bis 49-Jährigen und versus den 50- bis 70-Jährigen signifikant sind. Die Expressionsveränderungen von COP/pseudo-ICE, RIP2 und TOLLIP wurden in allen drei Gegenüberstellungen als statistisch nicht signifikant ermittelt.

MD2 zeigt bei den langlebigen Probanden eine deutliche Hochregulierung ($\text{Ratio}_1=1,70$; $\text{Ratio}_2=2,42$) auf, während es bei den 50- bis 70-Jährigen gegenüber den 30- bis 49-Jährigen eine starke Herunterregulierung von 30% erfährt.

ICEBERG wird in der Gegenüberstellung der langlebigen Probanden gegenüber den 50-70-jährigen Probanden stark herunterreguliert ($\text{Ratio}_2=0,41$), während es im Vergleich der 50 bis 70-Jährigen versus den 30 bis 49-Jährigen stark hochreguliert ($\text{Ratio}_3=2,14$) wird.

TIRAP ($\text{Ratio}_1=0,50$; $\text{Ratio}_2=0,56$) und TRIF ($\text{Ratio}_1=0,62$; $\text{Ratio}_2=0,56$) werden bei den Langlebigen in den ersten beiden Gegenüberstellungen stark herunterreguliert, während CD14 ($\text{Ratio}_2=0,67$), SIGIRR ($\text{Ratio}_2=0,54$) und SARM1 ($\text{Ratio}_2=0,63$) lediglich im Vergleich der über 90-Jährigen versus den 50- bis 70-Jährigen herunterreguliert werden.

Der Nahrungstransporter HpepT1 (hier SLC15A1) konnte lediglich bei zwei von 55 Probanden und ICEBERG bei 24 von 55 Probanden amplifiziert werden.

3.3.3.1. Ratios der funktionell assoziierten Gene bei weiblichen Probanden

Als statistisch signifikant wurden mittels des Mann-Whitney U-Testes alle drei Ratios nachstehender Gene ermittelt:

- CD14
- CIAS1
- ICEBERG
- MyD88
- SIGIRR
- TIRAP
- TRIF

MD2 wurde lediglich in der 2. Gegenüberstellung als nicht signifikant bezeichnet.

In Abbildung XVI ist eine starke Hochregulierung von MD2 im Alter zu erkennen. MD2 ist bei den über 90-Jährigen versus den 30- bis 49-Jährigen um 77% ($\text{Ratio}_1=1,77$) und gegenüber den 50- bis 70-Jährigen um 176% ($\text{Ratio}_2=2,76$; dieser Wert ist statistisch jedoch nicht signifikant) höher reguliert. Bei den 50- bis 70-Jährigen gegenüber den 30- bis 49-Jährigen ist MD2 um ca. 35% ($\text{Ratio}_3=0,64$) stark herunterreguliert.

CD14 ($\text{Ratio}_1=0,59$; $\text{Ratio}_2=0,64$), ICEBERG ($\text{Ratio}_1=0,37$; $\text{Ratio}_2=0,49$), SIGIRR ($\text{Ratio}_1=0,63$; $\text{Ratio}_2=0,58$), TIRAP ($\text{Ratio}_1=0,44$; $\text{Ratio}_2=0,50$) und TRIF ($\text{Ratio}_1=0,63$; $\text{Ratio}_2=0,50$) zeigen in den ersten beiden Gegenüberstellungen eine auffällig verminderte Expression im Alter auf.

ICEBERG konnte lediglich bei 17 weiblichen Probanden amplifiziert werden.

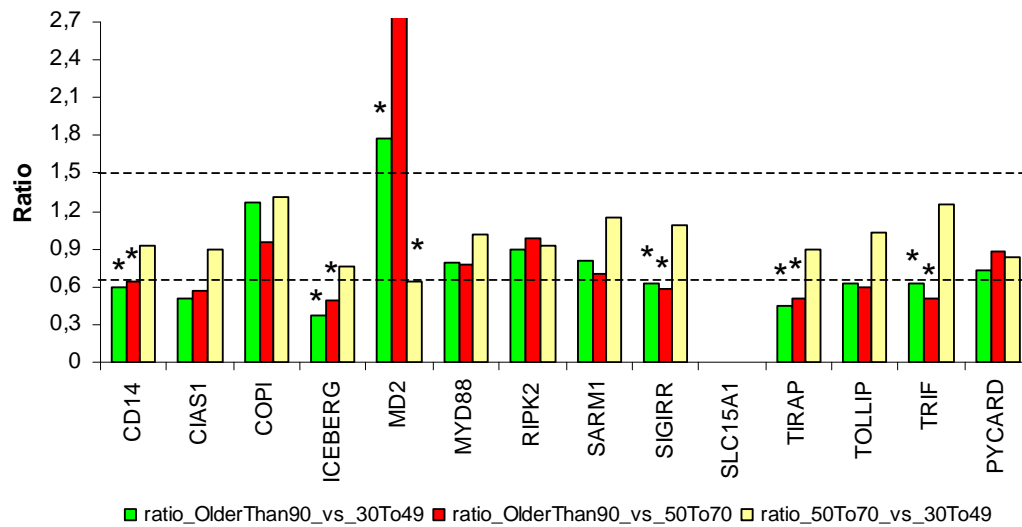


Abbildung XVI: Ratios der funktionell assoziierten Gene bei weiblichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

3.3.3.2. Ratios der funktionell assoziierten Gene bei männlichen Probanden

Die Daten aller drei Gegenüberstellungen sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Obwohl statistisch nicht signifikant, weist ICEBERG eine starke Herunterregulierung im Alter auf. Im Vergleich der über 90-Jährigen mit den 30- bis 49-Jährigen wird ICEBERG um 70% und mit den 50- bis 70-Jährigen um ca. 91% herunterreguliert. Werden die 50- bis 70-jährigen Probanden jedoch mit den 30- bis 49-Jährigen in Bezug gesetzt, so wird ICEBERG um ca. 250% hochreguliert.

Weitere höhere Expressionslevel im höheren Alter, die statistisch jedoch als nicht signifikant gelten, wurden bei LY96/MD2 und RIPK2 beobachtet. MD2 wird in den Gegenüberstellungen eins und zwei ($\text{Ratio}_1 = 1,62$; $\text{Ratio}_2 = 1,77$) und RIPK2 nur im Vergleich der langlebigen Probanden mit den 50- bis 70-Jährigen ($\text{Ratio} = 1,62$) hochreguliert.

Der Oligopeptidtransporter SLC15A1 (HpepT1) wurde lediglich einmal und ICEBERG siebenmal bei den männlichen Probanden amplifiziert.

