

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK  
DES AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES  
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN  
CHEFARZT: PROF. DR. MED. HANS SCHWERING  
UND  
AUS DER GASTROENTEROLOGISCHEN KLINIK  
DES AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES  
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN  
CHEFARZT: DR. MED. CH. GINSBACH

**FACS-Untersuchungen zur antigenspezifischen Zytokinantwort  
von mononukleären Zellen (PBMC)**

INAUGURAL – DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT  
MÜNSTER

VORGELEGT VON  
DU-QUOC, BAO  
AUS KHANH HUNG, VIETNAM

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwering

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Preusser

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Februar 2008

Aus der chirurgischen und gastroenterologischen Klinik des Akademischen  
Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen  
(Chefarzt Prof. Dr. med. H. Schwering und Chefarzt Dr. med. Ch. Ginsbach)

**Referent: Prof. Dr. med. H. Schwering**

**Koreferent: Prof. Dr. med. P. Preusser**

## **ZUSAMMENFASSUNG**

### **FACS-Untersuchungen zur antigenspezifischen Zytokinantwort von mononukleären Zellen (PBMC)**

Du-Quoc, Bao

Eine Hepatitis C-Virus Infektion bei gleichzeitiger HIV-Erkrankung führt zu einem rascheren Krankheitsverlauf der chronischen Lebererkrankung, welche zu einer Leberzirrhose und schließlich zu einem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms führt.

Die Pathogenese der HCV-Infektion im Rahmen einer Koinfektion mit dem HI-Virus ist komplex, da bislang noch unzureichend geklärte Immuneffekte mit verändertem Interleukin-, Zytokin-, Monokinmuster und Zellinteraktionen ablaufen. Diese verschlechtern eine Virus-Elimination und begünstigen eine Viruspersistenz.

Eine effiziente Kontrolle der Virusinfektion hängt von zahlreichen Immunabwehrzellen und von einer effektiven antiviralen Therapie (PEG-Interferon/Ribavirin bzw. HAART) ab. Neben der regulatorischen Funktion der T-Helfer-Zellen kommt den Monozyten eine wichtige Rolle in der Immunabwehr zu.

Die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse heben die Bedeutung einer TH1-dominierenden Immunantwort für eine effektive HCV-Elimination hervor. Eine „Monozyten-Dysfunktion“ in Form eines TH2-Shifts scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, so dass eine effiziente Aktivierung von T-Lymphozyten ausbleibt.

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Februar 2008

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologie von Hepatitis C und HIV</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Das Hepatitis C-Virus</b>	<b>4</b>
1.2.1	Aufbau des HCV-Genoms	4
1.2.2	Beschreibung der Hepatitis C-Proteine	6
1.2.3	HCV-Genotypen	6
1.2.4	Klinischer Verlauf	7
1.2.5	Antivirale Immunantwort bei Hepatitis C	8
1.2.6	Therapie bei HCV	10
<b>1.3</b>	<b>Das Human-Immundefizienz-Virus</b>	<b>10</b>
1.3.1	Aufbau des HIV-Genoms	10
1.3.2	Der Lebenszyklus von HIV	13
1.3.2.1	Bindung an Zielzellen und Fusion	13
1.3.2.2	Reverse Transkription	13
1.3.2.3	Expression der Gene	14
1.3.2.4	Entstehung infektiöser Viren	14
1.3.3	Klinischer Verlauf	14
1.3.4	Antivirale Immunantwort bei HIV	15
1.3.5	Therapie bei HIV	16
<b>1.4</b>	<b>Gliederung des Immunsystems</b>	<b>17</b>
1.4.1	B-Lymphozyten	17

1.4.2	T-Lymphozyten	18
1.4.3	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	19
1.4.4	Antigenpräsentierende Zellen	19
1.4.4.1	Mononukleäres Phagozytensystem	20
<b>1.5</b>	<b>Zytokine</b>	<b>22</b>
1.5.1	Interleukin-1 $\beta$	22
1.5.2	Interleukin-6	23
1.5.3	Interleukin-10	23
1.5.4	Interleukin-12	24
1.5.5	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	24
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
2.1.1	Chemikalien	28
2.1.2	Laborgeräte	28
2.1.3	Labormaterialien	29
2.1.4	Lösungen	29
2.1.5	Monoklonale Antikörper für Immunzytochemie	30
2.1.6	Immunphänotypisierung	30
2.1.7	Vollblut und Patientenserum	31
2.1.8	Rekombinante HCV-Proteine	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1	Patientengruppen	33
2.2.2	Methoden zur Charakterisierung der Studienpopulation	38

2.2.2.1	Bestimmung der HCV-/HIV-Antikörper	38
2.2.2.2	Nachweis der HCV-RNA und Analyse des HCV-Genotypes	38
2.2.3	Grundlagen der Durchflusszytometrie	39
2.2.4	FACS-Auswertung	41
2.2.5	Immunstatus	43
2.2.6	Bestimmung der Zytotoxizität von Monensin	45
2.2.7	Leukozytenseparation mit Ficoll	48
2.2.8	Bestimmung der Zellkonzentration	50
2.2.9	Patientenserum	50
2.2.10	Kultivierung und Zellstimulation	50
2.2.11	Mehrfarbandurchflusszytometrie zur Charakterisierung monozytärer Oberflächenmarker und Zytokine	52
2.2.12	Statistik	59
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Studienpopulation-Immunstatus-Laborchemie</b>	<b>60</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuche zur Optimierung der Antigenstimulation im experimentellen Ansatz</b>	<b>60</b>
3.2.1	Analyse des Puffersystems auf die Zellvitalität und die Zytokinexpression	60
3.2.2	Analyse zur Monensinzytotoxizität	61
3.2.3	Analyse der HCV-spezifischen Monokinantwort bei unterschiedlicher Inkubationsdauer	63
<b>3.3</b>	<b>Native Zytokinproduktion von Monozyten im peripheren Blut</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Zytokinproduktion unstimuliert und nach HCV-spezifischer Stimulation</b>	<b>68</b>
<b>3.5</b>	<b>Zytokinproduktion nach HCV-spezifischer Stimulation im Gruppenvergleich</b>	<b>72</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss der HIV-Therapieart auf die Monokinexpression</b>	<b>78</b>

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
7-AAD	7-Aminoaktinomycin D
cDNA	komplementäre DNA
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunsorbent assay
FACS	Fluoreszenz-aktivierter-Zell-Sortierer
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	hypervariable Region
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
NTR	Nicht-translatierte Region
NS	non structural, Nicht-Struktur
p	Statistische Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Rundläufe pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreulicht
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie von Hepatitis C und HIV

Hepatitis C und HIV-Erkrankungen sind chronisch verlaufende Infektionskrankheiten, die unbehandelt eine hohe Letalität aufweisen.

Seit Mitte der siebziger Jahre gibt es klinische und epidemiologische Hinweise, dass es neben den damals bekannten Hepatitis A- und B-Erregern eine weitere Form der viralen Lebererkrankung existiert. Diese Form trat insbesondere nach Bluttransfusionen auf und war durch einen überwiegend chronischen Verlauf gekennzeichnet. Man bezeichnete sie zunächst als **Non A-, Non B-Hepatitis**. Ende der achtziger Jahre 1988 konnte das Hepatitis C-Virus (HCV) molekularbiologisch als der häufigste Erreger der posttransfusionalen Non A- Non B-Virushepatitis isoliert werden (Choo et al. 1989).

Weltweit liegt die Prävalenz der HCV-Infizierten bei etwa 1-3% der Bevölkerung (Alter 1997), insgesamt schätzungsweise 60-180 Millionen. Die höchste Infektionsrate weist Ägypten auf, wo 15-30% der Bevölkerung erkrankt sind. In Deutschland sind es 0,5 % der Bevölkerung, ca. 500.000 Infizierte (Caspari et al. 1989; Heintges et al. 1997), wobei Risikogruppen wie Hämophile (70-90 %), i.v.-Drogenabhängige (50-90 %) und chronische Dialysepatienten (5-30 %) eine deutlich höhere Prävalenz aufweisen.

Die ersten, nachträglich diagnostizierten Infektionen mit dem **HI-Virus** stammten aus den 60er und 70er Jahren aus Zaire. 1983 konnte in den USA das HI-Virus als Ursache eines erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS), das gehäuft bei homo- und bisexuellen Männern beobachtet wurde, identifiziert werden. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation haben sich bis 1998 weltweit etwa 30 Mio. Menschen mit HIV infiziert und täglich kommen etwa 16.000 HIV-Neuinfektionen hinzu. Davon sind in Europa 220.000 Menschen an AIDS erkrankt (Brodts et al. 1998). In Deutschland liegen zu Zeit ca. 45.000 HIV-Erkrankungen vor (RKI 1997). Einige Länder Afrikas, wie Botswana und Malawi, weisen eine hohe Durchseuchung bis 25% der Bevölkerung mit HIV auf.

Da die HCV- und HIV-Infektion einen gemeinsamen Weg der parenteralen und sexuellen Übertragung teilen (McNair et al. 1992), treten in der Risikogruppe der i.v.-Drogenabhängigen eine hohe Prävalenz bis zu 95% als Doppel-Infektionen auf. Hauptübertragungsmodus sind Kontakte mit Blut, wie z. B. bei Bluttransfusionen, Sexualkontakte zu Infizierten, Nadeltausch bei i.v.-Drogenmissbrauch. Vertikale Transmissionen von Mutter auf Kind unter der Geburt wurden ebenfalls beschrieben. Nach Einführung von HIV-Ak-Testen von Blutkonserven Ende 1985 sowie Screening auf HCV seit Anfang der 90er Jahre konnte die Posttransfusionstransmission deutlich verringert werden (Consensus Statement EASL 1999).

Ähnlich wie die HIV-Infektion bleibt die HCV-Infektion über lange Jahre hinweg klinisch symptomlos. In ca. 85% der Fälle chronifiziert die Hepatitis C-Erkrankung (Alter H.J. et al. 1997). Bei etwa 20-30% der Patienten führt die HCV-Erkrankung über eine chronisch-progressive Entzündung schließlich nach 20 bis 30 Jahren zu Leberzirrhose, Leberversagen und in 5% der Zirrhosepatienten zu einem Entstehen eines primären Leberzellkarzinoms (Di Bisceglie 1995). Epidemiologische Daten zeigen bei HIV/HCV-koinfizierten Patienten einen rascheren Verlauf ihrer Lebererkrankung als HCV-monoinfizierte Patienten auf (Eyster et al. 1993). Ob eine gleichzeitige Hepatitis C auch den Krankheitsverlauf der HIV-Infektion ungünstig beeinflusst, wird dagegen zu Zeit noch kontrovers diskutiert.

Unter dem Einsatz der hochwirksamen antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART) lässt sich eine Abnahme der HIV-assoziierten Erkrankungen bei gleichzeitig deutlicher Zunahme von lebererkrankungsbedingten Todesfällen nachweisen. HIV-seronegative/HCV-seropositive Patienten haben ein circa 20mal höheres Risiko gegenüber der Normalbevölkerung an einer Lebererkrankung zu versterben, bei der Gruppe der HIV/HCV-Positiven ist das Risiko 94mal so hoch (Rockstroh).

Unter Berücksichtigung des schnelleren Verlaufs der Hepatitis C bei Koinfektion ist eine effektive Behandlung sowohl der Hepatitis C als auch der HIV-Erkrankung wichtig. Der Einsatz von pegyliertem Interferon plus Ribavirin scheint nach ersten Studienergebnissen bessere Ansprechraten zu zeigen. Welchen Einfluss eine HAART-

Therapie auf das Immunsystem im Sinne einer Immunrekonstitution hat, und wie dadurch die HCV-Infektion beeinflusst wird, bleibt noch unklar.

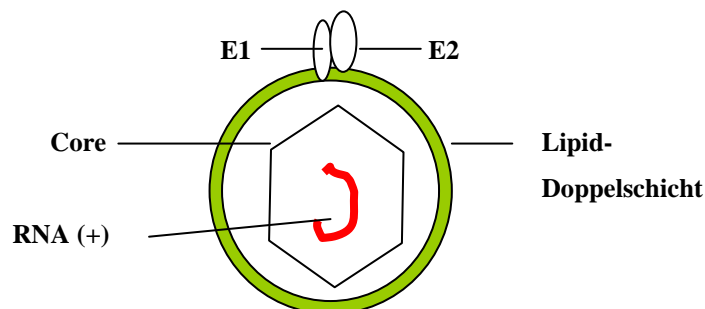
## 1.2 Das Hepatitis C-Virus

### 1.2.1 Aufbau des HCV-Genoms

Das etwa 30-60 nm große Hepatitis C-Virus gehört zur Familie der Flaviviridae und Pestiviren (Miller et al. 1990). Es besitzt ein umhülltes Nukleokapsid mit (+)-Strang RNA-Genom. Seine äußere Hülle stammt von der Zellmembran der Wirtszelle, wobei virale Glykoproteine in die Lipidmembran inseriert sind (Major and Feinstone 1997) (Abb. 1).

Das ca. 9400 Nukleotide umfassende RNA-Genom enthält einen offenen Leserahmen, der für ein 3010-3030 Aminosäuren langes Polypeptid kodiert, das am 3' und 5' Ende von nicht kodierenden Regionen (NCR) flankiert ist (Abb. 2) (Choo et al. 1991; Han et al. 1991; Takanzawa et al. 1991). Die 5'NCR stellt eine hochkonservierte Region dar und enthält Elemente, die als IRES (engl. internal ribosome entry sites) bezeichnet werden. Ihre Aufgabe ist die Bindung des Genoms an zelluläre Ribosomen, um somit die Translation zu ermöglichen (Honda et al. 1996; Wang et al. 1993). An der 3'NCR befindet sich eine Poly-Uridin-Sequenz und eine aus 100 Basenpaare lange konservierte Region, die eine sekundäre Schleife bildet und wahrscheinlich für die Stabilität der viralen RNA von Bedeutung ist (Kolyhalov et al. 1996).

Der offene Leserahmen kodiert für ein Vorläufer-Polypeptid, welches kotranslational in drei Strukturproteine (Core; E1; E2) und vier Nicht-Strukturproteine (NS2; NS3; NS4a und b; NS5a und b) proteolytisch mittels viraler und zellulärer Enzyme gespalten wird (Abb. 2) (Grakoui et al. 1993; Hijikata et al. 1991). Die Spaltung in die funktionalen Proteine erfolgt im Lumen des endoplasmatischen Retikulums.



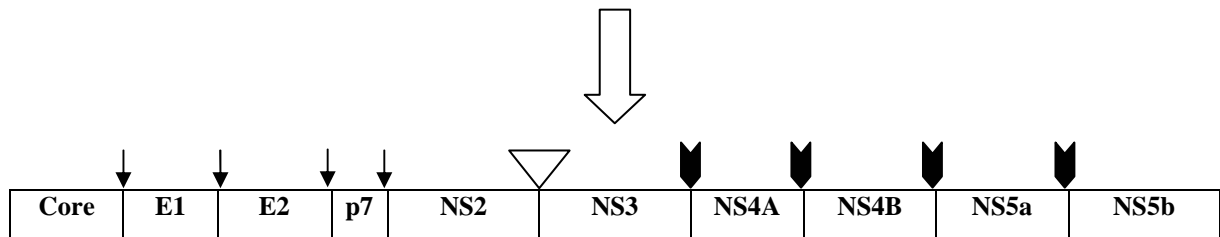
**Abb. 1:** Struktur des HCV-Virus.

(+)-Strang-RNA (ca. 9.400 Nukleotide)

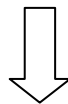
Nukleotid-Homologie

92%	81%	55%	65%	57%	70%	65%	66%	26%
5'	Core	E1	E2	NS2	NS3	NS4	NS5	3'

Translation



Spaltung durch zelluläre (↓), NS2 / NS3 (▽) und NS3 (▾) -kodierte Proteasen



I-----Strukturproteine-----I-----Nicht-Strukturproteine-----I

Kapsid- protein	Hüll- protein 1	Hüll- protein 2	?	Metallo- Protease	Serinprotease Helicase	Cofaktor	?	?	RNA-abhängige Polymerase
Core	E1	E2	?	NS2	NS3	NS4a	NS4b	NS5a	NS5b
p21	gp31	gp70	p7	p23	p70	p8	p27	p58	p68

**Abb. 2:** Vermuteter genomischer Aufbau und Prozessierung des HCV-Vorläuferproteins des Hepatitis C-Virus. Oberhalb des HCV-Genoms sind die prozentualen Nukleotidsequenz-Homologien (Poet et al. 1994) der Isolate mit den höchsten Nukleotidsequenzunterschieden angegeben.

## 1.2.2 Beschreibung der Hepatitis C-Proteine

Die Strukturproteine Core, E1 und E2 sind am 5'-Ende lokalisiert, während die Nicht-Struktur (NS)-Proteine NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b am 3' Ende des HCV-Genoms kodiert sind. Die ersten 191 AS des Polyproteins kodieren das Core-Protein (p21), welches die Grundstruktur der viralen Kapsidhülle bildet (Matsumoto et al. 1996). Darüber hinaus wurden auch verkürzte Formen des Core-Proteins beschrieben (Lo et al. 1995).

Die Glykoproteine E1 (gp31) und E2 (gp70) bilden als Heterodimer zusammen mit der Wirtsmembran die Hülle des Virus (Duboisson et al. 1994). Sie besitzen im Gegensatz zu Core eine relativ hohe Sequenz-Variabilität. Das carboxyterminale Ende von E2 wird auch als p7-Protein bezeichnet und dient vermutlich bei einigen Genotypen als fakultative Erweiterung des eigentlichen E2-Proteins (Lin et al. 1994; Mizushima et al. 1994; Selby et al. 1994).

Das sich anschließende NS2-Protein (p23) kann als potentielle  $Zn^{2+}$ -abhängige Metalloprotease die Spaltung zwischen NS2 und NS3 herbeiführen (Hijikata et al. 1993). Das NS3-Protein (p70) ist eine Serinprotease und ermöglicht einerseits als multifunktionales Enzym eine autoproteolytische Trennung vom Polyprotein und katalysiert andererseits mit Hilfe von NS4a als Cofaktor die proteolytischen Spaltungen der restlichen Vorläuferproteine in die Nicht-Strukturproteine (NS4a und b; NS5a und b) (Bartenschlager et al. 1994; Lin et al. 1994; Failla et al. 1994; Tanji et al. 1995).

Das NS4-Protein besitzt zwei Untereinheiten, wovon NS4a (p6) als Cofaktor für die NS3-Protease fungiert.

Die Untereinheit NS5b (p68) wird bei der Replikation des komplementären RNA(-)-Stranges als RNA-abhängige RNA-Polymerase freigesetzt (Behrens et al. 1996). Der (-)-Strang dient wiederum als Matrize für die Replikation des (+)-Stranges. Über die Funktion der Abschnitte NS4b (p27) und NS5a (p58) ist wenig bekannt.

## 1.2.3 HCV-Genotypen

Die Einteilung des Hepatitis C-Virus beruht auf Nukleotidsequenzvergleiche der bisher acht bekannten Isolate nach dem Nomenklatorsystem von Peter Simmonds (Simmonds



et al. 1994). Dabei werden HCV-Genotypen mit arabischen Zahlen und die Subtypen mit Buchstaben gekennzeichnet. Weltweit gibt es sechs HCV-Genotypen (Typ 1-6). Sequenz-Homologien unter den Genotypen betragen 66-69%, bei den Subtypen 77-80% und 91-98% bei den Isolaten (Simmonds et al. 1995).

Die geographische Verteilung der HCV-Genotypen ist unterschiedlich. Die Genotypen 1, 2 und 3 zeigen eine gehäufte Verteilung vor allem in den USA und West-Europa. 1b kommt oft in Süd-Europa vor. Genotyp 4 und 5 finden sich in Afrika, während Genotyp 6 vor allem in Asien beobachtet wird (Simmonds 1995; Purchell 1997). In Deutschland liegt die Prävalenz des HCV-Typs 1 bei etwa 70% (20% Genotyp 1a, 80% Genotyp 1b), des HCV-Typs 2 um 5% und des HCV-3a bei 17-26% (Berg et al. 1997; HENCORE 1998).

Der Einfluss des Genotyps auf die Pathogenese der Erkrankung wird kontrovers diskutiert (Benvegna et al. 1997; Kobayashi et al. 1996; Mondelli und Silini 1999; Purchell 1997).

Gut belegt ist, dass der Genotyp 1 weniger gut auf eine antivirale Therapie anspricht als der Genotyp 2 und 3 (McHutchison et al. 1998; Poynard et al. 1998; Reichard et al. 1998).

#### **1.2.4 Klinischer Verlauf**

Ausgehend von einer akuten Hepatitis C-Infektion weisen etwa 15% der Patienten einen selbstlimitierten Verlauf ohne Nachweis von anti-HCV-Antikörpern und HCV-RNA auf (Alter et al. 1997). Die Verläufe sind auch nach Chronifizierung zu 80-90% milde und mit Ausnahme von schweren fulminanten Verläufen inapparent. Etwa die Hälfte der Patienten mit chronischer Hepatitis C weisen normale oder nur leicht erhöhte Serumtransaminasen auf, obwohl ausgeprägte entzündliche und fibrotische Veränderungen in der Leber vorliegen können (Hoofnagle 1997).

Prognostisch gesehen, entwickelt sich bei etwa 20-30% der Patienten die HCV-Erkrankung über eine chronisch-progressive Entzündung schließlich nach 20 bis 30 Jahren zu Leberzirrhose und Leberversagen. Die Inzidenz eines hepatozellulären Karzinoms beträgt pro Jahr 3-10% der HCV-assoziierten Leberzirrhose (Di Bisceglie 1995).

Die Zirrhoseentwicklung hängt von zahlreichen „Wirtsfaktoren“ ab, wie Alter zum Zeitpunkt der Infektion, Alkoholkonsum, Koinfektionen mit dem Human-Immundefizienz-Virus (HIV) oder Hepatitis B-Virus (HBV) (Alberti et al. 1997). Die „Virusfaktoren“, wie zum Beispiel Viruslast und HCV-Genotyp, sind dagegen noch umstritten.

### **1.2.5 Antivirale Immunantwort bei Hepatitis C**

Die Immunantwort bei Hepatitis C ist zu Zeit Gegenstand intensiver Forschung und beschäftigt sich vor allem mit der Frage, warum HCV-Infektionen häufig chronifizieren. Bisherige Untersuchungen zeigten bei HCV-Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf eine verstärkte humorale Immunantwort in der Bildung von Antikörper gegen das Core-, NS3- und NS4-Protein und in 97,3 % aller HCV-RNA positiven Patienten Antikörper gegen das glykolysierte rekombinante E2-Hüll-Protein (Lesniewski et al. 1995). Neutralisierende Antikörper werden nur bei etwa 60% der chronisch Erkrankten gebildet (Rosa et al. 1996). Im Gegensatz hierzu findet sich nur eine schwache zelluläre HCV-spezifische Immunantwort.

Patienten mit chronischer Hepatitis C weisen höhere Antikörper-Titer auf, dagegen aber nur schwache T-Zellproliferationsantworten (Spengler et al. 1996). Eine Verschiebung der TH1/TH2-Balance ähnlich wie bei der HIV-Infektion zugunsten der TH2-Population konnte in mehreren Arbeiten beschrieben werden (Clerici et al. 1993; Tsai et al. 1997; Woitas et al. 1996). Es wird aber auch von einigen Autoren ein Mangel an antiviralen Typ 1-Zytokinen propagiert.

Die zelluläre Immunität basiert auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die ihre Zielzellen durch verschiedene Mechanismen schädigen. Diese CTL erkennen kurze Peptide von 8-10 Aminosäurenlänge, die durch MCH-Moleküle der Klasse I auf der Oberfläche von virusinfizierten Zellen präsentiert werden.

Die Sezernierung von lytischer Granula, die Perforin enthalten, bewirkt eine Lyse der Zielzellen über eine Porenbildung in der Zellmembran. Ein weiteres Enzym der Granula, das Granzym, ist eine Serinprotease, die durch Perforin-Kanäle in die Zelle gelangt und dort durch Aktivierung einer Enzymkaskade den Zelltod herbeiführt.

Das FAS-System bestehend aus einem membranständigen Effektormolekül FAS-Ligand, das sich auf der Oberfläche der CTL befindet, und dem FAS-Rezeptor, der zur Familie der TNF-Rezeptoren zählt, induziert über eine Aktivierung von proteolytischen Enzyme, sogenannte Caspasen, eine Apoptose der Zelle.

Durch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und IFN $\gamma$  werden infizierte Zellen lysiert. Es wird vermutet, dass diese Zytokine das umgebende gesunde Parenchym mitzerstören. Es kommt zum sogenannten „bystander killing effect“ (Ando et al. 1997) und zu einer Ausweitung des chronischen Entzündungsprozesses mit der möglichen Folge einer Leberzirrhose. IFN- $\gamma$  hat neben der direkten Wirkung auf HCV-infizierte Zellen auch immunmodulatorisch antivirale Effekte, indem die virale Replikation gehemmt wird.

HCV-spezifische zytotoxische T-Zellantworten gegen HCV-Proteine und HCV-Peptide sind beschrieben worden (Bruna-Romero et al. 1997; Nelson et al. 1997). Die identifizierenden CTL erkennen sowohl Epitope in den variablen als auch konservierten Regionen der HCV-Proteine. Sie kommen vermehrt in Lebern von chronisch HCV-Erkrankten vor (Koziel und Walker 1997). Dies deutet daraufhin, dass trotz der Anwesenheit dieser CTL eine ausreichende Wirkung bei der Viruseliminierung nicht erfolgt. Ihr Auftreten scheint die Pathogenese der Leberzellschädigung zu beeinflussen. Andererseits belegen Studien an Patienten mit akuter Hepatitis C, dass eine starke T-Helferzell-Antwort gegen virale Antigene im frühen Stadium ein wirksamer Faktor für eine erfolgreiche Bekämpfung des Virus ist (Diepolder et al. 1995; Misale et al. 1996). Das Immunsystem selbst bei Patienten mit chronischer Infektion kann eine gewisse Kontrolle über das Hepatitis C-Virus ausüben (Spengler et al. 1996). Dafür spricht, dass die meisten chronischen Virusträger keine Anzeichen einer schweren Leberzellschädigung aufweisen (Alter H.J. et al. 1997; Hoofnagle 1997).

Interessanterweise zeigen Patienten mit zunächst stabiler Hepatitis C nach Immunsuppression, wie zum Beispiel bei einer HIV-Neuinfektion, einen zunehmend beschleunigten Verlauf mit Leberversagen (Eyster et al. 1993). Ähnliche Beobachtungen konnten auch nach Organtransplantationen und bei Patienten mit Hypogammaglobulinämie gemacht werden (Bjoro et al. 1994; Lim et al. 1994).

### **1.2.6 Therapie bei HCV**

Die derzeitige Behandlung der Hepatitis C-Infektion mit Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) in Kombination mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin (Rebetol®) ist noch unbefriedigend, denn 80% der Patienten mit einer primären Ansprechrate erleiden nach 6 Monate einen Relaps. Die hohe Quote der „Non-Responder“ von etwa 40% zeigt, dass es an neuen Ansätzen in der Therapie der HCV-Infektion bedarf, zumal neuere Studien mit einer solchen Standardbehandlung bei HIV/HCV-Koinfizierten noch schlechtere Ansprechraten zeigen. Viel versprechend scheint die neue Kombinationstherapie mit Interferon  $\alpha$ -2b ( $3 \times 3$  IE/ Woche) und Ribavirin (1000-1200 mg/täglich) zu sein, welche in den USA seit Sommer 1998 eingesetzt wird.

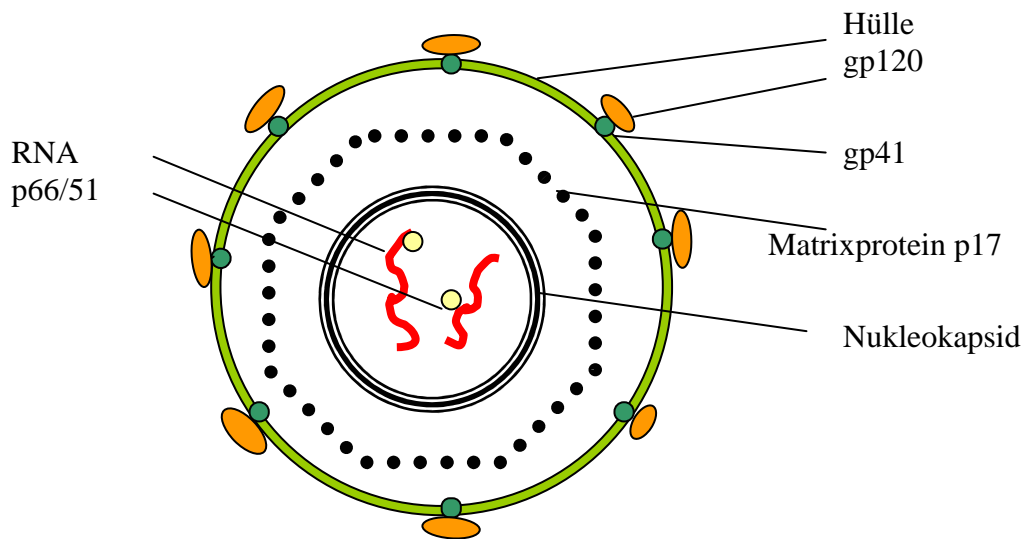
## **1.3 Das Human-Immundefizienz-Virus**

### **1.3.1 Aufbau des HIV-Genoms**

Das „human deficiency virus“ (kurz HIV genannt) ist neben dem „human T-cell leukemia virus“ (HTLV) ein für Menschen pathogenes Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Viren aus dieser Gruppe sind durch eine persistierende Virämie und eine lange klinische Latenzzeit geprägt. Es lassen sich zwei Typen, das HIV 1 und das HIV 2, unterscheiden.

Das HIV ist ein Ikosaeder. Seine äußere Hülle besteht aus einer Doppellipid-Membran, die sich aus 72 kugelförmigen „Andockproteinen“, dem Hüllprotein gp120 (engl. spike of envelope) und dem transmembranen gp41 (gp= Glykoprotein), zusammensetzt (Abb. 3). Das Nukleokapsid (Viruskernmembran) umfasst die Proteine p24, p17, p9 und p7, die aus der proteolytischen Spaltung des vom gag-Gen kodierenden Vorläuferproteins p53 durch die HIV-Protease hervorgehen. Im Viruskern befinden sich zwei Kopien des einsträngigen ca. 9-Kilobasen großen RNA-Genom sowie zwei wichtige Enzyme des pol-Gens, die reverse Transkriptase und die Protease.

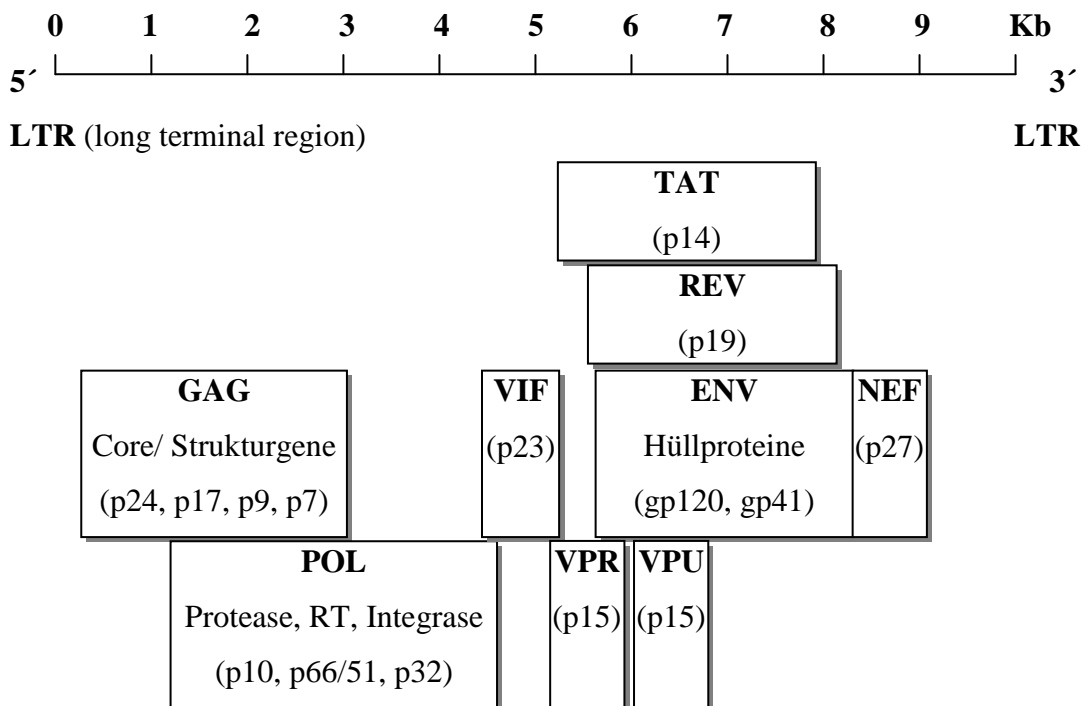
Das Genom umfasst 9 Gene, nach deren Funktion man sie zu den Struktur- bzw. Regulatorgenen zählt (Tab. 1).