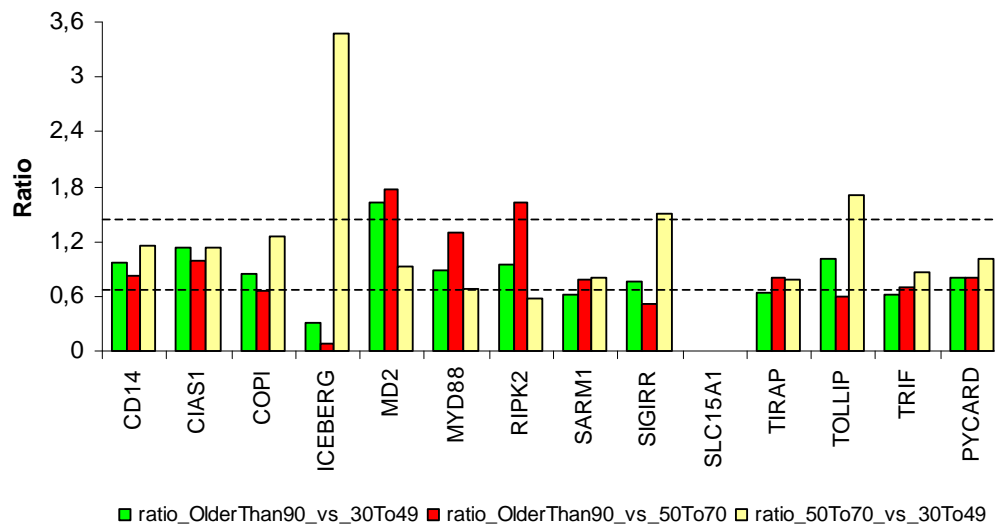


Abbildung XVII: Ratios der funktionell assoziierten Gene bei männlichen Probanden. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

3.3.4. Gene mit besonders starker Expressionsveränderung

Die in Kapitel 3.3. dargestellten Ergebnisse zeigen bei den Genen MD2, ICEBERG und NALP11 besonders starke Hoch- oder Herunterregulierungen der Genexpressionen im hohen Alter auf. Um diese Veränderungen zu verdeutlichen, werden die Ergebnisse der gesamten und der geschlechtsspezifischen Analyse dieser drei Gene in diesem Kapitel gesondert dargestellt.

Eine deutlich signifikante Hochregulierung im hohen Alter erfährt MD2 bei den männlichen sowie bei den weiblichen Probanden (Abb. XVIII).

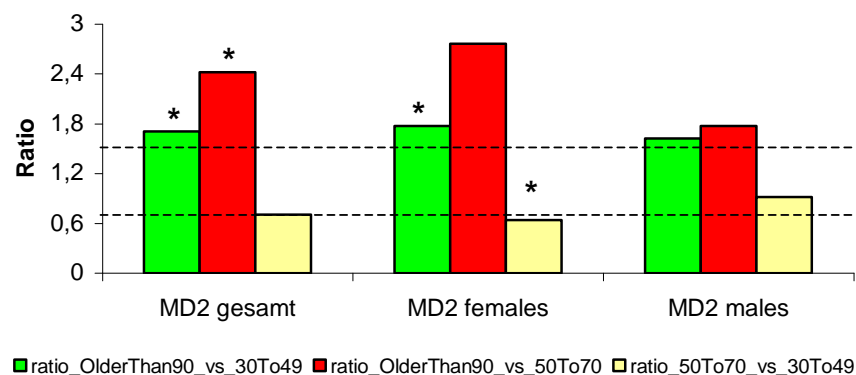


Abbildung XVIII: MD2 Expressionsveränderungen. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

Eine deutlich signifikante Herunterregulierung im hohen Alter wurde bei ICEBERG beobachtet (Abb. XIX).

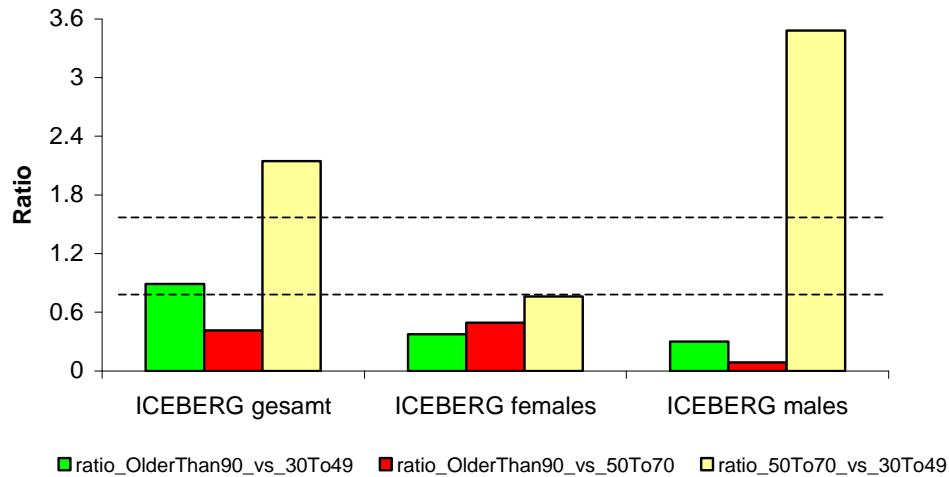


Abbildung XIX: Genexpressionsänderungen bei ICEBERG. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

Obwohl NALP11 bei den männlichen Probanden nicht amplifiziert wurde, zeigte es bei den weiblichen Probanden eine deutliche Hochregulierung der Genexpression bei den Langlebigen auf (Abb. XX)

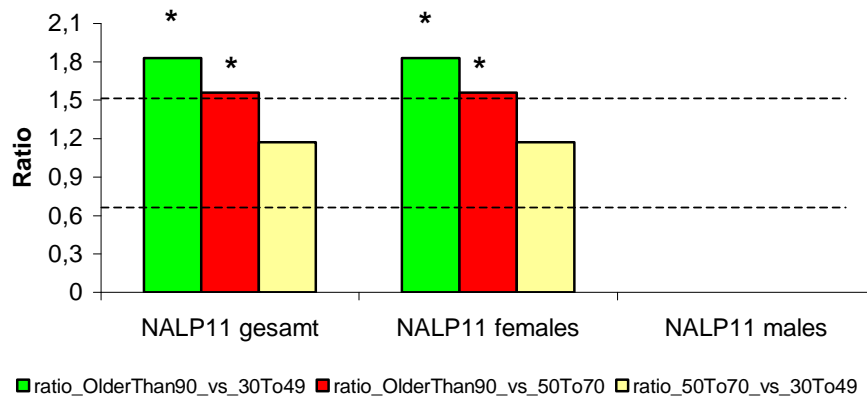


Abbildung XX: Genexpressionsänderungen bei NALP11. * = starke, signifikante Hoch- bzw. Herunterregulierung; --- = Ratio-Grenze; Signifikanzlevel $p \leq 0,05$

4. Diskussion

4.1. Zusammensetzung der Studiengruppen

In der vorliegenden Arbeit setzten sich die Gruppe der langlebigen Probanden und der 50- bis 70-jährigen Probanden aus 72,2 Prozent Frauen (entsprechend 13 Frauen) und 27,8 Prozent Männern (entsprechend 5 Männer) zusammen. Die Gruppe der 30- bis 49-Jährigen umfasste 66,7 Prozent Frauen (12 Frauen) und 33,3 Prozent Männer (6 Männer).