**Abb. 3:** Aufbau und Genomorganisation des HIV.

Gen	Funktion
<b>Strukturgene:</b>	
<b>gag (p9, p7?)</b>	
p53	Nukleokapsid, Vorläuferprotein von p24, p17, p9, p7 (HIV Protease)
p17	Matrixprotein
p24	Kapsidprotein
<b>pol</b>	Polymeraseregion, (Zelluläre Protease)
p66/51	reverse Transkriptase
p32	Integrase
p10	HIV-Protease
<b>env</b>	
gp160	Glykoprotein, Vorläuferprotein von gp120, gp41 (Zelluläre Protease)
gp120	Oberflächenprotein (Bindung an CD4-Molekül der Wirtszelle)
Gp41	Transmembranprotein

<b>Regulatorgene für Virusreplikation:</b>	
<b>tat (essentiell), p14</b>	Aktivatorprotein für die Exprimierung aller viralen Gene durch Bindung an TAR-Region im LTR
<b>rev (essentiell), p19</b>	Umschalten von früher (splicing von env und Herstellung von Regulatorprotein) zu später Proteinsynthese (Herstellung von Strukturproteinen)
<b>nef, p27</b>	Hemmung der viralen Transkription durch Bindung an LTR; Einfluss auf T-Zell-Aktivierung
<b>vif, p23</b>	Erhöhung der Infektiösität des Viruszusammenbau
<b>vpr, p15</b>	Zusammen mit Matrixprotein Aufnahme der cDNA in Zellkern; Steuerung der Replikationsgeschwindigkeit
<b>vpv</b>	nur bei HIV 2: Replikationsgeschwindigkeit
<b>vpu, p15</b>	nur bei HIV 1: Virusfreisetzung; Hemmung der Synzytiumbildung; Degradierung des CD4-Molekül im ER



**Tab. 1:** Überblick über Struktur- und Regulatorgene bei HIV.

## **1.3.2 Der Lebenszyklus von HIV**

### **1.3.2.1 Bindung an Zielzellen und Fusion**

Die wichtigsten Zielzellen von HIV sind CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Bei der Infektion interagieren das HIV-Hüllprotein gp120 mit dem CD4-Oberflächenmolekül und bewirken eine Verschmelzung der Lipidhülle des Virus mit der Zellmembran. Dabei wird unter Verlust des „envelope“ der Viruskern in das Zytoplasma gegeben. Für diese Virusinkorporation spielen je nach Virusstamm unterschiedliche Ko-Rezeptoren auf der Wirtszellmembran eine wichtige Rolle. Fusin bzw. CXCR4 vermitteln die Infektion von Zellen mit sogenanntem T-Tropismus, d. h. es werden T-Zelllinien infiziert, CCR-5 die Infektion von Makrophagen/Monozyten (M-Tropismus). Unmittelbar nach einer primären HIV-Infektion haben M-trope Virusstämme einen Selektionsvorteil gegenüber T-Stämmen. Der Grund hierfür ist derzeit noch unklar, jedoch scheinen diese Virusstämme sich besser in einem noch immunkompetenten Organismus durchsetzen zu können.

Mutationen der für die Korezeptoren kodierenden Genabschnitte stellen insbesondere im Falle der CCR5-D32 Mutation einen starken relativen Schutz gegenüber der HIV-Infektion dar.

### **1.3.2.2 Reverse Transkription**

Nach der Aufnahme des Virus in das Zellzytoplasma beginnt die reverse Transkriptase das einsträngige RNA-Virusgenom in einen DNA-Doppelstrang umzuschreiben (RNA-abhängige DNA-Synthese). Der provirale DNA-Doppelstrang wird in den Zellkern transportiert und dort von der HIV-Integrase in das Wirtsgenom eingebaut.

Die reverse Transkriptase ist ein heterodimeres Enzym, bestehend aus zwei Untergruppen p66 und p51, das mit einer sehr geringen Genauigkeit arbeitet, so dass es während eines Replikationszyklus zu Mutationen in der entstehenden DNA-Kopie kommt. Es wird geschätzt, dass etwa 5-10 Fehler auf 9,5 Kilobasen RNA-Länge auftreten. Bei einem Virusumsatz (viral turnover) von  $10^9$  Viruspartikeln entstünden ca.  $10^4$ - $10^5$  Punktmutationen pro Tag 99% der zirkulierenden Viruspartikeln stammen von neu infizierten Zellen innerhalb einer Woche, 40% vom vorangehenden Tag. Auf diese

Weise entsteht innerhalb kürzester Zeit eine Vielzahl von lebensfähigen Mutanten. Es ist anzunehmen, dass vor einer antiretroviralen Therapie bereits resistente Stämme gegen die verfügbaren Medikamente vorliegen.

### **1.3.2.3 Expression der Gene**

Die Replikation in infizierten Zellen beginnt mit der Expression der Regulatorgene *tat*, *rev* und *nef*, *tat* ist ein potenter Aktivator für die Expression aller viralen Proteine und wäre ein Ansatzpunkt für eine medikamentöse Therapie. Jedoch wurden klinische Anwendungen mit einem *tat*-Inhibitor wegen fehlender Wirksamkeit abgebrochen.

Erst in der zweiten Phase des Replikationszyklus werden die Strukturgene exprimiert. Die Produkte von *gag* und *pol* bilden dabei den Viruskern, während die Produkte der *env*-Gene die äußere Hülle bilden. Die proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine *pol* und *env* erfolgt durch eine zelluläre Protease, die von *pol* durch die HIV-Protease.

### **1.3.2.4 Entstehung infektiöser Viren**

Der Viruskern mit der HIV-RNA, dem *gag*-Vorläuferprotein sowie den Virusenzymen werden im Zytoplasma „unterhalb“ der Zellmembran zusammengesetzt. Danach durchdringt der Viruskern-Komplex die Zellmembran und erhält dabei eine Lipidhülle mit den Virushüllproteinen gp120 und gp41. Erst im darauffolgenden Schritt werden unter Aktivität der HIV-Protease die funktionsfähigen *gag*-Proteine (p24, p17, p9, p7) gespalten. Damit ist der Zyklus abgeschlossen, und die reifen, infektiösen Viren können von neuem CD4+-Zellen infizieren.

### **1.3.3 Klinischer Verlauf**

Nach einer Primärinfektion mit dem HIV kommt es innerhalb von Tagen zu einer massiven Virusreplikation von meist mehr als 1.000.000 HIV-RNA Kopien/ml. Klinisch zeigen sich nur unspezifische Symptome, ähnlich wie die eines grippalen



Infektes. Das Immunsystem führt nach 3-6 Wochen zu einem Rückgang der Viruslast. Gleichzeitig lassen sich im Plasma Antikörper nachgewiesen.

Da eine vollständige Viruseliminierung nicht erreicht wird, etabliert sich eine persistierende Infektion, die vor der Zeit der antiretroviralen Therapie in 50% der Patienten nach 10 Jahren zum Stadium AIDS führte. Während dieser Zeit kommt es zum Absinken der CD4-Zellen mit gleichzeitigem Anstieg der HIV-Viruslast. CD4-Zellen sind Surrogatmarker, die Aussagen über den etwaigen Krankheitsabschnitt der Immunschwäche erlauben, dagegen gibt die HIV-RNA-Last Hinweise über die Progression und Geschwindigkeit der Erkrankung (Mellors 1997).

Nach Auftreten von AIDS, definiert durch die „C-Erkrankungen“ der CDC-Klassifikation, beträgt die Lebensdauer 0,5-2 Jahre.

### **1.3.4 Antivirale Immunantwort bei HIV**

Die antivirale Antwort bei der HIV-Infektion hängt von vielen Faktoren ab, zum einen von den Virusfaktoren, welche Replikationsgeschwindigkeit, Mutationsverhalten und Zellpathogenität des Virus umfassen, zum anderen von Wirtsfaktoren. Die Untersuchung von Wirtsfaktoren ist Gegenstand intensiver Forschung. Unterschiedliche Mediatoren nehmen Einfluss auf die Virusreplikation. So wurde nachgewiesen, dass GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  die Virusreplikation in T-Zellen sowie Makrophagen aktivieren. Erstaunlicherweise werden diese aktivierenden Mediatoren nur von B-Zellen produziert (Molina 1993). Andere Zytokine, wie IFN- $\alpha$ , und Suppressorsubstanzen, die unter anderem von CD8+-Zellen synthetisiert werden, sind potente Inhibitoren der HIV-Replikation.

Die Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  sind Liganden für den  $\beta$ -Chemokinrezeptor 5 (CCR5); sie reduzieren die Virusreplikation, indem sie die Infektion von Zellen durch Viren mit M-Tropismus behindern.

### 1.3.5 Therapie bei HIV

Wann mit einer Therapie angefangen wird, hängt im Wesentlichen von dem Verlauf der HIV-Infektion, symptomatisch oder asymptomatisch, und von der Höhe der Viruslast ab. Den Empfehlungen der Deutsch-Österreichischen-Richtlinien I und II zufolge, sollten alle symptomatischen HIV-Verläufe sofort therapiert werden. Bei asymptomatischem Verlauf „bestimmen“ die Laborwerte das weitere Prozedere: hierbei sollte die Therapie bei  $CD4 < 300/\mu L$  und einer HIV-RNA  $> 50.000$  Kopien/mL begonnen werden. Das Therapieziel ist die Viruslast unter die Nachweisgrenze zu senken. Die heutige Therapie stützt sich auf zwei Prinzipien, erstens Hemmung der Reversen Transkriptase durch Nukleosid-Analoga (RT-Inhibitoren) oder durch Non-Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) und zweitens durch Protease-Inhibitoren (PI).

Die Wahl der Therapieart hat sich in den letzten Jahren mit der Entwicklung der Medikamente geändert. Eine Monotherapie mit Inhibitoren der RT in den Jahren 1987-1990 zeigte keine effektiven Langzeitergebnisse, da Resistenzentwicklungen schon nach kürzester Zeit auftraten. Die Entwicklung ging über eine 2er-Kombination mit AZT und 3TC schließlich im Jahre 1996 zur Einführung der hochwirksamen antiretroviralen Therapie (HAART). Diese Therapieform umfasst eine Kombination von zwei Nukleosid-Analoga und einem Protease-Inhibitor. Mit diesem Therapieregime konnte die Viruslast unter die Nachweisgrenze gesenkt und die CD4-Zellzahl gesteigert werden. Dadurch ließ sich die HIV-assoziierte Morbidität um mehr als 50% senken.

Eine solche hochwirksame Therapie mit einem Protease-Inhibitor weist andererseits viele Langzeittoxizitäten auf, die dazuführen, dass oft ein Therapiewechsel erfolgen muss. Nur 30% der Behandelten bleiben nach 2 Jahren der Behandlung bei ihrer Ausgangstherapie (Rockstroh).

Es können Diabetes mellitus, Hypertriglyzerid-/Cholesterinämie, gastrointestinale Störungen, Osteoporose, Nierensteine (Indinavir) auftreten. Ein weiterer Nachteil ist der rasche Abfall des Plasmawirkspiegels der Protease-Hemmer.

Bei guten CD4-Zellzahlen werden deshalb auch zwei Nukleosid-Analoga mit einem Non-Nukleosid-RTI kombiniert, um Komplikationen der Protease-Hemmer zu vermeiden.

## 1.4 Gliederung des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem muss sich ständig mit den unterschiedlichsten Pathogenen aus der Umwelt auseinandersetzen. Dafür stehen ihm die spezifische, sowie die unspezifische Immunantwort zur Verfügung. Diese können entweder humorale (Antikörper, Komplement) oder zellulärer Art (Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten) sein. Welche Antwort letztlich zur Infektabwehr beschritten wird, hängt von der Art des Erregers (Bakterien, Viren, Parasiten, etc.) und vom Sitz des Pathogens (intra- bzw. extrazellulär) ab (Tab. 2).

	<b>Antigen spezifisch (erworbene, adaptive Immunität)</b>	<b>Antigen unspezifisch (angeborene Immunität)</b>
<b>humoral</b>	Antikörper, B-Lymphozyten	Komplementsystem
<b>zellulär</b>	T-Lymphozyten	Monozyten-Makrophagen System (MMS) Granulozyten, NK-Zellen

**Tab. 2:** Gliederung der wichtigsten Systeme des Immunsystems.

### 1.4.1 B-Lymphozyten

B-Zellen repräsentieren etwa 5-15% der zirkulierenden lymphatischen Zellen. Ihnen wird die humorale Immunantwort zugeschrieben. Auf ihrer Zelloberfläche präsentieren sie produzierte IgM und IgD-Antikörper (engl. B-cell-receptor, BCR), die bei Kontakt mit einem Antigen entweder zu Gedächtniszellen oder Plasmazellen reifen. Diese sind in der Lage große Mengen an löslichen Antikörpern der gleichen Spezifität wie die der stimulierten B-Zelle zu produzieren. Diese vermitteln verschiedene antikörpervermittelte Abwehrmechanismen, wie die Aktivierung des Komplementsystems, die Anlockung von Makrophagen sowie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Neben diesen Immunglobulin-Isotypen verfügen B-Zellen über eine Reihe anderer Rezeptoren, die bei der Interaktion mit anderen Immunabwehrsystemen eine Rolle spielen, z. B. Antigenpräsentation mittels MHC-

Klasse-II-Antigene für T-Zellen, Komplementrezeptoren, Fc-Rezeptoren für exogenes IgG.

### **1.4.2 T-Lymphozyten**

T-Zellen entwickeln sich aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks, die sich zu einer lymphatischen Vorläuferzelle differenziert. In der weiteren Entwicklung im Thymus, daher der Name T-Lymphozyt, kommt es zu einer Aussonderung von selbstreaktiven T-Zellen und zur Reifung von zwei restringierten T-Subtypen, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen (engl. Major Histocompatibility Complex). MHC-Moleküle sind für die Präsentation der Antigene entscheidend und werden in zwei Klassen eingeteilt: MHC-I- und MHC-II-Moleküle. Dabei erkennen die Gruppe der T-Helferzellen (CD4+) das Antigen in Verbindung mit einem MHC-II-Molekül, die der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) zusammen mit dem MHC-I-Molekül.

Im Gegensatz zu B-Lymphozyten erkennen T-Lymphozyten über ihren T-Zellrezeptor (TCR) nur Peptidfragmente. Daher spielen die Antigenprozessierung und Präsentation durch sogenannte antigenpräsentierende Zellen (engl. APC) eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der T-Zellantwort.

T-Helferzellen (TH, CD4+) sezernieren eine Reihe löslicher Effektormoleküle (Zytokine), die Einfluss auf weitere immunkompetente Zellen nehmen. Nach ihrem Zytokinmuster werden zum einen TH1-Zellen differenziert, die eine zellvermittelte proinflammatorische, zytotoxische Immunantwort durch CD8-Zellen und die eine Aktivierung von Makrophagen bewirken. Zum anderen gibt es TH2-Zellen, die eine humorale Antwort in Form einer B-Zellaktivierung und damit Antikörperproduktion induzieren.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, CD8+) sind in der Lage nach Stimulation durch Freisetzung von zytotoxischen Granulainhalten (Perforine) ihre Zielzelle direkt zu schädigen. Sie wirken, was die Entzündungsreaktion betrifft, suppressiv.

### **1.4.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

Zu dieser Gruppe werden per Definition Lymphozyten gezählt, die keine üblichen Oberflächenantigenrezeptoren (TCR oder Immunglobulin) tragen. Sie können mittels monoklonale Antikörper gegen CD16 (FC $\gamma$  RIII) nachgewiesen werden. Ihre zytotoxische Aktivität beruht vorwiegend auf der antikörperabhängigen-zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) und wird von dem Rezeptor für IgG vermittelt.

### **1.4.4 Antigenpräsentierende Zellen (APC)**

Eine Vielzahl von Zellen besitzen die Fähigkeit Antigene zu präsentieren. Sogar nichtleukozytäre, epitheliale oder endotheliale Zellen, können unter Einfluss von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  diese Eigenschaften erwerben. Voraussetzung ist eine Induktion von MHC-II-Molekülen. Klassische antigenpräsentierende Zellen (engl. antigen presenting cells, APC) sind Langerhans-Zellen in der Haut, interdigitierende Zellen in T-zellabhängigen Arealen sowie follikuläre dendritische Zellen in B-Arealen der Milz und der Lymphknoten, B-Lymphozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen (Tab. 3).

Interdigitierende dendritische Zellen scheinen die effektivsten Zellen der primären Immunantwort zu sein, da sie im Gegensatz zu Makrophagen eine stärkere Proliferation der T-Helferzellen bewirken (Feldman et al. 1989).

B-Lymphozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch bei geringen Antigenkonzentrationen noch sehr wirksam Antigene erkennen und binden. Dies hängt mit den hochaffinen spezifischen Immunglobulin-Rezeptoren (IgM, IgD) zusammen, die nach Bindung des Antigens durch Endozytose aufgenommen und zu kleinen Peptiden prozessiert werden. Schließlich erfolgt die Antigenpräsentation gekoppelt an Klasse-II-MHC.

Monozyten und Makrophagen sind unter den präsentierenden Zellen die „professionelleren“, phagozytierenden Zellen des menschlichen Organismus. Sie gehören dem sogenannten mononukleären Phagozytensystem an (früher auch als „retikuloendotheliales System“, RES genannt).

### 1.4.4.1 Mononukleäres Phagozytensystem

Monozyten/Makrophagen gehen aus einer myeloischen Stammzelle des Knochenmarks hervor. Sie entwickeln sich aus der koloniebildenden Einheit Granulozyten-Monozyten (CFU-GM) unter dem Einfluss von IL-3, GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor) und M-CSF. Über das Zwischenstadium der Promonozyten entwickeln sie sich zu reifen zirkulierenden Monozyten. Bei Einwanderung in Organen und Gewebe werden sie zu Makrophagen.

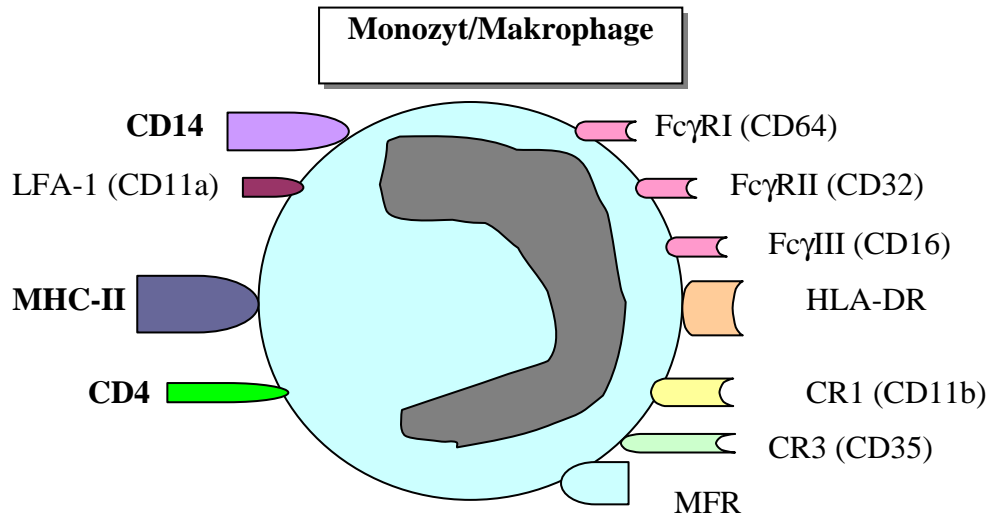
	Phagozytose	Art	Herkunft	Klasse-II-Expression
<b>Phagozyten (Monozyten-Makrophagen-System)</b>	+	Monozyten Makrophagen Randzonenmakrophagen Kupfer-Sternzellen Mikroglia	Blut Gewebe Milz/Lymphknoten Leber Gehirn	(+) → +++ induzierbar
<b>nichtphagozytierende antigenpräsentierende Zellen</b>	-	Langerhans-Zellen Interdigitierende dendritische Zellen (IDC)	Haut Lymphatisches Gewebe	++ wesentlich
		follikuläre dendritische Zellen	Lymph. Gewebe	-
<b>Lymphozyten</b>	-	B- und T- Zellen	Lymphatisches Gewebe und am Ort der Immunreaktion	- → ++ induzierbar
<b>fakultativ antigenpräsentierende Zellen</b>	+	Astrozyten	Gehirn	induzierbar
	-	Follikuläre Zellen	Schilddrüse	induzierbar
		Endothel Fibroblasten andere Arten in entsprechendem Gewebe	Gefäßgewebe Bindegewebe	- → ++

**Tab. 3:** Antigenpräsentierende Zellen (Roitt et al. 1995, Kurzes Lehrbuch der Immunologie 3., neubearbeitete Auflage).

Ein Blutmonozyt ist mit einem Durchmesser von 10-18µm im Vergleich zu einem Lymphozyt (Durchmesser von 6-10µm) eine große Zelle. Sein Nukleus ist hufeisenförmig und in seinem Zytoplasma zeigen sich viele Lysosomen, die Peroxidase und mehrere Säurehydrolasen. Diese sind für die intrazelluläre Prozessierung der phagozytierten Pathogene wichtig (Abb. 4).

Um antigene Strukturen zu erkennen, besitzt der Monozyt eine Reihe von Rezeptoren, zum Beispiel Fc-Rezeptoren zur Bindung von IgG, Komplementrezeptoren (CR), LFA-1 (engl. leucocyte function antigen). Immunhistochemisch lassen sich Monozyten vor allem an dem CD14-Rezeptor identifizieren. CD14 ist ein Rezeptor für das lipopolysaccharidbindende Protein, das normalerweise im Serum vorhanden ist und gramnegative Bakterien umhüllt.

Zusätzlich tragen Monozyten und Makrophagen Rezeptoren für Zytokine wie IL-4, IFN-γ und den Migrationshemmfaktor. Sie können selber bei Aktivierung einige Zytokine (Monokine) wie IFN, IL-1 und TNF-α bilden.



**Abb. 4:** Die wichtigsten Oberflächenmarker auf Monozyten/Makrophagen des Menschen (Roitt et al. 1995).

## **1.5 Zytokine**

Zytokine (Lymphokine, Monokine und Interleukine eingeschlossen) sind hormon-ähnliche Peptide bzw. Glykopeptide. Sie werden von immunkompetenten Zellen für ihre Interaktion mit anderen Zellen sezerniert. Die Wirkung kann sowohl parakriner als auch autokriner Art sein.

Oft genügen Konzentrationen im Bereich eines Femtomoles ( $10^{-15}$ ) zur Erzielung einer spezifischen Wirkung. Bei der Bindung an die hochaffinen Zelloberflächenrezeptoren wird eine Signalkaskade mit der Induktion von bestimmten Genen und Proteinen über sogenannte „second messenger“ in Gang gesetzt.

Im folgenden Abschnitt soll die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Monokine näher auf ihre Wirkungsweise im Rahmen der Infektabwehr charakterisiert werden (Tab. 4).

### **1.5.1 Interleukin-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  ist ein starkes endogenes Pyrogen (EP) und ein wichtiger Mediator der unspezifischen, proinflammatorischen Entzündungsreaktion. Es wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet. Andere Quellen sind unter anderem T-/B-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen und Fibroblasten.

IL-1 $\beta$  geht aus der Spaltung eines 33 kD-Vorläuferproteins hervor und hat ein Molekulargewicht von 17,5 kD. Sein Wirkungsspektrum ist lokaler und systemischer Art. In der Leber induziert es als Reaktion auf ein Trauma oder eine Infektion die Produktion von Akut-Phase-Proteinen.

Die Hauptwirkung von IL- $\beta$  ist die Stimulation von T-Helferzellen zur Produktion und Sekretion von IL-2 und die Expression von IL-2 Rezeptoren. IL-2 wurde ursprünglich als T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) bezeichnet. Des Weiteren werden B-Zellen zur Proliferation und zur Freisetzung von Immunoglobulinen angeregt. Andere Wirkungsbereiche von IL-1 $\beta$  sind unter anderem die NK-Zell-zytotoxische Aktivität, die Steigerung des Arachidonsäure-Metabolismus (Prostaglandine, PGE<sub>2</sub>) bei Makrophagen und inflammatorischen Zellen.



### **1.5.2 Interleukin-6**

Das ca. 26 kD schwere IL-6 gilt als ein multifunktionales Zytokin, das auch als B-Zell-differenzierender (BSF-2)- oder hepatozytenstimulierender (HSF)-Faktor bezeichnet wird. Gleichzeitig werden ihm bei der Initiierung von protektiven Mechanismen zur Limitierung des Gewebeschadens eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Seghal 1990), so dass man es zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählt.

Die Bildung von IL-6 erfolgt in lymphoiden Zellen und in zahlreichen Körperzellen wie zum Beispiel Fibroblasten und Endothelzellen. Seine Hauptwirkung ist die Induktion der B-Zell-Differenzierung zu antikörperperformierenden Zellen (AFC). Außerdem fördert IL-6 wie IL-1 $\beta$  die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber.

### **1.5.3 Interleukin-10**

IL-10 ist ein 18 kD schweres Zytokin, welches hauptsächlich von TH2-Zellen produziert wird. Es wird außer von TH2- auch von B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Keratinozyten und Mastzellen sezerniert. Sein kodierendes Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert.

Die Wirkung von IL-10 ist humoraler und antiinflammatorischer Art, denn IL-10 ist ein potenter Wachstums- und Differenzierungsfaktor für aktivierte B-Zellen (Kawashima I. et al. 1991). Darüber hinaus werden T-Zell-vermittelte, inflammatorische Prozesse von TH1-Zellen durch Synthesehemmung insbesondere von IFN- $\gamma$  und IL-2 unterdrückt, weswegen IL-10 auch früher als „cytokin synthesis inhibitory factor“ (CSIF) bezeichnet wurde (Fiorentino et al. 1991; Moore et al. 1990). Dadurch kommt es zu einer verringerten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Monozyten/Makrophagen und somit zur Einschränkung der T-Zell-vermittelten-Immunantwort. In Bezug auf das Monozyten-/Makrophagensystem führt IL-10 zu einer Inhibition zahlreicher Funktionen mit verminderter Fähigkeit zur Antigenpräsentation (Fiorentino et al. 1991; De Waal Malefyt et al. 1991).

#### **1.5.4 Interleukin-12**

IL-12 ist ein 70 kD schweres heterodimeres Zytokin, welches aus zwei über Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten von 40 kD und 35 kD sich zusammensetzt.

Seine Bildung erfolgt insbesondere in Monozyten und Makrophagen (Trinchieri 1994), aber auch B-Zellen, neutrophile Granulozyten, Keratinozyten sowie andere Zellen können IL-12 sezernieren.

Bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen nimmt IL-12 eine wichtige Rolle ein (Locksley, R.M. 1993), denn es verfügt über starke immunmodulatorische Funktionen in der zellvermittelten Antwort. Die Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion bei TH1-Zellen (Hsieh et al. 1993; Manetti et al. 1993), die zytolytische Aktivität von NK-Zellen (engl.: natural killer cell stimulatory factor, NKSF) und die antigen-abhängige-zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) werden induziert und verstärkt.

Damit kommt der Funktion von IL-12 bei der zellvermittelten Immunantwort hinsichtlich der Regulation der TH1/TH2-Balance eine wichtige Rolle zu. Die Wirkungen von IL-12 und IFN- $\gamma$  sind dabei funktionell eng miteinander verknüpft.

#### **1.5.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  ist ein 17 kD schweres Polypeptid, welches als Multimer aus zwei oder drei identischen Untereinheiten vorliegt. TNF- $\alpha$  kann auch als integrales 26 kD schweres Membranprotein auf den Oberflächen von Monozyten/Makrophagen vorkommen. Durch proteolytischen Abbau des Transmembranteils entsteht die lösliche Form.

Die Hauptquelle des TNF- $\alpha$  sind aktivierte mononukleäre Phagozyten, ebenso können stimulierte T-Lymphozyten, aktivierte NK-Zellen, Mastzellen und Neutrophile dieses Zytokin sezernieren. Die biologischen Aktivitäten von TNF- $\alpha$  als potenter parakriner und endokriner Mediator sind vielfältig und proinflammatorischer, immunregulatorischer Art. Es wirkt synergistisch mit IFN- $\gamma$  und ist an der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen Zellen beteiligt. Des Weiteren hat TNF- $\alpha$  direkt toxische Wirkungen auf Tumorzellen, wie der Name es vermuten lässt.

Zytokine	Ursprungszellen des Immunsystems	Hauptziele	Hauptwirkungen	TH1 / TH2	Inflammatorisch/ Suppressiv
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Monozyten/Makrophagen B-Zellen NK-Zellen	T-/ B-Zellen Makrophagen Endothel Gewebezellen	Lymphozytenaktivierung (LAF) Makrophagenstimulation Pyrexie, Akut-Phase-Proteine Leukozytenadhäsion an Endothel	TH1	proinflammatorisch
<b>IL-6</b>	T-/ B-Zellen Monozyten/Makrophagen	B-Zellen	B-Zell-Differenzierung Akut-Phase-Antwort	TH2	suppressiv
<b>IL-10</b>	T-Zellen (TH2>TH1) Monozyten/Makrophagen	TH1-Zellen	Inhibierung der TH1-Zytokinsynthese	TH2	suppressiv
<b>IL-12</b>	Monozyten/Makrophagen B-Zellen	TH1-Zellen NK-Zellen	TH1-Differenzierung	TH1	proinflammatorisch
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monozyten/Makrophagen Lymphozyten Mastzellen	Makrophagen Granulozyten Gewebezellen	Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten und zytotoxischen Zellen Induktion v. MHC-Klasse-I-Molekülen Akut-Phase-Antwort, Angiogenese, Pyrexie, Leukozytenadhäsion	TH1	proinflammatorisch

**Tab. 4:** Aufstellung der untersuchten Monokine hinsichtlich immunregulatorische und biologische Effekte.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Eine wirksame Anregung zur T-Zellproliferation scheint bei der viralen HCV-Immunabwehr eine wesentliche Rolle zu sein, da sie der Ausgangspunkt zur Vergrößerung des antigenspezifischen T-Zell-Pools ist. Von grundlegender Bedeutung in der Infektabwehr ist das Zusammenwirken von antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen. Antigenpräsentierende Zellen mit Phagozytose-Aktivität, wie der Monozyt, stellen bei der Abwehr den ersten Antigenkontakt her. Ihre wichtige Aufgabe besteht neben der Phagozytose, Aufbereitung des Antigens (Prozessierung) zur Präsentation an T- und B-Lymphozyten auch in der Sekretion von Zytokinen zur Aktivierung derselben (Effektorfunktionen).

Bei einer HCV/HIV-Doppelinfection können alle CD4<sup>+</sup>-Zellen, darunter Monozyten und T-Helferzellen, von HIV infiziert werden (M-trope Stämme). Es gibt aber auch Befunde, wonach CD8-Lymphozyten infiziert werden können (Nat. Med 2001). Durch die Infektion der für die Immunabwehr verantwortlichen immunkompetenten Zellen, einhergehend mit einer Zellzahlabnahme, kommt es zu einem möglichen veränderten Abwehrverhalten der Zelle, wodurch eine Persistenz von HIV und HCV begünstigt wird. Somit kann der Verlauf der Hepatitis C-Erkrankung entscheidend negativ beeinflusst werden.

In vitro-Untersuchungen von Blutmonozyten sind schwierig, aber sinnvoll, da man anhand des Monokinmusters indirekte Rückschlüsse über ihre Effektorfunktionen als phagozytierende Zelle sowie antigenpräsentierende Eigenschaften gewinnen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die Monokininduktion für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  auf die fünf HCV-Antigene Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b bei HIV/HCV-Koinfizierten untersucht werden. Als Kontrollgruppe sollen HIV-Monoinfizierte Patienten dienen. Hierbei sollen mögliche Veränderungen der Ag-spezifischen Antwort bei Monozyten gezeigt werden. Diese können mit der Progression der Hepatitis C-Erkrankung bei Koinfizierten korrelieren.

Im Vorfeld der Hauptuntersuchungen werden Versuche zur Optimierung der Antigenstimulation im experimentellen Ansatz ausgeführt. Zum einen wird die konzentrationsabhängige Zytotoxizität des im Versuch eingesetzten Monensins untersucht, um die optimale Einsatzkonzentration mit einem geringen Zellverlust zu bestimmen. Zum anderen soll die optimierte Inkubationsdauer für die HCV-spezifische Monokinantwort ermittelt werden. Bei den Hauptuntersuchungen wird nach der Methode von Ficoll PBMC aus EDTA-Blut isoliert und inkubiert. Sodann erfolgt die Anfärbung der Monozyten und Darstellung mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie. Spezifitätskontrollen werden mit Puffer, Medium, LPS vorgenommen. Abschließend erfolgt die Beurteilung der klinisch erhobenen Parameter der Patientengruppen hinsichtlich Risikofaktoren, Genotyp, Immunstatus, CD4-counts, Leberwerte in Bezug auf das Endergebnis sowie auf aktuell vorliegende Studienergebnisse.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

- **7-Aminoaktinomycin D**, 1 mg Fa. Sigma, München
- **Ficoll-Trennlösung**, Dichte 1,077 g/cm<sup>3</sup> Fa. Biochrom Seromed, Berlin
- **Golgi Stop TM** (Monensin) PharMingen, Hamburg
- **L-Glutamin** 200 mM Fa. Gibco BRL, Eggenstein
- **Lipopolyssacharide** (LPS) von E.coli Fa. Sigma, München
- **Monensin** 1 g, Natrium- Salz 90-95% Fa. Sigma, München
- **Paraformaldehyd** (PFA) reinst 1 kg Fa. Merck, Darmstadt
- **PBS**, Phosphatpuffer pH 7,5 Apotheke der Universität Bonn
- **Penicillin/Streptomycin** 10.000 U/ml; 10.000 µg/ml Fa. Biochrom Seromed, Berlin
- **Polyglobin**
- **RPMI 1640** mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne Glutamin Fa. Biochrom Seromed, Berlin
- **Saponin** von Quillaja Bark Fa. Sigma, München
- **Trypan-Blau** Fa. Merck AG, Darmstadt

#### 2.1.2 Laborgeräte

- **FACScan** Fa. Becton Dickinson, Heidelberg  
488 nm luftgekühlter Argon-Ionenlaser,  
3 Hochleistungsfotoverteilungsröhrchen  
mit Bandpassfiltern 430 nm, 585 nm, >650 nm
- **Feinwaage** Fa. Sartorius, Göttingen
- **Brutschrank** Fa. Forma Scientific, Ohio
- **Spinchron 14 R Centifuge** Fa. Beckmann, München
- **Lichtmikroskop**, Typ DMIL Fa. Leitz, Nürnberg
- **Mehrkanalpipette** 50-50 µl, 50-200 µl Laborsystem, Frankfurt a. Main
- **Plattenschüttler**, Typ MTS 2 Fa. Janke & Kunkel IKA-Labor
- **Sterilbank**, Typ BSB4A Fa. Flow Laboratories GmbH, Meckenh
- **Vortexer**, Typ Vortex VF2 Fa. J & K IKA-Labortechnik, Staufen

### 2.1.3 Labormaterialien

- **Auslaufpipetten**, einzelverpackt steril, wattiert  
1, 5, 10, 25 ml  
Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- **Biopur-Combitips plus**, steril  
0.5, 1.25, 2.5 ml  
Fa. Eppendorf, Hamburg
- **Kryo-Röhrchen**, Polypropylen,  
2.0 ml, 12.5 × 78 mm  
Fa. Greiner, Frickenhausen
- **Microwell<sup>TM</sup>-Platten**, Nunclon<sup>TM</sup>  
(96 Vertiefungen) Rundboden  
Fa. Nunc, Wiesbaden
- **Pasteur-Einmalpipetten**, Länge 150 mm  
Fa. Brand, Wertheim
- **Pipettenspritzen**  
10-100 µl (gelb), 100-1.000 ml (blau)  
Fa. Eppendorf, Hamburg
- **PP-Röhrchen**  
konisch, 30/115 mm (50 ml) und 17/120 mm (15 ml)  
Fa. Greiner, Frickenhausen
- **Polytyren-Rundboden-Röhrchen**  
ohne Deckel, 12 × 17 mm, 6 ml Kapazität  
Fa. Falcon/ BD, Heidelberg

### 2.1.4 Lösungen

#### 2.1.4.1 Kulturmedium für PBMC

#### Komplettmedium für PBMC

---

- |                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| • RPMI 1640             | RPMI 1640             |
| • 2 mM L-Glutamin       | 2 mM L-Glutamin       |
| • 100E/ml Penicillin    | 100E/ml Penicillin    |
| • 100µg/ml Streptomycin | 100µg/ml Streptomycin |
| • 10% autologes Serum   | -                     |

#### 2.1.4.2 Trypanblau-Farblösung

0,025 %ige Trypanblau-Stammlösung in Ampuwa gelöst

## 2.1.5 Monoklonale Antikörper für Immunzytochemie

### 2.1.5.1 Oberflächenmarker für direkte Fluoreszenzfärbung von Monozyten

Spezifität	Klon / Isotyp	Konjugat	Firma
anti-CD14 Leu <sup>TM</sup> -M3	M P9 / Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	Pharmingen, Hamburg
Maus IgG1		FITC	Pharmingen, Hamburg

### 2.1.5.2 Anti-Human-Zytokinantikörper

Spezifität	Klon / Isotyp	Konjugat	Firma
anti-human IL-1 $\beta$	H9.5 / Maus IgG <sub>1</sub>	PE	Hölzel Diagnost, Köln
Ratte anti-human IL-6	MQ2-6A3 / Ratte IgG <sub>2a</sub>	PE	Pharmingen, Hamburg
Ratte anti-human IL-10	JE 3-19F1 / Ratte IgG <sub>2a</sub>	PE	Pharmingen, Hamburg
anti-human IL-12 (p40/p70)	C11.5.14 / Maus IgG <sub>1</sub>	PE	Pharmingen, Hamburg
Maus anti-human TNF- $\alpha$	Mab 1 / Maus IgG <sub>1</sub>	PE	Pharmingen, Hamburg

### 2.1.5.3 Zytokin-Isotypkontrollen

Spezifität	Klon	Konjugat	Firma
Maus IgG <sub>1</sub>	MOPC-21, $\kappa$	PE	Pharmingen, Hamburg
Ratte IgG <sub>2a</sub>	R35-95	PE	Pharmingen, Hamburg

## 2.1.6 Immunphänotypisierung

### 2.1.6.1 Reagenzien

- **FACS Lysing Solution** (10fach konzentriert) Fa. Becton Dickinson, Heidelberg  
1:10 mit Wasser von Reagenziengüte verdünnen
- **PFA 1%**



- **PBS**

- *Simultest*<sup>TM</sup> *IMK-Lymphocyte*,

Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

	<b>Spezifität</b>	<b>Klon / Isotyp</b>	<b>Konjugat</b>
Reagenz A	CD45 CD14	2D1 / Maus IgG <sub>1</sub> M P9 / Maus IgG <sub>2a</sub>	FITC PE
Reagenz B	Isotyp-Kontrolle	X40 / Maus IgG <sub>1</sub> X39 / Maus IgG <sub>2a</sub>	FITC PE
Reagenz C	CD3 CD19	SK7 / Maus IgG <sub>1</sub> 4G7 / Maus IgG <sub>1</sub>	FITC PE
Reagenz D	CD3 CD4	SK7 / Maus IgG <sub>1</sub> SK3 / Maus IgG <sub>1</sub>	FITC PE
Reagenz E	CD3 CD8	SK7 / Maus IgG <sub>1</sub> SK1 / Maus IgG <sub>1</sub>	FITC PE
Reagenz F	CD3 CD16 + CD56	SK7 / Maus IgG <sub>1</sub> B73.1 / Maus IgG <sub>1</sub> MY 31 / Maus IgG <sub>1</sub>	FITC PE
Reagenz G	CD8 CD38		FITC PE

### 2.1.7 Vollblut und Patientenserum

Die PBMC wurden aus EDTA-Blut (20-24 ml) mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation (Biochrom, Berlin) gewonnen. Die Blut- und Serumproben der Patientenserum wurden von der Immunologischen Ambulanz sowie von der Hämatologischen Ambulanz zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8 Rekombinante HCV-Proteine

Die rekombinanten HCV-Proteine Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b wurden von Fa. Mikrogen (München, Germany) bezogen.

Die für diese HCV-Antigene kodierenden cDNA-Abschnitte waren in Expressionsplasmide kloniert und in E. coli überexprimiert worden, wobei die cDNA mit der HCV-Prototyp Sequenz (Choo 1989) identisch war. Nach der enzymatischen Lyse der Bakterien wurden die als Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) anfallenden Proteine in verschiedenen Waschlösungen resuspendiert, zentrifugiert und anschließend

in 8 M Harnstoff denaturierend gelöst. Die Aufreinigung der Proteine unterschied sich von Antigen zu Antigen und erfolgte mit verschiedenen chromatographischen Trenntechniken und einer anschließenden präparativen SDS-Gelelektrophorese.

Die Proteine wurden in Tris-Glycerinpuffer mit 0,1% SDS gelöst und hatten unterschiedliche Konzentrationen (Tab. 5). Es wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 50 µg/ml für die Versuche angesetzt. Die optimierte Endkonzentration war jeweils 1 µg/ml.

Die Verunreinigung mit bakteriellem Lipopolysaccharid von < 50 pg Endotoxin/ml gilt als unbedenklich für Zellkulturexperimente (Angaben nach Hoffmann et al. 1995). In den Versuchen wurden als Positivkontrollen LPS in den Konzentrationen von 10 µg-200 µg verwendet.

<b>rekombinante HCV-Proteine</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Aminosäure-Position</b>	<b>Größe</b>
<b>Core</b> (E. coli)	350 µg/ml	1-115	14 kD
<b>NS 3</b> (E. coli)	690 µg/ml	1007-1534	70 kD
<b>NS 4</b> (E. coli)	180 µg/ml	1616-1863	27 kD
<b>NS 5a</b> (E. coli)	50 µg/ml	2005-2267	39 kD
<b>NS 5b</b> (E. coli)	50 µg/ml	2621-2868	38 kD

**Tab. 5:** Rekombinante HCV-Proteine mit genauer Angabe der Aminosäurepositionen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patientengruppen**

Die durchgeführten Untersuchungen wurden vergleichend an anti-HIV seropositiven Patienten ohne klinischen Anhalt einer chronischen HCV-Infektion (Gruppe B) sowie alters- und geschlechtsentsprechenden Patienten, die anti-HIV seropositiv waren und gleichzeitig eine chronische Hepatitis C aufwiesen (Gruppe A), durchgeführt.

Es handelte sich hierbei um Patienten, die sich zur Verlaufskontrolle entweder in der Hämophilie-Ambulanz des Institutes für experimentelle Bluttransfusion oder in der Immunologischen-Ambulanz vorstellten. Alle Patienten wurden vor der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Blutentnahme.

Die Charakterisierung der Patienten wurde hinsichtlich Infektionsdauer, Risikofaktoren für eine HIV- bzw. HCV-Infektion und bezüglich des HCV-Virustyps (Gruppe A) durchgeführt. Zur Einschätzung der HCV-assoziierten Lebererkrankung wurden die Serumtransaminasen (GT, AST, ALT) und die HCV-RNA-Viruslast erfasst. Der Immunstatus diente zur Ermittlung der Monozytenfraktion, der T-Helferzellen (CD4+) und der zytotoxischen Zellen (CD8+). Neben diesen Bestimmungen gaben die HIV-RNA Kopienzahl sowie die HIV-Therapieart Informationen über das jeweilige Stadium der Immunschwächekrankheit der untersuchten Patienten an.

Die Gruppe A (HIV/HCV-Koinfizierte; Tab. 6) umfasste 31 Patienten, davon waren 7 Patienten weiblich (22,6%) und 24 männlich (77,4%) (Tab. 8). Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 39,1 Jahre (Spannweite 31-54 Jahre). Zum Zeitpunkt der Untersuchung fanden sich signifikant erhöhte AST- ( $p \leq 0,02$ ) und ALT-Werte ( $p \leq 0,005$ ) verglichen zur Gruppe B, der Median für AST war 24,7 U/L (Spannweite 9-97,5 U/L) und für ALT 37,8 U/L (Spannweite 8-149 U/L) waren fast doppelt so hoch wie in Gruppe B.

Die HIV-Infektionsdauer betrug im Mittel 13 Jahre ( $p \leq 0,0002$ ), die HIV-Viruslast 3600 Kopien/ml und die HCV-Viruslast 733 Kopien/ml.

Der Immunstatus zeigte einen prozentualen Monozytenanteil am Gesamt-Leukozytenzahl von 6% ( $p < 0,005$ ) und die CD4-Zahl betrug 311 Zellen/ $\mu$ l.

Bei der HCV-Genotypisierung mit Hilfe des INNO-LIPA-Tests (Innogenetic, Gent, Belgien) hatten 8 Patienten (40%) den Genotyp 1 (1a-25,8%; 1a/1b-3,2%; 1b-12,9%), 4 Patienten (13%) den Genotyp 2 (2a/2b-6,2%; 2b-6,2%), 4 Patienten den Genotyp 3a (12,9%) und 1 Patient den Genotyp 4c/4d (3,2%). Für 6 Patienten wurde der Genotyp nicht bestimmt, 3 wiesen keine Antikörper gegen eines der HCV-Typen auf.

Von den Patienten bekamen 6 (19,3%) eine hochwirksame antiretrovirale Therapie (HAART) mit einem Protease-Inhibitor (Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir), 21 Patienten (67,7%) eine Dreifachkombination mit zwei Nukleosid-RTI (Zido-/Lamivudin, Didanosin, Stavudin, Abacavir) und einem Non-Nukleosid-RTI (Nevirapin, Efavirenz), und bei 4 Patienten (12,9%) wurde die Therapie aufgrund von Unverträglichkeit oder Erreichen des Therapieziels ausgesetzt. 7 Patienten (22,6%) sprachen auf die Therapie an und wiesen eine HIV-Viruslast unter der Nachweisgrenze von 80 Kopien/ml auf. Nur einer (14,3%) davon bekam HAART.

Zu den häufigsten Risikofaktoren gehörte in 14 Fällen (53,8%) die Hämophilie-Erkrankung, gefolgt von dem i.v.-Drogenkonsum bei 7 Patienten (26,9%). Bei Dreien (11,5%) konnte ein zweifaches Infektionsrisiko durch Hämophilie/Homosexualität und bei jeweils einem für Hämophilie/IVDA und Homosexualität evaluiert werden.

Die Gruppe B (HIV-Monoinfizierte; Tab. 7) bestand aus 19 Patienten, davon waren 4 weiblich (21,1%) und 15 männlich (78,9%). Das mittlere Alter betrug 39,4 Jahren (Tab. 8). Die Serumtransaminasen sind überwiegend normwertig gewesen, nur in 4 Fällen waren erhöhte ALT-Werte festzustellen, wovon zwei auch erhöhte AST-Werte zeigten (Median ALT: 17 U/L, AST: 13 U/L). Die HIV-Infektionsdauer war im Durchschnitt mit 7 Jahren halb so lang wie die Gruppe der Koinfizierten. Die HIV-Viruslast betrug im Median 530 Kopien/ml und war deutlich geringer als in Gruppe A.

Insgesamt 7 Patienten (36,8%) bekamen HAART und 12 (63,2%) eine Dreifachkombinationstherapie (s.o.). Bei 5 Patienten (26%) konnte mit Hilfe der Therapie die Viruslast unter die Nachweisgrenze gebracht werden, drei von ihnen (60%) erhielten als Therapie HAART. Hauptrisikofaktor in dieser Gruppe war zu 85% die Homosexualität.

Code	Sex	Alter (Jahre)	Risikofaktor	Infektionsdauer(Jahre)			HAART	HIV-RNA (Kopien/ml)	HCV-RNA (Kopien/ml)	HCV Genotyp Inno-Lipa II	CD 4		Ratio
				HIV	AIDS	HCV					(Zellen/ml)	%	
1	m	52	Hämo A, IVDA	13		13	nein	3600	200.000	1b	373	21	0,37
2	m	31	Hämo A, HS	12,5		15	nein	39000	656.000	1a, Matrix	265	11	0,2
3	m	41	Hämo A	14		10	ja	3200	4.708.000	2b	137	13	0,19
4	f	45	IVDA	12		5	keine ART	5500	0	Reakt. HCV-Matrix	292	38	1,31
5	f	38		12		2	nein	<80	?	?	1346	32	1
6	m	31		8,5		8	nein	<80	?	Reakt. HCV-Matrix	349	26	0,53
7	m	37	IVDA	13		13	nein	4100	3.437.000	1b	476	26	0,55
8	f	45		2,5			nein	130000	?	?	786	37	0,82
9	m	38	IVDA>20	12		12	ja	4000	?	?	549	22	0,35
10	m	40	HS, C2-Abusus	8,5		19	ja	4500	?	?	363	26	0,41
11	m	32	Hämo A	15		2	ja	27000	74.450.000	1a	10	2	0,04
12	m	32	Hämo A, HS	13		15	nein	<80	?	1a, Matrix	400	14	?
13	f	42	IVDA>10	15			nein	84	4.982.000	1a	85	23	0,57
14	m	39	Hämo A	15			nein	24000	22.940.000	2b	235	18	0,29
15	m	43	IVDA	13			keine ART	4800	221.000	3a	500	33	0,75
16	m	48	Hämo A	14		11	ja	<80	884.000	3a	275	23	0,39
17	m	40	Hämo A	13		12	nein	12000	12.300.000	1a	187	10	0,17
18	f	31	IVDA	5		5	nein	2600	?	Reakt. HCV-Matrix	490	21	0,32
19	m	39	Hämo A			11	?	380	7.911.000	1a	1091	31	0,49
20	m	33	Hämo A			0,3	keine ART	16000	11.550.000	3a	400	22	0,3
21	m	54	Hämo A				nein	2600	72.990.000	2	206	22	0,39
22	m	34	Hämo A	13		11	ja	440	42.240.000	?	431	28	0,5
23	m	37	Hämo A	15		11	nein	2600	77.820.000	1a	174	13	0,18
24	m	32	Hämo A, HS	13		16	nein	<80	557.000	1a, Matrix	386	16	?
25	m	32	Hämo A			11	nein	190	6.741.000	4c/4d	211	20	0,33
26	m	40	Hämo A	5		11	nein	<80	28.090.000	1a	444	18	0,31
27	m	50	Hämo A	10		11	nein	<80	18.480.000	3a	180	12	0,16
28	f	35	IVDA>10	8		2	nein	5700	1.560.000	1b	311	24	0,44
29	f	47		8	7	7	ja	4500	1.018.574	Reakt. HCV-Matrix	102	10	0,16
30	m	31	Hämo A	12		8	keine ART	12000	8.891.000	1b	274	14	0,24
31	m	43		14		4	ja	8700	75.860.000	2a/2c	121	9	0,2

**Tab. 6:** Klinische Befunde der HIV/HCV-Koinfizierten (Gruppe A); Hämo A= Hämophilie A; IVDA= intravenöser Drogenabusus; HS= Homosexualität; C2= Alkoholmissbrauch; ART= antiretrovirale Therapie.

Code	Sex	Alter (Jahre)	Risikofaktor	Infektionsdauer (Jahre)		HAART	HIV-RNA (Kopien/ml)	CD 4		Ratio
				HIV	AIDS			(Zellen/ml)	%	
1	m	44		4,5	5,5	ja	<80	6	1	0,01
2	m	45		11		ja	32.000	536	14	0,29
3	m	42	HS	3		nein	530	129	13	0,2
4	m	40	C2-Abusus	13		Pause	1.800	61	4	0,06
5	m	56		12	6	nein	200	234	11	0,2
6	m	40		7	1,5	nein	7.000	178	11	0,2
7	f	32		7		ja	3.100	231	18	0,25
8	m	44	HS	0,5		nein	<80	87	6	0,11
9	m	39	HS	10		ja	1.300	504	26	0,52
10	f	26		8		ja	<80	255	14	0,25
11	m	51		13		nein	9.200	68	7	0,1
12	f	24		0,5		nein	470	939	43	1,26
13	m	38	HS	8		ja	1.800	402	23	0,39
14	m	45	HS	12		nein	410	496	22	0,41
15	m	37		7	6	nein	43.000	58	2	0,03
16	m	40	HS	6		nein	130.000	84	4	0,09
17	m	30		3		ja	<80	187	15	0,29
18	f	34		4		nein	<80	640	39	0,7
19	m	41		5		nein	280	423	27	0,45

**Tab. 7:** Klinische Befunde der HIV-Patienten (Gruppe B); IVDA= intravenöser Drogenabusus;

HS= Homosexualität; C2= Alkoholmissbrauch.

<b>Patientengruppe</b>	<b>HIV und HCV Infizierte</b>	<b>HIV („matched“) Kontroll-Patienten</b>
<b>Gesamtanzahl (n)</b>	31	19
<b>Alter (Jahre)</b> (Median ± SEM) (Spannweite)	39 ± 1,2 (31-54)	40 ± 1,8 (24-56)
<b>Geschlecht</b> - männlich weiblich	24 (77,4%) 7 (22,6%)	15 (78,9%) 4 (21,1%)
<b>Infektionsdauer (Jahre)</b> (Median ± SEM) <b>HIV</b> <sup>1)</sup> <b>HCV</b>	13 ± 0,6 11 ± 0,6	7 ± 0,9 -
<b>HIV-RNA (Kopien/ml)</b> (Median ± SEM) (Spannweite)	3600 ± 4312,6 0-13 × 10 <sup>4</sup>	530 ± 7074,1 0-13 × 10 <sup>4</sup>
<b>HCV-RNA (Kopien/ml)</b> (Median ± SEM) (Spannweite)	733 ± 556,9 (0-7782)	-
<b>Transaminasen (U/l)*</b> (Median ± SEM) <b>γ-GT</b> <b>GOT (AST)</b> <sup>2)</sup> <b>GPT (ALT)</b> <sup>3)</sup>	24 ± 8,4 24,7 ± 3,4 37,8 ± 5,7	25,2 ± 11,9 13 ± 3,3 17 ± 3,7
<b>Genotyp 1 (n)</b>	13 (41,9%)	-
<b>CD4 (Zellen/μl)</b> <sup>5)</sup> (Median ± SEM)	311 ± 50,2	231 ± 56,7
<b>CD8 (Zellen/μl)</b> (Median ± SEM)	863 ± 83,3	941 ± 80,7
<b>Monozyten (%)</b> <sup>4)</sup> *(Median ± SEM)	6 ± 0,5	8,4 ± 0,5
<b>HAART (n)</b>	6 (19,3%)	7 (36,8%)

\*Referenzbereich für die Laborparameter: γ-GT: 4-28 U/L; AST: 0-19 U/L; ALT: 0-23 U/L;

Monozyten: 2-9%

**Tab. 8:** Patientencharakterisierung der Studiengruppe. Alle Werte sind als Median angegeben. **1)** p<,0002 **2)** p<,02 **3)** p<,005 **4)** p<,005 **5)** p=,0853

## **2.2.2 Methoden zur Charakterisierung der Studienpopulationen**

### **2.2.2.1 Bestimmung der HCV-/HIV-Antikörper**

Die HCV-Antikörper-Bestimmung wurde im Institut für Klinische Mikrobiologie und Immunologie mit einem kommerziell erhältlichen Micropartikel-Enzymimmunoassay ELISA (MEIA) der 2. Generation (Fa. Abbott, Wiesbaden) bestimmt.

### **2.2.2.2 Nachweis der HCV-RNA und Analyse des HCV-Genotypes**

Aus den Serumproben der HIV/HCV-Koinfizierten Patienten (Gruppe A) wurde mit Hilfe des Amplicor-Kits (Fa. Hoffmann LaRoche, Grenzach-Wyhlen) HCV-spezifische cDNA-Fragmente gewonnen (Methode nach Imberti et al. 1991). Danach wurde die cDNA mit einer Taq DNA-Doppelstrang-Polymerase mit 5'-GATGCACGG-TCTACGAGACCTC-3' („antisense“) und 5'-AACTACTGTCTTCACGCAGAA-3' („sense“) als erste Primerpaare und mit 5'-GCGACCCAACACTATACTCGGCT-3' („antisense“) und 5'-ATGGCGTTAGTATGAGTG-3' („sense“) als zweite Primerpaare amplifiziert.

Die HCV-Geno- bzw. Subtypisierung erfolgte anhand des INNO-LIPA (Line Probe Assay) HCV-II-Test-Kits (Fa. Innogenetics, Belgien). Hierbei werden cDNA-Fragmente mit subtypspezifischen Primern der 5'-nichtkodierenden Region auf Teststreifen hybridisiert und anschließend mittels Substratlösung sichtbar gemacht. Es ergeben sich typische Bandenmuster die den Typus jeweils charakterisieren.

6 Genotypen sowie deren Subtypen lassen sich differenzieren Genotyp 1 (1a, 1b), Genotyp 2 (2a/2c, 2b), Genotyp 3 (3a, 3b, 3c), Genotyp 4 (4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h), Genotyp 5 (5a) und Genotyp 6 (6a).



### 2.2.3 Grundlagen der Durchflusszytometrie

#### Prinzip der durchflusszytometrischen Messung

Durchflusszytometrie ist einfach ausgedrückt ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Partikeln bzw. hier in diesem Versuch monozytäre Zellen analysiert und graphisch darstellt. Das Gerät lässt sich in drei Bestandteile gliedern:

1) Flüssigkeitssystem, 2) Optisches System, 3) Signalverarbeitung (Abb. 5).

Dabei müssen die zu analysierenden Partikeln bzw. Zellen als Zellsuspension vorliegen, denn sie werden mit der Trägerflüssigkeit als laminaren Strom durch die Messküvette gesaugt und werden dort von einem Laserstrahl (Argon-Laser, 488 nm) getroffen. Die entstehenden Streulichte/-signale unterschiedlicher Qualität und Fluoreszenz beruhen zum einen auf Zelleigenschaften, wie Querschnittsfläche, Faltung der Membran, Granularität, zum anderen auf Färbereigenschaften.

Das Licht wird nicht in allen Richtungen gleichmäßig gestreut, sondern ist am größten in dem Kleinwinkelbereich ( $0-10^\circ$ ) des einfallenden Lichtes und wird als Vorwärtsstreulicht (engl. Forward-Angle-Light Scatter, FSC) bezeichnet. Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Querschnittsfläche, also Größe, und differenziert außerdem zwischen lebenden und toten Zellen.

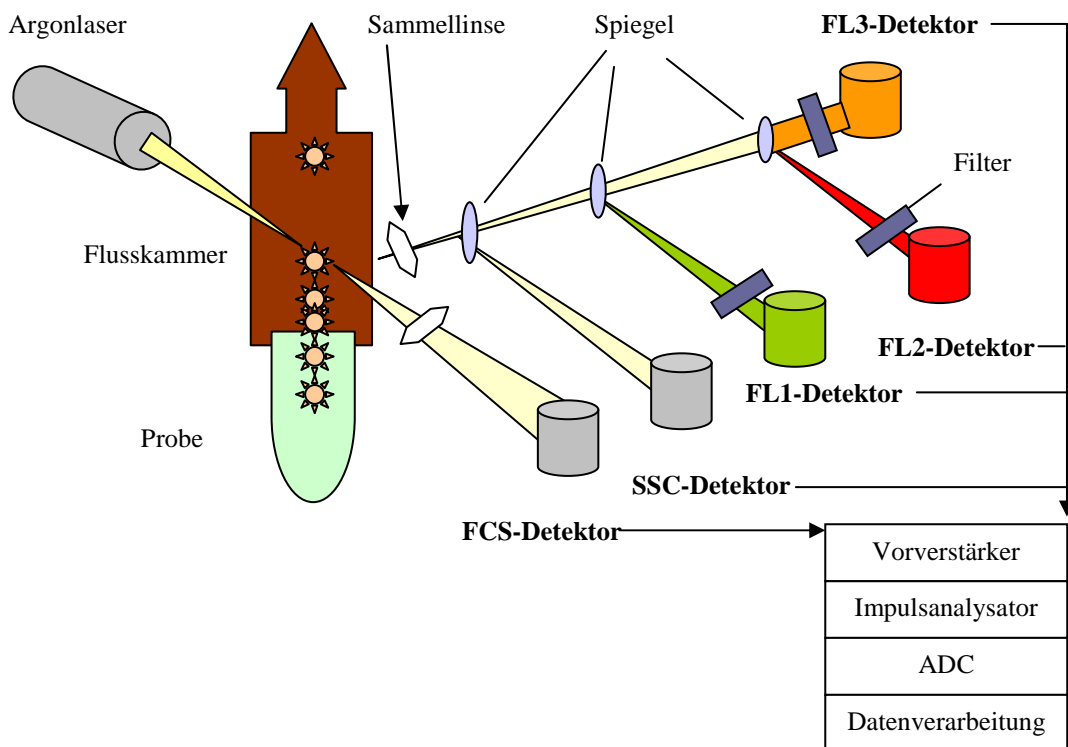
Tote Zellen erscheinen im Durchflusszytometer kleiner als lebende Zellen. Ein geringer Anteil wird als Seitwärtsstreulicht (Sightward-Scatter, SSC) im Winkel von  $90^\circ$  abgestrahlt. Dieses Licht wird von der Granularität, Membranfaltung der Zelle bestimmt.

Die zu untersuchenden Zellen können durch diverse fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, sog. Fluorochrome, näher hinsichtlich Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Zytokine charakterisiert werden. Die Eigenschaft solcher fluoreszierenden Verbindungen beruht auf eine Lichtemission von Molekülen nach Anregung durch energiereiche Strahlung. Je nach Verbindung ist das Absorptionsmaximum unterschiedlich. Das Emissionslicht ist aufgrund des Energieverlustes in Form von Licht und Wärme beim Rückgang in das Ausgangsniveau (Fluoreszenz) langwelliger. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) besitzt ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 525 nm. Sammeloptiklinsen, Teilerspiegel, und Lichtfilter trennen den Fluoreszenzkanal vom Seitwärtsstreulicht, zerlegen die Fluoreszenz in verschiedene Farben und leiten sie auf die verschiedenen

Detektoren (Photomultiplier). Die Photodetektoren arbeiten spannungsabhängig und verarbeiten die Lichtsignale zu elektrischen Signalen. Bei Mehrfarbenmessung kommt es zu Überlappungen der Fluoreszenzspektren, d.h. Emissionsspektren eines anderen Kanals wird im falschen Kanal gemessen. Dies erfordert deshalb eine spezielle Kompensationselektronik, das vom Signalimpuls die überlagerten Impulse subtrahiert. Die elektrischen Signale gelangen über den Vorverstärker zum Impulsanalysator, dann zum Analog-Digitalwandler (ADC) und schließlich zur Datenverarbeitung (Abb. 5). Der Analog-Digitalwandler konvertiert die in Volt gemessene Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft in eine Klassenzahl. Die ADC-Auflösung des FACScan (Fa. Becton Dickinson) umfasst 0-1023 Kanäle (1024-Klassenauflösung).

Die Messung eines Versuchsansatzes erfolgt jeweils bei gleichen Einstellungen für Verstärkung (Volt), Schwellenwert (engl. threshold) und Kompensation, die vor der Messung eingestellt werden. Die Proben entstammen einem Dreifachansatz.

Mit dem Softwareprogramm CellQuest<sup>TM</sup> werden die Messung und Auswertung der Proben durchgeführt.



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

## 2.2.4 FACS-Auswertung

### Geräteeinstellung

Die Detektion für alle Versuche sind bei folgenden Verstärker-Einstellungen des Mess-Instrumentes durchgeführt:

#### Verstärker-Einstellung

- **FSC:** E00 1,45(linear)
- **SSC:** 385 (linear)
- **FL1:** 565-600 (logarithmisch)
- **FL2:** 528-594 (logarithmisch)
- **FL3:** 513-602 (logarithmisch)

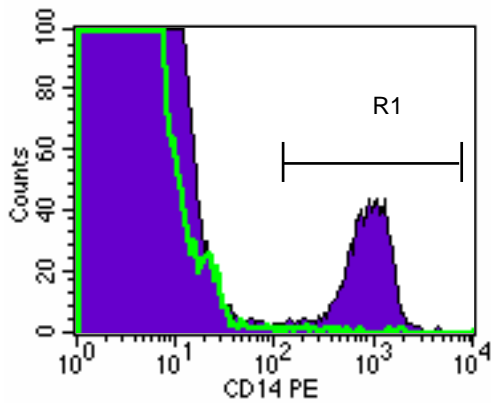
Bei der Dreifarben-Fluoreszenzanalyse können die Zellen mit drei verschiedenen Antikörpern markiert werden, die jeweils mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert sind (FITC, PE, PerCP). Am FL1-Detektor (Grünlicht) kann die FITC-Färbung (z. B. CD14-FITC), am FL-2 Detektor (Rotlicht) die PE-Färbung (IL-1 $\beta$ -PE, IL-6-PE, etc.) und am FL3-Detektor (Orangelicht) die PerCP-Färbung nachgewiesen werden. Bei dem Zytotoxizitätstest von Monensin wird der Totfarbstoff 7AAD von dem FL-3 Detektor erfasst.