Vorangegangene Studien bewiesen, dass Frauen in Europa eine höhere Lebenserwartung als Männer haben (FERNANDEZ BALLESTEROS et al, 1999). Während Männer im Durchschnitt 73,7 Jahre alt werden, liegt die durchschnittliche Lebensdauer der Frauen bei 83,8 Jahren. Aufgrund dieser Tatsache setzen sich Probandengruppen in der Altersforschung erwartungsgemäß zu einem größeren Prozentsatz Frauen und einem kleineren Prozentsatz Männern zusammen, was durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden konnte.

Aufgrund der Tatsache, dass die Studiengruppen der männlichen Probanden lediglich fünf oder sechs Personen umfaßten, konnte in diesen Gruppen keine Signifikanzaussage getätigt werden. Für eine Signifikanzberechnung ist eine größere Anzahl von Personen notwendig. Somit ergaben die Berechnungen in den männlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

4.2. Herunterregulierung der Toll-like Rezeptor-Expression bei langlebigen Probanden

Die allgemeine Datenuntersuchung der Toll-like Rezeptoren bestärkte die schon in einigen vorangegangenen Studien belegte Herunterregulierung der TLRs im Alter. Bei den weiblichen sowie den männlichen Probanden war in der vorliegenden Arbeit bei TLR1, TLR3, TLR9 und TLR10 ein deutlicher Trend zur signifikanten Abnahme der Genexpression im hohen Alter zu erkennen.

RENSHAW et al. (2002) untersuchten junge (2-3 Monate alt) und alte (18-24 Monate alt) Mäuse hinsichtlich der Expressionslevel und Funktionen aller murinen TLRs, die auf Makrophagen lokalisiert worden sind. Alle TLRs der alten Mäuse zeigten

signifikant niedrigere Expressionslevel als die der jungen Mäuse. Weiterhin zeigte diese Studie, dass Makrophagen in der Milz und peritonealen (Bauchfell) Makrophagen (PECs) von alten Mäusen, die mit LPS stimuliert wurden, weniger TNF- α und IL-6 produzierten als die der jungen Mäuse. BOEHMER et al. (2004) konnten die verminderte Zytokinproduktion von PECs jedoch nicht die verminderten Expressionslevel von TLR4 bei alten Mäusen bestätigen. In einer weiteren Studie wurde die Abnahme der NF- κ B-Aktivierung durch TLR2 und TLR4 im hohen Alter bewiesen (BOEHMER et al., 2005).

FLYNN et al. (2003) beschrieben den Einfluss von Belastungstrainings und Hormonstatus auf die mRNA-Expression von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), CD14, IL-1 β , IL-6 und TNF- α bei älteren Frauen (65 bis 85 Jahre). TLR4- und CD14-Expressionen waren bei den trainierten Gruppen (alle trainierten Gruppen zusammengefasst) signifikant niedriger als bei der untrainierten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse belegen eine durch Belastungstraining induzierte Reduzierung der TLR4- und CD14-Expression bei älteren Frauen.

Die geschlechtsspezifische Ergebnisanalyse der Toll-like Rezeptorfamilie ergab Unterschiede in den Genexpressionen. TLR3 und TLR10 werden im hohen Alter bei Männern stärker exprimiert als bei Frauen, während TLR8 im Alter deutlich stärker bei Frauen exprimiert wurde. TLR3 und TLR10 waren bei den langlebigen Frauen signifikant herunterreguliert. Eine starke Herunterregulierung war ebenfalls bei TLR1 und TLR9 zu beobachten. Das pathogene Bakterium *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) wurde in die Top 10 der Todesursachen bei über 65-jährigen Personen eingestuft (BRADLEY et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache ist die Herunterregulierung der Expression von TLR1, TLR2 und TLR6, zu deren Liganden die Zellwandbestandteile von *S. aureus* gehören. Eine starke Herunterregulation von TLR1 könnte zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *S. aureus* führen.

Die vorliegenden Daten belegen eine Abnahme der Toll-like Rezeptor-Expression während des Alterungsprozesses. Werden TLRs im hohen Alter vermindert exprimiert, könnte dies unter anderem zu einer Beeinträchtigung der Pathogenerkennung und der Zellgewebsreparatur führen. Ältere Personen weisen hierdurch möglicherweise eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infekten auf. Im Zuge der Herunterregulierung der TLR-Expression könnte

sich ebenfalls die pro-inflammatorische Zytokinproduktion verringern, womit ein Ausbleiben grundlegender Anzeichen von Entzündungsprozessen wie Fieber einhergehen würde.

4.3. NOD-Proteinfamilie

NALPs sind zytoplasmatische Proteine, die innerhalb der CATERPILLER-Familie eine Subfamilie bilden. NALPs sind unter anderem in die Aktivierung der pro-inflammatorischen Caspasen und der Inflammasom-Bildung eingebunden.

Die Datenanalyse der vorliegenden Arbeit zeigte eine geschlechtsspezifische Herunterregulierung von NALP3 bei langlebigen Frauen. NALP3, auch unter den Synonymen *CIAS1* (*cold-induced autoinflammatory syndrome 1*) oder *PYPAF1* bekannt, wird in peripheren Blutleukozyten exprimiert und kodiert für das Protein Cryopyrin. Mutationen in dem *CIAS1*-Gen verursachen verschiedene auto-inflammatorische Erkrankungen wie das Muckle-Wells-Syndrom, ein chronisch neurologisches Haut- und Gelenksyndrom (*CINCA*, *chronic neurologic cutaneous and articular syndrome*; FELDMANN et al., 2002), das auch als *NOMID* (*neonatal onset multisystem inflammatory disease*; AKSENTIJEVICH et al., 2002) bekannt ist, und die familiäre Kälte-Urtikaria (ALBRECHT et al., 2003; DODÉ et al., 2002). Charakteristisch für diese Erkrankungen sind wiederkehrende Entzündungen, die mit Fieber, Hautausschlag und einer Arthritis einhergehen. DODÉ et al. (2002) konnten einen erheblichen Einfluß der NACHT-Domäne von *CIAS1* in die Entstehung des Muckle-Wells-Syndroms und der familiären Kälte-Urtikaria nachweisen. Verschiedene Studien konnten schon zuvor belegen, dass Mutationen der NACHT-Domäne in entzündliche Erkrankungen involviert sind (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001).

CIAS1/NALP3 bildet in Verbindung mit ASC, dem CARD-tragenden Protein CARDINAL und Caspase-1 das Inflammasom, welches eine erhöhte Prozessierung von Pro-IL-1 β zu IL-1 β induziert (MANJI et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen von Muckle-Wells Patienten bei einer Stimulation mit MDP (*muramyl dipeptide*) vermehrt aktives IL-1 β absondern (MARTINON et al., 2003). Ein Grund für diese erhöhte Aktivität könnte die verstärkte Inflammasom-Bildung durch *CIAS1*/NALP3-Mutationen in der NACHT-Domäne

sein, da ebenfalls die NACHT-Domäne für die Oligomerisierung der Proteine verantwortlich ist. Somit stellt die erhöhte Inflammasom-Aktivität die molekulare Basis für Symptome auto-inflammatorischer Erkrankungen dar, die durch Mutationen in CIAS1/NALP3 hervorgerufen werden (AGOSTINI et al., 2004).

O'CONNOR et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass die CIAS1/NALP3-Expression in humanen Monozyten durch eine Vielzahl pro-inflammatorischer Stimuli wie TNF- α und TLR-Liganden induziert wird. CIAS1 ist in Abwesenheit von ASC in der Lage, das Signalgeschehen von NF- κ B negativ zu regulieren und somit das Ausmaß entzündlichen Reaktionen zu beschränken (O'CONNOR et al., 2003). Zusammenfassend kann CIAS1/NALP3 in Verbindung mit ASC ein Inflammasom bilden und somit auto-inflammatorische Prozesse verstärken, während es ohne die Assoziation mit PYCARD/ASC diese Prozesse vermindern kann. Eine starke Herunterregulation von NALP3 im hohen Alter könnte dazu führen, dass inflammatorische Prozesse sowie Zytokinbildung vermindert initiiert werden und damit die physiologische Abwehrreaktion verringert wird.

NALP5, NALP8-10, NALP13 und NALP14 wurden weder bei den weiblichen noch bei männlichen Probanden amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde mRNA aus Vollblut isoliert, um die Genexpressionen zu untersuchen. Gene, die nicht amplifiziert werden konnten, sind womöglich in Zellgeweben lokalisiert und können somit nicht mittels Vollblut nachgewiesen werden. In vorangegangenen Studien konnte eine Expression von NALP5 in humanen Eizellen (TONG et al., 2002) und von NALP10 in nahezu allen Zellgeweben nachgewiesen werden. Hohe Level von NALP10 wurden besonders im Gehirn, im Herzen und in der Skelettmuskulatur beobachtet (WANG et al., 2004). Für NALP8, NALP9, NALP13 und NALP14 liegen zur Zeit noch keine Erkenntnisse über die Expressionen in Zellgeweben vor.

NALP11 hingegen wurde nur bei den Frauen amplifiziert und zeigte eine auffällig vermehrte Expression im hohen Alter auf. TSCHOPP et al. (2003) lokalisierten NALP11 auf Chromosom 19q13.42. Funktionen von NALP11 sind bisher noch unbekannt.

NALP4 konnte ebenfalls, außer bei drei Männern, nur bei den weiblichen Probanden amplifiziert werden. Die Funktionen von NALP4 sind ebenfalls noch ungeklärt.

Die Daten von CARD15, NALP1 und NALP7 deuten darauf hin, dass diese Gene bei Männern im hohen Alter stärker exprimiert werden als bei Frauen. Da CARD15 in der Lage ist, NF- κ B zu aktivieren und Apoptose einzuleiten und NALP1 in die Inflammation involviert ist (INOHARA & NUNEZ, 2003), könnte eine verminderte Expression dieser Gene bei sehr alten Frauen für eine verminderte Immunantwort auf Pathogene sprechen. Funktionen von NALP7 sind bisher noch unbekannt.

Die Analyse von NALP6 ergab, dass dieses Gen bei Männern und Frauen im hohen Alter gleichermaßen stark herunterreguliert wird. NALP6 ist neben NALP10 und NALP14 auf Chromosom 11p15 lokalisiert und aktiviert in Interaktion mit ASC NF- κ B und Pro-Caspase-1 (GRENIER et al., 2002). REIK & MAHER (1997) zeigten den Zusammenhang der Chromosomregion 11p15.5 und dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom, einer autosomal erblichen Erkrankung, die mit einer abnormen Größe von Körper oder Organen einhergeht, sowie einer Vielzahl von humanen Krebserkrankungen auf. Durch eine starke Herunterregulierung von NALP6 im hohen Alter werden Apoptose und NF- κ B-Aktivierung vermindert, was zu einer Anhäufung geschädigter Zellen und einer geringeren Immunantwort auf Pathogene führt.

CARD8 ist bei den langlebigen Frauen signifikant herunterreguliert. Eine Überexpression wurde bei vielen Krebserkrankungen beobachtet. Eine Überexpression von CARD8 induziert Apoptose (RAZMARA et al., 2002) und unterdrückt die durch Pro-Caspase-9/Cytochrom-C-induzierte Apoptose, in dem CARD8 an Pro-Caspase-9 bindet und durch Interaktion APAF-1 blockiert (PATHAN et al., 2001). Weiterhin aktiviert CARD8 NF- κ B (RAZMARA et al., 2002). Da eine Überexpression von CARD8 vornehmlich in Tumorgewebe vorzufinden ist, könnte eine niedrige Expression für gesundes Zellgewebe sprechen und somit ein Grund für die Langlebigkeit bei Frauen sein.

APAF1 stellt ein weiteres Gen in der CATERPILLER-Familie dar, dessen Genexpression im hohen Alter stark herunterreguliert wird. Besonders bei den weiblichen Probanden ist diese Veränderung zu beobachten. In einer Studie von KRAJEWSKA et al. (2005) konnte ein Zusammenhang zwischen niedrigen Expressionsleveln von APAF1 und Dickdarmkrebs hergestellt werden. So wurden in 28 Prozent der untersuchten Tumoren hohe Expressionslevel von CARD8 und

niedrige Level von APAF1 gefunden. Diese Gen-Kombination, die mit einer Hemmung des Apoptoseprozesses einhergeht, führte bei 63 Prozent der Patienten zum Tode (KRAJEWSKA et al., 2005).

4.4. Funktionell assoziierte Gene

Der Oligopeptid-Transporter HpepT1 konnte weder bei den weiblichen noch bei den männlichen Probanden amplifiziert werden.

CD14 und TIRAP werden bei langlebigen Frauen stärker herunterreguliert als bei langlebigen Männern. Die Herunterregulierung von CD14 durch Belastungstrainings bei älteren Frauen wurde in einer Studie von Flynn et al. (2003) nachgewiesen.

Die Ergebnisse von MD2 ergaben, dass dieses Gen bei Männern und Frauen im hohen Alter gleichermaßen stark hochreguliert wird. Das humane MD2-Molekül ist mit der extrazellulären Domäne des humanen Toll-like Rezeptors 4 assoziiert und nimmt großen Einfluss auf dessen NF- κ B-Aktivierung (SHIMAZU et al., 1999). AKASHI et al. (2000) untersuchten diesen Sachverhalt bei Mäusen und konnten nachweisen, dass eine erhöhte MD2-Expression mit einer erhöhten NF- κ B-Aktivierung durch LPS einhergeht. MD2 allein reagiert nicht auf LPS, während TLR4 ohne MD2 auf eine LPS-Stimulation antwortet. Die Signalgebung vom TLR4-MD2-Komplex ist jedoch bis zu dreifach stärker als die des TLR4 alleine (AKASHI et al., 2000). Weiterhin konnte bei Mäusen nachgewiesen werden, dass TLR4 bei einer MD2-Abstinenz nicht korrekt an die Zelloberfläche transportiert wird, und es dadurch zu einer TLR4-Akkumulation im Golgi-Apparat kommt (NAGAI et al., 2002). Eine sehr starke Hochregulierung von MD2 im hohen Alter könnte möglicherweise eine Abnahme der Immunabwehr gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien durch TLR4 verhindern.