Da es bei der Mehrfarbenanalyse zu starken Überlappungen der Emmissionsspektren der verwendeten Fluorochrome kommt, sind folgende Kompensationen gewählt worden:

- FL1 - 0,5% FL2
- FL2 - 25,4% FL1
- FL2 - 0% FL3
- FL3 - 10,8% FL2

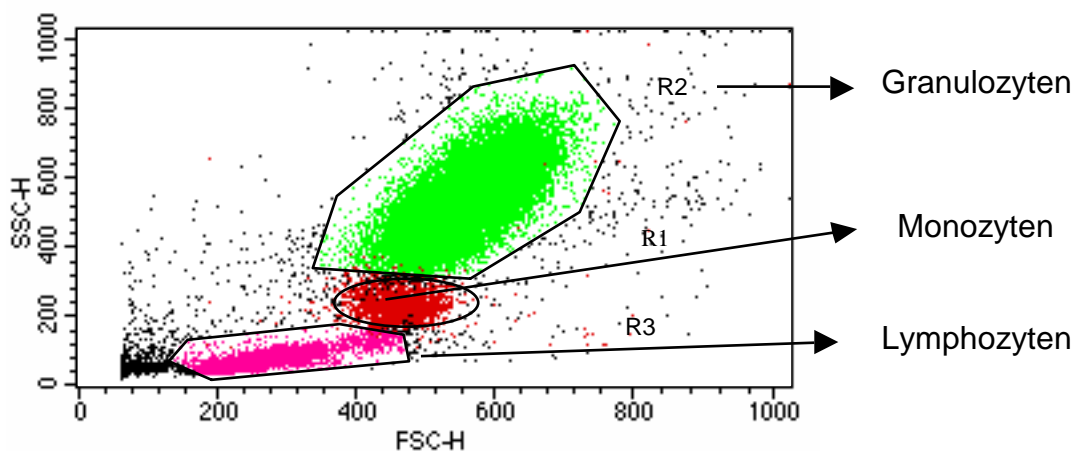
### Darstellung der Messergebnisse

In der Darstellung der Messdaten sind Zytogramme (engl. dot plot) und das Frequenz-histogramm gewählt, welche die Signale linear oder logarithmisch verstärkt präsentieren können. Bei dem Frequenzhistogramm (Abb. 6) werden die Anzahl der Zellen auf der Ordinate gegen Fluoreszenzintensitäten (anhand der 1024 Kanäle ausgewertet) auf der Abszisse aufgetragen. Dadurch kann die Häufigkeitsverteilung bezüglich eines Messparameters in einer Zellpopulation beschrieben werden.



**Abb. 6:** Darstellungsform eines Frequenzhistogramms. Auf der Abszisse ist die CD14-PE-Fluoreszenzintensität und auf der Ordinate die Zahl der gezählten Zellen aufgetragen. Die stärkste Intensität (peak) für CD14 liegt in der Regel zwischen  $10^2$ - $10^3$ . Der grüne Kurvenverlauf entspricht der Isotypkontrolle für CD14.

Das Zytogramm ermöglicht eine Darstellung zweier Parameter (z.B. FSC und SSC, Rot- und Grünfluoreszenz), bei der jede Zelle als einzelner Punkt dargestellt wird (Abb. 7). Häufig werden in Zytogramme sog. Quadranten gesetzt, um eine Interpretation der erworbenen „Punktwolken“ zu ermöglichen. Dafür ist jedoch vor jeder Analyse die Messung einer Negativkontrolle sowie die Isotypkontrolle notwendig (Abb.11). Es handelt sich hierbei um einen fluoreszenzmarkierten Kontrollantikörper des gleichen Immunglobulin-Isotyps wie der des Testantikörpers. Durch Positivkontrollen sollen die Effektivität der Färbung bestätigt werden



**Abb. 7:** Darstellung des Streulichtzytogramms mononukleärer Zellen (FSC vs. SSC).

Die Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenpopulation lassen sich hierbei differenzieren. Mit Einstellung des Schwellenwertes (engl. threshold) können Zelltrümmer von der Messung ausgeschlossen werden.

### **2.2.5 Immunstatus**

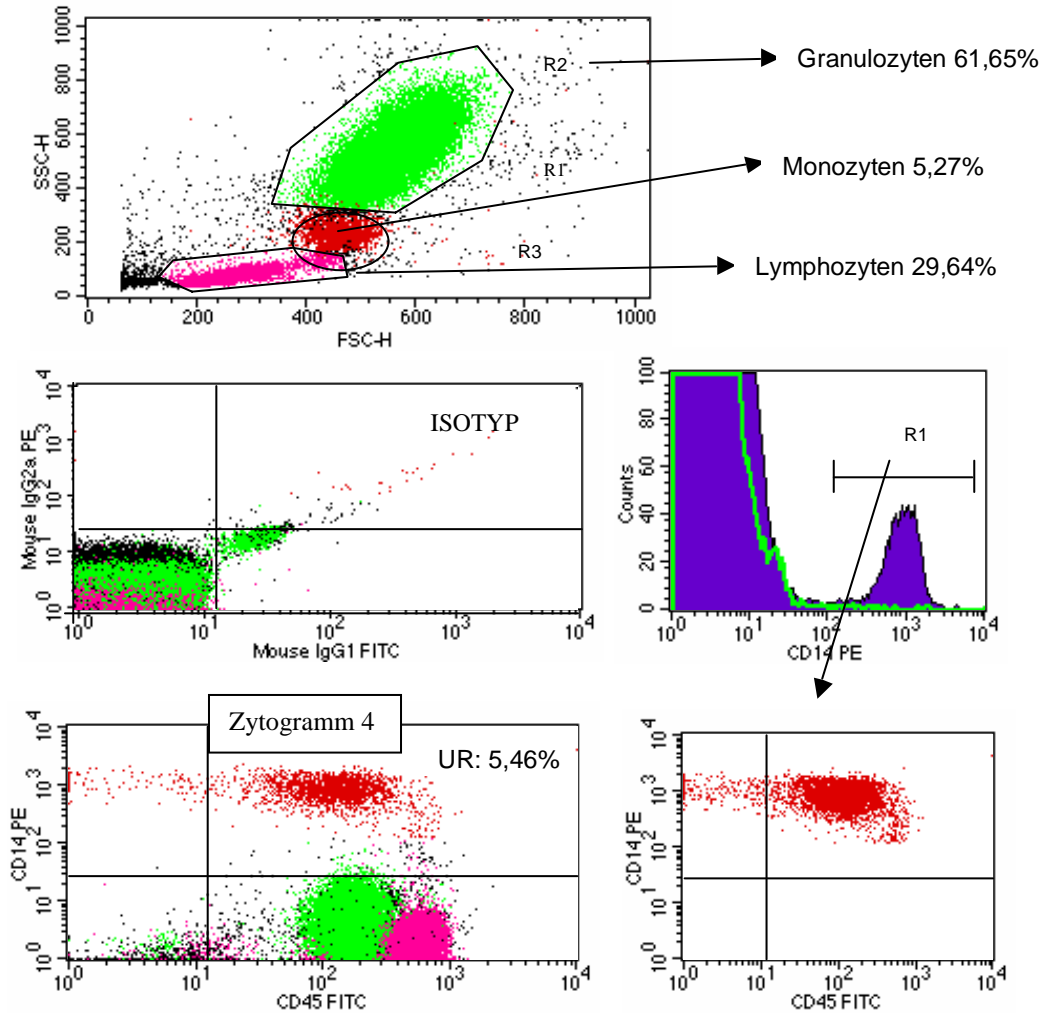
Der Immunstatus (Phänotypisierung der peripheren Blutzellen (PBMC)) wurde routinemäßig mit Hilfe des Standard-Antikörper-Panels (Simultest<sup>TM</sup>-IMK-Lymphocyte-Test) durchflusszytometrisch durchgeführt und mittels CELL-Quest<sup>TM</sup>-Software-Programm ausgewertet (Fa. BD, Heidelberg).

#### **Färbung und Fixierung der Zellen**

- 100 µl der gut antikoagulierten Vollblutprobe (EDTA) in Rundboden-Röhrchen A und B pipettieren.
- Färbung durch Zugabe von 20 µl des Leuco-GATE-Reagenzes (CD45-FITC/CD14-PE) in Röhrchen A und 20 µl des Simultest-Control-Reagenzes (IgG<sub>1</sub>-FITC/IgG<sub>2a</sub>-PE) in Röhrchen B (20 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln auf dem Rüttler).
- Zugabe von 2 ml FACS Lysing Solution (10 min, RT, Rüttler).
- Zentrifugieren bei 300 × g für 5 min und dekantieren.
- Zugabe von PBS mit 0,1% Natriumazid (200 × g für 5 min und dekantieren).
- Zugabe von 200 µl des 1 % Paraformaldehyds zur Fixierung.

Messung und Darstellung mittels Durchflusszytometer (Abb. 8).

## Immunstatus-Auswertblatt



**Abb. 8:** Der Immunstatus dient zur Bestimmung der Monozytenfraktion, welche sich im Zytogramm 4 als CD45+/CD14+-Zellen (upper right Feld) darstellt.

### 2.2.6 Bestimmung der Zytotoxizität von Monensin

Monensin ist ein lipophiler Metabolit von *Streptomyces cinnamomensis*, der Natrium-, Kalium- und Wasserstoffionen bindet und so zu einer Aufhebung des Ionengradienten an der biologischen Membran führt (Tartakoff 1983). Monensin spielt bei intrazellulären Zytokinuntersuchungen eine große Bedeutung, da es intrazellulär vesikuläre Transportprozesse von Proteinen aus dem Golgiapparat blockiert und somit zu einer Akkumulation der zu detektierenden Zytokinproteine beiträgt (Jung et al. 1993). Dabei wird die de-novo-Synthese von Proteinen nicht beeinflusst (Pohlmann et al. 1984).

Da Monensin jedoch eine dosis- und zeitabhängige Zytotoxizität aufweist, müssen in Voruntersuchungen die optimalen Bedingungen getestet werden. Vorarbeiten zeigen, dass das Wirkungsoptimum von Monensin bei 12h Inkubation liegt. Im Folgenden wurde die dosisabhängige Toxizität von Monensin nach 12h Inkubation untersucht.

Hierbei wurden in aufsteigenden Monensinkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 6  $\mu\text{M}$  die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) inkubiert. Nach 12h Inkubationszeit wurde die Anzahl der toten Zellen mittels der 7AAD-Färbung untersucht. Diese Färbungsmethode beruht auf der sog. „cell exclusion“ Eigenschaft des Farbstoffes, sofern die Zelle intakt ist. Bei der Auswertung spielt der Gesamtanteil aller toten Zellen (7AAD+) und der der Monozytenfraktion (CD14+/7AAD+) eine wichtige Rolle. Als Kontrolle dienten eine Messreihe ohne Monensin sowie Isotypkontrollen für den Monozytenmarker CD14 (Tab. 9).

Um Zellvitalität nachweisen zu können, wurde der Totfarbstoff 7-Aminoaktinomycin D gewählt. Dieses DNA-bindende Fluorochrom dringt nur bei defekter Zellmembran in den Zellkern hinein.

Die Isolierung von PBMC erfolgte nach der Methode Ficoll (s.u.). Nach der Auszählung wurden 150  $\mu\text{l}$  mit je 250.000 Zellen in die Vertiefungen pipettiert, das Monensin aus der Stammlösung  $1,4 \times 10^{-4}$  M wurde in Kompletmedium verdünnt und zu je 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über 12h im Brutschrank. Nach einmaligem Waschen mit Kompletmedium wurden die Zellen zur FACS-Messung mit dem monoklonalen Antikörper CD14-FITC (20  $\mu\text{l}/10^6$  Zellen) für 25 min im Dunkeln inkubiert. Der Totfarbstoff 7AAD (2  $\mu\text{l}/10^6$  Zellen) wurde 5 min vor Ende der ersten Inkubationszeit hinzugegeben, um eine unspezifische Einlagerung des Totfarbstoffes

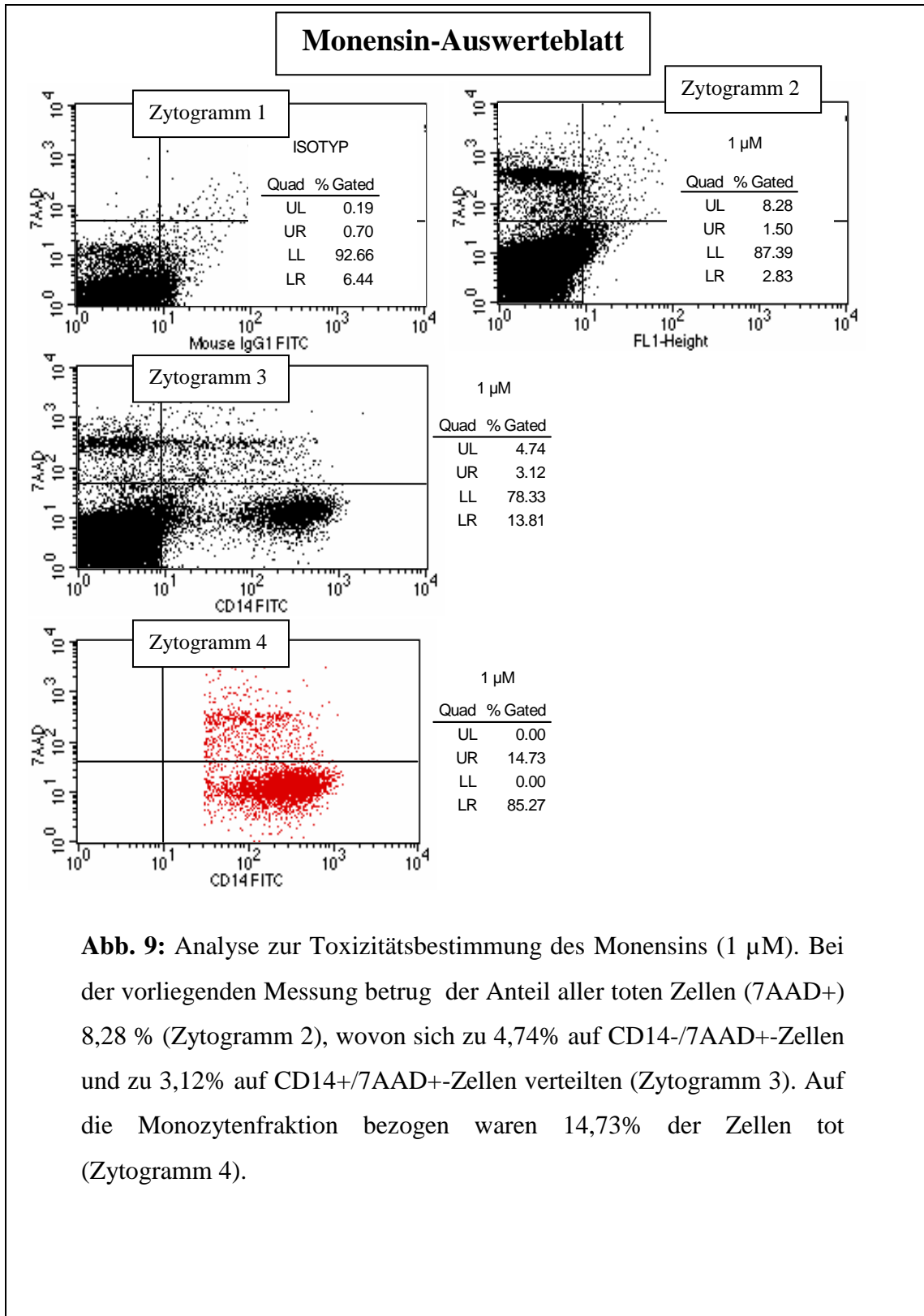
durch eine zu lange Inkubation zu vermeiden. Die Isotypkontrolle war IgG<sub>1</sub>-FITC für CD14. Ungebundene Antikörper sowie nicht eingelagertes 7AAD wurden durch Waschen aus der Zellsuspension herausgewaschen und in Rundboden-Röhrchen zur FACS-Analyse mit dem „CellQuest“-Programm überführt.

<b>0 µM</b> (Kontrolle)	<b>1 µM</b> (1,4 µl)	<b>2 µM</b> (2,8 µl)	<b>3 µM</b> (4,2 µl)	<b>4 µM</b> (5,6 µl)	<b>5 µM</b> (7 µl)	
						<b>CD14-FITC + 7AAD</b>
						<b>7AAD</b>
						<b>CD14</b>
						<b>Isotyp IgG<sub>1</sub>- FITC</b>

**Tab. 9:** Versuchsaufbau des Monensin-Toxizitätstest.

Messung und Darstellung mittels Durchflusszytometer (Abb. 9).





**Abb. 9:** Analyse zur Toxizitätsbestimmung des Monensins (1  $\mu$ M). Bei der vorliegenden Messung betrug der Anteil aller toten Zellen (7AAD+) 8,28 % (Zytogramm 2), wovon sich zu 4,74% auf CD14-/7AAD+-Zellen und zu 3,12% auf CD14+/7AAD+-Zellen verteilten (Zytogramm 3). Auf die Monozytenfraktion bezogen waren 14,73% der Zellen tot (Zytogramm 4).

### 2.2.7 Leukozytenseparation mit Ficoll

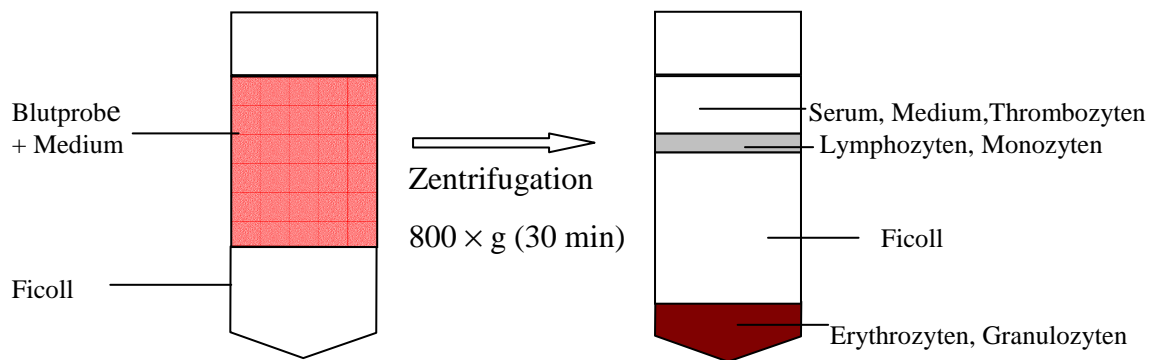
Die Separation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte aus heparinisiertem Frischblut mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Böyum 1968).

Nach Verdünnung von 20 ml Frischblut mit RPMI 1640-Medium in einem 50 ml Falcon Blue-Röhrchen (Verhältnis 1:1) wird das verdünnte Blut vorsichtig über ein mit 7 ml Ficolllösung gefüllten Spitzbodenröhrchen geschichtet, ohne dass eine Vermischung stattfindet. Danach wird für 30 min bei 2400 rpm ( $800 \times g$ ) ohne Bremse zentrifugiert.

Ficoll ist ein synthetisches hochmolekulares Polymer aus Zuckern und Epichlorohydrin mit einer spezifischen Dichte von  $1,077 \text{ g/cm}^3$ , also höher als die von Blutlymphozyten, jedoch geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten, so dass nach der Zentrifugation sich vier Zonen ausbilden: 1. am Boden des Spitzbodenröhrchen das Sediment mit Erythrozyten und Granulozyten, 2. Ficoll, 3. die sog. Interphase mit Lymphozyten und Monozyten, 4. Serum, Plasma, Thrombozyten (von unten nach oben) (Abb. 10).

Der weißliche Lymphozytenring wird mit Hilfe einer Pasteurpipette in kreisenden Bewegungen abgenommen und in neues Spitzbodenröhrchen überführt. Dabei ist zu beachten, dass man die Ficoll-Phase nicht mit abnimmt, da Ficoll toxische Eigenschaften besitzt. Nach Zugabe von Waschmedium (RPMI 1640 mit Glutamin und Penicillin/Streptomycin) wird für 5 min. bei 2000 rpm mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, das Pellet wieder in Waschmedium resuspendiert und nochmals zweimal gewaschen, bei 1800 rpm und schließlich bei 1600 rpm.

Abschließend wurde das Pellet in 1 ml Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und die Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Färbung in der Zählkammer mikroskopisch bestimmt.



**Abb. 10:** Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.

<b>Aufbau des Dichtegradienten</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Heparinisiertes Vollblut mit Medium im Verhältnis 1:1 verdünnen.</li> <li>2. In ein steriles 50 ml Röhrchen mit 20 ml Ficoll-Trennlösung (D=1,077) füllen.</li> <li>3. Verdünntes Vollblut (20 ml) vorsichtig über Ficoll-Trennlösung schichten.</li> </ol>
<b>Dichtegradientenzentrifugation</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Zentrifugieren bei <math>800 \times g</math>, 30 min bei RT.</li> </ol>
<b>Abnehmen der Interphase</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Den Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abnehmen, in ein Spitzbodenröhrchen überführen und mit Waschmedium auffüllen.</li> </ol>
<b>Waschen</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. Zentrifugieren bei <math>600 \times g</math>, 10 min bei RT.</li> <li>7. Überstand absaugen.</li> <li>8. Lymphozytensediment mit Medium resuspendieren.</li> <li>9. Zentrifugieren bei <math>400 \times g</math>, 10 min bei RT.</li> <li>10. Überstand absaugen, Lymphozytensediment mit Medium resuspendieren.</li> <li>11. Waschvorgang wiederholen.</li> <li>12. Lymphozytensediment in 1 ml RPMI 1640 Medium aufnehmen.</li> </ol>
<b>Vitalitätsbestimmung</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>13. 20 <math>\mu</math>l Zellsuspension und 20 <math>\mu</math>l Trypanblau (0,025%) mischen, nach 2 min nicht gefärbte Zellen in der Neubauer-Zählkammer auszählen</li> </ol>
<b>Berechnung der Zellzahl</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>14. Ausgezählte Zellen in 16 Kästchen <math>\times 10^4 \times 2 = \text{Zellzahl/ml}</math></li> </ol>

**Tab. 10:** Überblickschema über den Versuchsablauf. Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Vitalitätsbestimmung.

### 2.2.8 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Konzentration der Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand, Wetzlar) bestimmt. Die Zählkammer besteht aus 4 Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten (= 1 mm<sup>2</sup>). Aus der Tiefe der Kammer (0,1 mm), der Fläche eines Kleinquadraten (0,0625 mm<sup>2</sup>), der Anzahl der Kleinquadrate (16) ergibt sich ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup>. Da aber die Konzentration in Zellzahl/ml angegeben wird, muss noch ein Multiplikationsfaktor von 10<sup>4</sup> berücksichtigt werden. Für die Berechnung gilt die folgende Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl in einem Kleinquadrat} \times 16 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Eine Differenzierung lebendiger von toten Zellen erfolgt mit der Trypanblau-Färbung (0,025%). Tote Zellen mit nicht intakter Zellmembran werden von dem sauren Farbstoff durchsetzt, so dass das Zytoplasma sich blau anfärbt. Zur Bestimmung wurde 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung 1:2 verdünnt. Ein bis zwei Tropfen dieser Lösung wurden zwischen Deckgläschen und Vertiefung der Kammer gegeben. Nach dreiminütiger Färbung erfolgte die Auszählung im Lichtmikroskop.

### 2.2.9 Patientenserum

10%iges autologes Patientenserum für das Kulturmedium wurde nach Zentrifugation für 30 min. bei 2400 rpm als Überstand gewonnen. Es wurde außerdem 1 ml des Patientensersums in Kryoröhrchen für weitere immunologische Kontrollen wie HCV-Genotypisierung bei -20° C eingefroren.

### 2.2.10 Kultivierung und Zellstimulation

#### Prinzip

PBMC, gewonnen durch Dichtegradienten-Zentrifugation, wurden als Zellsuspension in Kompletmedium RPMI 1640 (Biochrom) mit Zusatz von 10%igem autologen Serum, 1% Penicillin (100 E/ml) und 1% Streptomycin (100 µg/ml) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in

Mikrotiterplatten mit 96 U-förmigen Vertiefungen (Fa. Nunc, Wiesbaden) für 12h in Anwesenheit von synthetisch rekombinanten HCV-Proteinen (Endkonzentration von 1 µg/ml) sowie 1 µM Monensin (Sigma Chemical Co., München) inkubiert. Monensin ist ein intrazellulärer Golgi-Transportinhibitor für Zytokinproteine aus dem Golgi-Komplex, bewirkt daher deren Akkumulation und führt folglich zu einer verbesserten Detektionsmöglichkeit von zytokinproduzierenden Zellen.

Positive sowie negative Kontrollen zur Verifizierung der Spezifität der mononukleären Zytokinantwort wurden stets mitbestimmt (Tab. 11). Dabei diente LPS (Lipopolysaccharid), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien, als Positivkontrolle. Puffer und Medium waren die Negativkontrollen.

### **Durchführung**

Nach Bestimmung der absoluten Zellzahl wurde durch Zugabe von frischem sterilem Kulturmedium (s.o.) eine Zellkonzentration von  $1,6 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 150 µl der Suspension, also  $2,5 \times 10^5$  Zellen, wurden jeweils pro Vertiefung pipettiert. Die rekombinanten HCV-Proteine Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b wurden mit Kompletmedium ohne autologes Serum auf eine Endkonzentration von 1µg/ml verdünnt, von der je 25 µl pro Vertiefung eingesetzt wurde. Die Positivkontrollen mit LPS hatten unterschiedliche Endkonzentrationen: LPS 10 µg/ml bei IL-10; 100 µg/ml bei IL-1β, IL-6, TNF-α; 200 µg/ml bei IL-12. Auch hier erfolgte eine Verdünnung mit Kompletmedium, pipettiert wurden jeweils 25 µl. Als Beweis für die spezifische mononukleäre Antwort auf HCV-Antigene wurden statt der rekombinanten Proteine die Negativkontrollen Medium und Puffer genommen. Die Endkonzentration lag wie bei den HCV-Proteinen bei 1µg/ml.

In allen Vertiefungen wurden abschließend 25 µl des 1 µM Monensins hinzugegeben, so dass ein Endvolumen von 200 µl pro Vertiefung erreicht wurde. Danach erfolgte die Inkubation für 12h im Brutschrank bei 37°C und befeuchteter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Tab. 11).

<b>Schema des Versuchsansatzes (1.Tag)</b>	
<b>Einstellen der Zellzahl</b>	1. Aufnehmen des Lymphozytensediments in Kulturmedium und auf $1,6 \times 10^6$ einstellen.
<b>Versuchsansatz</b>	2. Pipettieren von 150 $\mu$ l dieser Zellsuspension (250.000 Zellen) pro Vertiefung in eine 96-Loch-Rundbodenplatte. 3. Zugabe von 25 $\mu$ l Probenlösung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HCV-Antigene</b> : rekombinante HCV-Proteine (1 <math>\mu</math>g/ml)</li> <li>• <b>(-)-Kontrollen:</b> Medium               <ul style="list-style-type: none"> <li>Pufferkontrolle der rekombinanten Proteine</li> <li>Borrelia burgdorferi Antigene (1 <math>\mu</math>g/ml) *</li> <li>HIV-1 P-24 Antigen (1 <math>\mu</math>g/ml) *</li> </ul> </li> <li>• <b>(+)-Kontrolle:</b> LPS 10 <math>\mu</math>g/ml : IL-10               <ul style="list-style-type: none"> <li>LPS 100 <math>\mu</math>g/ml : IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-12</li> <li>LPS 200 <math>\mu</math>g/ml : IL-12</li> </ul> </li> </ul>
<b>Inkubation</b>	5. 12h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 95% rel. Feuchte

**Tab. 11:** Experimenteller Ablauf des ersten Versuchstages. \* Kontrollantigen an einer kleinen Gruppe aus 5 HIV-Patienten und 10 HIV/HCV-Koinfizierte exemplarisch untersucht.

### **2.2.11 Mehrfarbendurchflusszytometrie zur Charakterisierung monozytärer Oberflächenmarker und Zytokine**

#### **Charakterisierung von Monozyten**

Nach 12h wurden die Mikrotiterplatten bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert (Tab. 12). Ein Zellpellet bildete sich deutlich am Boden der Vertiefung aus. Die Identifizierung der Monozyten erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz mit einem FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper (mAk). Die Inkubation erfolgte mit Anti-CD14-FITC in der Konzentration 20  $\mu$ l pro  $10^6$  Zellen für 25 min, im Dunkeln auf dem Plattenschüttler. Die Antikörperlösung wurde mit PBS so eingestellt, dass 25  $\mu$ l in jede Vertiefung pipettiert werden konnte. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 150  $\mu$ l Kompletmedium aus der Zellsuspension entfernt. Es wurde bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert und dekantiert.

## **Darstellung intrazellulärer Zytokine**

### **Fixierung**

Die Fixierung der Zellen geschah durch Zugabe von 150 µl der eiskalten 4%igen Paraformaldehyds (PFA)-Lösung für 25 min, im Dunkeln auf dem Rüttler. Sie bewahrt ein hohes Maß an Antigenität und erhält die lichtstreuenden Eigenschaften menschlicher Blutlymphozyten (Mc Lean und Nakane 1974), auch Membranstabilität und Zellmorphologie bleiben erhalten (Halldén et al. 1989). Danach wurde für 5 min zentrifugiert (1600 rpm) und anschließend dekantiert.

### **Permeabilisierung der Zellen**

Ein wichtiger Schritt bei der intrazellulären Färbung ist die Permeabilisierung der Zellen mit Saponin. Hier wurden 150 µl der 0,1 %igen Saponinlösung eingesetzt, wiederum für 25 min, im Dunkeln auf dem Rüttler. Danach erfolgte das Auswaschen mit 150 µl Kompletmedium (5 min, 1600 rpm). Saponin ist ein Pflanzenglykosid mit einem Steroidgerüst, das mit einer hydrophilen Kohlenstoffkette verbunden ist (Lucy und Glauert 1962). Es wird vermutet, dass Saponin anstelle von Cholesterin in die Zellmembran eingebaut wird und die Zelle dadurch permeabilisiert. Hierbei wird Porengröße bis 8 nm Durchmesser erreicht (Seeman 1974). Zelloberflächenstrukturen werden nicht beeinflusst.

### **Fluoreszenzfärbung der intrazellulären Zytokine**

Zum Schluss erfolgte die intrazelluläre Zytokinfärbung mit PE-markierten Anti-Zytokinantikörpern, die in 0,1%igem Saponin verdünnt zu je 25 µl pipettiert wurden. Die Inkubation dauerte 25 min, im Dunkeln auf dem Rüttler. Danach wurde mit 150 µl Kompletmedium (5 min, 1600 rpm) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für jedes Zytokin wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt: IL-1 $\beta$  (IgG<sub>1</sub>), IL-6 (IgG<sub>2a</sub>), IL-10 (IgG<sub>2a</sub>), IL-12 (IgG<sub>1</sub>) und TNF- $\alpha$  (IgG<sub>1</sub>).

Um die Spezifität der Färbemethode zu gewährleisten, wurde an zwei Patienten exemplarisch in einem Blockiersversuch die intrazellulären Zytokine mit einem unspezifisch-bindenden polyklonalen Antikörper in 5-fach höherer Konzentration (Polyglobin) abgesättigt und danach mit dem Zytokinantikörper gefärbt.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in 100 µl PBS pro Vertiefung resuspendiert und in Rundbodenröhrchen (6 ml, Falcon) zur Messung überführt (Tab. 13).