ICEBERG wird bei langlebigen Personen (Männer und Frauen) deutlich herunterreguliert. ICEBERG ist auf Chromosom 11q21-q22 lokalisiert und wird hauptsächlich im Herzen und in der Placenta exprimiert (HUMKE et al, 2000). ICEBERG ist ein eine CARD-Domäne enthaltene Protein (bestehend aus 90 Aminosäuren), das die Generierung von IL-1 β verhindert, indem es mit Caspase-1 (*cysteiny l aspartate-specific protease 1*) interagiert und somit dessen Assoziation

mit RIP2 unterbindet, welches als Aktivator von Caspase-1 agiert. ICEBERG verhindert LPS-induzierte IL-1 β Generierung und unterdrückt somit Entzündungsreaktionen. In geringen Konzentrationen agiert IL-1 β vornehmlich als Mediator bei lokalen Entzündungsreaktionen, indem es mononukleare Phagozyten und Endothelzellen zur Synthetisierung von Chemokinen veranlasst, die wiederum verschiedene Leukozytpopulationen aktivieren. In höherer Konzentration hingegen kann IL-1 β potentiell als tödlich geltende Systemeffekte wie Fieber, Erkältung und Schocks hervorrufen. ICEBERG agiert also als IL-1 β -Inhibitor, um dessen Generierung zu kontrollieren (Humke et al., 2000). Wird ICEBERG im hohen Alter vermindert exprimiert, kann die IL-1 β -Prozessierung nicht mehr durch ICEBERG kontrolliert werden, wodurch es zu einer erhöhten Konzentration dieses Zytokins kommen könnte. Dies wiederum könnte das Auftreten von Infektionen, Fieber und septischen Schocks erhöhen. Eine interessante Parallele bildet der Befund, dass im Alter in der intestinalen Mucosa das Zytokin IL-1 β in Abwesenheit einer entzündlichen Erkrankung signifikant hochreguliert ist (Nikolaus et al., 1998).

Zusammenfassend kann die These zur Abnahme von Immunfunktionen im Alterungsprozess durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da wichtige Gene, die die Zytokinausschüttung, die Inflammation und die Apoptose steuern, im hohen Alter vermindert exprimiert werden.

Die Hypothese, dass langlebige Personen diese Herunterregulierung von Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr nicht erfahren, konnte in dieser Arbeit nur durch die Hochregulationen im hohen Alter von CARD8 und MD2 bestätigt werden.

Somit scheinen die Prozesse, die zur Langlebigkeit führen, eine komplexere Dysregulation der Immunfunktionen zu umfassen. Die alleinige Betrachtung der Sensoren des angeborenen Immunsystems ist anscheinend nicht ausreichend, um diese komplexen Zusammenhänge vollständig zu erklären.

5. Zusammenfassung

Die Erkennung und Abwehr eingedrungener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben vielzelliger Organismen. Mit der Entdeckung von membran-gebundenen Rezeptoren, den Toll-like Rezeptoren, und den zytoplasmatischen NOD-Proteinen, konnten Sensoren des angeborenen Immunsystems zur Detektion (PRRs, *pattern recognition receptors*) pathogener Strukturen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) und zur Initiierung von Abwehrreaktionen identifiziert werden.

Während des Alterungsprozesses beim Menschen kommt es zu einer Beeinträchtigung mehrerer Körperfunktionen, unter anderem zur verminderten Immunabwehr gegenüber eindringenden Pathogenen. Die Regulation der angeborenen Immunantwort als physiologisch ältester Mechanismus der Pathogenabwehr stellt einen wichtigen Faktor für die physiologische Homöostase dar. Der Einfluss dieses Systems auf die Langlebigkeit beim Menschen ist bisher nicht ausreichend untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Anlehnung an den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand die humane TLR-Familie und NOD-Familie sowie funktionell assoziierte Gene daraufhin zu untersuchen, wie stark sie in der Gruppe der sehr alten Menschen (> 90 Jahre) im Vergleich zu jüngeren Probanden exprimiert sind.

Für die Expressionsanalyse der Gentranskripte wurde das ABI Prism[®] 7900HT Sequence Detection System in Verbindung mit dem Micro Fluidic Card System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Daten wurden mittels der vergleichenden C_T-Methode ausgewertet.

Eine starke signifikante Hochregulierung im hohen Alter erfuhren MD2, CARD8 (lediglich bei Frauen) und NALP11, während bei ICEBERG eine starke Herunterregulierung beobachtet wurde.

Wichtige Gene wie die TLRs und NODs, die Immunantwort steuern, wurden bei den langlebigen Probanden im hohen Alter vermindert exprimiert. Eine deutliche Hochregulierung im hohen Alter von CARD8 und MD2 könnte für die Langlebigkeit sprechen.

6. Summary

The recognition and defence of invading pathogens through the innate immunity is important for the survival of multi-cellular organisms. The development of membrane-bound receptors, Toll-like receptors, and cytoplasmatic NOD proteins led to the identification of PRRs (*pattern recognition receptors*) which are able to detect PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) and initiate immune response.

During human aging, lots of physical functions are inhibited, which leads to a decreased innate response to invading microorganisms. The regulation of the innate immunity, which seems to be the oldest physiological mechanism to defense pathogens, is meaningful factor in the physiological homeostasis. The impact of this system in human longevity is unclear, as yet.

Target of this study was to examine human TLR family, the NOD family and genes, which are connected to these families, whether they are more expressed in older persons (>90 years) as in younger ones.

To analyse the expressions of the genes below, we used the ABI Prism[®] 7900HT Sequence Detection System and the Micro Fluidic Card System (Applied Biosystems, Darmstadt) which support real-time PCR. For the relative quantification of nucleic acids we chose the Comparative C_T Method.

A significant upregulation in very old persons was detected by MD2, CARD8 (only women) and NALP11. ICEBERG was also downregulated.

On the one hand, important genes who regulate immune response, such as TLRs and NODs, showed decreased expressions in very old persons. On the other hand CARD8 and MD2 were significantly upregulated, which could explain the high lifespan of this persons.

7. Literatur

- Adibi, S.A.: The Oligopeptide transporter (Pept-1) in Human Intestine: Biology and Function, in: *Gastroenterology* **113** (1997): 332-340
- Agostini, L.; Martinon, F.; Burns, K.; McDermott, M. F.; Hawkins, P. N.; Tschopp, J.: NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder, in: *Immunity* **20** (2004):319-325
- Akashi, S.; Shimazu, R.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Takeda, K.; Kimoto, M.; Miyake, K.: Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages, in: *The Journal of Immunology* **164** (2000): 3471-3475
- Akira, S.: Mammalian Toll-like receptors, in: *Current Opinion in Immunology* **15** (2003): 5-11
- Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, in: *Nature Immunology* **2(8)** (2001): 675-680
- Akira, S; Takeda, K: Toll-like receptor signalling, in: *Immunology* **4** (2004): 499-510
- Albrecht, M.; Domingues, F. S.; Schreiber, S.; Lengauer, T.: Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2, in: *FEBS Lett* **554** (2003): 520-528
- Anders, H.-J., Patole, P.S.: Toll-like receptors recognize uropathogenic Escherichia coli and trigger inflammation in the urinary tract, in: *Nephrol Dial Transplant* **20** (2005): 1529-1532
- Anderson, K.V. ; Jurgens, G.; Nusslein-Volhard, C.: Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, in: *Cell* **42 (3)** (1985): 779-789
- Asentijevich, I.; Nowak, M.; Mallah, M.; Chae, J.J.; Watford, W.T.; Hofmann, S.R.; et al.: De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases, in: *Arthritis & Rheumatism* **46** (2002): 3340-3348
- Benedict, M. A.; Hu, Y.; Inohara, N.; Nunez, G.: Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome- c binding and regulated activation of procaspase-9, in: *Journal of Biological Chemistry* **275** (2000): 8461-8468
- Beutler, B.; Hoebe, K.; Ulevitch, R.J.: How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers, in: *Journal of Leukocyte Biology* **74** (2003): 479-485
- Boehmer, E. D.; Goral, J.; Faunce, D. E.; Kovacs, E. J.: Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression, in: *Journal of Leukocyte Biology* **75** (2004): 342-349

- Boehmer, E. D.; Meehan, M. J.; Cutro, B. T.; Kovacs, E. J.: Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway, in: *Mechanisms of Ageing and Development* **126(12)** (2005): 1305-1313
- Bradley, S.F.: *Staphylococcus aureus* Infections and Antibiotic Resistance in Older Adults, in: *Aging and Infectious Diseases* **34** (2002): 211-216
- Cario, E.; Podolsky, D.K.: Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals, in: *Molecular Immunology* **42** (2005): 887-893
- Chamaillard, M.; Girardin, S.E.; Viala, J.; Philpott, D.J.: Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation, in: *Cellular Microbiology* **5** (2003): 581-592
- Dangl, J.L.; Jones, J.D. : Plant pathogens and integrated defence responses to infection, in: *Nature* **14(411)** (2001): 826-833
- Dodé, C. ; Le Du, N. ; Cuisset, L. ; Letourneur, F. ; Berthelot, J.-M. ; Vaudour, G. ; Meyrier, A. ; Watts, R.A. ; Scott, D.G. ; Nicholls, A. ; Granel, B.; Frances, C.; Garcier, F.; Edery, P. ; Boulinguez, S.; Domergues, J.-P.; Delpech, M.; Graeau, G.: New Mutations of *CIAS1* That Are Responsible for Muckle-Wells Syndrome and Familial Cold Urticaria: A Novel Mutation Underlies Both Syndromes, in: *The American Journal of Human Genetics* **70** (2002): 1489-1506
- Dorman, J. B.; Albinder, B. ; Shroyer, T.; Kenyon, C.: The age-1 and daf-2 genes function in common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, in: *Genetics* **141** (1995): 1399-1406
- Druilhe, A.; Srinivasula, S.M.; Razmara, M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.: Regulation of IL-1 β generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins, in: *Cell Death and Differentiation* **8** (2001): 649-657
- Dunne, A.; O'Neill, L. A.: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signaltransduction during inflammation and host defense, in: *Sci STKE* **2003** (2003):re3
- Feldmann, J.; Prieur, A.M.; Quartier, P.; Berquin, P.; Cortis, E.; Teillac-Hamel, D. ; Fischer, A. : Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in *CIAS1*, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes, in: *American Journal of Human Genetics* **71** (2002): 198-203
- Fernandez Ballesteros, R.; Diez Nicolas, J.; Ruiz Torres, A., in: *Aging in Europe* (1999): 107-121
- Flynn, M. G.; McFarlin, B. K.; Phillips, M. D.; Stewart, L. K.; Timmerman, K. L.: Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women, in: *Journal of Applied Physiology* **95** (2003): 1833-1842
- Girardin, S. E.; Tournebise, R.; Mavris, M.; Page, A. L.; Li, X.; Stark, G. R.; Bertin, J.; DiStefano, P. S.; Yaniv, M.; Sansonetti, P. J.; Philpott, D. J.: CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*, in: *EMBO Rep* **2** (2001):736-742

- Girardin, S.E.; Sansonetti, P.J.; Philpott, D.J.: Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies, in: *Trends Microbiology* **10(4)** (2002): 193-199
- Grenier, J.M.; Wang, L.; Manji, G.A.; Huang, W.-J.; Al-Garawi, A.; Kelly, R.; Carlson, A.; Merriam, S.; Lora, J.M.; Briskin, M.; DiStefano, P.S.; Bertin, J.: Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF- κ B and caspase-1, in: *Federation of European Biochemical Societies Letter* **530** (2002): 73-78
- Hampe, J.; Grebe, J.; Nikolaus, S.; Solberg, C.; Croucher, P. J.; Mascheretti, S.; Jahnsen, J.; Moum, B.; Klump, B.; Krawczak, M.; Mirza, M. M.; Fölsch, U. R.; Vatn, M.; Schreiber, S.: Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study, in: *Lancet* **359(9318)** (2002): 1661-1665
- Harton, J. A.; Linhoff, M. W.; Zhang, J.; Ting, J. P.: Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains, in: *Journal of Immunology* **169** (2002):4088-4093
- Hasan, U.; Chaffoir, C.; Gaillars, C.; Saulnier, V.; Merck, E.; Tancredi, S.; Guiet, C.; Brière, F.; Vlach, J.; Lebecque, S.; Trinchieri, G.; Bates, E. E. M.: Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B Cells and plasmacytoid Dendritic Cells, which activates gene transcription through MyD88, in: *The Journal of Immunology* **174** (2005): 2942-2950
- Herskind, A.M.; McGue, M.; Holm, N.V.; Sorensen, T.I.A.; Harvald, B.; Vaupel, J.W.: The heritability of human longevity. A population-based study of 2872 Danish twin Pairs born 1870-1900, in: *Human Genetics* **97** (1996): 319-323
- Hopkins, P. A.; Srisakandan, S.: Mammalian Toll-like receptors : to immunity and beyond, in : *Clinical and Experimental Immunology* **140** (2005) : 395-407
- Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cezard, J. P.; Belaiche, J.; Almer, S.; Tysk, C.; O'Morain, C. A.; Gassull, M.; Binder, V.; Finkel, Y.; Cortot, A.; Modigliani, R.; Laurent-Puig, P.; Gower-Rousseau, C.; Macry, J.; Colombel, J. F.; Sahbatou, M.; Thomas, G.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, in: *Nature* **411** (2001): 599-603
- Humke, E. W.; Shriver, S. K.; Starovasnik, M. A.; Fairbrother, W. J.; Dixit, V.: ICEBERG: A Novel Inhibitor of Interleukin-1 β Generation, in: *Cell* **103** (2000): 99-111
- Inohara, N.; Nunez, G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, in: *Nature Review Immunology* **3** (2003):371-382
- Inohara, N.; Nunez, G.: The NOD: a signaling module that regulate apoptosis and host defense against pathogens, in: *Oncogene* **20** (2001):6473-6481
- Inohara, N.; Ogura, Y.; Nunez, G.: Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens, in: *Current Opinion in Microbiology* **5** (2002):76-80