<b>Schema der Immunfärbungen (2.Tag)</b>	
<b>Waschen</b>	6. Zentrifugieren der 96-Loch-Rundbodenplatten bei $250 \times g$ (1600 rpm) für 5 min, RT. 7. Dekantieren des Überstandes. 8. Zugabe von 150 $\mu$ l Kompletmedium. 9. Zentrifugieren bei $250 \times g$ für 5 min und dekantieren.
<b>Zelloberflächenfärbung mittels direkter Immunfluoreszenz</b>	10. Zugabe von 25 $\mu$ l verdünnter Primärantikörperlösung/Vertiefung: CD14-FITC (20 $\mu$ l/ $10^6$ Zellen) IgG <sub>1</sub> -FITC (20 $\mu$ l/ $10^6$ Zellen) 11. Inkubation für 25 min bei RT und Dunkelheit auf dem Schüttler.
<b>Herauswaschen ungebundener Antikörper</b>	12. Zugabe von 150 $\mu$ l Kompletmedium. 13. Zentrifugieren bei $250 \times g$ für 5 min und dekantieren.
<b>Fixierung der Zellen</b>	14. Zugabe von 150 $\mu$ l der eiskalten Paraformaldehyd-Lösung 4%. 15. Inkubation für 25 min bei RT und Dunkelheit auf dem Schüttler. 16. Zentrifugieren bei $250 \times g$ für 5 min und dekantieren.
<b>Permeabilisierung der Zellen</b>	17. Zugabe von 150 $\mu$ l der eiskalten Saponin-Lösung 0,1%. 18. Inkubation für 25 min bei RT und Dunkelheit auf dem Schüttler. 19. Zentrifugieren bei $250 \times g$ für 5 min und dekantieren.
<b>*Blockierversuch</b>	20. Zugabe von 25 $\mu$ l verdünnter Blockierantikörper/Vertiefung: Polyglobin (20 $\mu$ l/ $10^6$ Zellen).
<b>Intrazelluläre Anti-Human-Zytokinfärbung</b>	21. Zugabe von 25 $\mu$ l verdünnter Zytokinantikörper/Vertiefung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\beta</math>-PE (1:10 mit Kompletmedium verdünnt!) (10 <math>\mu</math>l/ <math>10^6</math> Zellen)</li> <li>• IL-6, IL-10, IL-12, TNF-<math>\alpha</math>-PE (2,5 <math>\mu</math>l/ <math>10^6</math> Zellen)</li> <li>• IgG<sub>1</sub>-PE, Isotypkontrolle für IL-1<math>\beta</math>, IL-12 und TNF-<math>\alpha</math> (2,5 <math>\mu</math>l/ <math>10^6</math> Zellen)</li> <li>• IgG<sub>2a</sub>-PE Isotypkontrolle für IL-6 und IL-10 (2,5 <math>\mu</math>l/ <math>10^6</math> Zellen)</li> </ul> 22. Inkubation für 25 min bei RT und Dunkelheit auf dem Schüttler.
<b>Herauswaschen ungebundener Antikörper</b>	23. Zugabe von 150 $\mu$ l Kompletmedium. 24. Zentrifugieren bei $250 \times g$ für 5 min und dekantieren.
<b>Vorbereitung zur FACS-Analyse</b>	25. Resuspendieren in 100 $\mu$ l PBS pro Vertiefung. 26. Überführen der Zellsuspension in Rundbodenröhrchen (6 ml Falcon).

**Tab. 12:** Experimenteller Ablauf des 2. Versuchstages. \* Blockierversuch exemplarisch an 2 Patienten durchgeführt.



<b>Geräteeinstellung des Durchflusszytometers</b>	1. Verstärkereinstellung 2. Kompensationseinstellung
<b>Darstellung der CD14-/Zytokin-positiven Monozyten</b>	3. Isotypeinstellung (Abb. 11) mittels: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Zytogramm 1</u>: FSC (Größe) gegen SCC (Granularität) → Eingrenzung der Monozytenfraktion (CD14) <b>R2</b></li> <li>• Einstellung des Schwellenwertes (threshold)</li> <li>• <u>Zytogramm 2</u>: FL1 (CD14-FITC) log. vs. FL2 (Mouse IgG1/ IgG2a- PE) bzw. FL2 (anti-Zytokin-Ak-PE) log.</li> <li>• <u>Frequenz-Histogramm</u>: FL1 (CD14-FITC) log. vs. Zellzahl (counts) → Eingrenzung der CD14-positiven Zellen (<b>R1</b>) und Darstellung in Zytogramm 3</li> <li>• <u>Zytogramm 3</u>: FL1 (CD14-FITC) log. vs. FL2 (anti-Zytokin-Ak-PE) log.</li> </ul> 4. Messung der Proben (2-fach Ansatz) (Abb.12) 5. Analyse mit Hilfe der CellQuest™ Software von Becton Dickinson nach Zählung von 5.000 CD14/Zytokin-positiven Zellen im R1-Fenster 6. Auswertung der positiven Zellen mit Doppelfärbung im oberen rechten Quadranten (UR) von Zytogramm 3
<b>Auswertung und Darstellung der Monensin-Zytotoxizität</b>	1. Isotypeinstellung 2. Messung und Analyse wie oben mit folgendem Unterschied: FL1 (CD14-FITC) log. vs. FL3 (7AAD) log.

**Tab. 13:** Schema für FACS-Auswertung.

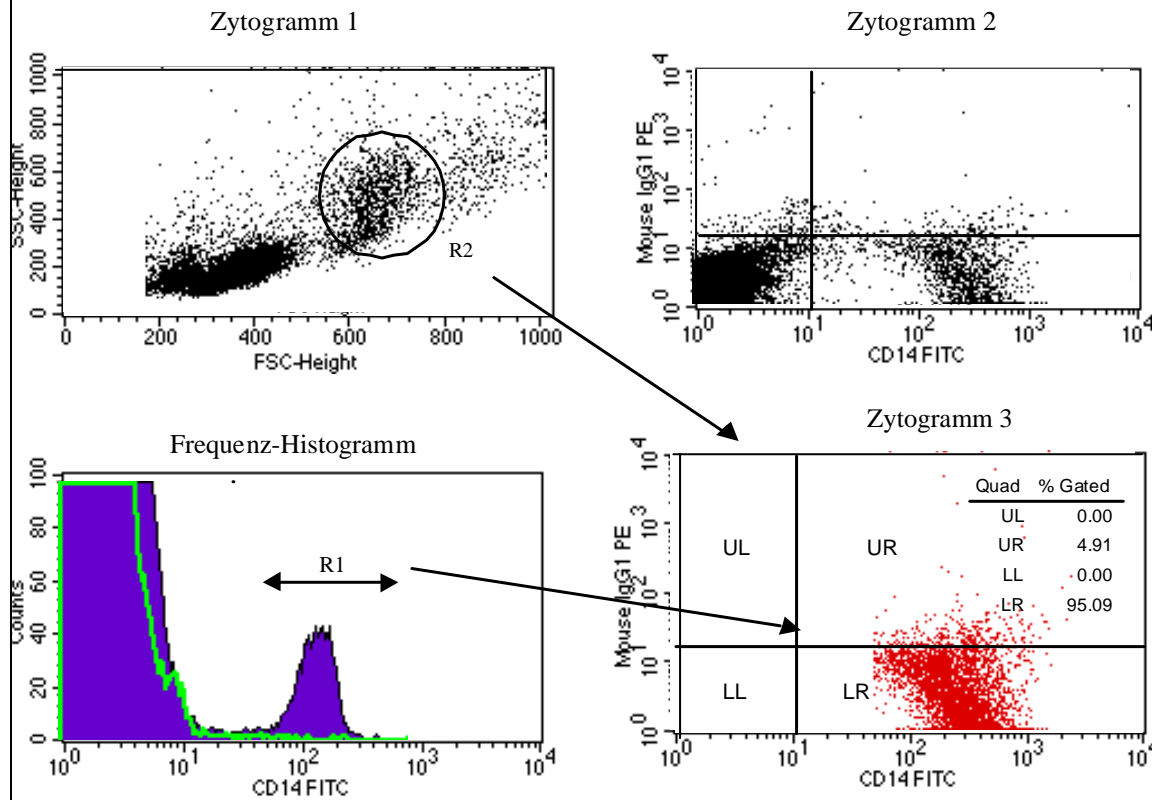
### **Darstellung der Messergebnisse**

Die Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenpopulation wurden im Zytogramm 1 (SSC gegen FSC) aufgetragen (Abb. 11). Gleichzeitig konnte anhand des Frequenzhistogramms die Monozytenfraktion am Peak bei  $10^2$ - $10^3$  Fluoreszenzintensität identifiziert werden (Abb. 11). Diese Population wurde in einem elektronischem Fenster (R1) eingegrenzt und gesondert in einem dritten Zytogramm bezüglich der CD14-Oberflächenmarker und der Zytokinexpression dargestellt.

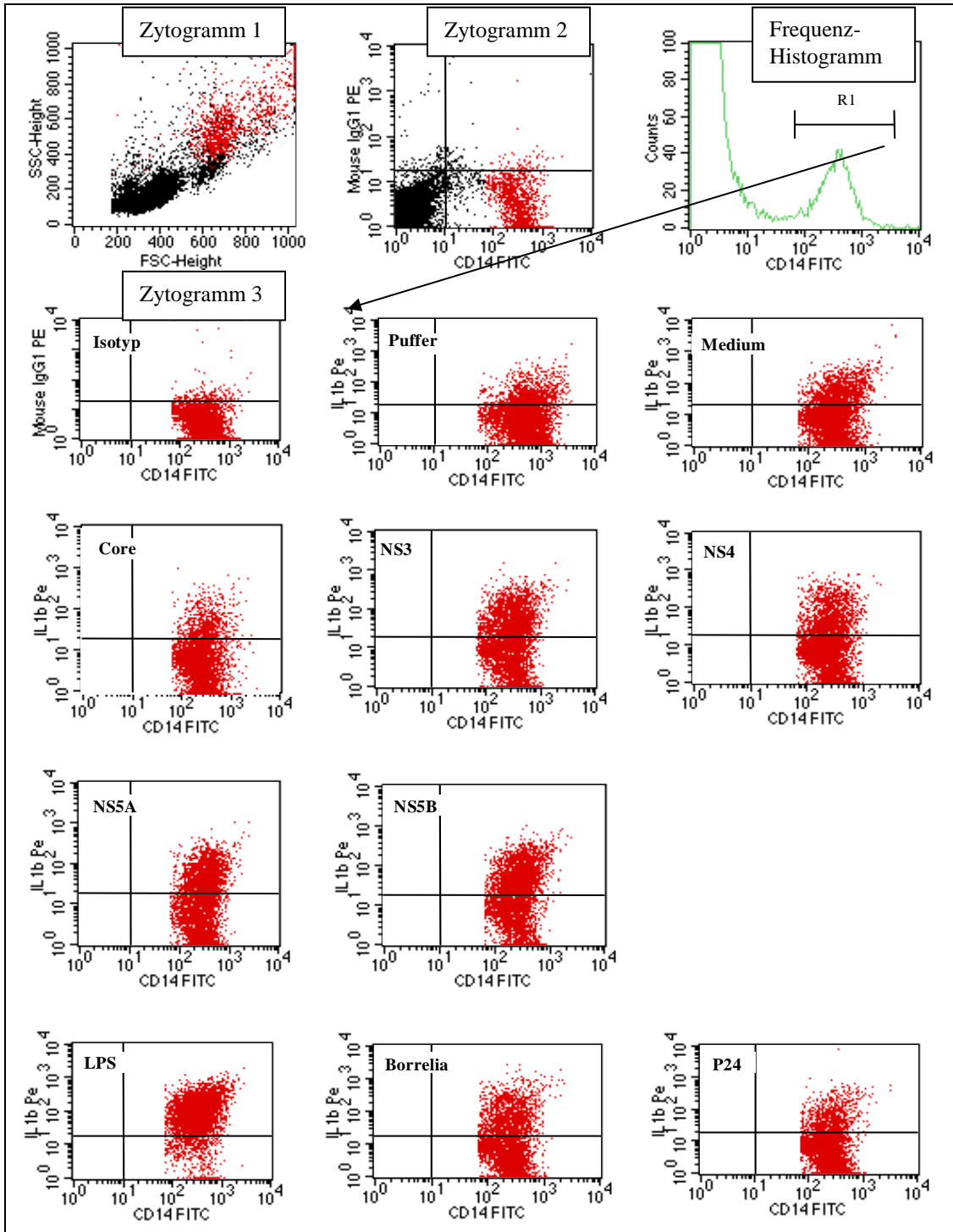
Anhand der Isotypkontrolle, die aus fluoreszenzmarkierten unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps, wie der des spezifischen Antikörpers besteht, wurden die Quadranten gesetzt, um so Zellen mit spezifischer Fluoreszenz von denen mit unspezifischen Fluoreszenz zu differenzieren. Mit Hilfe eines Auswerteprogramms und der Quadrantendarstellung konnte der prozentuale Anteil der CD14-positiven Zellen mit Expression des jeweiligen Zytokins im oberen rechten Quadranten (engl. upper right, UR) bestimmt werden.

Bei jeder Messung wurden jeweils 5.000 CD14-positive Zellen im R1 Fenster gezählt und mit der CellQuest<sup>TM</sup>-Software ausgewertet (Beispiel-Auswertebblatt für IL- $\beta$  siehe Abb. 12).

## Isotyp-Einstellung



**Abb. 11:** Die Quadranteneinstellung im Zytogramm 3 wurde nach Eingrenzung der CD14-positiven Zellen anhand der Isotypkontrolle des jeweils dazugehörigen Zytokins vorgenommen. Positive Ereignisse (gleichzeitiger Nachweis des Oberflächenmarkers und des Zytokins) stellten sich demnach im oberen rechten Quadranten (engl. **upper right, UR**) dar. Es wurden bei der Isotypeinstellung bis zu 5% positive Zellen toleriert. Diese Grundeinstellungen wurden für die gesamte Auswertung des jeweiligen Zytokins beibehalten.



**Abb. 12:** Auswertblatt für IL-1 $\beta$  bei unterschiedlicher Stimulation. Die Darstellung der Messdaten erfolgte mittels Zytogramms („dot plot“) und des Frequenzhistogramms.

### 2.2.12 Statistik

In der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden nichtparametrische Tests wie der ungepaarte Zweiergruppentest nach Mann-Whitney-U und der gepaarte Test von Wilcoxon („vorher-nachher“ Vergleiche) für nichtnormverteilte Gruppen verwendet. Nichtnormverteilte Gruppen sind deskriptiv durch einen unterschiedlichen Mittelwert und Median gekennzeichnet.

Bei Vorliegen einer Normverteilung der Gruppen wurde der gepaarte parametrische T-Test benutzt. Des Weiteren kam der Fischer-exakt-Test bei dem Kontingenz-Viertafel-Vergleich zur Geltung.

Statistische Signifikanz bei allen Tests wurde bei p-Werten  $\leq 0,05$  definiert. Alle Berechnungen erfolgten mit der Statview 4.5 Software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Charakterisierung der Studienpopulation - Immunstatus - Laborchemie**

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des Immunstatus, insbesondere die Verteilung des Monozytenanteils in beiden Studiengruppen, ergaben eine Signifikanz im Mann-Whitney U-Test ( $p \leq 0,05$ ) (Tab. 8). Es wurde in der Gruppe der HIV/HCV-Koinfizierten eine Monozytenfraktion von 6% (Median) (SEM:  $\pm 0,5\%$ ) gegenüber der HIV-Gruppe von 8,4% ( $\pm 0,5\%$ ) festgestellt. Außerdem bestand bei den Koinfizierten eine fast doppelt so lange HIV-Erkrankungsdauer von durchschnittlich 13 Jahren ( $\pm 0,6$ ) gegenüber 7 Jahren ( $\pm 0,9$ ) ( $p \leq 0,002$ ) sowie signifikant erhöhte Leberwerte für GOT (HIV/HCV: 24,7 U/L  $\pm 3,4$ ; HIV: 13 U/L  $\pm 3,3$ ) ( $p \leq 0,02$ ) und für GPT (HIV/HCV: 37,8 U/L  $\pm 5,7$ ; HIV: 17 U/L  $\pm 3,7$ ) ( $p \leq 0,005$ ). Eine erhöhte CD4-Zellzahl von 311 Zellen/ $\mu\text{l}$   $\pm 50,2$  war bei der HIV/HCV-Gruppe gegenüber der HIV-Gruppe 231 Zellen/ $\mu\text{l}$   $\pm 56,7$ ) zu beobachten. Jedoch bestand hierfür keine statistische Signifikanz ( $p \leq 0,08$ ).

#### **3.2 Versuche zur Optimierung der Antigenstimulation im experimentellen Ansatz**

##### **3.2.1 Analyse des Puffersystems auf die Zellvitalität und die Zytokinexpression**

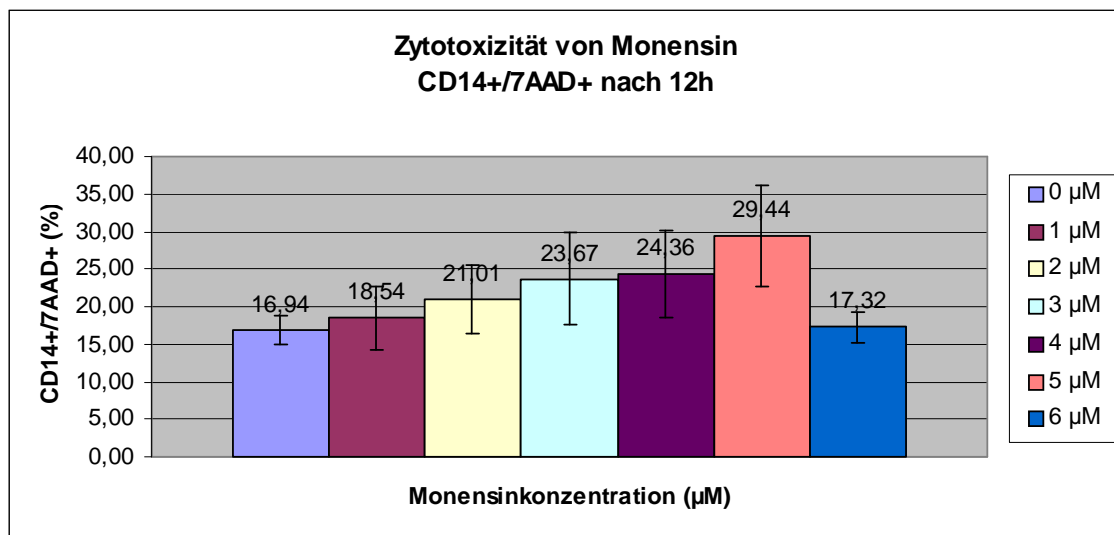
Bei der Inkubation der mononukleären Blutzellen (PBMC) im Medium unter Zusatz von unterschiedlichen rekombinanten HCV-Proteinen war eine deutliche Beeinflussung der Zellaktivität insbesondere bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) festzustellen. Es kam zu einer deutlichen Hemmung der Zellvitalität mit verminderter Zytokinexpression. Die Proteine Core, NS3, NS5a und NS5b waren in einer Tris-Glycin-Pufferlösung mit 0,1% SDS (engl.: sodium-dodecyl-sulfat, Natriumaurylsulfat) gelöst. Die zytotoxische Wirkung war auf die denaturierenden Eigenschaften des SDS zurückzuführen. Durch eine Verringerung der Proteinkonzentration auf 1  $\mu\text{g/ml}$  konnte dieser negative Einfluss in den nachfolgenden Experimenten gemindert werden.

### 3.2.2 Analyse zur Monensinzytotoxizität

Bei dieser Versuchsreihe konnte eine konzentrationsabhängige Toxizität von Monensin nachgewiesen werden.

Der Anteil toter CD14+/7AAD+-Zellen nach Abzug der Isotypkontrolle im nativen Blut (0  $\mu\text{M}$ ) und bei einer 1  $\mu\text{M}$  Monensinkonzentration betrug durchschnittlich 16% bis 18%, bei Anwendung einer 2-fach höheren Konzentration kam es zu einer signifikanten Erhöhung auf 21% ( $\pm\text{SEM}$  4,55) (Wilcoxon  $p=0,02$ ). Eine 5  $\mu\text{M}$  Konzentration führte zu einem Anstieg der Totfärbung auf fast 30% ( $p \leq 0,03$ ) (Abb. 13). Bei 6  $\mu\text{M}$  dagegen fiel der Anteil der CD14+/7AAD+-Zellen auf 17,32% ( $\pm 2,02$ ) ab.

CD 14+/ 7AAD+-Zellen (nach 12h)							
Monensin	0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	6 $\mu\text{M}$
CD 14+/7AAD+ (%)	16,94	18,54	21,01	23,67	24,36	29,44	17,32
$\pm$ SEM	1,94	4,21	4,55	6,15	5,81	6,82	2,02



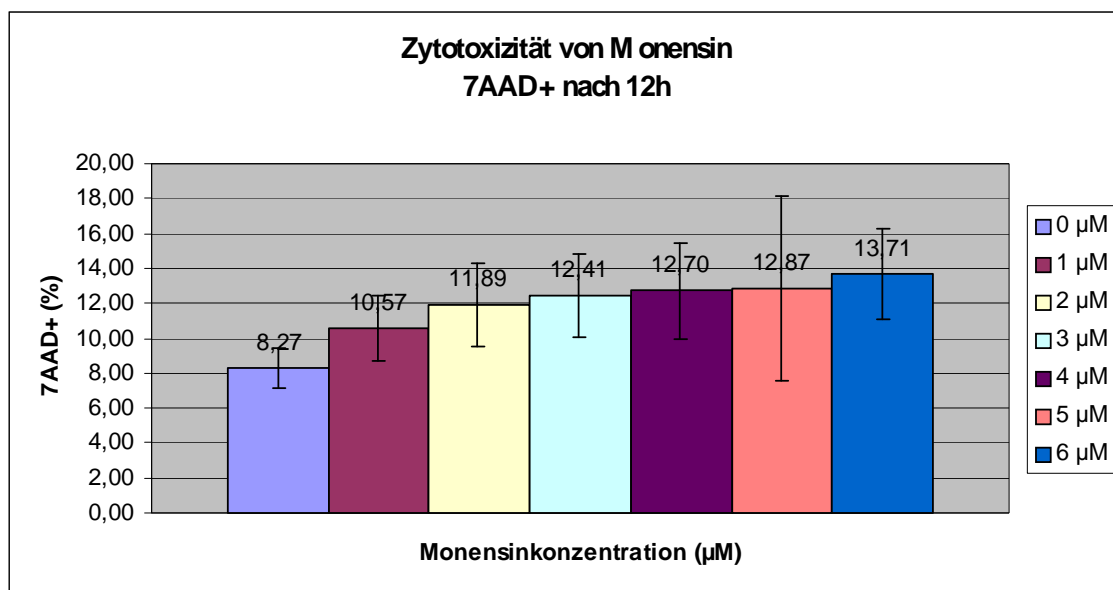
**Abb. 13:** Zytotoxizität von Monensin nach 12h Inkubation. Die Prozentwerte stellen Mittelwerte einer Untersuchung bestehend aus 8 Patienten dar (Fehlerbalken: Standardfehler).

Der prozentuale Anteil von CD14+/7AAD+-positiven toten Zellen unterliegt einer Konzentrationskinetik des Monensins. Der Anteil CD14+/7AAD+-Zellen nimmt bei steigender Konzentration auf 5  $\mu\text{M}$  Monensin stetig bis 29,44% zu. Bei 6  $\mu\text{M}$  scheint eine absolut toxische Grenze erreicht zu sein, so dass der messbare Anteil der positiven Zellen geringer ausfällt.

Die toxische Wirkung des verwendeten Monensins auf alle 7AAD+-PBMC bezogen, zeigte bei einer 1  $\mu\text{M}$ -Konzentration eine geringere Totfärbung von 10,57% (Abb. 14). Insgesamt war nur ein geringer Anstieg von 7AAD+-PBMC-Zellen bei zunehmender Monensin-Konzentration bis 6  $\mu\text{M}$  von maximal 14% festzustellen. Der Grund hierfür könnte in der Größe der Monozyten/Makrophagen (CD14) liegen, die bei der Leukozytenseparation einer verstärkten mechanischen Beeinflussung unterliegen.

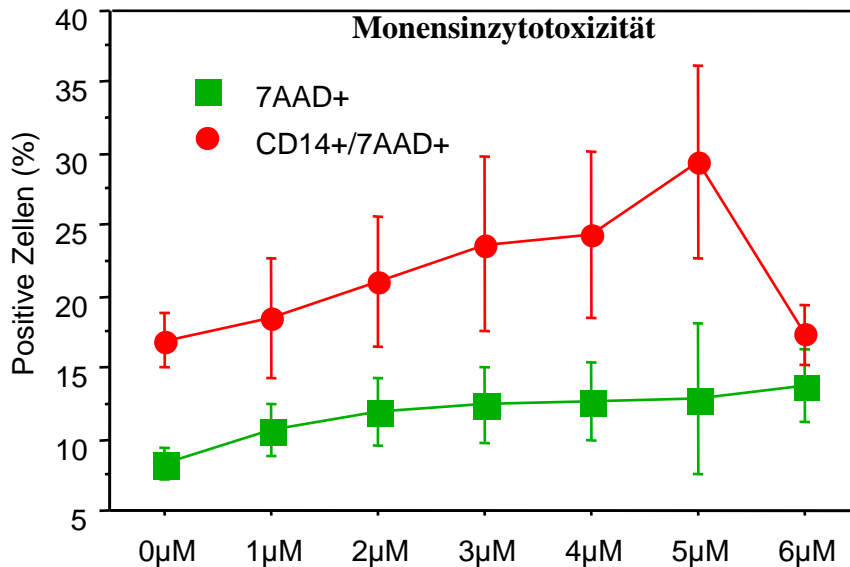
Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden für die Hauptuntersuchungen eine 1  $\mu\text{M}$ -Monensinlösung gewählt.

7AAD+-Zellen (nach 12h)							
Monensin	0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	6 $\mu\text{M}$
7AAD+ (%)	8,27	10,57	11,89	12,41	12,70	12,87	13,71
$\pm$ SEM	1,15	1,82	2,39	2,60	2,72	5,27	2,60



**Abb. 14:** Zytotoxizität von Monensin nach 12h Inkubation. Gemessen sind die mittleren 7AAD+-positiven Zellen in Prozent aus der Gesamtmenge der PBMC.



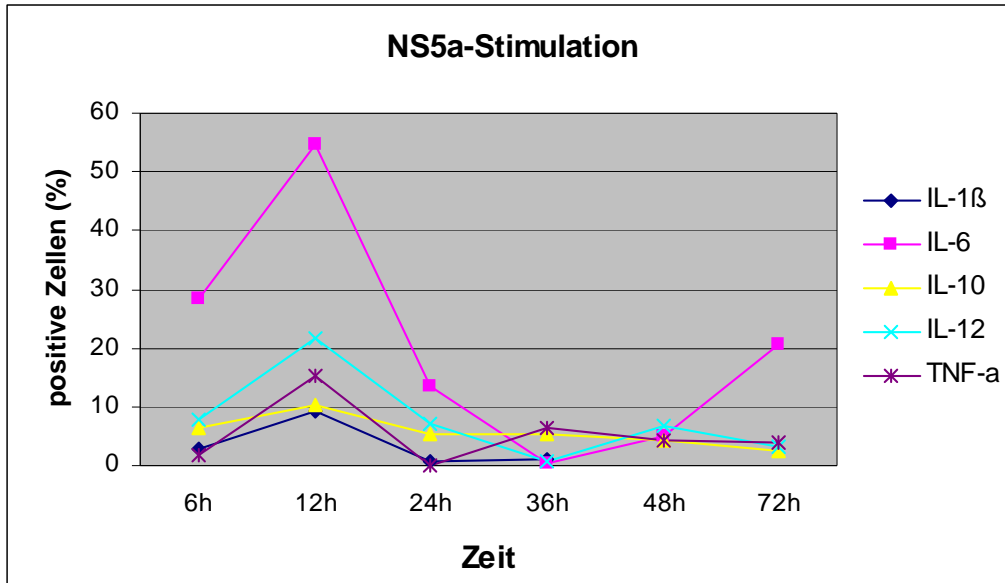


**Abb. 15:** Zytotoxizität von Monensin bei unterschiedlichen Konzentrationen nach 12h Inkubation. Dargestellt sind die mittleren 7AAD+ und CD14+/7AAD+-positiven Zellen. Die Fehlerbalken stellen +/- 1 Standardfehler dar.

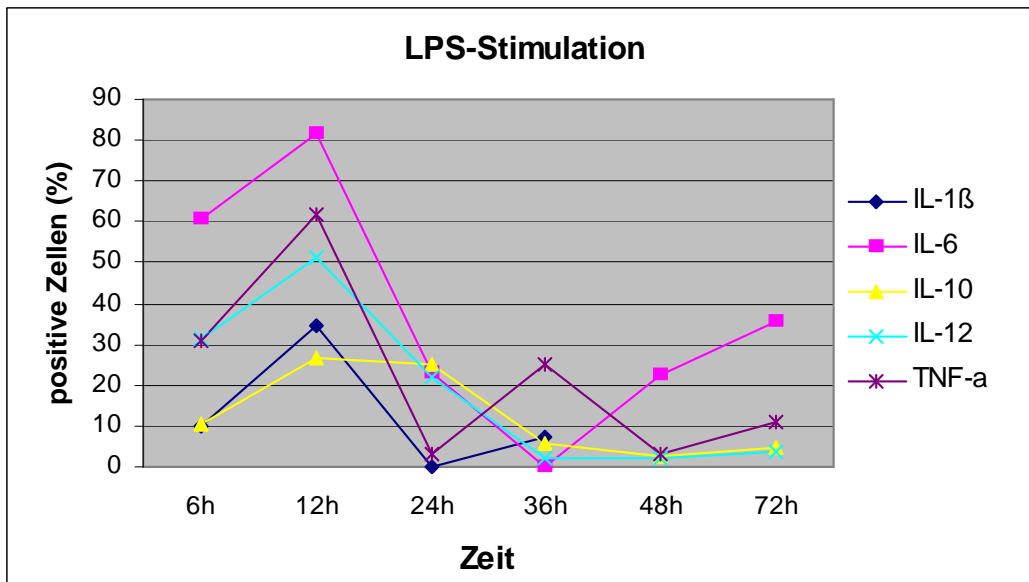
### 3.2.3 Analyse der HCV-spezifischen Monokinantwort bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

In Voruntersuchungen von Petersen wurde die optimale Inkubationszeit der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  von Monozyten ermittelt. Die Monozyten wurden dazu mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b und mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die Anzahl der Zytokin exprimierenden Monozyten durchflusszytometrisch nach 6h, 12h, 24h und 36h nach Abzug der Isotypkontrolle bestimmt. Die von Petersen erhobenen Daten wurden durch eigene Messuntersuchungen nach 48h und 72h Inkubation ergänzt.

Dabei konnten bereits nach 6h Stimulation in der durchflusszytometrischen Messung die untersuchten Zytokine in den Monozyten nachgewiesen werden. Die Anzahl der IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  exprimierenden Monozyten nahm bis 12h Inkubationszeit deutlich zu. In den weiteren Messungen nach 24h, 36h, 48h und 72h Inkubation war der Zytokinnachweis in den Monozyten rückläufig. Auch die LPS-Stimulation zeigte nach 12h Inkubationszeit ein Maximum der für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$ -positiven Monozyten.



**Abb. 16:** Zeitabhängigkeit der Zytokinproduktion nach Stimulation mit HCV-Proteinen am Beispiel von NS5a (freundlicherweise von U. Petersen zur Verfügung gestellt). Die Daten wurden durch eigene Messuntersuchungen nach 48h und 72h ergänzt.



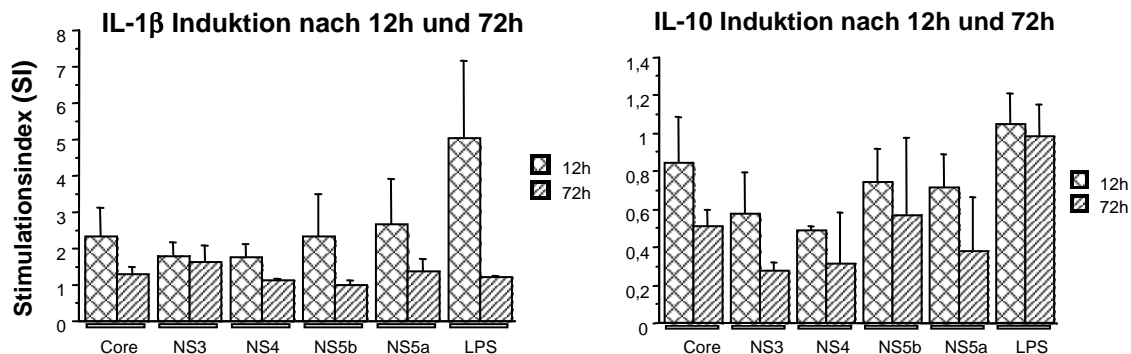
**Abb. 17:** Zeitabhängigkeit der Zytokininduktion nach LPS-Stimulation (freundlicherweise von U. Petersen zur Verfügung gestellt). Die Daten wurden durch eigene Messuntersuchungen nach 48h und 72h ergänzt.