- Krajewska, M.; Kim, H.; Kim, C.; Kang, H.; Welsh, K.; Matsuzawa, S.; Tsukamoto, M.; Thomas, R. G.; Assa-Munt, N.; Piao, Z.; Suzuki, K.; Perucho, M.; Krajewski, S.; Red, J. C.: Analysis of Apoptosis Protein Expression in Early-Stage Colorectal Cancer Suggests Opportunities for New Prognostic Biomarkers, in: *Clinical Cancer Research* **11(15)** (2005): 5451-5461
- Kurz, C. L.; Tan, M. W.: Regulation of aging and innate immunity in *C.elegans*, in: *Aging Cell* **3(4)** (2004): 185-193
- Lancaster, G. I.; Khan, Q.; Drysdale, P.; Wallace, F.; Jeukendrup, A. E.; Drayson, M. T.; Gleeson, M.: The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans, in: *Journal of Physiology* **563** (2005): 945-955
- Lauw, F. N.; Caffrey, D. R.; Golenbock, D. T.: Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin, in: *TRENDS in Immunology* **26** (2005): 509-511
- Lemaitre, B.; Reichhart, J.-M.; Hoffmann, J. A.: *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms, in: *Immunology* **94** (1997): 14614-14619
- Manji, G. A.; Wang, L.; Geddes, B. J.; Brown, M.; Merriam, S.; Al-Garawi, A.; Mak, S.; Lora, J. M.; Briskin, M.; Jurman, M.; Cao, J.; DiStefano, P. S.; Bertin, J.: PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B, in: *Journal of Biological Chemistry* **277** (2002):11570-11575
- Martinon, F.; Agostini, L.; Meylan, E.; Tschopp, J.: Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the NALP3/Cryopyrin Inflammasome, in: *Current Biology* **14** (2004): 1929-1934
- Medzhitov, R.: Toll-like receptors and innate immunity, in: *Immunology* **1** (2001): 135-145
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, in: *Methods Enzymol* **155** (1987): 335-350
- Nagai, M.; Akashi, S.; Nagafuku, M.; Ogata, M.; Iwakura, Y.; Akira, S.; Kitamura, T.; Kosugi, A.; Kimoto, M.; Miyake, K.: Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution, in: *Nature Immunology* **3** (2002): 667-672
- Nikolaus, S.; Raeder; Schreiber, S.: Immunosenescence of the GI immune system: increased secretion of proinflammatory cytokines, in: *Gastroenterology* **114** (1998): G3679
- Nishimura, M.; Naito, S.: Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-Like Receptors and Related Genes, in: *Biol. Pharm. Bull.* **28(5)** (2005): 886-892
- O'Connor, W.; Harton, J. A.; Zhu, X.; Linhoff, M. W.; Ting, J. P.-Y.: Cutting Edge: CIAS1/Cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kB suppressive properties, in: *The Journal of Immunology* **171** (2003): 6329-6333
- Oeppen, J.; Vaupel, J. W.: Broken limits to life expectancy, in: *Science* **296** (2002): 1029-1031

- Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R.; Britton, H.; Moran, T.; Karaliuskas, R.; Duerr, R. H.; Achkar, J. P.; Brant, S. R.; Bayless, T. M.; Kirschner, B. S.; Hanauer, S. B.; Nunez, G.; Cho, J. H.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, in: *Nature* **411** (2001):603-606
- Pathan, N.; Marusawa, H.; Krajewska, M.; Matsuzawa, S.; Kim, H.; Okada, K.; Torii, S.; Kitada, S.; Krajewski, S.; Welsh, K.; Pio, F.; Godzik, A.; Reed, J. C.: TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer, in: *Journal of Biological Chemistry* **276** (34) (2001): 32220-32229
- Philpott, D. J.; Girardin, S. E.: The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection, in: *Molecular Immunology* **41** (2004): 1099-1108
- Plowden, J.; Renshaw-Hoelscher, M.; Engleman, C.; Katz, J.; Sambhara, S.: Innate immunity in aging : impact on macrophage function, in : *Aging Cell* **3**(4) (2004): 161-167
- Razmara, M.; Srinivasula, S. M.; Wang, L.; Poyet, J.-L.; Geddes, B. J.; DiStefano, P. S.; Bertin, J.; Alnemri, E. S.: CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis, in: *Journal of Biological Chemistry* **277** (16) (2002): 13952-13958
- Reik, W.; Maher, E. R.: Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome, in: *Trends in Genetics* **13** (1997): 330-334
- Renshaw, M.; Rockwell, J.; Engleman, C.; Gewirtz, A.; Katz, J.; Sambhara, S.: Cutting edge : impaired Toll-like receptor expression and function in aging, in: *The Journal of Immunology* **169** (2002): 4697-4701
- Rock, F. L.; Hardiman, G.; Timans, J. C.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F.: A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll, in: *Developmental Biology* **95** (1998): 588-593
- Rosenstiel, P.; Fantini, M.; Bräutigam, K.; Kühbacher, T.; Wätzig, G. H.; Seegert, D.; Schreiber, S.: TNF-a and IFN-g regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells, in: (2002)
- Saleh, A.; Srinivasula, S. M.; Acharya, S.; Fishel, R.; Alnemri, E. S.: Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation, in: *Journal of Biological Chemistry* **274** (1999):17941-17945
- Salvesen, G. S.; Dixit, V. M.: Caspase activation: The induced-proximity model, in: *PNAS* **96** (1999): 10964-10967
- Schreiber, S.; Rosenstiel, P.; Albrecht, M.; Hampe, J.; Krawczak, M.: Genetics of Crohn Disease, an archetypal inflammatory Barrier disease, in: *Nature Review Genetics* **6**(5) (2005): 376-388
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K.; Kimoto, M.: MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-Like Receptor 4, in: *Journal of Experimental Medicine* **189** (1999): 1777-1782

-
- Skytthe, A.; Pedersen, N. L.; Kaprio, J.; Stazi, M. A.; v.B. Hjelmborg, J.; Iachine, I.; Vaupel, J. W.; Christensen, K.: Longevity studies in GenomEUwin, in: *Twin Research* **6** (2003): 448-454
- Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S.: Toll-like Receptors, in: *Annual Review Immunology* **21** (2003): 335-376
- Tong, Z.-B.; Bondy, .A.; Zhou, J.; Nelson, L. M.: A human homologue of mouse *Mater*, a maternal effect gene essential for early embryonic development, in: *Human Reproduction* **17**(4) (2002): 903-911
- Tschopp, J.; Martinon, F.; Burns, K.: NALPs: a novel protein family involved in inflammation, in: *Nature Review Molecular Cell Biology* **4** (2003):95-104
- Vasto, S; Caruso, C: Immunity & aging: a new journal looking at ageing from an immunological point of view, in: *Immunity & Aging* **1** (2004)
- Vavricka, S. R.; Musch, M. W.; Chang, J. E.; Nakagawa, Y.; Phanvijhitsiri, K., Waypa, T. S.; Merlin, D.; Schneewind, O.; Chang, E. B.: hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells, in: *Gastroenterology* **127**(5) (2004):1401-1409
- Wang, Y.; Hasegawa, M.; Imamura, R.; Kinoshita, T.; Kondo, C.; Konaka, K.; Suda, T.: PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1, in: *International Immunology* **16**(6) (2004): 777-786
- Who Issues: New healthy life expectancy rankings. Press release WHO. Veröffentlicht in Washington, D.C. und Genf, Schweiz 2000. www.who.int/inf-pr-2000/en/pr2000-life.html