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Abfall der Zytokininduktion nach 48h und 72h. Der Vergleich der Stimulationsindices, exemplarisch anhand der Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-10 im zeitlichen Verlauf nach 48h und 72h, weist eine verminderte Reaktivität der Monozyten nach (Abb. 18). Zum Teil halbierten sich die SI-Werte für IL-1 $\beta$  nach 72h bei NS5a von 2,65 ( $\pm$  1,27) auf 1,37 ( $\pm$  0,34). Bei LPS nahm der SI-Wert um sogar das Fünffache von 5,03 ( $\pm$  2,14) auf 1,21 ( $\pm$  0,03) ab.

Auch die IL-10 Profile zeigten ein ähnliches Bild mit schlechter Zytokininduktion der Zellen nach 72h Inkubationsdauer (Abb. 18).

Ein Vergleich der durchgeführten Messungen ließ keine Unterschiede in den Zeitverläufen der Zytokininduktion nach antigener Stimulation mit den HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a, NS5b und der Stimulation mit LPS erkennen.

Die optimale Inkubationszeit für die monozytäre Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde für die weiteren Untersuchungen auf eine zwölfstündige Kultur festgelegt.



**Abb. 18:** Stimulationsindex-Vergleich nach 12h und 72h Inkubationsdauer für IL-1 $\beta$  und IL-10. Die Monokin-Induktion auf HCV-Proteine und auf LPS war bei beiden Zytokinen nach 72h Inkubation gegenüber 12h deutlich vermindert (Fehlerbalken:  $\pm$  Standardfehler).

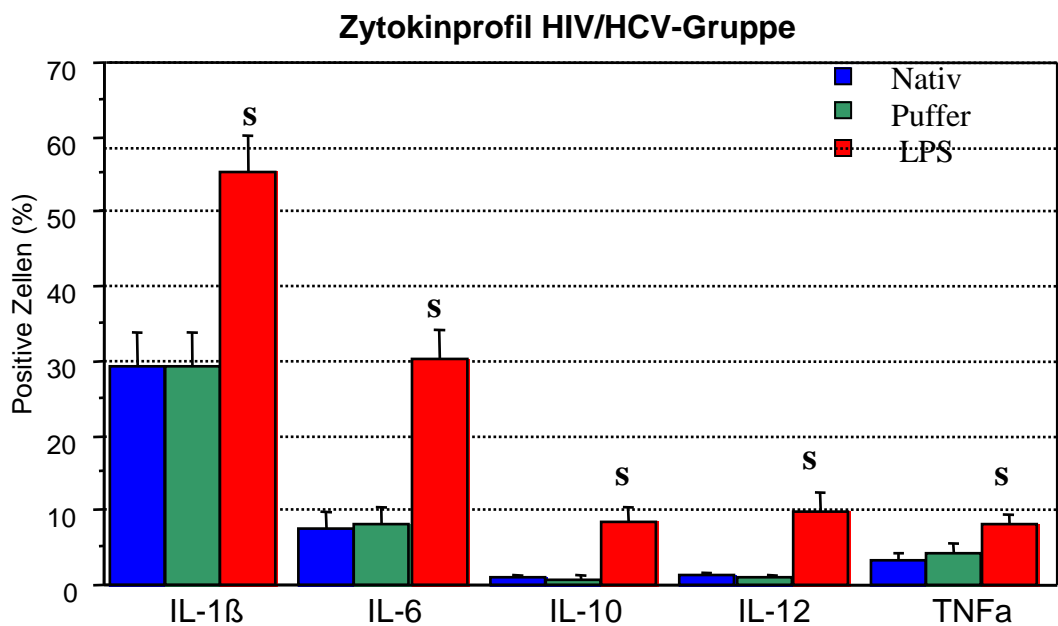
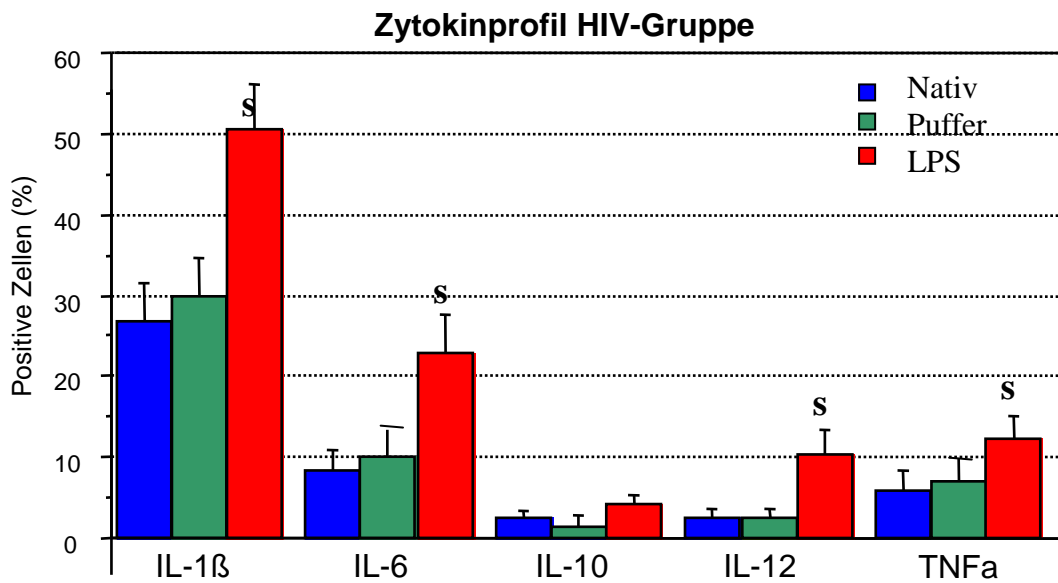
### **3.3 Native Zytokinproduktion von Monozyten im peripheren Blut**

Im nativen unstimulierten Zustand ist eine sehr hohe Spontanreaktivität der Zytokinexpression für IL-1 $\beta$  von ca. 28% und IL-6 von 7-8% in beiden Gruppen nachzuweisen. Die IL-10 und IL-12 Spontanaktivitäten dagegen betragen jeweils 1-3% und für TNF- $\alpha$  3-6% (Abb. 19).

Der Zytokinnachweis in den Pufferkontrollen entsprach dem der Nativproduktion, so dass eine Kontamination bzw. eine erhöhte Mitogenität durch SDS im Puffer ausgeschlossen werden konnte.

Nach Stimulierung mit LPS stieg der Anteil der zytokinpositiven Zellen zur Nativproduktion in beiden Gruppen, bis auf IL-10 in der HIV-Kontrollgruppe, für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  signifikant an (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test  $p \leq 0,05$ ). Für IL-1 $\beta$  betrug der Anteil nach LPS-Stimulation 50-55%, für IL-6 22-30%, für IL-10 4-9%, für IL-12 10% und für TNF- $\alpha$  8-12% (Abb. 19).

Zwischen beiden Gruppen gab es jedoch im Absolutvergleich mittels Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 19:** Darstellung der nativen Zytokinproduktion (blau), der Zytokinproduktion im Puffer (grün) und der unter Stimulation durch LPS (Positivkontrolle, rot) getrennt nach HIV- und HIV/HCV-Gruppe. Auf der Abszisse sind die Zytokine und auf der Ordinate die Mittelwerte der positiven Zellen in Prozent aufgetragen (Fehlerbalken:  $\pm$  Standardfehler). Sowohl die HIV-Gruppe, ausgenommen IL-10, als auch die HIV/HCV-Gruppe reagierten auf LPS Stimulation mit signifikanten Zytokinanstiegen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test  $s$   $p \leq 0,05$ ).

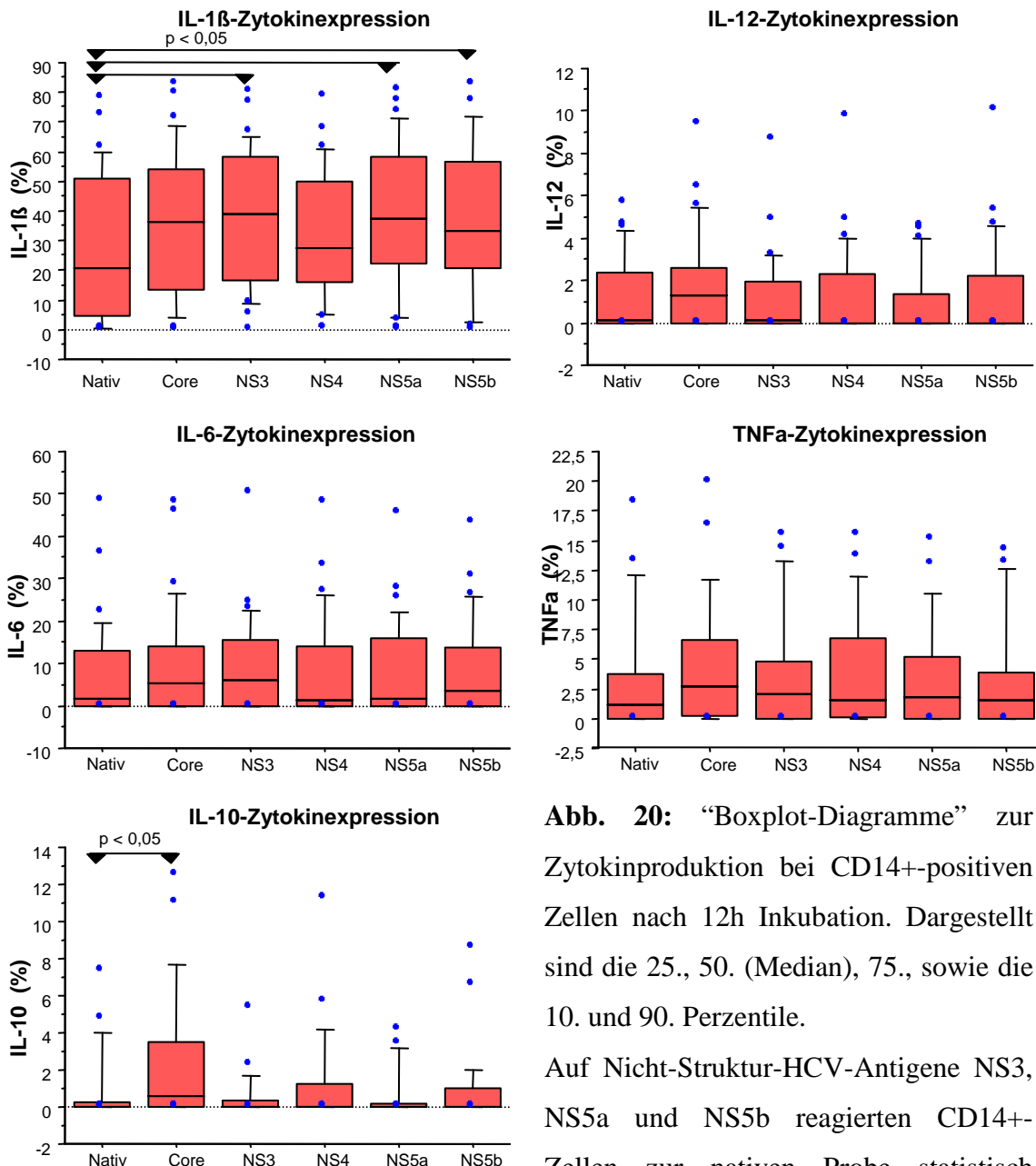
### **3.4 Zytokinproduktion unstimuliert und nach HCV-spezifischer Stimulation**

Der Vergleich der Zytokinproduktion von Monozyten (CD14+) im nativen Zustand und der nach HCV-spezifischer Stimulation zeigte, dass die IL-1 $\beta$  Produktion in beiden Gruppen stark zunahm. Hierfür gab es mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test innerhalb der jeweiligen Studiengruppe eine besondere Reaktivität der Zellen auf Nicht-Struktur-HCV-Antigene NS3, NS4, NS5a, NS5b (Tab. 14).

Bei den HIV/HCV-Koinfizierten konnte eine signifikante IL-1 $\beta$ -Produktion auf NS3, NS5a und NS5b festgestellt werden. Für IL-6 und IL-12 war bei den Koinfizierten die relative Abweichung zur nativen Produktion gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht (IL-6: 200% versus 20-100% und IL-12: 700-1000% versus 50%). Nach Core-Stimulation kam es zu signifikanten IL-10 Induktionen (Abb. 20).

Die HIV-Gruppe zeigte ebenfalls auf die Nicht-Strukturproteine NS3, NS4, NS5a, NS5b eine statistisch signifikante IL-1 $\beta$ -Zytokinproduktion. Auf NS5a nahm die IL-10-Produktion signifikant ab ( $p \leq 0,05$ ) (Abb. 21). Besonders auffällig war die TNF- $\alpha$ -Induktion in der HIV-Kontrollgruppe: hier betrug die relative Abweichung bei Core, NS5a und NS5b bis 1100% versus 100% bei den Koinfizierten.

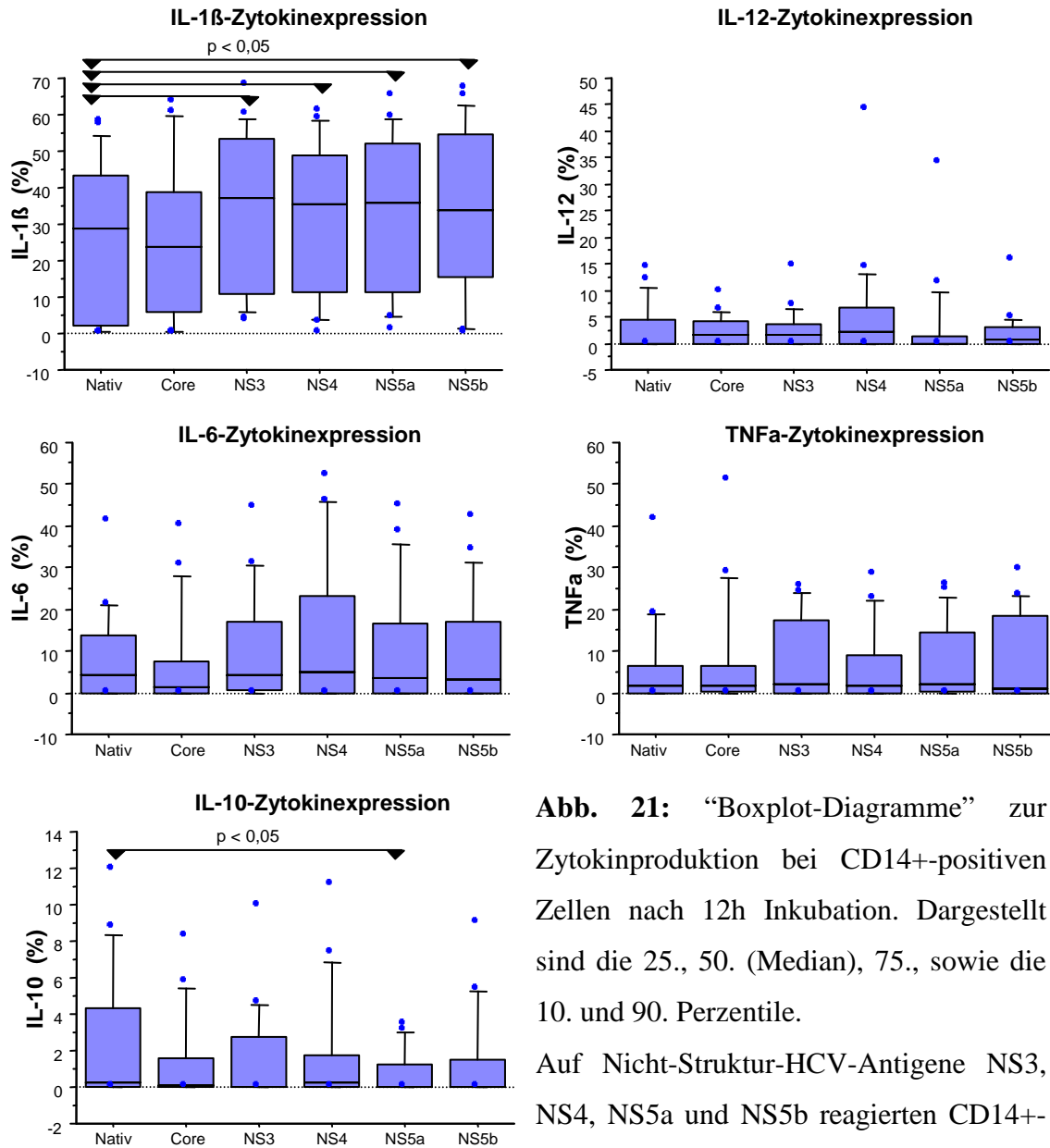
Vergleich der Zytokinproduktion nativ und nach HCV-spezifischer Stimulation -  
HIV/HCV-Gruppe (n=31)



**Abb. 20:** “Boxplot-Diagramme” zur Zytokinproduktion bei CD14+-positiven Zellen nach 12h Inkubation. Dargestellt sind die 25., 50. (Median), 75., sowie die 10. und 90. Perzentile.

Auf Nicht-Struktur-HCV-Antigene NS3, NS5a und NS5b reagierten CD14+-Zellen zur nativen Probe statistisch signifikant mit vermehrter IL-1 $\beta$  und auf Core mit erhöhter IL-10-Produktion (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test  $p \leq 0,05$ ).

**Vergleich der Zytokinproduktion nativ und nach HCV-spezifischer Stimulation -  
HIV-Kontrollgruppe (n=19)**



**Abb. 21:** “Boxplot-Diagramme” zur Zytokinproduktion bei CD14+-positiven Zellen nach 12h Inkubation. Dargestellt sind die 25., 50. (Median), 75., sowie die 10. und 90. Perzentile. Auf Nicht-Struktur-HCV-Antigene NS3, NS4, NS5a und NS5b reagierten CD14+-Zellen zur nativen Probe statistisch signifikant mit vermehrter IL-1 $\beta$  und auf NS5a mit verminderter IL-10-Produktion (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test  $p \leq 0,05$ ).



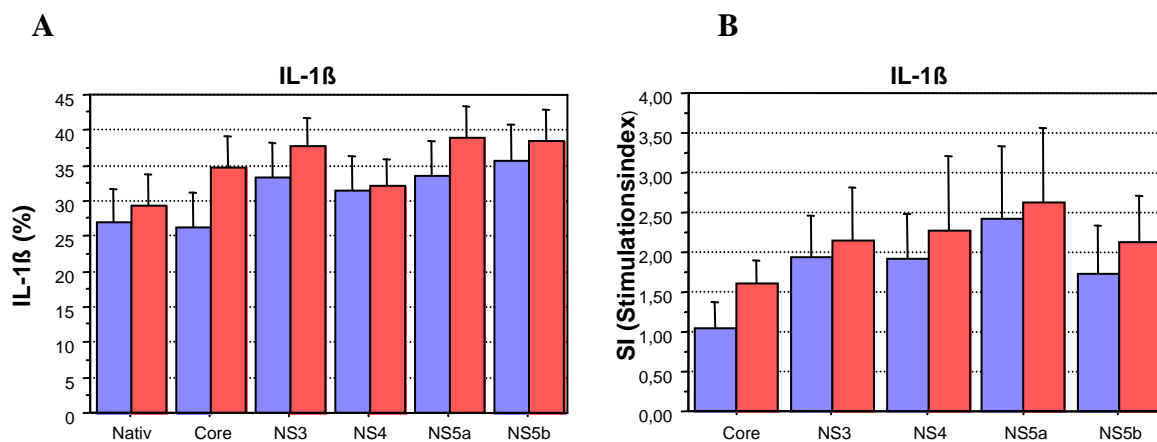
	HIV (n=19)		HIV/HCV (n=31)	
	CD14 Mittel% (Standardfehler)	Signifikanz	CD14 Mittel% (Standardfehler)	Signifikanz
<b>IL-1<math>\beta</math></b>				
Spontanexpression	26,88 (4,78)		29,32 (4,44)	
Core	26,28 (4,95)		34,80 (4,38)	
NS3	33,37 (4,93)	b	37,64 (4,18)	b
NS4	31,42 (4,87)	b	32,14 (3,78)	
NS5a	33,55 (4,88)	b	38,91 (4,34)	b
NS5b	35,58 (5,29)	b	38,34 (4,44)	b
LPS	50,43 (5,58)	b	55,27 (5,10)	b
<b>IL-6</b>				
Spontanexpression	8,33 (2,60)		7,58 (2,10)	
Core	6,97 (2,86)		9,73 (2,36)	
NS3	10,57 (3,23)		9,16 (2,17)	
NS4	14,58 (4,52)		8,88 (2,22)	
NS5a	10,41 (3,36)		8,14 (2,03)	
NS5b	9,86 (3,11)		8,56 (2,03)	
LPS	22,87 (4,84)	b	30,35 (3,89)	b
<b>IL-10</b>				
Spontanexpression	2,53 (0,91)		0,92 (0,39)	
Core	1,33 (0,59)		2,49 (0,74)	b
NS3	1,62 (0,67)		0,52 (0,24)	
NS4	1,68 (0,78)		1,26 (0,52)	
NS5a	0,72 (0,29)	b	0,60 (0,25)	
NS5b	1,39 (0,66)		0,93 (0,43)	
LPS	4,21 (1,05)		8,49 (1,94)	b
<b>IL-12</b>				
Spontanexpression	2,58 (1,06)		1,23 (0,34)	
Core	2,31 (0,69)		1,83 (0,46)	
NS3	2,47 (0,89)		1,17 (0,40)	
NS4	5,51 (2,61)	a	1,23 (0,45)	a
NS5a	3,05 (2,04)		0,89 (0,31)	
NS5b	2,28 (0,93)		1,23 (0,47)	
LPS	10,39 (2,96)	b	9,79 (2,64)	b
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
Spontanexpression	5,82 (2,66)		3,26 (1,00)	
Core	7,71 (3,36)		4,71 (1,10)	
NS3	7,88 (2,38)		3,61 (0,98)	
NS4	6,29 (2,21)		3,91 (1,00)	
NS5a	6,90 (2,16)		3,42 (0,90)	
NS5b	7,29 (2,50)		3,27 (0,93)	
LPS	12,38 (2,65)	b	8,12 (1,37)	b
a = p < 0,05 HIV-Positive vs. HIV/HCV-Positive (Mann-Whitney-U Test)				
b = p < 0,05 stimulierte vs. spontane Zytokinexpression (Wilcoxon-Vorzeichen-RangTest)				

**Tab. 14:** CD14+-Zellen mit intrazellulärer Monokinexpression.

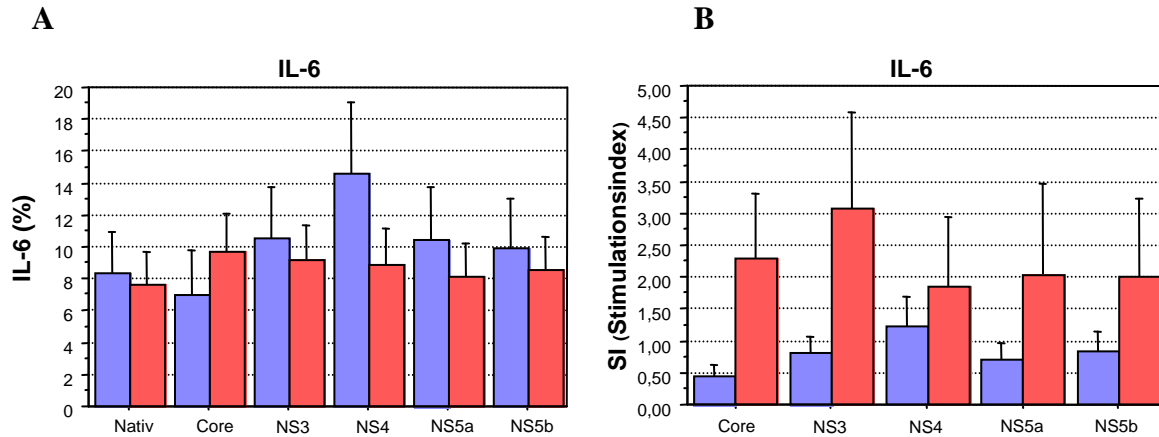
### 3.5 Zytokinproduktion nach HCV-spezifischer Stimulation im Gruppenvergleich

Obwohl die Kontrollgruppe gegenüber der HIV/HCV-Gruppe ein ähnliches Zytokinreaktionsmuster aufwies, lagen, bis auf IL-1 $\beta$ , die absoluten Mittelwerte für die Zytokine IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  bei den Monoinfizierten höher (Tab. 14). Betrachtet man die relative Abweichung (Stimulationsindex, SI), d.h. das Verhältnis der stimulierten Probe zur Pufferkontrolle, so konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Koinfizierten nach Stimulation eine deutlich höhere Expression für IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12 haben. Ein signifikanter Unterschied bestand für Core bei IL-10.

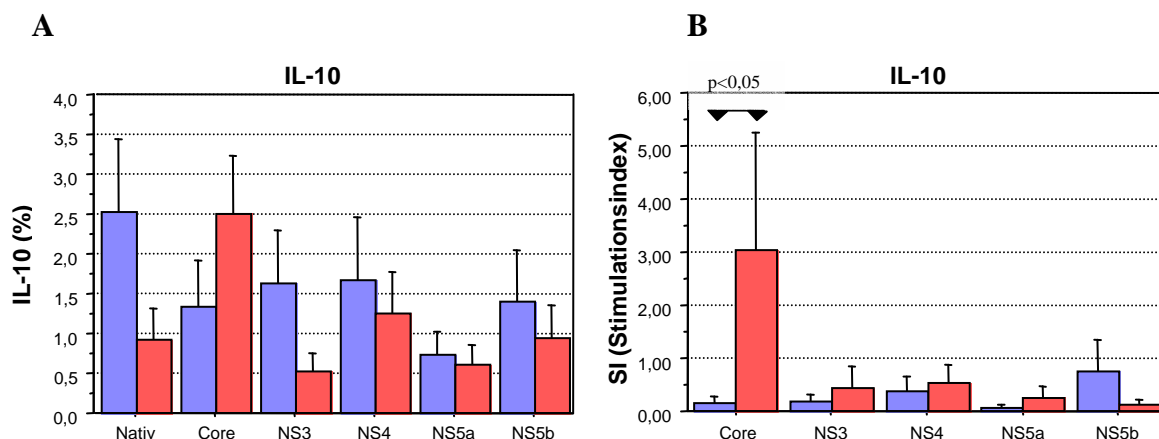
Die Zytokin-IL-1 $\beta$ -Produktion betrug in der HIV/HCV-Gruppe 32-38%  $\pm$ SEM ( $\pm$ 3-4%) und war gegenüber der HIV-Gruppe unter Stimulation um etwa 3-8% positive Zellen vermehrt, jedoch bestand hierfür keine statistische Signifikanz (Abb. **A**). Die relative Abweichung (Stimulations-Index) war bei den Koinfizierten im Mittel SI 1,5-2,5 größer als die der Monoinfizierten SI 1,0-2,5 (Abb. **B**).



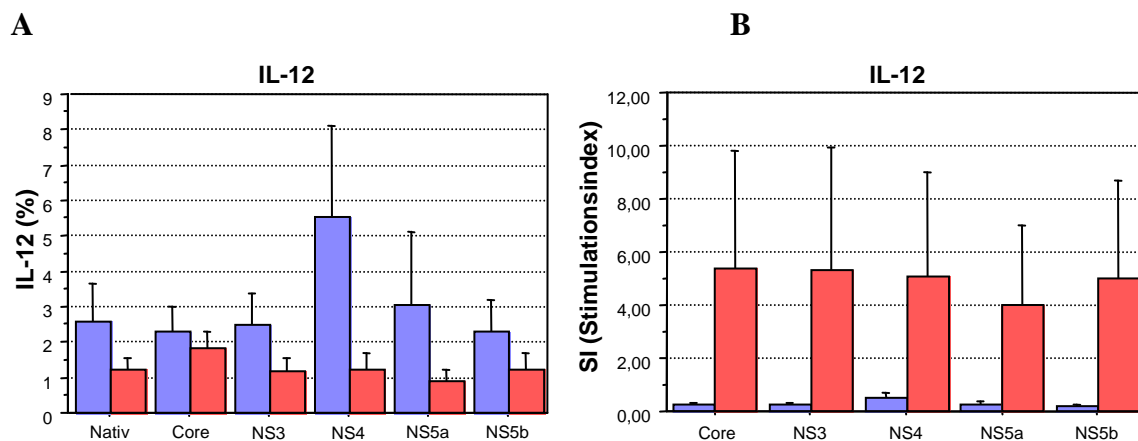
Unter Stimulation zeigte die HIV-Gruppe auf Nicht-Strukturproteine eine vermehrte IL-6 Reaktivität: hierbei waren auf NS4 doppelt so viele positive Zellen mit 14,6% ( $\pm$ 4,5%) gegenüber der Koinfizierten mit 8,9% ( $\pm$ 2,2%) zu beobachten. Nur bei Core war die durchschnittliche Anzahl an IL-6-positiven Zellen bei den Koinfizierten mit 9,7% ( $\pm$ 2,4%) gegenüber der HIV-Gruppe mit 7% ( $\pm$ 2,9%) erhöht (Abb. **A**). Trotz geringerer Absolutwerte lagen im Durchschnitt 2 bis 4-fach höhere SI-Werte für die HIV/HCV-Gruppe als in der Kontrolle vor (SI 2,0-3,0 versus SI 0,4-1,2) (Abb. **B**).



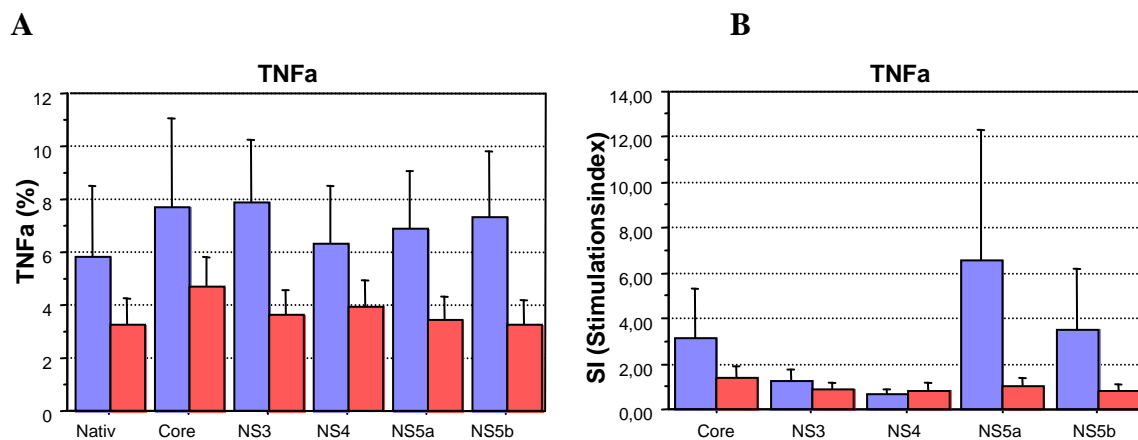
Der Zytokinnachweis für IL-10 fiel in beiden Gruppen nach Stimulation gering aus. Ähnlich wie bei IL-6 ist auf Core eine fast doppelt so hohe Reaktivität bei den Koinfizierten mit 2,4% ( $\pm 0,74\%$ ) versus 1,3% ( $\pm 0,59\%$ ) festzustellen: hierfür bestand eine statistische Signifikanz (Wald-Wolfowitz-Runs-Test). Die Absolutwerte bei Stimulation mit Nicht-Strukturproteinen waren dagegen in der Kontrollgruppe gegenüber der Untersuchungsgruppe nur leichtgradig erhöht, d. h. der NS3-Wert betrug in der HIV-Gruppe 1,62% ( $\pm 0,67$ ) und war demnach zur HIV/HCV-Gruppe mit 0,52% ( $\pm 0,24\%$ ) dreifach erhöht (Abb. **A**, **B**). Auffällig war hierbei eine relativ hohe Spontanexpression in der Kontrollgruppe von 2,5%, so dass die relative Abweichung (SI) für die HIV-Gruppe sehr gering ausfiel (SI 0,1-0,8 versus 0,1-3,0) (Abb. **B**).



Bei IL-12 wies die HIV-Gruppe im Durchschnitt eine höhere Absolutexpression von 2-6% versus ca. 1% bei den Koinfizierten auf. Ein signifikanter Unterschied konnte für NS4 ( $p \leq 0,05$ ) nachgewiesen werden. Der Mittelwert für die HIV-Gruppe betrug 5,5% ( $\pm 2,6$ ) versus 1,2% ( $\pm 0,45$ ) für HIV/HCV-Gruppe. Der Vergleich der SI-Werte zeigte in der Gruppe der Koinfizierten eine deutlich verstärkte Induktion von IL-12 gegenüber der Pufferkontrolle. Die Werte für die HIV/HCV-Gruppe lagen hierbei SI 4,0-5,0 versus HIV-Gruppe SI 0,1-0,3 (Abb. A, B).