Anhang

Chemikalien/Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Agarose SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
Bromphenolblau	Sigma, München
DEPC	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein
Glycerol	Sigma, München
Smart ladder	Eurogentec, Köln
Tris	Merck, Darmstadt

Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A.bidest. angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 X DNA-Lade-puffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
25 X TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
5X RT-Puffer	50 M Tris·HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂

Kits

Bezeichnung	Hersteller
Advantage [®] RT-for-PCR-Kit	Clontech, Heidelberg
PAXgene [™] Blood RNA Kit	PreAnalytix, Qiagen, Hilden
PAXgene [™] RNA Tubes	PreAnalytix, Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems, Darmstadt

Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
MMLV-Reverse Transkriptase	Clontech, Heidelberg
DNase I stock	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Qiagen, Hilden

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide („Primer“) wurden zur Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR benutzt:

Primername	Sequenz (5' → 3')	T_{anneal} (°C)	Zykle n	Ampli kon (bp)	Acc.No. (GenBank)
GAPDH_s	CCAGCCGAGCCACATCGC				
GAPDH_a	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	56	30	360	BC029618

Micro Fluidic Card Assays

Nr.	Name	Nucleotide ID	Bestellnummer
1	TLR1	AAC34137	Hs00413978_m1
2	TLR2	NP_003255	Hs00152932_m1
3	TLR3	NP_003256	Hs00152933_m1
4	TLR4	NP_612564	Hs00152937_m1
5	TLR5	NP_003259	Hs00152825_m1
6	TLR6	NP_006059	Hs00271977_s1
7	TLR7	NP_057646	Hs00152971_m1
8	TLR8	NP_057694	Hs00607866_mH
9	TLR9	NP_059138	Hs00152973_m1
10	TLR10	NP_112218	Hs00374069_g1
11	NOD1	AAD28350	Hs00196075_m1
12	NOD2	AAG33677	Hs00223394_m1
13	NOD3	DAA01245	Hs00605037_m1
14	NOD5	DAA01240	Hs00698226_m1
15	NOD6	DAA01247	Hs00603423_m1
16	NOD8	DAA01243	Hs00738590_m1
17	NOD9	DAA01244	Hs00226360_m1
18	NOD12	DAA01246	Hs00373683_m1
19	NOD14	DAA01241	Hs00603406_m1
20	NOD16	AAO18159	Hs00603419_m1
21	NOD17	NP_659444	Hs00376627_m1
22	NOD27	NP_115582	Hs00260008_m1
23	NALP2	AAG15253	Hs00215284_m1
24	NALP3	NP_004886	Hs00366461_m1
25	NALP4	AAL35293	Hs00370499_m1
26	NALP5	AAL15549	Hs00411266_m1
27	NALP6	NP_612202	Hs00373246_m1
28	NALP12	AAH28069	Hs00376282_m1
29	Ipaf	NP_067032	Hs00368367_m1
30	DEFCAP	AAG15254	Hs00248187_m1
31	APAF 1	AAC51678	Hs00185508_m1
32	Bcl10	CAA06955	Hs00184839_m1
33	MyD88	AAB49967	Hs00182082_m1
34	CD14	NP_000582	Hs00169122_g1
35	MD2/ LY96	NP_056179	Hs00209771_m1
36	SIGIRR	NP_068577	Hs00222347_m1
37	TIRAP	NP_443119	Hs00364644_m1
38	TRIF	NP_055076	Hs00706140_s1
39	SARM1	AAR17520	Hs00248344_m1
40	TOLLIP	CAB58118	Hs00184085_m1
41	ASC	NP_037390	Hs00203118_m1
42	TUCAN	AAG50014	Hs00209095_m1
43	ICEBERG	AAG23528	Hs00253674_s1
44	COP/pseudo-ICE	AAK71682	Hs00430993_m1
45	RIP2	AAC24561	Hs00169419_m1
46	hpepT1/SLC15A1	NP_005064	Hs00192639_m1

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Ailent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
BioDocAnalyze (Geldokumentationsanlage)	Biometra, Göttingen
Gene Amplification PCR System 9700 (Thermocycler)	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Micro Fluidic Card System	Applied Biosystem, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec 3100 pro, UV/visible Spectrophotometer	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Varifuge 3.0R	Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold
Multifuge 3s	Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold

Software

Bezeichnung	Hersteller
SigmaGel (densitometrische Auswertung)	Jandel, Scientific Corp., Erkrath
ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System Software (SDS 2.1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Mann-Whitney U-Test/ Excel™	Microsoft, München

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer- in Inhalt und Form und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmittel selbst verfasst habe. Die Arbeit wurde bis zu diesem Zeitpunkt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe.

Kiel, den _____

(Stefanie Derer)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Professorin, Frau Prof. Dr. Behr-Völtzer, dafür bedanken, dass sie mir die Arbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Schreiber ermöglicht hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. Schreiber für die Realisierung der vorliegenden Arbeit sowie für die interessante und anspruchsvolle Themenstellung bedanken.

Zu sehr großem Dank bin ich meinem fachlichen Betreuer, Herrn Dr. med. Philip Rosenstiel, verpflichtet. Seine engagierte fachliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die auch im privaten Urlaub nicht nachließ, sowie seine unermüdliche Geduld war für die Erstellung dieser Arbeit von sehr hohem Wert. Vielen, vielen Dank.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Mucosaimmunologie bzw. des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel, im besonderen meinen Kollegen der Projektgruppe Zellbiologie. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Andreas Till, Dr. Gunnar Jacobs, Tanja Kaacksteen und Yasmin Brodtmann bedanken, ohne die ich hilflos den Irrwegen der Zellbiologie ausgeliefert gewesen wäre. Ein großes Danke an alle „unter der 8“ für die tolle Unterstützung und die vielen netten Stunden mit euch.

Ebenso einen großen Dank an die Angehörigen der Projektgruppe Expression-Screening, Leiter Dr. Robert Häsler sowie Dorina, Martin und Nancy. Rob und Dorina, vielen Dank für eure tolle Unterstützung beim Micro Fluidic Card System. Ebenso möchte ich Almut Nebel (Gruppe Molecular Ageing Research) für wertvolle fachliche Hinweise danken, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Last but not least, möchte ich meiner Familie herzlich für die riesige Unterstützung in diesem etwas schwierigem Jahr danken. Das allergrößte DANKE dafür, dass es euch gibt.