Das Zytokinprofil für TNF- $\alpha$  fiel bei den HIV-Infizierten deutlich stärker aus. Es wurden auf Core, NS3, NS5a und NS5b doppelt so viele positive Zellzahlen, nämlich 6-7% gegenüber 3-4% beobachtet, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.



**Abb. 22: A** Zytokininduktion nach antigener Stimulation im Gruppenvergleich. Balkendiagramm der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Absolutexpression in der HIV-Kontrollgruppe war für IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  gegenüber der HIV/HCV-Gruppe erhöht.

**B** Mittlere relative Abweichung (SI)  $\pm$  Standardfehler zur nativen Zytokinproduktion. Eine deutlich stärkere Zytokinexpression nach Stimulation war in der Gruppe der Koinfizierten für IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 (Core) und IL-12 zu beobachten. Eine signifikante Abweichung bestand für IL-10 nach Stimulation mit Core ( $p \leq 0,05$ ).

Betrachtet man die relative Abweichung (Stimulationsindex, SI) und davon die Anzahl der Ereignisse in beiden Patientengruppen, die jeweils auf mindestens eines der verwendeten rekombinanten HCV-Proteine mit einem signifikanten Anstieg  $SI \geq 3$  (Quotient der Messprobe zur Pufferkontrolle  $\geq 3$ ) reagiert haben, so zeigte sich für das Zytokin IL-12 ein signifikanter Unterschied (Fisher-p-exakt  $\leq 0,05$ ) (Tab. 15). 21,33% der Patienten aus der Koinfizierten-Gruppe waren mit einem durchschnittlichen SI-Wert von 10,24 ( $\pm 8,05$ ) gegenüber 5,91% aus der Kontrollgruppe reaktiv. Hier betrug der SI-Mittelwert 2,1 ( $\pm 1,25$ ).

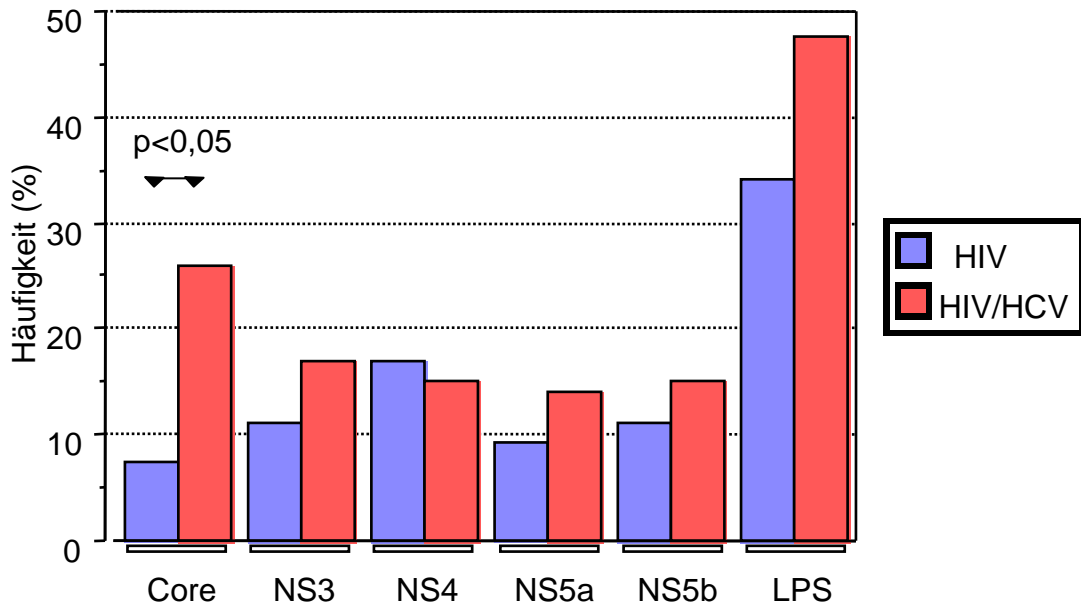
Auch auf Core-Stimulus bestand hinsichtlich der Anzahl reaktiver Patienten in beiden Gruppen eine statistische Signifikanz zugunsten der Koinfizierten-Gruppe ( $p \leq 0,001$ ) (Tab. 16). Dabei reagierten 25,88% der Koinfizierten mit einem SI-Mittelwert von 6,15 ( $\pm 3,99$ ) gegenüber 7,41 % der Patienten in der Kontrollgruppe mit einem SI von 1,72 ( $\pm 0,94$ ).

	IL-1 $\beta$		IL-6		IL-10		IL-12		TNFa	
	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV
<b>Mittelwert (SI)</b>	2,02	2,30	1,23	3,72	0,70	3,38	2,10	10,24	5,46	1,88
<b><math>\pm</math> SEM</b>	0,63	0,72	0,40	2,01	0,49	2,40	1,25	8,05	3,94	0,61
<b>Anteil reaktiver Pat.</b>	11/85	24/144	6/59	16/94	2/40	6/38	2/35	16/75	9/50	12/75
<b>SI &gt;3 (%)</b>	12,94%	16,70%	10,16%	17,02%	5,00%	15,79%	5,91%	21,33%	18,00%	16,00%

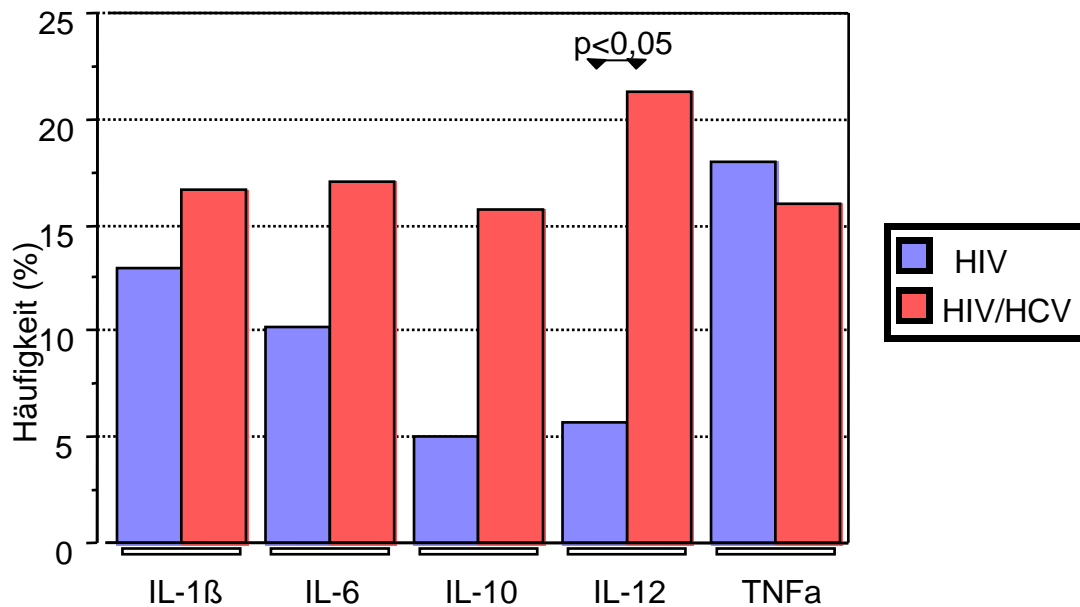
**Tab. 15:** Anteil reaktiver Patienten ( $SI \geq 3$ ) auf HCV-antigener Stimulation. Signifikanter Unterschied für IL-12 ( $p \leq 0,05$ ).

		core		NS3		NS4		NS5b		NS5a	
		HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV	HIV	HIV/HCV
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Mittelwert (SI)	1,17	1,71	2,17	2,29	2,14	2,43	1,94	2,28	2,70	2,80
	SEM	0,35	0,31	0,54	0,71	0,60	0,98	0,64	0,60	1,00	0,99
	Anteil reaktiver Pat.	1/17	7/28	3/17	5/29	3/17	3/29	2/17	5/29	2/17	4/29
	SI >3 (%)	5,90%	25,00%	17,60%	17,20%	17,60%	10,30%	11,80%	17,20%	11,80%	13,80%
<b>IL-6</b>	Mittelwert (SI)	0,70	3,90	1,24	5,11	1,88	3,03	1,24	3,26	1,07	3,31
	SEM	0,24	1,59	0,35	2,44	0,66	1,75	0,43	1,95	0,32	2,32
	Anteil reaktiver Pat.	0/12	5/19	1/12	4/18	3/12	3/19	1/12	2/19	1/12	2/19
	SI >3 (%)	0,00%	26,30%	8,30%	22,20%	25,00%	15,80%	8,30%	10,50%	8,30%	10,50%
<b>IL-10</b>	Mittelwert (SI)	0,36	11,32	0,40	2,10	0,88	2,01	1,70	0,48	0,17	0,99
	SEM	0,27	8,10	0,33	1,83	0,54	1,10	1,25	0,26	0,08	0,71
	Anteil reaktiver Pat.	0/8	2/8	0/8	1/6	1/8	2/8	1/8	0/8	0/8	1/8
	SI >3 (%)	0,00%	25,00%	0,00%	16,70%	12,50%	25,00%	12,50%	0,00%	0,00%	12,50%
<b>IL-12</b>	Mittelwert (SI)	0,67	11,12	0,65	11,01	1,28	10,41	7,22	10,35	0,70	8,32
	SEM	0,14	9,10	0,14	9,54	0,52	8,07	5,16	7,51	0,31	6,01
	Anteil reaktiver Pat.	0/7	5/15	0/7	2/15	2/7	3/15	0/7	3/15	0/7	3/15
	SI >3 (%)	0,00%	33,30%	0,00%	13,30%	28,60%	20,00%	0,00%	20,00%	0,00%	20,00%
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Mittelwert (SI)	5,70	2,68	2,17	1,64	1,22	1,60	6,31	1,55	11,87	1,92
	SEM	3,70	0,84	0,87	0,50	0,24	0,51	4,70	0,45	10,19	0,74
	Anteil reaktiver Pat.	3/10	3/15	2/10	2/15	0/10	2/15	2/10	3/15	2/10	2/15
	SI >3 (%)	30,00%	20,00%	20,00%	13,30%	0,00%	13,30%	20,00%	20,00%	20,00%	13,30%
	Mittelwert (SI)	1,72	6,15	1,33	4,43	1,48	3,90	3,68	3,58	3,30	3,47
	SEM	0,94	3,99	0,45	3,00	0,51	2,48	2,44	2,15	2,38	2,15
	Anteil reaktiver Pat.	4/54	22/85	6/54	14/83	9/53	13/86	6/54	13/86	5/54	12/86
	SI >3 (%)	7,41%	25,88%	11,11%	16,87%	16,98%	15,12%	11,11%	15,12%	9,26%	13,95%

**Tab. 16:** Übersicht über die absolute und relative Häufigkeit reaktiver Patienten (SI $\geq$ 3) für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit rekombinanten HCV-Proteinen im Gruppenvergleich. Die SI-Mittelwerte und Standardfehler (SEM) beziehen auch SI-Werte < 3 mit ein. Die Summe aller reaktiven Patienten auf HCV-Proteine ist im unteren Kästchen dargestellt. Bei core kam es in der Koinfizierten-Gruppe zu höheren SI-Werten von IL-6 (MW-p<0,02) und IL-10 (MW-p<0,05). Die Frequenz reaktiver Patienten auf Core zeigte eine statistische Signifikanz (Fisher p<0,001).



**Abb. 23:** Häufigkeit reaktiver Patienten ( $SI > 3$ ) auf HCV-antigene Stimulation. Signifikanter Unterschied besteht für Core.



**Abb. 24:** Häufigkeit reaktiver Patienten ( $SI > 3$ ) mit vermehrter Zytokinproduktion nach HCV-antigener Stimulation. Signifikante IL-12 Responderhäufigkeit bei der HIV/HCV-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

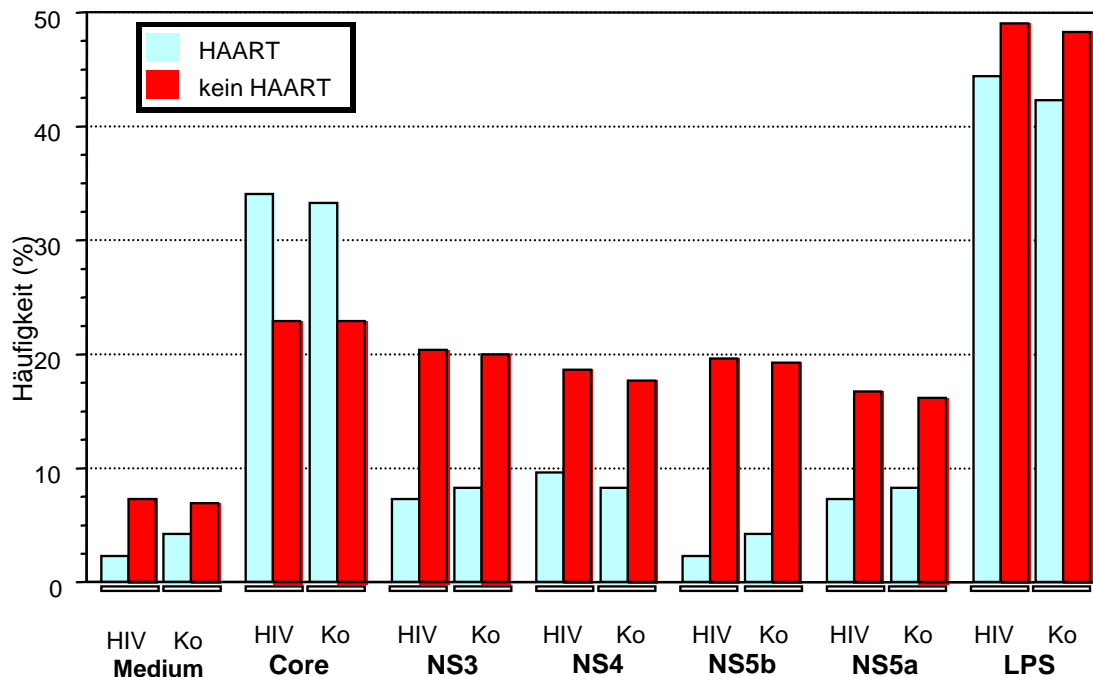
### 3.6 Einfluss der HIV-Therapieart auf die Monokinexpression

Eine wichtige Einflussgröße auf die Immunantwort der Monozyten ist die Art der HIV-Therapie. 8 Patienten (25,8%) der HIV/HCV-Patienten und 7 Patienten (36,8%) in der Kontrollgruppe erhielten eine hochwirksame antiretrovirale Therapie (HAART).

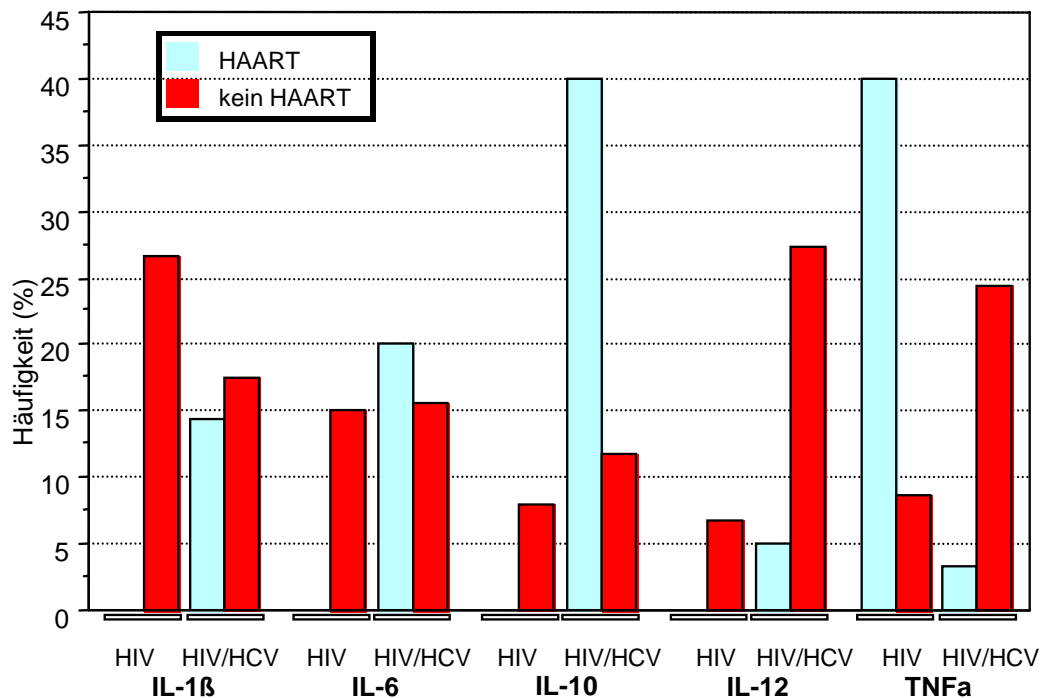
Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der reaktiven Patienten unter den Patienten, die keine HAART-Therapie zuvor erhielten, deutlich höher lag (Abb. 25). Nur bei Core waren sowohl in der HIV/HCV- als auch in der Kontrollgruppe bis zu 35% der HAART-behandelten Patienten gegenüber etwa 20% der Patienten ohne HAART-Therapie stärker reaktiv.

Hinsichtlich der Monokinproduktion zeigte die HIV/HCV-Gruppe eine geringere Responderhäufigkeit von 5% für IL-12 und TNF- $\alpha$  bei HAART+, demgegenüber lag die Häufigkeit bei HAART- bei 25%. Eine Ausnahme lag bei IL-10 mit 40% HAART+ versus 12% HAART- vor. Die Häufigkeit von IL-1 $\beta$  und IL-6-Expression lag sowohl bei HAART+ als auch bei HAART- bei 15%.

Auffällig war die höhere TNF- $\alpha$  Responderhäufigkeit bei der HIV-Gruppe nach HAART.







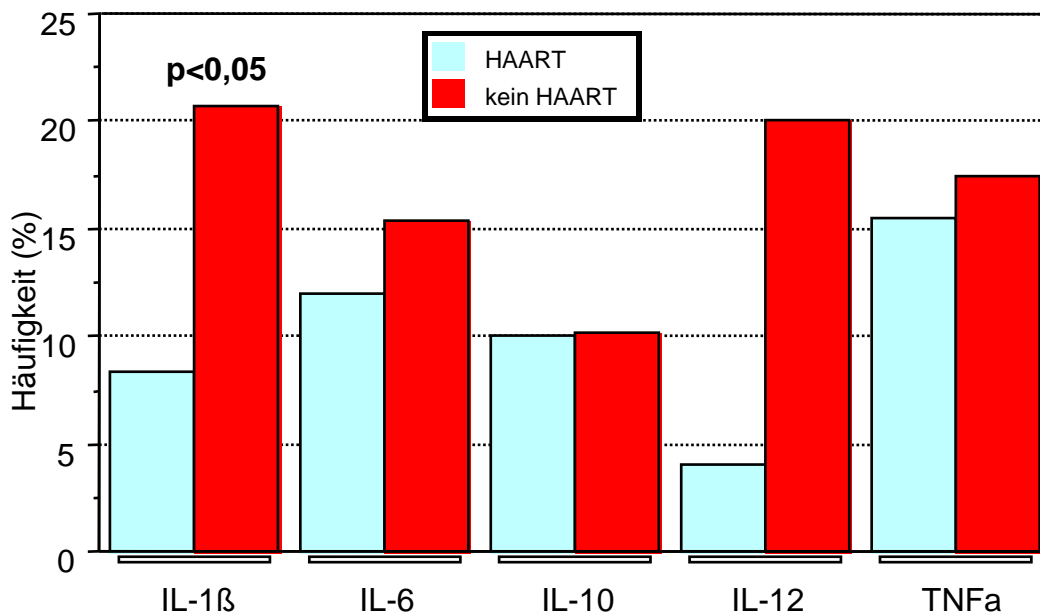
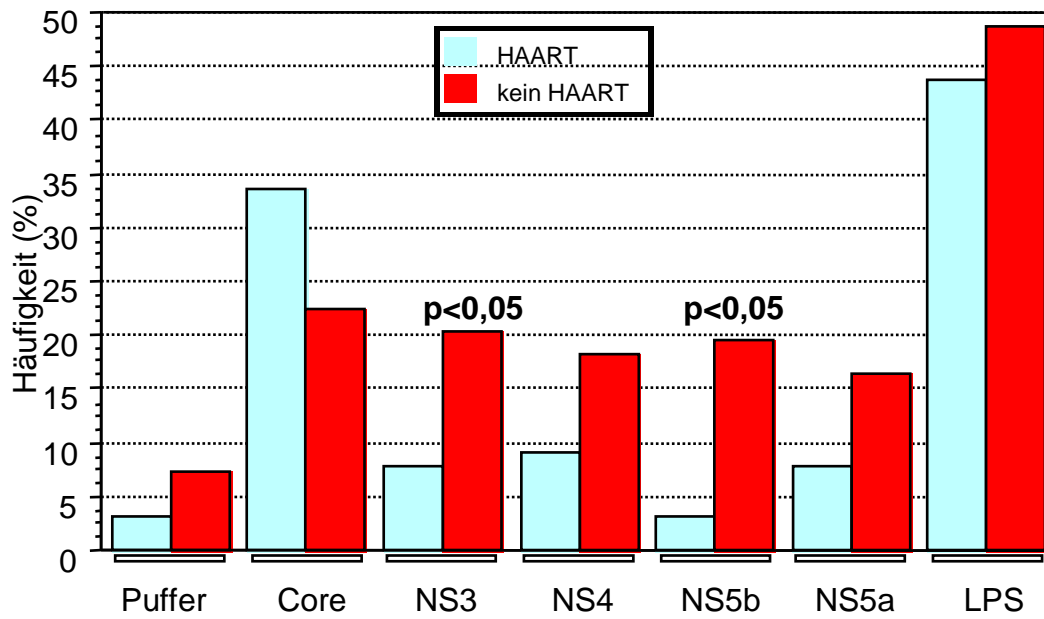
**Abb. 25:** Absolute und relative Häufigkeit reaktiver Patienten getrennt nach Gruppe und HIV-Therapieart. Patienten mit HAART-Therapie (HAART+) reagieren mit Ausnahme von Core weniger häufig und zeigen eine verminderte Zytokinproduktion.

Betrachtet man die Häufigkeit aller reaktiven Patienten beider Gruppen in Bezug auf eine erhaltene bzw. keine HAART-Therapie, so zeigte die Gruppe ohne HAART auf NS3 (Fisher  $p < 0,03$ ) und NS5b ( $p < 0,01$ ) eine erhöhte Responderhäufigkeit von 20% gegenüber 3-8% in der Gruppe mit HAART-Therapie. Des Weiteren waren bei 20% der nicht mit HAART behandelten Patienten eine signifikant erhöhte IL-1β-Produktion gegenüber 8% bei HAART-Patienten reaktiv ( $p < 0,03$ ) feststellbar (Tab. 17 und Abb. 26).

	Core		NS3		NS4		NS5b		NS5a	
	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-
<b>HIV/HCV</b>										
Anteil reaktiver Pat.	8/24	14/61	2/24	12/60	2/24	11/62	1/24	12/62	2/24	10/62
SI >3 (%)	33,30%	22,90%	8,30%	20,00%	8,30%	17,70%	4,20%	19,30%	8,30%	16,10%
<b>HIV</b>										
Anteil reaktiver Pat.	14/41	23/101	3/41	20/98	4/41	19/102	1/41	20/102	3/41	17/102
SI >3 (%)	34,10%	22,80%	7,30%	20,40%	9,70%	18,60%	2,40%	19,60%	7,30%	16,70%
	<b>22/65</b>	<b>37/162</b>	<b>5/65</b>	<b>32/158</b>	<b>6/65</b>	<b>30/164</b>	<b>2/65</b>	<b>32/164</b>	<b>5/65</b>	<b>27/164</b>
	<b>33,50%</b>	<b>22,40%</b>	<b>7,70%</b>	<b>20,20%</b>	<b>9,20%</b>	<b>18,30%</b>	<b>3,10%</b>	<b>19,50%</b>	<b>7,70%</b>	<b>16,50%</b>

	IL-1 $\beta$		IL-6		IL-10		IL-12		TNF $\alpha$	
	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-	HAART+	HAART-
<b>HIV/HCV</b>										
Anteil reaktiver Pat.	5/35	19/109	6/30	10/64	2/5	4/34	1/20	15/55	1/30	11/45
SI >3 (%)	14,30%	17,40%	20,00%	15,60%	40,00%	11,80%	5,00%	27,30%	3,30%	24,40%
<b>HIV</b>										
Anteil reaktiver Pat.	0/25	16/60	0/20	6/40	0/15	2/25	0/5	2/30	6/15	3/35
SI >3 (%)	0,00%	26,70%	0,00%	15,00%	0,00%	8,00%	0,00%	6,70%	40,00%	8,60%
	<b>5/60</b>	<b>35/169</b>	<b>6/50</b>	<b>16/104</b>	<b>2/20</b>	<b>6/59</b>	<b>1/25</b>	<b>17/85</b>	<b>7/45</b>	<b>14/80</b>
	<b>8,30%</b>	<b>20,70%</b>	<b>12,00%</b>	<b>15,40%</b>	<b>10,00%</b>	<b>10,20%</b>	<b>4,00%</b>	<b>20,00%</b>	<b>15,50%</b>	<b>17,50%</b>

**Tab. 17:** Betrachtet man die Häufigkeit aller reaktiven Patienten beider Gruppen in Bezug auf eine erhaltene bzw. keine HAART-Therapie, so zeigte die Gruppe ohne HAART auf NS3 (Fisher  $p < 0,03$ ) und NS5b ( $p < 0,01$ ) eine erhöhte Responderhäufigkeit von 20% gegenüber 3-8% in der Gruppe mit HAART-Therapie. Des Weiteren waren bei 20% der nicht mit HAART behandelten Patienten eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Produktion gegenüber 8% bei HAART-Patienten reaktiv ( $p < 0,03$ ) feststellbar.



**Abb. 26:** Häufigkeit reaktiver Patienten getrennt nach der HIV-Therapieart.

## **4. Diskussion**

Die Effizienz der antiviralen Immunantwort bei viralen Infektionen wird im Wesentlichen durch CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten und deren sezernierte Zytokine bestimmt. Hierbei wird zwischen einem TH1-(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) und einem TH2-Sekretionsmuster (IL-4, IL-10, IL-13) unterschieden. Einen günstigen Krankheitsverlauf der HCV-Infektion wird dabei dem zellulären TH1-vermittelten Zytokinmuster zugeschrieben.

Bei der Infektabwehr kommt den aktivierten Blutmonozyten eine wichtige Rolle zu, da diese Aufgaben in der Antigenerkennung, -prozessierung, und -präsentierung wahrnehmen. Zudem haben Blutmonozyten durch ihre Monokinsekretion immunmodulatorische Funktionen. IL-12 ist hierbei ein wichtiges Zytokin der Monozyten (Monokin), welches die TH1-Lymphozytendifferenzierung beeinflusst, während IL-4, IL-6 und IL-10 die Typ 2-Immunantwort induzieren.

Da bei einer HIV/HCV-Koinfektion auch das Monozyten/Makrophagensystem von dem HI-Virus infiziert wird, liegt hierin möglicherweise die Ursache für eine Monozyten-Dysfunktion mit verändertem Zytokin-Sekretionsmuster und konsekutiv veränderter T-Zellinteraktion. Dies könnte ein Grund für den schnelleren Krankheitsverlauf der HCV bei HIV-Koinfektion sein.

In dieser Dissertation wurde deshalb die HCV-antigenspezifische Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  bei peripheren Blutmonozyten untersucht.

### **4.1 Native Zytokinproduktion von Monozyten im peripheren Blut bei HIV/HCV-Koinfektion und bei HIV-Monoinfektion**

Im ersten Teil der Dissertation wurde die spontane Monokinexpression untersucht. Hierbei wurde analysiert, ob eine Patientengruppe durch ein bestimmtes Zytokinprofil charakterisiert wird, das den Krankheitsverlauf beeinflusst.

Die in vitro durchgeführten Untersuchungen an peripheren mononukleären Blutzellen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der spontanen Monokinproduktion in beiden Untersuchungsgruppen.

Auffällig ist die vermehrte Spontanexpression für die Zytokine IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  bei den HIV-Infizierten, während die Spontanaktivitäten von IL-1 $\beta$  und IL-6 auf einem höheren Niveau in beiden Gruppen vergleichbar sind. Dieses deutet auf einen voraktivierten in vivo-Zustand der Monozyten hin. Zum anderen zeigt es die Hyporeagibilität der Monozyten mit einem schlechten TH1-Sekretionsmuster in der HIV/HCV-Gruppe an.

Auch Bocchino et al. (2001) konnte bei ihre Monokinuntersuchung an HIV-Infizierten eine verstärkte Spontanaktivität für IL-12 und TNF- $\alpha$  feststellen. Sie konnte sogar eine positive Korrelation für die Cosynthese von IL-12 und TNF- $\alpha$  beobachten. Lathey et al. (1994) zeigte bei seinen Monokinbestimmungen mittels RT-PCR, dass erhöhte Spontanexpressionen für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , vor allem bei asymptomatischer HIV, vorliegen. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Verfassers bestätigen diese Beobachtung.

Dennoch bleibt der Einfluss der HIV-Infektion auf die TNF- $\alpha$ -Induktion unklar. In einigen Arbeiten wurde eine verminderte TNF- $\alpha$ -Synthese bei HIV-Positiven (Ullum et al. 1997) und in Anderen eine verstärkte Spontanexpression von PBMC bei Patienten mit fortgeschrittenem AIDS (Wright et al., 1988) gezeigt. Sicher ist, dass TNF- $\alpha$  eine entscheidende Rolle in der HIV-Pathogenese spielt (Beretta et al. 2000; Aukrust et al. 1999).

Diese Daten stehen nicht in Einklang mit den erhobenen Befunden von Amaraa et al. (2002), die bei chronischen HCV Patienten signifikant höhere IL-10 und IL-12 Aktivitäten feststellen konnten. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die unterschiedliche Auswahl der Untersuchungsgruppe und die unterschiedliche Methodik zurückzuführen sein. Insoweit ist zu berücksichtigen, dass Amaraa et al. bei ihrer Untersuchung die Spontanmonokin-Expression bei chronischer HCV-Monoinfektion mit einer asymptomatischen bzw. gesunden Kontrollgruppe verglichen haben. Zum anderen ging es bei Amaraa et al. um die Untersuchung von

CD14<sup>+</sup>/CD80<sup>+</sup>-peripheren Monozyten unter einer Interferon-Therapie in Kombination mit Ribavirin. Eine Koinfektion mit einem HIV-Virus verursacht eine Reihe von intrazellulären Veränderungen in den Monozyten, wie zum Beispiel eine erleichterte HCV-Aufnahme in Monozyten/Makrophagen und konsekutiv eine Zunahme der HCV-Replikation, welche zu einer veränderten Zytokininduktion führen können (Laskus et al. 2004; Radkowski et al. 2004).

Auch zur Synthese von IL-10 bei HIV-positiven Patienten gibt es in der Literatur divergierende Ergebnisse. Sein negativer kontrollregulativer Effekt auf die IL-12-Synthese bei CD64-Monozyten/Makrophagen scheint jedoch erhalten zu sein (Bocchino et al. 2001). In einigen Arbeiten wird kein relevanter Einfluss des HIV-1 auf die IL-10-Monokinproduktion beschrieben (Bergamini et al. 1998).

Die niedrige Spontanaktivität in der HIV/HCV-Gruppe könnte außerdem auf eine verschlechterte Immunlage bei fortgeschrittener Progression der Immunschwäche/Immunsuppression hinweisen, denn die HIV/HCV-Gruppe zeigt eine signifikant längere HIV-Infektionsdauer, einen verminderten Monozytenanteil und einen verminderten CD4-Anteil. Die HIV-Viruslast in der Koinfiziertengruppe ist ebenfalls deutlich erhöht. Dieses konnte Thomas et al. (1996) in einer großen Gruppe von über 2900 i.v.-Drogenabhängigen zeigen. Hedge et al. (2001) beschrieb bei HIV und AIDS einen Zustand der „Anergie“ für TH1-Helfer-Zellen mit reduzierter Lymphokin-Produktion durch Bindung des HI-Virus an das CD4-Membranmolekül sowie an Chemokin-Rezeptoren. Denkbar wäre dieser Einfluss auch bei Monozyten, da auch sie über CD4-Rezeptoren verfügen.

#### **4.2 Zytokinproduktion unstimuliert und nach HCV-spezifischer Stimulation**

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Monozyten-Antwort der beiden Patientengruppen auf eine HCV-antigenspezifische Stimulation *in vitro* analysiert.

Nach HCV-antigenspezifischer Stimulation war bei den Koinfizierten ein signifikanter Anstieg bei IL-1 $\beta$  besonders auf Nicht-Struktur-HCV-Antigene NS3, NS5a und NS5b

und bei IL-10 auf Core zu beobachten. IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  zeigten keinen signifikanten Anstieg auf die antigene Stimulation.

Der in vitro geringerer Zuwachs positiver Zellen in der HIV/HCV-Gruppe könnte als Folge einer viralen „Voraktivierung“ durch in vivo Exposition betrachtet werden. Monozyten könnten aufgrund einer vorbestehenden Antigenstimulation gegenüber einer in vitro Re-Stimulation hyporesponsiv reagieren (Karp et al. 1998; Kawabe und Ochi 1990; Rellahan et al. 1990). Denkbar wäre auch, dass es durch eine antigenspezifische in vitro Stimulation zu einer „Überaktivierung“ mit konsekutivem Zelltod durch Apoptose kommt. Dies ist jedoch spekulativ, da im Rahmen dieser Dissertation keine Apoptoseprozesse untersucht wurden.

Der signifikante Anstieg von IL-10 auf Core ist ein weiterer Hinweis für eine TH2-gerichtete Immunantwort mit der Folge einer schlechteren viralen Immunabwehr. Auch Schols und De Clercq 1996 beschreiben eine HIV-gp120 induzierte IL-10-Produktion in der Makrophagen/Monozyten-Population, welche schließlich zu einer verminderten Proliferation der CD4-abhängigen Zellantwort führt („gp120 induzierte Immunsuppression“). IL-10 hemmt die antivirale Aktivität, indem es die T-Zell-Proliferation und die Synthese der Typ1-Zytokine unterdrückt (De Waal Malefyt et al. 1991). Dies könnte dazu führen, dass bei Patienten mit chronischer HCV bzw. mit zusätzlicher Immunsuppression bei Koinfektion eine effektive Immunantwort gegen das Hepatitis C-Virus ausbleibt (Osna et al., 1997).

In der HIV-Kontrollgruppe kam es nach Stimulation zu einer signifikant verminderten IL-10-Induktion auf NS5a und zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Induktion auf NS3, NS4, NS5a und NS5b. Sonst waren keine signifikanten Änderungen für IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  zu beobachten.

Die signifikante IL-1 $\beta$ -Induktion in der HIV-Gruppe scheint ein HIV-spezifischer Effekt zu sein. Untersuchungen konnten insoweit zeigen, dass selbst das HIV-1 gp120 und sein Vorläuferprotein gp160 an Lymphozyten und an Monozyten eine Induktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10 bewirken (Capobianchi 1996). Ebenfalls zeigten die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Estcourt et al. (1997) eine erhöhte intrazelluläre Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gegenüber einer gesunden

Kontrollgruppe. In einigen Arbeiten wurde eine CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>-Monozytensubgruppe für diese hohe Produktion mit einer möglichen Immundysfunktion im Rahmen der HIV-Infektion vermutet (Thieblemont et al. 1995)

Wie auch bei der Spontanexpression zeigt sich nach einer HCV-antigenspezifischen Stimulation, bis auf IL-1 $\beta$ , keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen für die Zytokine IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$ , wobei eine stärkere Reaktion bei den Monoinfizierten zu finden ist.

Dieses Phänomen könnte, wie oben beschrieben, in der schlechteren Immunabwehrlage der Koinfizierten liegen, denn die HIV/HCV-Gruppe zeigt eine signifikant längere HIV-Infektionsdauer, einen verminderten Monozytenanteil und einen verminderten CD4-Anteil. Die HIV-Viruslast in der Koinfizierten-Gruppe ist ebenfalls deutlich erhöht.

Eine andere Ursache könnte darin liegen, dass es sich bei den HIV-Patienten um eine Risikogruppe handelt, bei der möglicherweise häufiger „HCV-Kontakte“ durch den gemeinsamen Weg der Übertragung, Geschlechtsverkehr mit HCV-Infizierten oder i.v.-Drogen-Missbrauch zustande kommt. Es ist zu bedenken, dass es im Laufe der HIV-Infektion durch einen fortschreitenden Immundefekt zu einem Verlust der HCV-Antikörper kommen kann, so dass eine Koinfektion nur durch Bestimmung der HCV-RNA erkannt werden kann. Man nimmt an, dass dadurch die Prävalenz einer HCV-Infektion bei HIV-positiven Patienten in ca. 4% nicht erkannt wird (Bonacini et al. 1999 und 2001). Eine HCV-Serokonversion wird 2,5-5-fach häufiger bei HIV-Infizierten als bei HIV-negativen Patienten beobachtet (Chamot et al. 1990; Ragni et al. 1993).

#### **4.3 Zytokinproduktion nach HCV-spezifischer Stimulation im Gruppenvergleich**

Ein Vergleich der absoluten Mittelwerte der beiden Gruppen zeigt, außer für IL-1 $\beta$ , bei den Koinfizierten eine insgesamt niedrige antivirale Monozyten-Aktivität für IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  gegenüber HCV-spezifischen Antigenen.

Nur auf Core liegen höhere Monokininduktionen für IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 ( $p < 0,05$ ) für die HIV/HCV-Gruppe vor. Die Anzahl reaktiver Patienten zeigt eine statistische Signifikanz zugunsten der Koinfizierten-Gruppe ( $p \leq 0,001$ ) (Tab. 16). Dabei reagierten



25,88% der Koinfizierten mit einem SI-Mittelwert von 6,15 ( $\pm 3,99$ ) gegenüber 7,41 % der Patienten in der Kontrollgruppe mit einem SI von 1,72 ( $\pm 0,94$ ). Wie in Vorarbeiten festgestellt, gehört das Core-Protein zu den immunogenen HCV-Proteinen (Sippel et al. 2000). Trotz allem scheint eine effektive zelluläre Immunantwort zur Kontrolle des Hepatitis C-Virus gegen das Core-Protein allein nicht ausreichend zu sein. Nicht-Strukturproteine erweisen sich als schlechtere antigene Stimuli bei Patienten mit Koinfektion.

Insgesamt deuten die vom Verfasser gefundenen Daten darauf hin, dass Patienten mit Doppelinfektion auf die Aktivierung mit rekombinanten Core-HCV-Proteinen als spezifische Antigene häufiger mit einer Typ 2-ähnlichen Zytokinantwort reagieren (IL-6; IL-10  $p < 0,05$ ). Der IL-1 $\beta$  Anstieg scheint dagegen eine unspezifische monozytäre Antwort auf die HCV-spezifische Stimulation zu sein, da auch die HIV-Gruppe signifikant reagiert.

Über eine vermehrte Produktion von IL-10 im peripheren Blut bei Patienten mit chronischer Hepatitis C wurde auch von anderen Autoren berichtet (Cacciarelli et al. 1996; Fan et al. 1998; Reiser et al. 1997). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit berichten Woitas et al. (1999) in ihren Untersuchungen nach Core-spezifischer Stimulation von einer Zunahme des Typ 1-Zytokinprofils bei asymptomatischen HIV/HCV-Infizierten, welche sich durch ein verändertes Zytokinprofil in der CD30-Subpopulation kennzeichnen (IL-4, IL-10, INF-gamma). CD30 wird dabei als ein Typ 2-Zytokin-Marker propagiert (Del Prete et al. 1995; Romagnani et al. 1995). Allerdings wurden diese durchflusszytometrischen Untersuchungen an peripheren Lymphozyten und bei asymptomatischen HIV/HCV-Koinfizierten durchgeführt.

Die Spontanexprimierung von IL-6 ist in beiden Gruppen vergleichbar. Auch nach der HCV-antigenspezifischen Stimulation gibt es keine signifikanten Unterschiede für beide Gruppen. Nur auf Core-Protein kommt es bei den Koinfizierten zu einer höheren Reaktion. Insgesamt lässt sich eine häufigere monozytäre IL-6-Expansion bei allen HCV-Antigenen zugunsten der HCV/HIV-Gruppe feststellen. IL-6 gilt als ein

multifunktionales Zytokin, dessen Hauptwirkung die B-Zell-Differenzierung mit konsekutiver IgG-Produktion ist.

In früheren Arbeiten von Birx et al. (1990) konnte bei der HIV-Erkrankung stadienabhängig, in Monozytkulturen hohe IL-6 Serumspiegel sowie IgG festgestellt werden. Auch Chemimi et al. (1994) zeigte eine 3-4-fache IL-6-Induktion bei PBMC nach Stimulation mit *S. aureus*.

Auffällig ist außerdem der geringere Absolutanteil positiver Zellen für IL-12 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation. Bei Betrachtung der relativen Abweichung (Verhältnis von stimulierter Probe zur Spontanaktivität) zeigen jedoch die Koinfizierten nach HCV-antigener Stimulation höhere Stimulationsindices, insbesondere für IL-6 und IL-12. Es kommt zu einer deutlichen IL-12-Expansion gegenüber der Spontan-IL-12-Expression. Betrachtet man die relative Abweichung (Stimulationsindex, SI), und davon die Anzahl der Ereignisse in beiden Patientengruppen, die jeweils auf mindestens eines der verwendeten rekombinanten HCV-Proteine mit einem signifikanten Anstieg von  $SI \geq 3$  (Quotient der Messprobe zur Pufferkontrolle  $\geq 3$ ) reagiert haben, so zeigt sich für das Zytokin IL-12 ein signifikanter Unterschied (Fisher-p-exakt  $\leq 0,05$ ) (Abb. 24). 21,33% der Patienten aus der Koinfizierten-Gruppe waren mit einem durchschnittlichen SI-Wert von  $10,24 (\pm 8,05)$  gegenüber 5,91% aus der Kontrollgruppe reaktiv. Hier betrug der SI-Mittelwert  $2,1 (\pm 1,25)$ .

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass zum einen die spontane IL-12-Monikexpression unter einer HIV-Infektion mit Immunsuppression stark negativ beeinflusst wird (HIV: 2,58% versus HIV/HCV: 1,23%) oder dass zum anderen eine spezifische antivirale IL-12 Expansion vorliegt.

Die Aussage ist allerdings angesichts von fehlenden Literaturdaten nicht verifizierbar.

#### **4.4 Einfluss der HIV-Therapieart auf die Monokinexpression**

In der Dissertation konnte aufgezeigt werden, dass die Häufigkeit reaktiver Patienten für beide Untersuchungsgruppen, die keine HAART-Therapie zuvor erhielten, deutlich höher lagen (Abb. 25). Nur bei Core waren sowohl in der HIV/HCV- als auch in der

Kontrollgruppe bis zu 35% der HAART-behandelten Patienten gegenüber etwa 20% der Patienten ohne HAART-Therapie stärker reaktiv gewesen.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es durch eine HAART –Therapie zu einer verringerten bzw. supprimierten Monokin-Expression bei Monozyten kommt. Allerdings deuten diese Daten noch einmal auf die gute Immunogenität von Core hin. In der Literatur gibt es zu Zeit wenige Untersuchungen zu Monokinen bei HIV/HCV-Koinfektion unter HAART, so dass eine Einordnung der gefundenen Ergebnisse schwierig erscheint.

Ob die Einführung der HAART einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Hepatitis C hat, kann zu Zeit noch nicht abschließend geklärt werden. Nach den bisherigen Untersuchungen wird die Entwicklung des Leberversagens unter einer erfolgreichen HAART-Therapie hinausgezögert. Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass durch eine Immunrekonstitution mit Anstieg von CD4-Zellen und Abfall der HIV-Viruslast eine verbesserte Immunlage entsteht, welche zu einer verstärkten entzündlichen Aktivität und folglich zu einer Progression der Hepatitis C führt. Ein solcher Effekt wird zumindest temporär nach Einleitung von HAART beobachtet. Eine erhöhte Lebertoxizität mit Anstieg von GPT wird häufig nach einem Helferzellanstieg auf eine verbesserte Immunantwort zurückgeführt.

Im Rahmen einer Immunrekonstitution kann es aber auch zu einer Immundysregulation mit konsekutiver Erkrankung kommen. Diese Erkrankungen werden als sog. IRD (immune restoration diseases) bezeichnet.

Hinsichtlich der Monokinproduktion zeigt die HIV/HCV-Gruppe eine geringere Responderhäufigkeit von 5% für IL-12 und TNF- $\alpha$  bei HAART+; demgegenüber liegt die Häufigkeit bei HAART- bei 25%. Eine Ausnahme liegt bei IL-10 mit 40% HAART+ versus 12% HAART- vor. Für IL-1 $\beta$  und IL-6 reagieren sowohl die HAART+ als auch die HAART- in 15%.

Die HIV-Gruppe weist nach HAART eine insgesamt höhere TNF- $\alpha$ -Responderhäufigkeit auf. Diese Daten stehen im Einklang mit den Zytokinuntersuchungen einiger Autoren, die eine Abnahme von CD4-T-produzierenden TNF- $\alpha$  und IL-4-Zellen

beobachten (Aukrust et al. 1999; Lew et al. 2001). Stylianou et al. (1999) beobachtet ebenfalls eine Abnahme der hochregulierten Zytokine IL-10 und TNF- $\alpha$ , welche vor allem AIDS Patienten aufweisen. Es kommt jedoch zu keine Normalisierung des Zytokinlevels. Außerdem wird durch HAART die sog. CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>-Monozytensubgruppe (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) signifikant supprimiert (Amirayan-Chevillard et al. 2000). Diese Daten deuten auf einen beeinflussenden Faktor der HAART-Therapie auf die Monozytenaktivierung hin.

Auch bei Untersuchungen des Verfasser lässt sich eine Abnahme der Reaktivität nach HCV-antigenspezifischer Stimulation durch HAART erkennen. Die Daten zeigen, dass bei Koinfizierten unter einer HAART-Therapie die Responderhäufigkeit für die TH1-Zytokine (IL-12 und TNF- $\alpha$ ) abnimmt dagegen scheint unter HAART eine IL-10-Rekonstitution abzulaufen. Dieses Ungleichgewicht zugunsten einer TH2-ähnlichen Immunantwort ist möglicherweise der Grund für eine insuffiziente Viruselimination und somit verantwortlich für eine schnellere Leberzirrhoseentwicklung trotz HAART.

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an einem kleinen Kollektiv erhoben und bedürfen weiterer Studien zur Klärung des komplexen immunologischen Zusammenspiels bei Hepatitis C und HIV-Infektion.

## 5. Zusammenfassung

Eine Hepatitis C-Virus Infektion bei gleichzeitiger HIV-Erkrankung führt zu einem rascheren Krankheitsverlauf der chronischen Lebererkrankung, welche zu einer Leberzirrhose und schließlich zu einem Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms führt.

Die Pathogenese der HCV-Infektion im Rahmen einer Koinfektion mit dem HI-Virus ist komplex, da bislang noch unzureichend geklärte Immuneffekte mit verändertem Interleukin-, Zytokin-, Monokinmuster und Zellinteraktionen ablaufen. Diese verschlechtern eine Virus-Elimination und begünstigen eine Viruspersistenz.

Sicher ist aber, dass eine effiziente Kontrolle der Virusinfektion von zahlreichen Immunabwehrzellen und von einer effektiven antiviralen Therapie (PEG-Interferon/Ribavirin bzw. HAART) abhängt. Neben der regulatorischen Funktion der T-Helfer-Zellen kommt den Monozyten eine wichtige Rolle in der Immunabwehr zu.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Dissertation die wirtsspezifische Monozyten-Zellantwort *in vitro* vergleichend an zwei Gruppen untersucht: Zum einen an Patienten mit einer HCV/HIV-Koinfektion und zum anderen an Patienten mit einer HIV-Monoinfektion. Bei den Untersuchungen wurde die CD14-Monozyten-Population untersucht. Die intrazytoplasmatische Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10-IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde im nativen Zustand und nach Stimulation mit den rekombinanten HCV-Proteinen Core, NS3, NS4, NS5a und NS5b mit Hilfe der Dreifarben-Durchflusszytometrie auf Einzelzellniveau analysiert.

Im ersten Teil der Dissertation wurde die native Monokinexpression in der HCV/HIV- und in der HIV-Gruppe untersucht. Gleichzeitig wurde analysiert, ob beide Gruppen durch ein bestimmtes Zytokinprofil charakterisiert werden, das den Verlauf der Erkrankung beeinflusst. Die *in vitro*-Untersuchungen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Spontanexpression, aber das Zytokinprofil in der HIV/HCV-Gruppe zeigt indes gegenüber der HIV-Gruppe eine Hyporeagibilität mit schlechterem TH1-Sekretionsmuster.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die Monozyten-Zell-Antwort der beiden Gruppen auf eine HCV-spezifische Stimulation *in vitro* analysiert. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die antigenspezifische Stimulation von Monozyten zu einer unterschiedlichen antigenspezifischen Immunantwort (TH1/TH2) führt und somit zu einer verbesserten Viruselimination bzw. Viruspersistenz der Hepatitis C-Infektion führt. Die Ergebnisse zeigen in der HIV/HCV-Gruppe einen signifikanten unspezifischen IL-1 $\beta$  nach NS3, NS5a und NS5b-Stimulation und einen signifikanten IL-10-Anstieg nach Core-Stimulation. Dieses ist ein weiterer Hinweis für eine TH2-gerichtete Immunantwort mit der Folge einer schlechteren Immunabwehr. Hingegen zeigt sich in der HIV-Gruppe eine signifikante Abnahme für IL-10 nach NS5a sowie signifikante IL-12-Zunahme nach NS4.

Als besonders immunogen konnte das HCV-Protein Core identifiziert werden. Trotz allem scheint eine effektive zelluläre Antwort zur Kontrolle des Hepatitis C-Virus nicht ausreichend zu sein.

Bei niedrig spontaner IL-12-Monokinexpression kann nach antigener Stimulation in der Koinfizierten-Gruppe eine signifikante Responderhäufigkeit gegenüber der HIV-Gruppe festgestellt werden. Dieses lässt die Vermutung zu, dass die IL-12-Expression bei HCV unter einer HIV-Infektion stark negativ beeinflusst wird.

Die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse betätigen die Bedeutung einer TH1-dominierenden Immunantwort für eine effektive HCV-Elimination. Eine „Monozyten-Dysfunktion“ in Form eines TH2-Shifts scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, denn dadurch bleibt eine effiziente Aktivierung von T-Lymphozyten, die TH1-ähnliche Zytokine produzieren, aus.

## 6. Literaturverzeichnis

**Alter MJ** (1997) The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 1(3): 559-568

**Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, Tan D, Van Raden M, Herion D, Lau D, Hoofnagle JH** (1997) Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *Hepatology* 26(3 Suppl 1): 29-33

**Amaraa R, Mareckova H, Urbanek P, Fucikova T** (2002) Production of interleukins 10 and 12 by activated peripheral blood monocytes/macrophages in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection with respect to the response to interferon and ribavirin treatment. *Immunol Lett.* 83(3): 209-214

**Ameglio F, Cordiali Fei P, Solmone M, Bonifati C, Prignano G, Giglio A, Caprilli F, Gentili G, Capobianchi MR** (1994) Serum IL-10 levels in HIV-positive subjects: correlation with CDC stages. *J Biol Regul Homeost Agents* 8(2): 48-52

**Amirayan-Chevillard N, Tissot-Dupont H, Capo C, Brunet C, Dignat-George F, Obadia Y, Gallais H, Mege JL** (2000) Impact of highly active anti-retroviral therapy (HAART) on cytokine production and monocyte subsets in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 120(1): 107-112

**Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M** (1997) Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *Immunol.* 158(11): 5283-5291

**Aukrust P, Muller F, Lien E, Nordoy I, Liabakk NB, Kvale D, Espevik T, Froland SS** (1999) Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. *Infect Dis.* 179(1): 74-82

**Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H (1994)** Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol.* 68(8): 5045-5055

**Behrens SE, Tomei L, De Francesco R (1994)** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15(1): 12-22

**Berg T, Hopf U, Stark K, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E (1997)** Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol.* 26(3): 484-491

**Bergamini A, Bolacchi F, Faggioli E, Placido R, Vendetti S, Cappannoli L, Ventura L, Cerasari G, Uccella I, Andreoni M, Rocchi G (1998)** HIV-1 does not alter in vitro and in vivo IL-10 production by human monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol.* 112(1): 105-111

**Bjoro K, Froland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T (1994)** Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med.* 331(24):1607-1611

**Bocchino M, Ledru E, Debord T, Gougeon ML (2001)** Increased priming for interleukin-12 and tumour necrosis factor alpha in CD64 monocytes in HIV infection: modulation by cytokines and therapy. *AIDS* 15(10): 1213-1223

**Brodt HR, Kamps BS, Gute P, Knupp B, Staszewski S, Helm EB (1997)** Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS* 11(14): 1731-1738

**Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J (1997)** Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 25(2): 470-477



**Benvegnu L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A (1997)** Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 25(1): 211-215

**Birx DL, Redfield RR, Tencer K, Fowler A, Burke DS, Tosato G (1990)** Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 76(11): 2303-2310

**Bonacini M (1999)** Retrospective analysis of the impact of HIV infection and alcohol use on chronic hepatitis C in a large cohort of drug users. *J Hepatol.* 30(2): 347-348

**Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM (1996)** Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology* 24(1): 6-9

**Capobianchi MR (1996)** Induction of lymphomonocyte activation by HIV-1 glycoprotein gp120. Possible role in AIDS pathogenesis. *J Biol Regul Homeost Agents* 10(4): 83-91

**Caspari D (1989)** Public health approach to infectious disease imported by plane. *CMAJ* 140(8): 892-894

**Caussin-Schwemling C, Schmitt C, Stoll-Keller F (2001)** Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* 65(1): 14-22

**Chamot E, Hirschel B, Wintch J, Robert CF, Gabriel V, Deglon JJ, Yerly S, Perrin L (1990)** Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. *AIDS* 4(12): 1275-1277

**Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 88(6): 2451-2455**

**Clerici M, Shearer GM (1993) A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. Immunol Today 14(3): 107-111**

**Cooper CL, Cameron DW (2002) Review of the effect of highly active antiretroviral therapy on hepatitis C virus (HCV) RNA levels in human immunodeficiency virus and HCV coinfection. Clin Infect Dis. 35(7): 873-879**

**de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 174(5): 1209-1220**

**Del Prete G, Maggi E, Pizzolo G, Romagnani S (1995) CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link. Immunol Today 16(2): 76-80.**

**Di Bisceglie AM (1995) Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis. 15(1): 64-69**

**Di Bisceglie AM, Simpson LH, Lotze MT, Hoofnagle JH (1994) Development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease due to hepatitis C viral infection. Clin Gastroenterol. 19(3): 222-226**

**Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR (1995) Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. Lancet 346(8981): 1006-1007**

**Dumoulin FL, Leifeld L, Honecker U, Sauerbruch T, Spengler U (1999) Intrahepatic**

expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 180(5) :1704-1708

**EASL** (1999) International Consensus Conference on hepatitis C. Paris. Consensus statement. Consensus Development Conference. *J Hepatol.* 31 Suppl 1: 3-8

**Estcourt C**, Rousseau Y, Sadeghi HM, Thieblemont N, Carreno MP, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N (1997) Flow-cytometric assessment of in vivo cytokineproducing monocytes in HIV-infected patients. *Clin Immunol Immunopathol.* 83(1): 60-67

**Eyster ME**, Fried MW, Di Bisceglie AM, Goedert JJ (1994) Increasing hepatitis C virus RNA levels in hemophiliacs: relationship to human immunodeficiency virus infection and liver disease. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Blood* 84(4): 1020-1023

**Failla C**, Tomei L, De Francesco R (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* 68(6): 3753-3760

**Fiorentino DF**, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147(11): 3815-3822

**Graham CS**, Curry M, He Q, Afdhal N, Nunes D, Fleming C, Horsburgh R, Craven D, Sherman KE, Koziel MJ (2004) Comparison of HCV-specific intrahepatic CD4+ T cells in HIV/HCV versus HCV. *Hepatology* 40(1): 125-132

**Grakoui A**, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol.* 67(3): 1385-1395

**Han JH**, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, Houghton M (1991) Characterization of the terminal regions of

hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5): 1711-1715

**Hegde** HR, Woodman RC, Robbins SM (2001) Anergy and acquired immune deficiency syndrome. *Med Hypotheses* 56(6): 739

**Hegde** HR, Robbins SM (2001) Anergy and human immunodeficiency virus infection. *Med Hypotheses* 56(3): 376-380

**Heintges** T, Wands JR (1997) Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 26(3): 521-526

**Hijikata** M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K (1991) Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(13): 5547-5551

**Hijikata** M, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hirowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohno K (1993) Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(22): 10773-10777

**Hoofnagle** JH (1997) Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26 (3 Suppl 1): 15-20

**Hoofnagle** JH (1999) Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J Hepatol.* 31 Suppl 1: 264-268

**Honda** M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, Lemon SM (1996) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222(1): 31-42

**Hsieh** CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260(5107): 547-549

**Kakumu** S, Okumura A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, Yoshioka K (1997) Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol.* 108(1): 138-143

**Kawabe** Y, Ochi A (1990) Selective anergy of V beta 8+, CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med.* 172(4):1065-1070

**Kobayashi** M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K (1996) The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 23(4): 695-699

**Koziel** MJ, Walker BD (1997) Characteristics of the intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response in chronic hepatitis C virus infection. *Springer Semin Immunopathol.* 19(1): 69-83

**Laskus** T, Radkowski M, Jablonska J, Kibler K, Wilkinson J, Adair D, Rakela J (2004) Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages. *Blood* 103(10): 3854-3859

**Lathey** JL, Kanangat S, Rouse BT (1994) Differential expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta compared with interleukin 6 in monocytes from human immunodeficiency virus-positive individuals measured by polymerase chain reaction. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 7(2): 109-115

**Lathey** JL, Kanangat S, Rouse BT, Agosti JM, Spector SA (1994) Dysregulation of cytokine expression in monocytes from HIV-positive individuals. *Leukoc Biol.* 56(3): 347-352

**Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U (1996)** T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C viruspositive blood donors without viremia. *Hepatology* 24(4): 790-795

**Lechmann M, Woitas RP, Langhans B, Kaiser R, Ihlenfeldt HG, Jung G, Sauerbruch T, Spengler U (1999)** Decreased frequency of HCV core-specific peripheral blood mononuclear cells with type 1 cytokine secretion in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 31(6): 971-978

**Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC (2001)** Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 279(1): 271-279

**Lesniewski R, Okasinski G, Carrick R, Van Sant C, Desai S, Johnson R, Scheffel J, Moore B, Mushahwar I (1995)** Antibody to hepatitis C virus second envelope (HCV-E2) glycoprotein: a new marker of HCV infection closely associated with viremia. *J Med Virol.* 45(4): 415-422

**Lew E, Gallagher L, Kuehnert M, Rimland D, Hubbard M, Parekh B, Zell E, Jarvis W, Jason J . (2001)** Intracellular cytokines in the acute response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 15(13): 1665-1670

**Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM (1994)** Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol.* 68(8): 5063-5073

**Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH (1995)** Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213(2): 455-461

**Locksley RM (1993)** Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13): 5879-5880

**Major ME, Feinstone SM (1997)** The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 25(6): 1527-1538

**Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S (1993)** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 177(4): 1199-1204

**McNair AN, Main J, Thomas HC (1992)** Interactions of the human immunodeficiency virus and the hepatotropic viruses. *Semin Liver Dis.* 12(2): 188-196

**Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N, Lai MM (1996)** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* 218(1): 43-51

**McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK (1998)** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.* 339(21): 1485-1492

**Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr (1997)** Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 126(12): 946-954

**Miller RH, Purcell RH (1990)** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6): 2057-2061

**Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K (1994)** Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *Viol.* 68(10): 6215-6222

**Mondelli** MU, Silini E (1999) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol.* 31 Suppl 1: 65-70

**Nakamoto** Y, Kaneko S, Kobayashi K (2001) Monocyte-dependent cell death of T lymphocyte subsets in chronic hepatitis C. *Immunol Lett.* 78(3): 169-174

**Osna** N, Silonova G, Vilgert N, Hagina E, Kuse V, Giedraitis V, Zvirbliene A, Mauricas M, Sochnev A (1997) Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 57(8): 703-710

**Poynard** T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J (1998) Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) Lancet* 352(9138): 1426-1432

**Price** P, Mathiot N, Krueger R, Stone S, Keane NM, French MA (2001) Immune dysfunction and immune restoration disease in HIV patients given highly active antiretroviral therapy. *J Clin Virol.* 22(3): 279-287

**Radkowski** M, Bednarska A, Horban A, Stanczak J, Wilkinson J, Adair DM, Nowicki M, Rakela J, Laskus T (2004) Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *J Gen Virol.* 85(Pt 1): 47-59

**Ragni** MV, Ndimbie OK, Rice EO, Bontempo FA, Nedjar S (1993) The presence of hepatitis C virus (HCV) antibody in human immunodeficiency virus-positive hemophilic men undergoing HCV "seroreversion". *Blood* 82(3): 1010-1015



**Reichard O**, Norkrans G, Fryden A, Braconier JH, Sonnerborg A, Weiland O (1998) Comparison of 3 quantitative HCV RNA assays-accuracy of baseline viral load to predict treatment outcome in chronic hepatitis C. *Scand J Infect Dis.* 30(5): 441-446

**Rellahan BL**, Jones LA, Kruisbeek AM, Fry AM, Matis LA (1990) In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med.* 172(4): 1091-1100

**RKI** "Current version of prophylactic drug therapy after occupational HIV-exposure". Consensus conference 21 November 1997 in Munich. Consensus Development Conference Review. *Chirurg.* 1998 Jul; 69(7): suppl 224-226

**Rockstroh JK**, Spengler U, Sauerbruch T (1995) The therapy of viral hepatitis in HIV-infected patients. *Dtsch Med Wochenschr.* 20(49): 1705-1708

**Rockstroh JK**, Vogel M (2004) Therapy of hepatitis C in HIV-coinfection. *Eur J Med Res.* 9(6): 304-308

**Rockstroh JK**, Spengler U (2004) HIV and hepatitis C virus co-infection. *Lancet Infect Dis.* 4(7): 437-444

**Romagnani S**, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G (1995) CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol.* 57(5): 726-730

**Selby MJ**, Glazer E, Masiarz F, Houghton M (1994) Complex processing and protein: protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204(1): 114-122

**Schols D**, De Clercq E (1996) Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J Virol.* 70(8): 4953-4960

**Simmonds P**, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al (1994) A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19(5): 1321-1324

**Simmonds P** (1995) Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21(2): 570-583

**Spengler U**, Lechmann M, Irrgang B, Dumoulin FL, Sauerbruch T (1996) Immune responses in hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 24(2 Suppl): 20-25

**Stone SF**, Price P, French MA (2004) Immune restoration disease: a consequence of dysregulated immune responses after HAART. *Curr HIV Res.* 2(3): 235-242

**Stone SF**, Price P, Keane NM, Murray RJ, French MA (2002) Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. *HIV Med.* 3(1): 21-27

**Stylianou E**, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS (1999) IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression-down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol.* 116(1): 115-120

**Tanji Y**, Hijikata M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K (1995) Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol.* 69(3): 1575-1581

**Thieblemont N**, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N (1995) CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol.* 25(12): 3418-3424

**Tsai SL**, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC (1997) Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 25(2): 449-458

**Ullum H, Victor J, Katzenstein TL, Gerstoft J, Gotzsche PC, Bendtzen K, Skinhoj P, Pedersen BK (1997)** Decreased short-term production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in human immunodeficiency virus-seropositive subjects. *J Infect Dis.* 175(6): 1507-1510

**Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993)** Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol.* 67(6): 3338-3344

**Woitás RP, Rockstroh JK, Beier I, Jung G, Kochan B, Matz B, Brackmann HH, Sauerbruch T, Spengler U (1999)** Antigen-specific cytokine response to hepatitis C virus core epitopes in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 13(11): 1313-1322

**Woitás RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, Spengler U (2002)** HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 8(3): 562-566

## **DANKSAGUNG**

Auf dem langen weiten Weg als „Flüchtling“ von Saigon/Vietnam nach Euskirchen ist am heutigen Tag mit Vollendung der Promotion ein wichtiger Meilenstein in meinem Lebenslauf erreicht.

Mein Dank gilt ALLEN, die mich auf diesem Wege begleitet und unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein verbindlichster Dank Herrn Prof. Dr. med. H. Schwering für die engagierte, umfangreiche und kritische Betreuung bei der Verwirklichung meiner Arbeit. Herrn Dr. med. M. Bothe danke ich herzlichst für die wertvolle Zusammenarbeit.

Meiner Frau, meiner Tochter, meinen Eltern, meinem Bruder sowie meiner Schwägerin und all meinen Freunden danke ich für die moralische und tatkräftige Unterstützung während dieser Zeit.

